



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fakultät für Medizin

Klinik und Poliklinik für Innere Medizin III

Klinikum rechts der Isar

**Aufhebung erworbener Apoptoseresistenz als therapeutischer Ansatz
für Patienten mit Myelodysplastischen Syndromen (MDS) und
Patienten mit sekundärer akuter myeloischer Leukämie (sAML)**

Veronika Dill

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

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Philipp J. Jost
2. Prof. Dr. Florian Bassermann
3. Prof. Dr. Angela Krackhardt

Die Dissertation wurde am 11.10.2018 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 14.08.2019 angenommen.

Diese Dissertation wurde durch ein GMIHO-DGHO-Promotionsstipendium gefördert.



Cancer begins and ends with people. In the midst of scientific abstraction, it is sometimes possible to forget this one basic fact. Doctors treat diseases but they also treat people, and this precondition of their professional existence sometimes pulls them in two directions at once.

(June Goodfield)

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Inhaltsverzeichnis..... | 4 |
| 1 Einleitung | 6 |
| 1.1 Apoptose-Resistenz als Schlüsselmerkmal maligner Zellen und effektiver Therapieansatz | 6 |
| 1.1.1 Caspasen – Schlüsselenzyme der Signalkaskade | 6 |
| 1.1.2 Der extrinsische Apoptose-Signalweg | 7 |
| 1.1.3 Der intrinsische Apoptose-Signalweg | 8 |
| 1.1.4 Die Familie der BCL-2-Proteine | 8 |
| 1.1.5 Die Deregulation der BCL-2-Proteine in malignen Zellen | 10 |
| 1.1.6 Die BH3-mimetische Substanz ABT-737 | 11 |
| 1.1.7 Der selektive BCL-2-Inhibitor ABT-199 | 12 |
| 1.2 Myelodysplastische Syndrome | 13 |
| 1.2.1 Definition und Epidemiologie | 13 |
| 1.2.2 Myelodysplastische Syndrome als Stammzellerkrankungen | 13 |
| 1.2.3 Dysregulierte Apoptose als stadienabhängiges Charakteristikum in MDS 14 | |
| 1.2.4 Diagnose und Stadieneinteilung | 16 |
| 1.2.5 Therapie und klinische Prognose | 19 |
| 1.3 Problemstellung | 20 |
| 2 Material, Methoden und Patienten | 21 |
| 2.1 Material | 21 |
| 2.1.1 Verwendete Software | 21 |
| 2.1.2 Standardgeräte | 21 |
| 2.1.3 Verbrauchsmaterialien..... | 22 |
| 2.1.4 Chemikalien und biogene Substanzen..... | 22 |
| 2.1.5 Standardlösungen | 23 |
| 2.1.6 Puffer | 23 |
| 2.1.7 Zellkulturmedien | 23 |
| 2.1.8 Inhibitoren | 24 |
| 2.1.9 Kits | 24 |
| 2.1.10 Antikörper | 24 |
| 2.2 Methoden | 25 |
| 2.2.1 Patientenproben und Zelllinien | 25 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|--|----|
| 2.2.2 | Zellbiologische Methoden | 26 |
| 2.2.3 | Genexpressionsanalysen | 29 |
| 2.2.4 | Statistische Auswertung | 30 |
| 2.3 | Patientencharakteristika | 31 |
| 3 | Ergebnisse | 34 |
| 3.1 | Apoptose-Induktion durch BCL-2-Inhibitoren in primären humanen Knochenmarkzellen | 34 |
| 3.1.1 | ABT-199 induziert keine Apoptose in primären Knochenmarkzellen gesunder Kontrollpatienten | 34 |
| 3.1.2 | ABT-199 und ABT-737 induzieren schnell und effektiv Apoptose in CD34 ⁺ Knochenmarkzellen von Hochrisiko-MDS/sAML | 36 |
| 3.1.3 | Reaktivierung der Apoptose durch ABT-199 überwindet die Apoptose-Resistenz in „high-risk“-MDS und sAML | 38 |
| 3.1.4 | ABT-737 und ABT-199 induzieren effektiv Zelltod in Vorläuferzellen von Hochrisiko-MDS/sAML und reduzieren deren Koloniebildung | 45 |
| 3.1.5 | Die pro-apoptotische Wirkung von ABT-737 wird durch die protektive Wirkung von Stromazellen nur partiell aufgehoben | 47 |
| 3.2 | Die Ermittlung potenzieller Biomarker für eine Behandlung mit ABT-199 und ABT-737 | 49 |
| 3.2.1 | Die Proteinexpression kritischer BCL-2-Familienmitglieder korreliert mit der Viabilität nach Inhibitor-Behandlung | 49 |
| 3.2.2 | Die Apoptose-Induktion durch ABT-199 in MDS-Progenitorzellen ist unabhängig von prognostisch ungünstigen Mutationen in <i>RUNX1</i> , <i>ASXL1</i> , <i>TP53</i> und <i>EZH2</i> | 53 |
| 4 | Diskussion | 65 |
| 5 | Zusammenfassung | 69 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 70 |
| 7 | Abkürzungsverzeichnis | 78 |
| 8 | Abbildungsverzeichnis | 82 |
| 9 | Tabellenverzeichnis | 83 |
| 10 | Danksagung | 84 |

1 Einleitung

1.1 Apoptose-Resistenz als Schlüsselmerkmal maligner Zellen und effektiver Therapieansatz

Als Apoptose bezeichnet man den programmierten Zelltod. Es handelt sich um einen aktiven zellulären Mechanismus, welcher der Elimination überflüssiger oder geschädigter Zellen dient. Somit ist Apoptose essenziell für die Zellhomöostase (1). Bösartig entartete Zellen besitzen zahlreiche Strategien um den Apoptoseprozess einzuschränken oder zu umgehen um hierdurch einen Überlebensvorteil zu erzielen. Deshalb gilt die Resistenz gegenüber dem programmierten Zelltod als ein Schlüsselmerkmal maligner Zellen (2). Klassische Mechanismen von Tumorzellen sind beispielsweise die Deletion des Tumorsuppressorgens *TP53*, die Überexpression anti-apoptotischer Regulatorproteine (wie BCL-2 und BCL-X_L) oder die gezielte Inaktivierung pro-apoptotischer Proteine (wie BAX, BIM und PUMA) (2, 3). Die fehlregulierte Apoptose ist auch ein zentrales Merkmal der Myelodysplastischen Syndrome (MDS) (4). MDS gehören zu den häufigsten malignen Erkrankungen des älteren Menschen (5). Aufgrund von Alter und Begleiterkrankungen der Patienten sind die Behandlungsoptionen häufig limitiert (6). Neue Therapiestrategien werden dringend benötigt. Diese sollten möglichst selektiv auf die malignen Zellen wirken, um schwerwiegende systemische und hämatologische Nebenwirkungen zu vermeiden. Pro-apoptotische Substanzen wie der BCL-2-selektive Inhibitor ABT-199 können dazu beitragen, die Apoptose-Sensitivität im Hochrisiko-MDS wiederherzustellen und das Gleichgewicht zugunsten des programmierten Zelltodes zu verschieben. Ein gezieltes und stadiengerechtes Eingreifen in die krankheitsspezifischen Pathomechanismen ist eine attraktive Behandlungsoption für dieses Patientenkollektiv.

1.1.1 Caspasen – Schlüsselenzyme der Signalkaskade

Caspasen (Cysteinyln-aspartat-specific Proteases) sind spezifische Proteasen, die eine zentrale exekutive Funktion im Apoptoseprozess einnehmen. Ihre Aktivierung bewirkt den selektiven Abbau zentraler zellulärer Zielproteine. Hierdurch kommt es zu Fragmentierung der DNA, Schrumpfung des Zellkerns und Verlust der Zellform (1). Abhängig von ihrer Substratpräferenz werden sie in Initiator-Caspasen (Caspase-8, -9 und -10) und Effektor-Caspasen (Caspase-2, -3, -6 und -7) unterteilt. Caspasen werden als enzymatisch inaktive Vorstufen, sogenannte Pro-Caspasen, synthetisiert und im Verlauf

der Apoptose aktiviert (1). Hierfür werden bei den Initiator-Caspasen zwei Mechanismen beschrieben. Liegt eine hohe lokale Konzentration von Pro-Caspase-8 vor, ist die intrinsische Protease-Aktivität des Zymogens ausreichend, um sich zwischen seinen einzelnen Domänen zu spalten und sich somit selbst zu aktivieren (1). Caspase-9 benötigt für ihre Aktivierung die Proteininteraktion mit APAF-1 (Apoptotic Protease-activating Factor 1). Gemeinsam mit dem mitochondrialen Cytochrom c bilden sie das sogenannte Apoptosom, ein Holoenzym, das Caspase-3 spaltet. Die Effektor-Caspasen werden mittels proteolytischer Spaltung durch eine vorgeschaltete Caspase aktiviert (1). Caspasen können über zwei unterschiedliche Apoptose-Signalwege aktiviert werden, die verschiedene Initiator-Caspasen erfordern und auf Ebene der Effektor-Caspasen zusammenführen. Man unterscheidet einen intrinsischen und einen extrinsischen Apoptose-Signalweg, die im Folgenden beschrieben werden (7).

1.1.2 Der extrinsische Apoptose-Signalweg

Der extrinsische oder rezeptorvermittelte Apoptose-Signalweg wird durch die Bindung spezifischer Liganden an Todesrezeptoren der TNF-R (Tumor Necrosis Factor Receptor)-Superfamilie ausgelöst. Diese Rezeptoren sind an der Plasmamembran lokalisiert und besitzen extrazelluläre Cystein-reiche Domänen zur Ligandenbindung sowie eine zytoplasmatische Todesdomäne. Diese „Death Domain“ (DD) überführt das Todessignal von der Zelloberfläche in intrazelluläre Signalwege (3). Wichtige Todesrezeptoren sind CD95 (APO-1/Fas), TNFR1 (TNF Receptor 1), TRAIL-R1 (TNF-related Apoptosis-inducing Ligand Receptor 1) und TRAIL-R2 (TNF-related Apoptosis-inducing Ligand Receptor 2). Zu den korrespondierenden Liganden zählen CD95L (CD95 Ligand), TNF- α (Tumor Necrosis Factor) und TRAIL (TNF-related Apoptosis-inducing Ligand) (3). Die Bindung eines Liganden an den entsprechenden Rezeptor bewirkt dessen Trimerisierung sowie die Rekrutierung von zytoplasmatischen Adapterproteinen an die Todesdomäne. Gemeinsam bilden der aktivierte Rezeptor, Adapterproteine wie FADD (Fas associated Death Domain) und Caspase-8 den zytosolischen Signaltransduktionskomplex „DISC“ (Death-inducing signaling Complex) (3). Dies führt zur autokatalytischen Spaltung von Caspase-8 und zur konsekutiven Aktivierung der Effektor-Caspasen. Caspase-8 kann durch proteolytische Spaltung des BCL-2-Proteins BID auch den mitochondrialen Apoptose-Signalweg aktivieren. Hierdurch wird das Apoptose-signal verstärkt (3).

1.1.3 Der intrinsische Apoptose-Signalweg

Der intrinsische oder mitochondriale Apoptose-Signalweg wird durch zellinterne Stresssignale wie DNA-Schäden, Hypoxie oder Zytokin-Mangel ausgelöst (3). Die BCL-2-Proteinfamilie funktioniert als Schaltzentrale, die diverse inter- und intrazelluläre Signale integriert und bestimmt, ob der intrinsische Apoptose-Signalweg aktiviert wird oder nicht. Dies geschieht über die Interaktionen zwischen anti-apoptotischen und pro-apoptotischen BCL-2-Proteinen (8). Normalerweise befinden sich diese in einem Gleichgewichtszustand (9). Überwiegt das pro-apoptotische Signal, bewirken pro-apoptotische Effektorproteine wie BAX und BAK die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (9). Dadurch gelangen mitochondriale Proteine wie Cytochrom c, SMAC/DIABLO, OMI/HTRA2 und Endonuklease G ins Zytosol (3). Cytochrom c kann an die C-terminale Region von APAF-1 binden, einem zytosolischen Protein mit der N-terminalen Caspase-Rekrutierungsdomäne „CARD“ (Caspase Recruitment Domain). Hierdurch oligomerisiert diese und rekrutiert konsekutiv die Initiator-Caspase-9 (3). Dieses Holoenzym, Apoptosom genannt, aktiviert die Effektor-Caspase-3, die eine zentrale Funktion im Apoptoseprozess einnimmt. SMAC/DIABLO und OMI/HTRA2 wirken Apoptose-fördernd, indem sie IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein)-Proteine neutralisieren (3). Dies sind endogene Caspasen-Inhibitoren, welche die Caspasen-Funktion mit ihrer BIR (Baculoviral IAP Repeat)-Domäne beeinträchtigen. Sie stellen einen essenziellen zellulären Kontrollmechanismus dar, um den Zelltod durch eine zufällige Caspasen-Aktivierung zu verhindern. Somit liegt ein dynamisches Gleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptotischen Effektormolekülen vor, das die apoptotische Signaltransduktion streng reguliert (3).

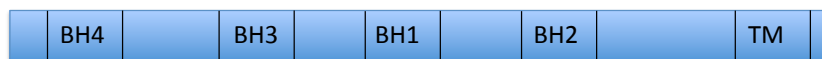
1.1.4 Die Familie der BCL-2-Proteine

Die Steuerung des intrinsischen Apoptose-Signalweges erfolgt über die Familie der BCL-2 (B-Cell Lymphoma 2)-Proteine. Ihre Mitglieder können in eine pro- und in eine anti-apoptotische Fraktion unterteilt werden. Die Interaktion der pro- und anti-apoptotischen Proteine reguliert die Aktivierung der Caspasen und vermittelt somit die Entscheidung, ob eine Zelle überlebt oder den Apoptoseprozess durchläuft (9). Charakteristischerweise besitzen die BCL-2 Proteine mindestens eine BCL-2-Homology (BH)-Domäne und werden anhand ihrer Funktionalität und Struktur in drei Subgruppen eingeteilt (Abbildung 1). Anti-apoptotische Proteine wie BCL-2, BCL-X_L, BCL-W, MCL-1 (Myeloid Cell Leukemia Sequence 1) und A1 unterdrücken den pro-

grammierten Zelltod (9). Ihre dreidimensionale Struktur ist ein kugelförmiges Bündel aus fünf amphiphatischen α -Helices, die um zwei zentrale hydrophobe α -Helices angeordnet sind. Die Reste der Domänen BH1, BH2 und BH3 bilden die Rezeptor-Domäne, eine hydrophobe Bindungsfurche, die mit den BH3-Domänen (Liganden-Domänen) pro-apoptotischer BCL-2 Proteine interagieren kann (9). Über ihre hydrophobe carboxyterminale Transmembrandomäne (TM) erfolgt die Bindung an Zellorganellen, z.B. an die äußere Mitochondrienmembran. BCL-2 ist ein integrales Membranprotein, während sich BCL-X_L und BCL-W nur nach Eingang eines zytotoxischen Signals mit der Membran assoziieren. Den anti-apoptotischen Proteinen stehen die Apoptose-fördernden Proteine gegenüber, die man zwei unterschiedlichen Fraktionen zuordnen kann. Die pro-apoptotischen Effektor-proteine BAX (BCL-2-associated X Protein), BAK (BCL-2 Antagonist/Killer) und BOK (BCL-2-related ovarian Killer Protein) sind BCL-2 strukturell ähnlich, insbesondere in ihren drei BH-Regionen (BH1-BH3) (8). BAK ist ein integrales Membranprotein der äußeren Mitochondrienmembran, wohingegen BAX als Monomer im Zytosol vorliegt und sich nur temporär an die Membran verlagert. Als Antwort auf ein zytotoxisches Signal verändern die Proteine ihre Konformation und bilden membranassoziierte Homo-Oligomere. Diese permeabilisieren die äußere Mitochondrienmembran, woraufhin mitochondriale Proteine ins Zytosol freigesetzt werden und die Caspasen-Kaskade aktiviert wird (8). Zu den BH3-only-Proteinen zählen BID (BH3-interacting Domain Death Antagonist), BIK (BCL-2-interacting Killer), BAD (BCL-2 Antagonist of Cell Death), BIM (BCL-2-interacting Mediator of Cell Death), BMF (BCL-2-modifying Factor), HRK (Harakiri), NOXA und PUMA (P53 upregulated Modulator of Apoptosis). Sie besitzen strukturell nur die namensgebende BH3-Domäne, die den Zelltod-fördernden Effekt vermittelt, und in einigen Fällen auch eine Transmembrandomäne. Über ihre amphiphatische α -Helix binden sie an die hydrophobe Bindungstasche der anti-apoptotischen BCL-2-Proteine. Im Normalfall sind die Effektorproteine BAX und BAK durch Apoptose-hemmende Proteine gebunden und damit neutralisiert (8). Erhöht sich der Spiegel von BH3-only-Proteinen, verdrängen sie BAX und BAK kompetitiv aus diesen Bindungen. Daraufhin bewirken die freien pro-apoptotischen Effektor-proteine die Porenbildung in der äußeren Mitochondrienmembran. Während die BH3-only-Proteine BIM, tBID (Truncated BID) und PUMA alle anti-apoptotischen Proteine neutralisieren können, bindet BAD selektiv an BCL-2, BCL-X_L und BCL-W und NOXA spezifisch an MCL-1 und A1. Außerdem gibt Hinweise darauf, dass BH3-only-Proteine BAX und BAK auch direkt aktivieren können (10).

Anti-apoptotische BCL-2-Proteine:

BCL-2-Familie: BCL-2, BCL-X_L, A1, BCL-W, MCL-1



Pro-apoptotische BCL-2-Proteine:

BAX-Familie: BAX, BAK, BOK



BH3-only-Familie: BIM, BID, BIK, BAD, BMF, HRK, NOXA, PUMA



Abbildung 1: Die BCL-2-Familie als Gruppe pro- und anti-apoptotischer Proteine. Die BCL-2-Proteine bestehen aus anti-apoptotischen (blau) und pro-apoptotischen Proteinen (grün und rot). Neben dieser funktionellen Einteilung kann eine strukturelle Unterteilung anhand der vorliegenden BH3-Domänen (BH1-BH4) vorgenommen werden. Anti-apoptotische BCL-2-Proteine (BCL-2, BCL-X_L, BCL-W, A1 und MCL1) besitzen vier BH-Domänen. Die Domänen BH1, BH2 und BH2 bilden eine hydrophobe Tasche, über welche die Bindung an BH3-only-Proteine erfolgt. Die pro-apoptotischen Effektorproteine BAK, BAX und BOK besitzen ebenfalls mehrere BH-Domänen (BH1-BH3). Die BH3-only-Proteine (BIM, BID, BIK, BAD, BMF, HRK, NOXA, PUMA) weisen nur die BH3-Domäne auf, mithilfe derer sie anti-apoptotische BCL-2-Proteine neutralisieren. Viele BCL-2-Proteine besitzen zusätzlich eine carboxy-terminale hydrophobe Transmembrandomäne (TM), welche die Assoziation mit intrazellulären Membranen vermittelt.

1.1.5 Die Deregulation der BCL-2-Proteine in malignen Zellen

In der Mehrzahl der malignen Zellen liegt eine Störung des Apoptoseprogrammes vor (9). Tumorzellen entwickeln eine Vielzahl von Strategien um den programmierten Zelltod einzuschränken oder gänzlich zu umgehen. Dabei kann Apoptose-Resistenz durch Überexpression anti-apoptotischer BCL-2-Proteine sowie durch gezielte Inaktivierung pro-apoptotischer BCL-2-Proteine erreicht werden (2). Anti-apoptotische BCL-2-Proteine nehmen in diesem Kontext eine Funktion als Onkogene ein (9). So findet sich bei Patienten mit Follikulärem Lymphom in etwa 90% der Fälle eine Überexpression von BCL-2 als Resultat der chromosomalen Translokation t(14;18) (10). Im Mausmodell fördert die Überexpression von BCL-2 die neoplastische Transformation von B- und T-Lymphozyten sowie myeloischen Zellen, insbesondere bei Co-Expression von MYC (11). In Tumorzellen wirken also Mutationen, die Proliferation fördern, synergistisch mit Mutationen, die Apoptose einschränken. Außerdem vermitteln BCL-2-Proteine die Sensitivität einer Zelle gegenüber einer zytoreduktiven Therapie, da zahlreiche Zytostatika den mitochondrialen Apoptose-Signalweg induzieren. So wurden Tumorzellen durch Überexpression von BCL-2 *in vivo* und *in vitro* refraktär gegenüber Chemotherapie und Bestrahlung (9). Eine fehlregulierte Apoptose mit erhöhter Expression anti-apoptotischer BCL-2-Proteine liegt auch in CD34⁺ Knochenmarkszellen von MDS-

Patienten der Hochrisikogruppe vor (12). Pro-apoptotische BCL-2-Proteine hingegen wirken als Tumorsuppressoren, die in soliden und hämatologischen Tumorzellen gezielt deaktiviert werden. Dies betrifft unter anderem BAX und BAK in Leukämien und im Kolonkarzinom (9).

1.1.6 Die BH3-mimetische Substanz ABT-737

Das deregulierte Gleichgewicht pro- und anti-apoptotischer Proteine kann als Ansatzpunkt für zielgerichtete Therapiestrategien genutzt werden. Niedermolekulare Inhibitoren hemmen anti-apoptotische Proteine und verschieben das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptotischen Proteinen zugunsten des programmierten Zelltods. Durch die strukturelle Ähnlichkeit der Inhibitoren mit der BH3-Domäne der BH3-only-Proteine ahmen sie deren Funktion nach. Mittels NMR (Nuclear magnetic Resonance)-Technologie und strukturbasiertem Design entwickelten Oltsdorf *et al.* die BH3-mimetische Substanz ABT-737 (13). Diese bindet mit hoher Affinität ($K_i \leq 1$ nM) an die anti-apoptotischen Proteine BCL-2, BCL-X_L und BCL-W, aber nur äußerst schwach an MCL-1 und A1 (13, 14). Somit ähnelt das Bindungsspektrum von ABT-737 dem BH3-only-Protein BAD. In präklinischen Untersuchungen erwies sich ABT-737 als besonders wirksam in Zelllinien und primären Zellen von B-CLL (Chronische Lymphatische Leukämie) und Follikulärem Lymphom. Dabei war die Konzentration 1 μ M eine Standarddosis für Versuche *in vitro*. Auch in Zelllinien ($EC_{50} < 1$ μ M) und einem Xenograft-Modell des kleinzelligen Bronchialkarzinoms (SCLC) induzierte ABT-737 effektiv Apoptose (13). In AML-Zelllinien variierten die IC_{50} -Werte des Inhibitors zwischen 50 nM und 5000 nM. Primäre AML-Stammzellen reagierten bereits sensitiv auf eine Inhibitor-Dosis von 100 nM. Dabei zeigten Konopleva *et al.* erstmals, dass eine erhöhte Expression des anti-apoptotischen Proteins MCL-1 ein essenzieller Resistenzfaktor für eine Behandlung mit ABT-737 ist (15). ABT-263 (Navitoclax) besitzt ein vergleichbares Proteinbindungsprofil wie ABT-737 bei einer verbesserten Bioverfügbarkeit. In einer klinischen Phase-I-Studie mit 29 Patienten mit refraktärer/rezidivierender CLL erzielte die Substanz bei 35% der Patienten eine partielle Remission. Die häufigste unerwünschte Nebenwirkung der Therapie war eine schwere, dosisabhängige Thrombozytopenie. Sie beruht auf der Inhibition des anti-apoptotischen Proteins BCL-X_L, einem wichtigen Überlebensfaktor für Thrombozyten. Dabei korrelierte die MCL-1-Expression in CLL-Zellen mit Therapieresistenz, die BIM-Expression mit Sensitivität gegenüber Navitoclax (16). In einer weiteren Eskalationsstudie mit 53 Patienten mit therapierefraktären lymphatischen Malignomen erzielten 10 Patienten eine partielle

Remission. Der größte Erfolg zeigte sich in der Gruppe der CLL-Patienten, in der sich die Tumorzelllast bei allen sieben Patienten um mindestens die Hälfte reduzierte. Bei den dosislimitierenden Ereignissen dominierte abermals die akute Thrombozytopenie (17). Bedenken gegenüber dem gehäuften Auftreten dieser spezifischen Nebenwirkung veranlassten das Unternehmen AbbVie, klinische Studien mit ABT-263 nicht weiter zu verfolgen.

1.1.7 Der selektive BCL-2-Inhibitor ABT-199

Durch Veränderung der molekularen Struktur von Navitoclax entstand der BCL-2-selektive Inhibitor ABT-199 (Venetoclax). Diese Substanz besitzt eine subnanomolare Affinität für BCL-2 ($K_i < 0.010$ nM) sowie ein deutlich geringeres Bindungspotenzial für BCL-X_L ($K_i = 48$ nM), BCL-W ($K_i = 245$ nM) und MCL-1 ($K_i > 444$ nM) (18). Die dosislimitierende Thrombozytopenie von Navitoclax konnte so verhindert werden. ABT-199 erwies sich als sehr effektiv in primären CLL-Zellen *in vitro* ($EC_{50} = 0.003$ μ M) (18). Außerdem induzierte ABT-199 effektiv Apoptose in AML-Zelllinien und einem AML-Xenograft-Modell. Die Wirkung auf primäre AML-Proben war mit IC_{50} -Werten von 0.43 bis über 1000 nM individuell sehr unterschiedlich ausgeprägt. Dabei korrelierte die BCL-2-Expression der Zellen positiv mit Sensitivität gegenüber ABT-199, während für die BCL-X_L-Expression eine inverse Korrelation vorlag. Das Ausschalten von MCL-1 erhöhte die Sensitivität von AML-Zelllinien für ABT-199. Eine Analyse der Proteinexpression von 577 AML-Patienten ergab ein heterogenes Expressionsmuster anti-apoptotischer BCL-2-Proteine innerhalb einer FAB-Gruppe (19). Wenn man den Effekt der Einzelsubstanzen ABT-199 und ABT-737 direkt miteinander vergleicht, können aufgrund des unterschiedlichen Proteinbindungsspektrums auch funktionelle Rückschlüsse auf die Abhängigkeit der Zellen von bestimmten BCL-2-Proteinen gezogen werden. Sowohl ABT-737 als auch ABT-199 verstärkten den Effekt von Azacitidin in AML-Zelllinien. Hierfür wurden für ABT-199 höhere Konzentrationen benötigt. Auch als Monotherapie war ABT-737 ($EC_{50} = 0.14$ mM) effektiver als ABT-199 ($EC_{50} = 4.3$ mM) (19). Bei einer Kohorte von drei Patienten mit refraktärer CLL führte ABT-199 in einer Einzeldosis von 100 mg oder 200 mg innerhalb von 24 Stunden zu einer Reduktion der Lymphadenopathie und einer 95%-Reduktion der Lymphozytose im peripheren Blut. Hier bestätigte sich, dass ABT-199 in geringerem Ausmaß Thrombozytopenien verursacht als Navitoclax (18). In Patienten mit rezidivierter oder refraktärer CLL, die mit einem Inhibitor des BCR (B-Cell Receptor)-Signalübertragungswegs vorbehandelt waren und eine del(17p13) bzw. eine TP53-Mutation aufwies-

sen, erzielte Venetoclax als Monotherapie eine Remissionsrate von 79% (20). Aufgrund dieser vielversprechenden Daten ist Venetoclax seit Dezember 2016 von der Europäischen Kommission als Monotherapie für dieses Patientenkollektiv zugelassen. Außerdem wird Venetoclax als Monotherapie eingesetzt bei rezidivierender/refraktärer CLL ohne del(17p13) bzw. *TP53*-Mutation nach Therapieversagen einer Chemoimmuntherapie und einem Inhibitor des BCR-Signalübertragungswegs (21).

1.2 Myelodysplastische Syndrome

1.2.1 Definition und Epidemiologie

Myelodysplastische Syndrome (MDS) sind klonale Erkrankungen der hämatopoetischen Stammzelle. Sie sind durch Knochenmarkinsuffizienz, Dysplasiezeichen in mindestens einer hämatopoetischen Zellreihe und die Tendenz zur Entwicklung einer sekundären akuten myeloischen Leukämie (sAML) gekennzeichnet (5). Leitbefund der Erkrankung ist meist eine Anämie, oft auch eine Bi- oder Panzytopenie (22). Das Knochenmark ist häufig normo- oder hyperzellulär, in der Minderzahl der Fälle auch hypozellulär (5). Die Inzidenz beträgt 4-5/100.000 Einwohner und steigt bei der Bevölkerung der über 70-Jährigen auf über 30/100.000 an (23). Damit zählen MDS zu den häufigsten malignen Erkrankungen des älteren Menschen (4, 5, 24). Das mediane Alter bei Diagnosestellung beträgt ca. 75 Jahre (23). Frauen erkranken etwas seltener an MDS als gleichaltrige Männer. Viele Patienten versterben an den Komplikationen der progressiven Zytopenien, wie z.B. Infektionen, oder am Übergang der Erkrankung in eine sAML (25).

1.2.2 Myelodysplastische Syndrome als Stammzellerkrankungen

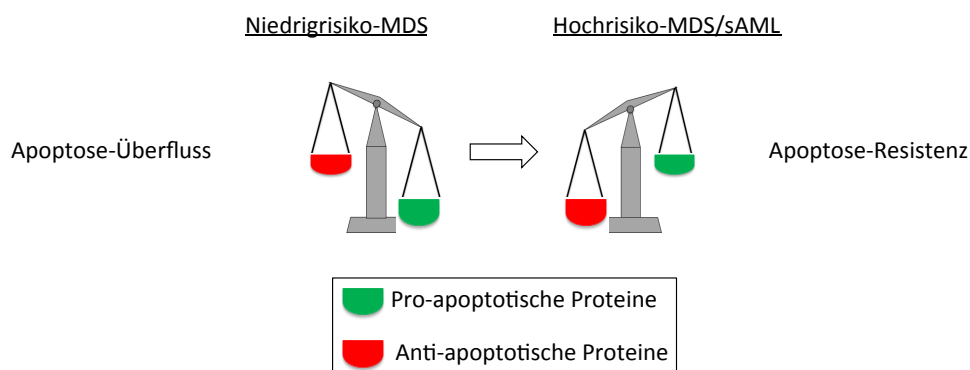
Ursprung der Erkrankung ist die maligne Transformation einer hämatopoetischen Stammzelle. Durch genetische oder epigenetische Veränderungen erhält sie einen Wachstumsvorteil gegenüber den normalen Stammzellen (26, 27). Das Modell der klonalen Evolution beschreibt komplexe genetische Interaktionen, die kritische Schritte während der Krankheitsprogression definieren (28). Zusätzliche Veränderungen der mesenchymalen Stromazellen, die Fehlregulation der Immunantwort in regulatorischen T-Zellen und die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine wirken sich außerdem negativ auf die gesunde Resthämatopoese aus (5). Im Gegensatz zu anderen malignen Knochenmarkerkrankungen behalten die klonalen MDS-Zellen zunächst ihre Fähigkeit zur Differenzierung (4). Mit Fortschreiten der Erkrankung steigt die Anzahl an zytogenetischen und molekulargenetischen Aberrationen (5). Weitere Mutationen der gene-

tisch instabilen Stammzelle begünstigen die Expansion des malignen Klons und fördern den Übergang in eine sAML (22). Mit diesem Schritt verlieren die Knochenmarkszellen ihre Fähigkeit zur Differenzierung und Apoptose (4). Die meisten MDS-Fälle sind klonal heterogen und besitzen einen begründenden Klon und mehrere Subklone (29). Der Hauptklon einer späteren sAML ist oft schon als kleinerer Subklon im MDS-Stadium nachweisbar (30). Das Modell der genetischen Prädestination besagt, dass frühe Driver-Mutationen den künftigen Krankheitsverlauf mit einem bestimmten klinischen Phänotyp vorschreiben. Frühe molekulargenetische Veränderungen betreffen häufig das Spliceosom (*SF3B1*, Splicing Factor 3B Subunit 1), später auch die epigenetische Regulation (*TET2*, Tet Methylcytosine Dioxygenase 2; *ASXL1*, Additional Sex Combs-like 1; *EZH2*, Enhancer of Zeste Homologue 2) und Transkriptionsfaktoren (*RUNX1*, Runt-related Transcription Factor 1). In fortgeschrittenen Krankheitsstadien treten oft Mutationen der Tumorsuppressorgene (*TP53*) oder Kinasen (*NRAS*) auf (28). Mutationen können dem dominanten Klon, wenn sie in der Mehrzahl der Tumorzellen vorhanden sind, oder einem kleineren Subklon zugeordnet werden. Dabei haben onkogene Driver-Mutationen, egal ob sie klonal oder subklonal auftreten, eine negative prognostische Bedeutung für das leukämiefreie Überleben (28). Zudem sind somatische Mutationen wie *TP53*, *EZH2*, *RUNX1* oder *ASXL1* ein unabhängiger Prädiktor für ein schlechtes Gesamtüberleben der MDS-Patienten (31). Inwiefern der Mutationsstatus der Patienten auch ihr Therapieansprechen beeinflusst, ist hingegen noch nicht restlos verstanden. Patienten mit Mutationen in *ASXL1* oder *TP53* hatten ein reduziertes Gesamtüberleben unter Standardtherapie mit hypomethylierenden Substanzen (32, 33). Müller-Thomas *et al.* zeigten ein schlechteres Gesamtüberleben von MDS-Patienten mit *TP53*-Mutation, obwohl diese ebenso auf eine hypomethylierende Therapie ansprachen wie Patienten ohne Mutation (34). Der Zusammenhang zwischen Mutationsstatus und Therapieansprechen von MDS-Patienten ist also noch genauer zu erforschen. Dies gilt insbesondere für eine Therapie mit pro-apoptotischen Substanzen. Vielversprechende Daten von CLL-Patienten legen nahe, dass der zytotoxische Effekt von ABT-199 *in vitro* und *in vivo* unabhängig vom Vorliegen einer *TP53*-Mutation ist (35, 36).

1.2.3 Dysregulierte Apoptose als stadienabhängiges Charakteristikum in MDS

Fehlregulierte Apoptose ist ein zentrales Merkmal im Knochenmark von MDS-Patienten. Dabei variiert das Ausmaß an Apoptose zwischen den einzelnen Risikogruppen. Verglichen mit gesundem Knochenmark ist die Apoptose-Rate in frühen Krank-

heitsstadien wie RARS (Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten) erhöht (12, 37). Dies kann den charakteristischen Befund eines meist normo- oder hyperzellulären Knochenmarks bei gleichzeitigem Vorliegen von Zytopenien im peripheren Blut erklären (38). In hämatopoetischen Zellen von Patienten mit Niedrigrisiko-MDS sind der extrinsische und intrinsische Apoptose-Signalweg verstärkt aktiv. Dies zeigt sich an der Überexpression von CD95- und TRAIL-Rezeptoren sowie deren Liganden. Als Ursache werden die Produktion von TNF- α durch Makrophagen, Stromazellen oder T-Zellen diskutiert (5). Außerdem zeigt sich eine erhöhte Expression der Initiator-Caspase-9 (5). Bei Progression der Erkrankung zu RAEB (Refraktäre Anämie mit Blastenexzess) sinkt die Apoptose-Rate in CD34⁺ Zellen. So ist in RAEB die Expression von CD95L und pro-apoptotischen BCL-2-Proteinen im Vergleich zu RARS vermindert (5). Die zunehmende Apoptose-Resistenz im Knochenmark von RAEB und sAML zeigt sich auch an der erhöhten Expression anti-apoptotischer Proteine (39). Während das Verhältnis von pro-apoptotischen Proteinen (BAX, BAD) zu anti-apoptotischen Proteinen (BCL-2, BCL-X) in RARS erhöht war, änderte sich dieses Verhältnis in RAEB durch die relative Zunahme der BCL-2-Expression und Abnahme der BAD-Expression (12). In fortgeschrittenen MDS-Stadien erhöhen erworbene Apoptose-Defekte in Verbindung mit verstärkter Proliferation das Risiko einer leukämischen Transformation. Die Resistenz gegenüber der mitochondrialen Apoptose bietet zudem eine mögliche Erklärung für das geringe Ansprechen dieser Patienten auf konventionelle Chemotherapie (5).



- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • Hyperzellularität im Knochenmark • Panzytopenie im peripheren Blut | <ul style="list-style-type: none"> • Akkumulation von Blasten • Resistenz gegenüber konventioneller Chemotherapie |
|---|---|

Abbildung 2: Die stadienabhängige Fehlregulation der Apoptose im Knochenmark von MDS-Patienten. In Knochenmarkszellen von Patienten mit Niedrigrisiko-MDS findet verstärkt Apoptose statt. Die Expression pro-apoptotischer BCL-2-Proteine ist im Vergleich zu anti-apoptotischen BCL-2-Proteinen erhöht. Mit Fortschreiten der Erkrankung zu Hochrisiko-MDS kehrt sich dieses Verhältnis um. Hier lässt sich eine zunehmende Apoptose-Resistenz mit relativem Überwiegen der anti-apoptotischen Proteinfraktion feststellen. Bei sAML liegt eine unkontrollierte Proliferation von Blasten bei gleichzeitigem Differenzierungsblock vor.

1.2.4 Diagnose und Stadieneinteilung

Klinische Leitsymptome von MDS-Patienten sind meist Anämie, Infektanfälligkeit und Blutungskomplikationen bei Thrombozytopenie (5). Die Diagnose eines MDS wird anhand typischer Veränderungen in Blutbild, Differentialblutbild und Knochenmark gestellt. Im Mittelpunkt der Diagnostik steht der zytomorphologische Knochenmarkbefund. Zur Diagnosestellung eines MDS müssen mindestens 10% der Zellen einer Zellreihe Dysplasien aufweisen (22). Obligat ist die Bestimmung der Anzahl an dysplastischen Zellreihen und des medullären Blastenanteils. Diese Parameter gehen in die WHO (World Health Organization)-Klassifikation (2008) ein (Tabelle 1) (40). Bei einem Blastenanteil von $\geq 20\%$ in Blut und Knochenmark spricht man gemäß WHO-Klassifikation von einer sAML.

| MDS-Subtyp | Blutbildkriterien | Knochenmarkkriterien |
|---|--|--|
| Refraktäre Zytopenie mit unilineärer Dysplasie (RCUD) a) Refraktäre Anämie (RA) b) Refraktäre Neutropenie (RN) c) Refraktäre Thrombopenie (RT) | Uni- oder Bizytopenie, <1% Blasten | Unilineäre Dysplasie bei $\geq 10\%$ der Zellen einer Reihe, <5% Blasten, <15% Ringsideroblasten |
| Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten (RARS) | Anämie, keine Blasten | Dyserythropoese, <5% Blasten, $\geq 15\%$ Ringsideroblasten |
| Refraktäre Zytopenie mit multilineärer Dysplasie (RCMD) | Zytopenie(n), <1% Blasten, Monozyten <1000/ μ l | Dysplasie bei $\geq 10\%$ der Zellen von 2-3 Zellreihen, <5% Blasten |
| MDS mit isolierter del(5q) | Anämie, oft Thrombozytose, <1% Blasten | Normale/vermehrte Megakaryozyten, isolierte del(5q) |
| Refraktäre Anämie mit Blastenvermehrung (RAEB-1) | Zytopenie(n), <5% Blasten <1000/ μ l Monozyten, keine Auerstäbchen | Uni- oder multilineäre Dysplasie, 5-9% Blasten, keine Auerstäbchen |
| Refraktäre Anämie mit Blastenvermehrung (RAEB-2) | Zytopenie(n), 5-19% Blasten, <1000/ μ l Monozyten, \pm Auerstäbchen | Uni- oder multilineäre Dysplasie, 10-19% Blasten, \pm Auerstäbchen |
| Unklassifizierte MDS (MDS-U) | Zytopenien, <1% Blasten | Dysplasien bei $\leq 10\%$ der Zellen, MDS-typische Zytogenetik, <5% Blasten |

Tabelle 1: WHO-Klassifikation Myelodysplastischer Syndrome (2008) (40).

Zytogenetische Veränderungen sind im MDS prognostisch entscheidend (41-43). Deshalb ist eine Chromosomenanalyse des Knochenmarkes obligat. Etwa 40% der Patienten weisen einen normalen Karyotyp mit einer günstigen Prognose auf. Bei der Mehrzahl der Patienten sind zytogenetische Aberrationen vorhanden, die mit charakte-

ristischen klinischen Verläufen einhergehen (41). So besitzen Patienten mit isolierter del(5q) einen vergleichsweise indolenten klinischen Verlauf (41). Anomalien des Chromosoms 7 hingegen werden als prognostisch ungünstig gewertet. Etwa 10-15% der MDS-Patienten weisen einen komplexen Karyotyp mit mindestens drei chromosomalen Veränderungen und schlechter Prognose auf (41). Es stehen mehrere validierte Risikoklassifikationen zur Prognoseabschätzung zur Verfügung. Dazu zählen IPSS (International Prognostic Scoring System) (41), IPSS-R (International Prognostic Scoring System-Revised) (43) und r-WPSS (Revised WHO Prognostic Scoring System) (44). Im IPSS werden der Karyotyp, der Prozentsatz medullärer Blasten und die Anzahl der Zytopenien berücksichtigt (Tabelle 2). Die Definition einer sAML erfolgt bei einer Blastenzahl von 30%. Bei Patienten der IPSS-Kategorien „intermediate-risk 1“ oder „low-risk“ beträgt die mediane Überlebenswahrscheinlichkeit drei bis fünf Jahre, bei Patienten mit „intermediate-risk 2“ oder „high-risk“ lediglich ein bis zwei Jahre (41).

| Punktwerte | | | | | |
|--|-----------------|-------------|----------|-------|-------|
| | 0 | 0.5 | 1 | 1.5 | 2 |
| Medulläre Blasten (%) | <5 | 5-10 | - | 11-20 | 21-30 |
| Karyotyp* | günstig | intermediär | schlecht | - | - |
| Zahl der Zytopenien** | 0/1 | 2/3 | - | - | - |
| Risikogruppe | Gesamtpunktzahl | | | | |
| Low-risk | 0 | | | | |
| Intermediate-risk 1 | 0.5-1 | | | | |
| Intermediate-risk 2 | 1.5-2 | | | | |
| High-risk | ≥2.5 | | | | |
| *günstig: normal, -Y, del(5q), del(20q); schlecht: komplex (≥ 3 Anomalien) oder Chromosom 7-Anomalien; intermediär: alle anderen | | | | | |
| **Hämoglobin <10 g/dl, Neutrophile <1,8 /nl, Thrombozyten <100 /nl | | | | | |

Tabelle 2: Definition des IPSS nach Greenberg *et al.* (1997) (41).

Dem r-WPSS (Tabelle 3) liegt die zytomorphologische WHO-Klassifikation (2008) zugrunde. Zudem sind die Zytogenetik und der Schweregrad der Anämie enthalten.

| Punktwerte | | | | | |
|--|-----------------|---------------|----------|--------|--|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | |
| WHO Subtyp | RA, RARS, 5q- | RCMD, RCMD-RS | RAEB-1 | RAEB-2 | |
| Karyotyp* | günstig | intermediär | schlecht | - | |
| Schwere Anämie** | nicht vorhanden | vorhanden | - | - | |
| Risikogruppe | Gesamtpunktzahl | | | | |
| Very low-risk | 0 | | | | |
| Low-risk | 1 | | | | |
| Intermediate-risk | 2 | | | | |
| High-risk | 3-4 | | | | |
| Very high-risk | 5-6 | | | | |
| *günstig: normal, -Y, del(5q), del(20q); schlecht: komplex (≥ 3 Anomalien) oder Chromosom 7-Anomalien; intermediär: alle anderen | | | | | |
| **Hämoglobin <9 g/dL bei Männern oder <8 g/dL bei Frauen | | | | | |

Tabelle 3: Definition des r-WPSS (44).

Aufgrund der großen Heterogenität chromosomaler Anomalien in MDS wurde die zytogenetische Klassifikation durch Schanz *et al.* überarbeitet und erweitert (42). Diese zytogenetische Einteilung (Tabelle 4) wurde bei der Revision des IPSS verwendet und ist Teil des aktuellen IPSS-R. Zudem wurde im IPSS-R bei medullärer Blastenzahl und Blutbild genauer differenziert (43).

| Risikogruppe | Karyotyp | Medianes Überleben (Jahre) |
|---------------|---|----------------------------|
| Sehr günstig | -Y, del(11q) | 5.4 |
| Günstig | normal, del(5q), del(12p), del(20q), Doppelanomalie mit del(5q) | 4.8 |
| Intermediär | del(7q), +8, +19, i(17q), jede andere Einzel- oder Doppelanomalie | 2.7 |
| Schlecht | -7, 3q-Anomalie, Doppelanomalie mit -7/del(7q), komplex mit 3 Anomalien | 1.5 |
| Sehr schlecht | komplex mit >3 Aberrationen | 0.7 |

Tabelle 4: Zytogenetische Risikogruppen nach Schanz *et al.* (2012) (42) und Greenberg *et al.* (2012) (43).

1.2.5 Therapie und klinische Prognose

Die Therapie eines MDS erfolgt in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium bzw. der Risikogruppe. Unter Berücksichtigung von Alter und Begleiterkrankungen ist bei vielen MDS-Patienten der Niedrigrisikogruppe eine „watch and wait“-Strategie ausreichend. Supportive Therapieformen umfassen Transfusionen und die bedarfsweise Gabe von Antibiotika. Als spezifische Behandlung ist Lenalidomid für Patienten der IPSS-Kategorien „low-risk“ und „intermediate-risk 1“ mit isolierter del(5q) zugelassen. Die Substanz wirkt u.a. über die Inhibition von TNF- α , die Aktivierung von T- und NK (Natural Killer)-Zellen und besitzt auch direkte pro-apoptotische Effekte (45). Durch eine Therapie mit Lenalidomid erreichen ca. 60% der Patienten Transfusionsfreiheit und etwa 70% der Patienten ein zytogenetisches Ansprechen (46). MDS-Patienten der Hochrisikogruppe besitzen eine extrem ungünstige Prognose. Bis zum Übergang in eine sAML vergehen häufig weniger als 1,5 Jahre (25). Bei Patienten der Hochrisikogruppe sollte die Möglichkeit einer allogenen Stammzelltransplantation geprüft werden. Dies ist das einzige potenziell kurative Therapieverfahren, das jedoch mit einer hohen Mortalität einhergeht. Die 3-Jahres-Letalität beträgt kumulativ 37% (47). Für diese Therapie eignen sich in der Regel Patienten bis zum Alter von 65-70 Jahren ohne relevante Begleiterkrankungen (48). Aufgrund des meist fortgeschrittenen Alters von MDS-Patienten muss über dieses Therapieverfahren im Einzelfall entschieden werden (49). Eine Alternative stellt die epigenetische Therapie mit hypomethylierenden Substanzen dar. Azacitidin ist ein Pyrimidin-Analogon, das die DNA-Methyltransferase (DNMT) irreversibel hemmt. Dies kann die normale Funktion von Genen wiederherstellen, die an der Regulation des Zellzyklus, der Zelldifferenzierung und der Apoptose beteiligt sind (50). Außerdem besitzt die Substanz eine direkte zytotoxische Wirkung für proliferierende Zellen (51). Eine Therapie mit Azacitidin erwies sich in zwei unabhängigen randomisierten Studien einer alleinigen Supportivtherapie überlegen (52, 53). Dieser Vorteil drückte sich in einem absoluten Unterschied von 9 Monaten im Gesamtüberleben aus (52). Etwa die Hälfte der Patienten spricht auf diese Therapie an. Die mittlere Dauer des Ansprechens wird mit 14 Monaten beschrieben (6). Nach Therapieversagen beträgt das Gesamtüberleben der Patienten nur wenige Monate (54). Die etablierten Therapiekonzepte können also die Progression eines MDS verzögern, nicht aber den natürlichen Verlauf der Erkrankung aufhalten. Zudem fehlen effektive Behandlungsmöglichkeiten nach Versagen einer hypomethylierenden Therapie. Deshalb werden für MDS-Patienten der Hochrisikogruppe dringend neue Therapiestrategien benötigt.

1.3 Problemstellung

MDS sind klonale Erkrankungen der hämatopoetischen Stammzellen und gehören zu den häufigsten malignen Erkrankungen des älteren Menschen (5). Insbesondere MDS-Patienten der Hochrisikogruppe besitzen eine extrem schlechte Prognose (41). Das Vorhandensein molekulargenetischer Mutationen in *ASXL1*, *RUNX1*, *TP53* und *EZH2* ist darüber hinaus prognostisch ungünstig (31). Da die etablierten Behandlungsstrategien in diesem Kollektiv nur begrenzt wirken (6), ist es essenziell, neue Therapiekonzepte zu entwickeln. Ein zentraler Pathomechanismus in Hochrisiko-MDS ist die Resistenz gegenüber dem programmierten Zelltod, die u.a. durch Mitglieder der BCL-2-Proteinfamilie vermittelt wird (12, 39). Daher stellt die pharmakologische Inhibition anti-apoptotischer BCL-2-Proteine für dieses Patientengut einen aussichtsreichen Therapieansatz dar. Das primäre Ziel dieser Dissertation ist, den Effekt BCL-2-inhibierender Moleküle *in vitro* in primären Knochenmarkzellen von MDS- und sAML-Patienten zu untersuchen. Die Zelltod-Induktion wird mithilfe des BCL-2-selektiven Inhibitors ABT-199 und des BCL-2/BCL-X_L/BCL-W-spezifischen Inhibitors ABT-737 durchgeführt. Da es sich bei MDS um Stammzellerkrankungen handelt, sollen durch eine pro-apoptotische Intervention insbesondere die MDS-Vorläuferzellen getroffen werden. Deshalb ist die Toxizität der Inhibitoren für die Subpopulation der CD34⁺ mononukleären Knochenmarkzellen und für die Koloniebildungskapazität des Knochenmarks von besonderem Interesse. Bekanntermaßen bietet die Mikroumgebung für MDS-Zellen ein protektives Milieu (55, 56). Um der Situation *in vivo* möglichst nahe zu kommen, wird ein Teil der MDS-Zellen in Anwesenheit der murinen Stromazelllinie EL08-1D2 behandelt. Darüber hinaus soll diejenige Patientengruppe identifiziert werden, die optimal von einer BCL-2-Inhibition profitiert. Mittels durchflusszytometrischer Quantifizierung relevanter BCL-2-Proteine sollen potenzielle Biomarker bestimmt werden. Diese Analyse soll auch als Routinevorgang für das hämatologische Labor am Klinikum rechts der Isar der TU München etabliert werden und kann als wissenschaftliches Begleitprogramm einer klinischen Studie zur Effektivität und Sicherheit von ABT-99 (Venetoclax) bei Patienten mit Hochrisiko-MDS/sAML eingesetzt werden. Um festzustellen, ob MDS-Hochrisiko-Mutationen ein Ausschlusskriterium für eine pro-apoptotische Intervention mit ABT-199 darstellen, soll die BCL-2-Inhibition auch in einem Kollektiv von MDS/sAML-Patienten mit Mutationen in *ASXL1*, *RUNX1*, *TP53* und *EZH2* genauer untersucht werden.

2 Material, Methoden und Patienten

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Software

| Bezeichnung | Hersteller (Firmensitz, Staat) |
|---------------------------------|--|
| FlowJo Software Version 10.05.5 | Tree Star Inc. (Ashland, USA) |
| Microsoft Excel Version 14.6.8 | Microsoft (Redmond, USA) |
| GraphPad Prism Version 5.01 | GraphPad Software Inc. (La Jolla, USA) |

2.1.2 Standardgeräte

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

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

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

2.1.4 Chemikalien und biogene Substanzen

| Bezeichnung | Hersteller (Firmensitz, Staat) |
|--|--|
| Aqua ad iniectabilia | B. Braun Melsungen (Hallbergmoos, DE) |
| BSA Fraktion V | BioLabs (Ipswich, USA) |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen, DE) |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Carl Roth (Karlsruhe, DE) |
| Gelatine Lösung 2% in H ₂ O | Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen, DE) |
| HEPES | Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen, DE) |
| Kaliumchlorid | Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen, DE) |
| Natriumchlorid | Carl Roth (Karlsruhe, DE) |
| Phosphat-gepufferte Saline (PBS), 1x | Gibco (Grand Island, USA) |

2.1.5 Standardlösungen

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

2.1.6 Puffer

| Bezeichnung | Zusammensetzung |
|--------------------------------|---|
| Annexin-V-Binding Puffer (10x) | 0,1M Hepes/NaOH, pH 7,4 1,4M NaCl 0,9% 25mM CaCl ₂ |
| FACS-Puffer | 1xPBS 3% FCS |
| MACS-Puffer | 1xPBS 0,5% BSA 2mM EDTA |

2.1.7 Zellkulturmedien

| Bezeichnung | Zusammensetzung (Hersteller, Firmensitz, Staat) |
|--------------------------|---|
| Serumfreies Medium (SFM) | IMDM (Gibco, Grand Island, USA) 20 % BIT 9500 (Stemcell Technologies, Vancouver, CAN) 1000 ng/ml Stem-Cell Factor (R&D Systems, Minneapolis, USA) 100 ng/ml Flt-3 Ligand (R&D Systems, Minneapolis, USA) 5 ng/ml Interleukin-6 (R&D Systems, Minneapolis, USA) 10 ng/ml Interleukin-3 (R&D Systems, Minneapolis, USA) 10 ng/ml Thrombopoetin (R&D Systems, Minneapolis, USA) 10 µM β-Mercaptoethanol (Gibco, Grand Island, USA) 4 µg/ml LDL (Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, DE) |
| Stroma-Medium | AlphaMEM (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE) 15 % FCS (Perbio, Bonn, DE) 5 % HS (BioWhittaker, Walkersville, USA) 100U Penicillin-Streptomycin (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE) 8 µM Folsäure (Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, DE) 80 µM Inositol (Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, DE) 10 µM β-Mercaptoethanol (Gibco, Grand Island, USA) |
| MethoCult H4434 enriched | Stemcell Technologies (Vancouver, CAN) |

2.1.8 Inhibitoren

| Bezeichnung | Hersteller (Firmensitz, Staat) |
|-------------|---------------------------------|
| ABT-199 | Abbvie (North Chicago, USA) |
| ABT-737 | Active Biochem (Maplewood, USA) |

2.1.9 Kits

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

2.1.10 Antikörper

| Bezeichnung | Konjugat | Hersteller (Firmensitz, Staat) |
|--------------------------------------|--------------|--------------------------------|
| Bcl-2 Klon Bcl-2/100 | FITC | BD (Heidelberg, DE) |
| Bcl-X _L Klon 54H6 | PE | Cell Signaling (Cambridge, GB) |
| Mcl-1 Klon 19C4 | APC | WEHI (Melbourne, AUS) |
| Fixable Viability Dye eFluor® 506 | AmCyan | eBioscience (San Diego, USA) |
| CD33 Klon D3HL60.251 | PC7 | Beckman Coulter (Brea, USA) |
| CD34 Klon 581 | PC5 | Beckman Coulter (Brea, USA) |
| CD34 eFluor® 450 Klon P3.6.2.8.1 | Pacific Blue | eBioscience (San Diego, USA) |
| CD45 Klon 2D1 | APC | eBioscience (San Diego, USA) |
| CD45 Klon J33 | ECD | Beckman Coulter (Brea, USA) |
| Annexin-V | FITC | eBioscience (San Diego, USA) |
| 7AAD | | eBioscience (San Diego, USA) |
| Fc-Block CD16/CD32 | | eBioscience (San Diego, USA) |

2.2 Methoden

2.2.1 Patientenproben und Zelllinien

2.2.1.1 MDS-Proben

Die pharmakologische Inhibition anti-apoptotischer Proteine wurde an einer großen Kohorte primärer Knochenmarkproben untersucht (Tabellen 5-9). Dabei handelt es sich um Knochenmarkaspirat, das MDS- und sAML-Patienten bei einer Knochenmarkpunktion zur Diagnostik und Beurteilung des Therapieerfolges mit einer Jamshidi-Nadel aus dem Beckenkamm entnommen wurde. Heparinisierte Knochenmarkproben wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Katharina Götze, Dr. med. Catharina Müller-Thomas (III. Medizinische Klinik für Hämatologie und internistische Onkologie, Klinikum rechts der Isar der TU München), Dr. med. Burkhard Schmidt (Onkologie Pasing, München), Prof. Dr. Dr. Torsten Haferlach und Dr. med. Frauke Bellos (MLL, München) zur Verfügung gestellt. In Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki gaben die Patienten vor Aufnahme in die Studie ihr schriftliches Einverständnis. Ein Ethikvotum der lokalen Ethikkommission wurde eingeholt. Die Knochenmarkproben wurden frisch verarbeitet und unabhängig von der bisherigen Therapie oder dem Therapieverlauf der Patienten in diese Untersuchung aufgenommen.

2.2.1.2 Kontrollproben

Mononukleäre Knochenmarkzellen einer alterskorrelierten gesunden Kohorte dienten als Kontrollproben (Tabelle 6). Sie wurden aus humanen Hüftköpfen gewonnen, die orthopädischen Patienten bei Einbau einer Hüft-Totalendoprothese explantiert wurden. Diese wurden in einer Kooperation mit Dr. med. Johannes Schauwecker bereitgestellt (Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie, Klinikum rechts der Isar der TU München). Ein Ethikvotum der lokalen Ethikkommission wurde eingeholt. Vor Aufnahme in die Studie erklärten die Kontrollprobanden schriftlich ihr Einverständnis. Die Hüftköpfe wurden mit einer Knochensplitterzange zu Knochenmarkchips verarbeitet. Anschließend wurden die hämatopoetischen Knochenmarkzellen in Waschsritten mit 1xPBS herausgelöst und die mononukleären Zellen über Ficoll-Dichtezentrifugation aufgereinigt. Falls ausreichend Zellen vorhanden waren, erfolgte eine Aufreinigung der CD34⁺ Stammzellen mittels Microbeads.

2.2.1.3 Zelllinien

Die murine embryonale Stromazelllinie EL08-1D2 wurde freundlicherweise von PD Dr. Robert Oostendorp (III. Medizinische Klinik für Hämatologie und internistische Onkologie, Klinikum rechts der Isar der TU München) zur Verfügung gestellt (57, 58).

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Kultur der Stromazelllinie EL08-1D2

Die Kultivierung der murinen embryonalen Stromazelllinie EL08-1D2 erfolgte in beschichteten Zellkulturplatten (0,1% Gelatine) und Stroma-Medium, das zweimal wöchentlich ausgetauscht wurde. In der Ko-Kultur mit humanen Knochenmarkzellen wurden 1×10^6 Stromazellen pro Well in einer 24-Well-Platte eingesetzt.

2.2.2.2 Präparation und Kultur primärer humaner Knochenmarkzellen

Die folgenden Vorgänge der Zellseparation und Zellkultivierung wurden unter sterilen Bedingungen an einer Werkbank durchgeführt. Mononukleäre Zellen aus primären humanen Knochenmarkproben wurden durch Dichtegradient-Zentrifugation mit Biocoll im Verhältnis 1:1 gewonnen. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 800 g und Raumtemperatur hatte sich die Fraktion der mononukleären Knochenmarkzellen aufgrund ihrer geringeren Dichte deutlich von den Erythrozyten abgesetzt und konnte mit einer Pipette abgenommen werden. Potenziell noch vorhandene Erythrozyten wurden mit 1 ml hypotonem Lysepuffer aufgelöst. Anschließend wurden die lebenden Zellen mit Trypanblau gefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 5×10^5 /ml Medium auf einer 24-Well-Platte ausgelegt und bei 37° C und 5% CO₂ für 72 h kultiviert.

2.2.2.3 Anreicherung von CD34⁺ mononukleären Knochenmarkzellen

Bei 1×10^8 Zellen erfolgte die Aufreinigung von CD34⁺ Knochenmarkzellen mittels MACS (Magnetic activated Cell Sorting)-Technik. Hierfür wurden die Zellen mit FcR Blocking Reagent und CD34 MicroBeads aus dem „MACS CD34 MicroBead Kit“ nach Anleitung des Herstellers inkubiert und die vorgegebenen Waschschriffe mit MACS-Puffer befolgt. Die Separation der CD34⁻ und CD34⁺ Zellfraktion wurde an einer LS-MACS-Säule durchgeführt. Sie enthält feine Stahlwolle, an welche die MicroBeads magnetisch binden. Die durchlaufende CD34⁻ Zellpopulation wurde in einem 15ml-Zentrifugenröhrchen gesammelt. Zur Anreicherung der CD34⁺ Zellen wurde die MACS-Säule vom Magneten getrennt und gespült. Unter Verwendung des Kolbens

wurde die CD34⁺ Zellfraktion in einem 15ml-Zentrifugenröhrchen gesammelt. Im Anschluss wurde die erfolgreiche Anreicherung der CD34⁺ Zellen durch eine FACS-Analyse bestätigt (Abbildung 3). Die Kulturbedingungen der CD34⁺ Zellen entsprachen denjenigen der mononukleären Knochenmarkszellen.

2.2.2.4 Inhibitorbehandlung

Die Inhibitoren ABT-737 und ABT-199 wurden in DMSO gelöst und, wenn nicht anderweitig angegeben, in einer finalen Konzentration von 1 µM eingesetzt. Als Lösungsmittelkontrolle wurde DMSO (1:1000) verwendet.

2.2.2.5 Apoptosemessung mittels Durchflusszytometrie

Die Apoptosemessung erfolgte mittels durchflusszytometrischer Detektion von spezifischen Oberflächenmolekülen. Das Phospholipid-bindende Protein Annexin-V besitzt eine hohe Affinität zu Phosphatidylserin, das in frühen Apoptose-Phasen von der Innenseite auf die Außenseite der Plasmamembran transloziert wird. Der fluoreszierende DNA-Farbstoff 7-Aminoactinomycin D (7AAD) diffundiert bei defekter Barriere-Funktion der Zellmembran in spät-apoptotische oder tote Zellen. Die Kombination aus Annexin-V und 7AAD kann also lebende (negativ für Annexin-V und 7AAD), früh apoptotische (positiv für Annexin-V und negativ für 7AAD) und spät apoptotische Zellen (positiv für Annexin-V und 7AAD) unterscheiden. Die Zellen wurden in FACS (Fluorescence activated cell sorting)-Röhrchen überführt, mit 1xPBS gewaschen und mit Fc-Block (1:200), Pacific-Blue-konjugiertem CD34-Antikörper (1:50) und APC-konjugiertem CD45-Antikörper (1:50) für 20 min bei 4° C inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 1x Annexin-V-Binding Puffer erfolgte die Färbung mit FITC-konjugiertem Annexin-V-GFP (1:20) für 10 min bei Raumtemperatur im Dunklen. Anschließend wurde 7AAD (1:20) hinzugefügt und die Zellen am Durchflusszytometer analysiert.

2.2.2.6 Quantifizierung anti-apoptotischer BCL-2-Proteine mittels Durchflusszytometrie

Nach einem Waschschrift mit 1xPBS wurden die Zellen mit fixierbarem Vitalfarbstoff (1:1000) gefärbt und bei 4° C für 30 min inkubiert. Es folgten ein Waschschrift mit FACS-Puffer und die Färbung mit PC5-konjugiertem CD34-Antikörper (1:10) für 20 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit. Nach zwei weiteren Waschschriften mit FACS-Puffer wurden die Zellen mit Paraformaldehydlösung (2% PFA) für 15 min bei Raumtemperatur im Dunklen fixiert und zweimal mit Permeabilisierungs-/Waschpuffer gewaschen. Dann erfolgte die intrazelluläre Färbung mit dem FITC-konjugierten BCL-2-

Antikörper (1:5), dem Alexa647-konjugierten MCL-1-Antikörper (1:500) und dem PE-konjugierten BCL-X_L-Antikörper (1:50) bei 4° C für 60 min. Entsprechende Isotyp-Antikörper wurden zur Bestimmung der Hintergrundfärbung verwendet. Nach zwei weiteren Waschschritten mit Permeabilisierungs-/Waschpuffer wurden die Zellen in FACS-Puffer resuspendiert und am Durchflusszytometer analysiert.

2.2.2.7 *Etablierung eines FACS-Protokolls für das hämatologische Routinelabor*

ABT-199 soll klinisch gezielt bei derjenigen Patientenpopulation eingesetzt werden, die hiervon maximal profitiert. Deshalb wurde ein FACS-Protokoll für das hämatologische Routinelabor des Klinikums rechts der Isar der TU München etabliert. Damit können bei allen MDS/sAML-Patienten, die an klinischen Studien zu Venetoclax (ABT-199) teilnehmen, standardmäßig die anti-apoptotischen Proteine BCL-2, BCL-X_L und MCL-1 aus dem Knochenmark quantifiziert werden. Diese können im Studienverlauf möglicherweise eine Funktion als Biomarker einnehmen. Nach einem Waschschriff mit 1xPBS erfolgte die Färbung der Zellen mit PC5-konjugiertem CD34-Antikörper (1:10), ECD-konjugiertem CD45-Antikörper (1:10) und PC7-konjugierten CD33-Antikörper (1:10) für 20 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit. Anschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und mit Paraformaldehydlösung (2% PFA) für 15 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit fixiert. Nach einem Waschschriff mit Permeabilisierungspuffer/Waschpuffer (BD) wurden die Zellen mit dem FITC-konjugierten BCL-2-Antikörper (1:5), dem PE-konjugierten MCL-1-Antikörper (1:50) oder mit dem PE-konjugierten BCL-X_L-Antikörper (1:50) bei 4° C für 60 min gefärbt. Isotypantikörper wurden zur Bestimmung der Hintergrundfärbung verwendet. Nach einem weiteren Waschschriff mit Permeabilisierungspuffer/Waschpuffer wurden die Zellen in FACS-Puffer resuspendiert und am Durchflusszytometer analysiert. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) wurde in Relation zur jeweiligen Isotypkontrolle bestimmt.

2.2.2.8 *Methylcellulose-Analyse*

Die Methylcellulose-Analyse zeigt das Wachstumsverhalten von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen verschiedener Entwicklungsstadien auf. In semisolidem Medium und unter Einfluss spezifischer Wachstumsfaktoren kann die Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Progenitorzellen beurteilt werden. Hierzu wurde kommerziell erworbene Methylcellulose mit den zugesetzten Zytokinen rh SCF (Recombinant human Stem-Cell Factor), rh GM-CSF (Recombinant human Gra-

nulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor), rh IL-3 (Recombinant human Interleukin-3), rh IL-6 (Recombinant human Interleukin-6), rh G-CSF (Recombinant human Granulocyte Colony-stimulating Factor) und rh EPO (Recombinant human Erythropoietin) zu je 3 ml in Zellkulturröhrchen portioniert und bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Nach drei Waschschrritten mit 1xPBS wurden 1×10^4 mononukleäre Knochenmarkzellen, 350 μl IMDM und 35 μl Penicillin/Streptomycin hinzugefügt. Nach gründlichem Mischen der Röhrchen und Entweichen der Luftblasen wurde die Methylcellulose-Zellsuspension mit einer Kanüle auf 2 kleine Zellkulturplatten (Durchmesser 3 cm) verteilt. Die Inkubation erfolgte für 14 Tage im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 . Dann wurden die gebildeten Kolonien im Lichtmikroskop ausgezählt und anhand ihrer Morphologie charakterisiert. Als Kolonien wurden Zellanhäufungen von mindestens 20 Zellen definiert. Dabei wurden die granulozytären/monozytären Kolonien CFU-GM (Colony forming Unit-Granulocyte, Macrophage), die erythroiden Kolonien BFU-E (Burst forming Unit-Erythrocyte) und die Kolonien CFU-GEMM (Colony forming Unit-Granulocyte, Erythrocyte, Macrophage, Megakaryocyte), die Zellen beider Reihen enthalten, unterschieden. Mithilfe des Fluoreszenzmikroskops BIOREVO BZ-9000 wurden Übersichtsaufnahmen der Platten und einzelner Kolonien angefertigt.

2.2.3 Genexpressionsanalysen

Die Genexpressionsanalysen inkl. Normalisierung wurden mit dem Human Genome U133 Plus 2.0 Array von Affymetrix (Santa Clara, CA, USA) durchgeführt. Die Messungen jedes Arrays wurden zur Normalisierung durch den über alle „Calls“ (present, mixed und absent) berechneten Median dividiert und logarithmisch transformiert. Es wurden BMMNC von 90 MDS-Patienten (del(5q) $n=23$, RA $n=4$, RARS $n=6$, RCMD $n=6$, RCMD-RS $n=6$, RAEB-1 $n=23$, RAEB-2 $n=22$) und PBMNC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) von 110 gesunden Kontrollprobanden analysiert. RA, RARS, RCMD und RCMD-RS wurden frühem MDS zugeordnet. RAEB-1 wurde als intermediäres MDS-definiert und RAEB-2 als spätes MDS. Um signifikante Unterschiede in der Genexpression zwischen den MDS-Gruppen „früh“, „intermediär“ und „spät“ sowie zwischen den Gruppen „Mutation nachweisbar“ vs. „keine Mutation nachweisbar“ zu untersuchen, wurde der t -Test für unabhängige Stichproben verwendet. Die p -Werte sind zweiseitig, mit einem Signifikanzniveau von 0.05, und wurden nicht für multiple Vergleiche angepasst. Alle statistischen Auswertungen wurden mit GraphPad Prism (Version 5.01) durchgeführt.

2.2.4 Statistische Auswertung

Um signifikante Unterschiede zwischen der behandelten Probe und der Kontrollprobe zu untersuchen, wurde der *t*-Test für unabhängige Stichproben verwendet. Die *p*-Werte sind zweiseitig, mit einem Signifikanzniveau von 0.05, und wurden nicht für multiple Vergleiche angepasst. Um signifikante Unterschiede hinsichtlich der Apoptose-Induktion in den verschiedenen MDS-Risikogruppen nachzuweisen, wurde die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA (Analysis of Variance) durchgeführt, gefolgt von paarweisen post-hoc-Vergleichen der Gruppenmittelwerte mit *t*-Tests, der sogenannten Bonferroni-Korrektur. Paarweise Differenzen der Mittelwerte sind in den Tabellen 10, 11 und 12 mit 95%-Konfidenzintervall angegeben. Bei der Korrelation von Proteinexpression und Viabilität der Zellen nach Inhibitor-Behandlung wurde die Effektstärke durch den Rangkorrelationskoeffizienten ρ nach Spearman bestimmt. Anschließend wurde der zweiseitige *p*-Wert mit einem Signifikanzniveau von 0.05 bestimmt. Die funktionelle Beziehung wurde durch eine lineare Regressionsanalyse beschrieben. Mithilfe der Geradengleichung können aus einer unabhängigen Variablen *x* die Eigenschaften der abhängigen Variablen *y* vorhergesagt werden. Alle statistischen Auswertungen wurden mit GraphPad Prism (Version 5.01) durchgeführt.

2.3 Patientencharakteristika

| Patient ID | Age | Gender | WHO category | Karyotype | Severe anemia | Sum of individual variables (r-WPSS) | r-WPSS category | IPSS category | Cytogenetic risk score (Schanz <i>et al.</i>) |
|------------|-----|--------|--------------|--|---------------|--------------------------------------|-----------------|---------------|--|
| 1 | 52 | male | RARS | 46,XY | absent | 0 | very low | low | good |
| 2 | 64 | female | RARS | 46,XX,del(5q) | absent | 0 | very low | low | good |
| 3 | 74 | male | RARS | 46,XY | absent | 0 | very low | low | good |
| 4 | 80 | female | RCMD | 46,XX | absent | 1 | low | int.-1 | good |
| 5 | 76 | male | RCMD | 45,X,-Y | absent | 1 | low | low | very good |
| 6 | 77 | male | RCMD | 45,X,-Y | absent | 1 | low | low | very good |
| 7 | 67 | male | RCMD | 46,XY,del(5q) | absent | 1 | low | int.-1 | good |
| 8 | 74 | male | RCMD | 46,XY | absent | 1 | low | low | good |
| 9 | 70 | female | RA | 46,XX | present | 1 | low | int.-1 | good |
| 10 | 72 | female | RARS | 46,XX | present | 1 | low | low | good |
| 11 | 76 | female | RARS | 46,XX | present | 1 | low | low | good |
| 12 | 70 | male | RCMD | 46,XY | absent | 1 | low | int.-1 | good |
| 13 | 74 | male | RCMD | 46,XY | present | 2 | intermediate | int.-1 | good |
| 14 | 62 | female | RCMD | 46,XX | present | 2 | intermediate | int.-1 | good |
| 15 | 72 | male | RCMD | 46,XY | present | 2 | intermediate | int.-1 | good |
| 16 | 41 | female | RCMD | 46,XX | present | 2 | intermediate | int.-1 | good |
| 17 | 87 | male | RAEB-1 | 46,XY | absent | 2 | intermediate | n.d. | good |
| 18 | 53 | female | RAEB-1 | 46,XX | absent | 2 | intermediate | n.d. | good |
| 19 | 74 | male | RCMD | 46,XY,i(14)(q10) | absent | 2 | intermediate | int.-1 | intermediate |
| 20 | 67 | male | RCMD | 46,XY | absent | 2 | intermediate | int.-1 | good |
| 21 | 79 | male | RAEB-1 | 46,XY | absent | 2 | intermediate | int.-1 | good |
| 22 | 87 | male | RCMD | 46,XY | present | 2 | intermediate | int.-1 | good |
| 23 | 77 | female | RAEB-1 | 46,XX | absent | 2 | intermediate | int.-1 | good |
| 24 | 85 | male | RCMD | 45,X,-Y | present | 2 | intermediate | int.-1 | good |
| 25 | 76 | male | RCMD | 46,XY | present | 2 | intermediate | n.d. | good |
| 26 | 74 | male | RCMD | 46,XY | present | 2 | intermediate | int.-1 | good |
| 27 | 74 | male | RAEB-1 | 46,XY | absent | 2 | intermediate | int.-2 | good |
| 28 | 64 | male | RAEB-2 | 46,XY | absent | 3 | high | int.-2 | good |
| 29 | 73 | male | RAEB-1 | 46,XY | present | 3 | high | n.d. | good |
| 30 | 72 | female | RAEB-1 | 46,XX | present | 3 | high | int.-1 | good |
| 31 | 69 | male | RAEB-1 | 46,XY | present | 3 | high | int.-1 | good |
| 32 | 84 | male | RAEB-1 | 46,XY | present | 3 | high | int.-1 | good |
| 33 | 83 | male | RAEB-1 | 46,XY | present | 3 | high | int.-1 | good |
| 34 | 76 | male | RAEB-2 | 46,XY | present | 4 | high | high | good |
| 35 | 76 | male | RAEB-2 | 46,XY | present | 4 | high | high | good |
| 36 | 72 | male | RAEB-2 | 46,XY [14], 46,XY,del(9)(q21q34) [4] | present | 4 | high | high | good |
| 37 | 81 | male | RAEB-1 | 46,XY,t(1;11)(q32;p15) | present | 4 | high | int.-2 | intermediate |
| 38 | 71 | female | RAEB-2 | 46,XX | present | 4 | high | int.-2 | good |
| 39 | 75 | male | RAEB-1 | 46,XY,del(7)(q21q36) | present | 4 | high | int.-2 | intermediate |
| 40 | 73 | female | RAEB-2 | 46,XX | absent | 3 | high | n.d. | good |
| 41 | 73 | female | RAEB-2 | 46,XX | absent | 3 | high | n.d. | good |
| 42 | 75 | female | RAEB-1 | 46,XX,der(22)t(1;22)(q11;p11) | absent | 3 | high | int.-2 | intermediate |
| 43 | 84 | female | RAEB-2 | 47,XX complex (≤ 3 aberrations) | present | 6 | very high | high | poor |
| 44 | 34 | female | RAEB-2 | 46,XX,+8 | present | 5 | very high | high | intermediate |
| 45 | 84 | female | RAEB-2 | complex (>3 aberrations) incl. del(5q) | present | 6 | very high | high | very poor |
| 46 | 57 | male | sAML | 45,X,-Y,del(4)(q23q27) | present | | | n.a./n.d. | poor |
| 47 | 74 | male | sAML | 46,XY | present | | | n.a./n.d. | good |
| 48 | 84 | male | sAML | 45,XY complex (>3 aberrations) incl. del(5q), -7 | present | | | high | very poor |
| 49 | 78 | male | sAML | 46,XY,i(17)(q19) | present | | | high | intermediate |
| 50 | 75 | male | sAML | 46,XY complex (≤ 3 aberrations) | present | | | high | poor |
| 51 | 81 | male | sAML | 46,XY,t(2;8)(p10;q10) | present | | | n.a./n.d. | intermediate |

Tabelle 5: Klinische Charakteristika des Patientenkollektivs für die Inhibition anti-apoptotischer Proteine. Für jede Patientenprobe wurden Alter, Geschlecht, WHO-Kategorie, Karyotyp, Vorliegen einer schweren Anämie (Hämoglobin-Wert <8 g/dl bei Frauen und <9 g/dl bei Männern), IPSS-Kategorie und die zytogenetische Risikogruppe nach Schanz *et al.* dokumentiert. Aus der Summe der Risikoparameter wurde die r-WPSS-Risikogruppe bestimmt. Die IPSS-Klassifikation wurde in Proben mit verfügbaren klinischen Annotationen durchgeführt. Nicht ausreichend annotierte Proben wurden als n.d. (not done) klassifiziert. Proben von sAML-Patienten mit >29% medullären Blasten, bei denen die IPSS-Risikogruppe nicht berechnet werden konnte, wurden als n.a. (not applicable) gekennzeichnet.

Material, Methoden und Patienten

| category | no. of patients analyzed | mean age | female | male |
|--------------------------------------|--------------------------|----------|--------|------|
| total | 70 | 70.4 | 29 | 41 |
| healthy | 19 | 64.2 | 12 | 7 |
| sAML | 6 | 74.8 | 0 | 6 |
| MDS | 45 | 72.3 | 17 | 28 |
| r-WPSS | | | | |
| very low | 3 | 63.3 | 1 | 2 |
| low | 9 | 73.6 | 4 | 5 |
| intermediate | 15 | 72.1 | 4 | 11 |
| high | 15 | 74.5 | 5 | 10 |
| very high | 3 | 67.3 | 3 | 0 |
| IPSS | | | | |
| low risk | 8 | 70.6 | 3 | 5 |
| int.-1 | 19 | 73.0 | 6 | 13 |
| int.-2 | 6 | 73.3 | 2 | 4 |
| high | 9 | 73.7 | 3 | 6 |
| unclassified / non applicable | 9 | 71.9 | 3 | 6 |
| cyogenetic risk score | | | | |
| very good | 2 | 76.5 | 0 | 2 |
| good | 37 | 72.1 | 13 | 24 |
| intermediate | 7 | 71.1 | 2 | 5 |
| poor | 3 | 72.0 | 1 | 2 |
| very poor | 2 | 84.0 | 1 | 1 |

Tabelle 6: Verteilung des mittleren Alters und des Geschlechts des Patientenkollektivs für die Inhibition anti-apoptotischer Proteine.

| Patient ID | Age | Gender | IPSS category | ASXL1 mutation | RUNX1 mutation | TP53 mutation | EZH2 mutation | Previous therapy |
|------------|-----|--------|---------------|----------------|----------------|----------------|---------------|------------------|
| 1 | 72 | female | low | absent | absent | absent | absent | EPO |
| 2 | 76 | female | low | absent | absent | absent | absent | EPO |
| 3 | 74 | male | low | absent | absent | absent | absent | no therapy |
| 4 | 83 | male | low | absent | absent | absent | absent | no therapy |
| 5 | 70 | female | int. I | absent | absent | absent | absent | no therapy |
| 6 | 73 | female | int. I | absent | absent | absent | absent | n.a. |
| 7 | 56 | female | int. I | absent | absent | absent | absent | n.a. |
| 8 | 70 | male | int. I | absent | absent | absent | absent | no therapy |
| 9 | 68 | male | int. I | absent | absent | absent | absent | n.a. |
| 10 | 62 | female | int. I | absent | absent | absent | absent | no therapy |
| 11 | 41 | female | int. I | absent | absent | absent | absent | EPO |
| 12 | 67 | male | int. I | absent | absent | absent | absent | no therapy |
| 13 | 67 | male | int. I | present (n.d.) | absent | absent | absent | lenalidomide |
| 14 | 74 | male | int. I | present (41%) | absent | absent | present (86%) | EPO |
| 15 | 79 | male | int. I | present (40%) | present (30%) | absent | absent | EPO |
| 16 | 64 | female | int. I | absent | absent | present (40%) | absent | lenalidomide |
| 17 | 74 | male | int. I | present (6%) | present (16%) | absent | absent | HMA |
| 18 | 63 | male | int. I | present (n.d.) | absent | absent | absent | no therapy |
| 19 | 61 | female | int. I | absent | present (n.d.) | absent | absent | HMA |
| 20 | 66 | male | int. I | present (n.d.) | absent | absent | absent | n.a. |
| 21 | 80 | male | int. I | present (40%) | absent | absent | absent | n.a. |
| 22 | 87 | male | int. II | absent | absent | absent | absent | n.a. |
| 23 | 75 | male | int. II | absent | absent | absent | absent | n.a. |
| 24 | 69 | male | int. II | absent | absent | absent | absent | HMA |
| 25 | 73 | female | int. II | absent | absent | present (n.d.) | absent | n.a. |
| 26 | 69 | male | int. II | present (50%) | present (50%) | absent | absent | no therapy |
| 27 | 66 | male | high | absent | absent | absent | absent | n.a. |
| 28 | 86 | female | high | absent | absent | absent | absent | n.a. |
| 29 | 62 | female | high | absent | absent | absent | absent | HMA |
| 30 | 74 | male | high | absent | absent | absent | absent | no therapy |
| 31 | 94 | female | high | absent | absent | present (40%) | absent | no therapy |
| 32 | 74 | male | high | present (50%) | present (50%) | absent | absent | HMA |
| 33 | 76 | male | sAML | absent | absent | absent | absent | no therapy |
| 34 | 78 | male | sAML | present (50%) | absent | present (63%) | absent | HMA |
| 35 | 75 | male | sAML | absent | absent | present (53%) | absent | no therapy |
| 36 | 81 | male | sAML | present (6%) | absent | absent | absent | HMA |
| 37 | 82 | male | sAML | present (6%) | absent | absent | absent | HMA |
| 38 | 65 | female | sAML | absent | absent | present (61%) | absent | HMA |
| 39 | 85 | female | sAML | absent | absent | present (53%) | absent | HMA |
| 40 | 71 | male | sAML | present (11%) | absent | absent | absent | n.a. |
| 41 | 79 | female | sAML | absent | absent | present (49%) | absent | n.a. |

Tabelle 7: Klinische Charakteristika des Patientenkollektivs für die Mutationsanalysen. Alter, Geschlecht, IPSS-Kategorie, Karyotyp sowie Anwesenheit und Abwesenheit somatischer Mutationen in *ASXL1*, *RUNX1*, *TP53* und *EZH2* wurden für jede MDS- und sAML-Patientenprobe dokumentiert. Die Definition einer sAML erfolgte bei einer medullären Blastenzahl $\geq 30\%$. Der Mutationsstatus der MDS- und sAML-Proben wurde durch konventionelle Sanger-Sequenzierung oder Next-Generation-Sequenzierung bestimmt. Wenn möglich, wurde die Mutationslast als Prozentzahl angegeben. Waren Proben nicht ausreichend annotiert, wurden sie als n.d. (not done) klassifiziert.

| IPSS category | no. of patients analyzed | mean age | female | male | non-mutated | mutated |
|-----------------|--------------------------|----------|--------|------|-------------|---------|
| total | 48 | 70.9 | 21 | 27 | | |
| healthy control | 7 | 63.4 | 5 | 2 | | |
| MDS | 32 | 70.9 | 13 | 19 | 19 | 13 |
| low | 4 | 76.3 | 2 | 2 | 4 | 0 |
| int. I | 17 | 66.8 | 7 | 10 | 8 | 9 |
| int. II | 5 | 74.6 | 1 | 4 | 3 | 2 |
| high | 6 | 76.0 | 3 | 3 | 4 | 2 |
| sAML | 9 | 76.9 | 3 | 6 | 1 | 8 |

Tabelle 8: Verteilung der klinischen und molekularen Charakteristika des Kollektivs für die Mutationsanalysen.

| IPSS category | sole <i>ASXL1</i> mutation | sole <i>RUNX1</i> mutation | sole <i>TP53</i> mutation | sole <i>EZH2</i> mutation | <i>ASXL1/RUNX1</i> mutation | <i>ASXL1/EZH2</i> mutation | <i>ASXL1/TP53</i> mutation |
|---------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| MDS | 4 | 1 | 3 | 0 | 4 | 1 | 0 |
| low | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| int. I | 4 | 1 | 1 | 0 | 2 | 1 | 0 |
| int. II | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| high | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| sAML | 3 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 1 |

Tabelle 9: Verteilung des Mutationsstatus von *ASXL1*, *RUNX1*, *TP53* und *EZH2* bei MDS- und sAML-Patienten für die Mutationsanalysen.

3 Ergebnisse

3.1 Apoptose-Induktion durch BCL-2-Inhibitoren in primären humanen Knochenmarkzellen

Die Experimente zur Zelltod-Induktion wurden mit 51 Knochenmarkproben von MDS/sAML-Patienten durchgeführt (Tabelle 5). Für die Analysen zum Einfluss molekulargenetischer Mutationen auf eine selektive BCL-2-Inhibition stand ein Kollektiv von 41 Patientenproben zur Verfügung (Tabelle 7). Diese Proben wurden im Rahmen einer routinemäßigen Knochenmarkpunktion zur Diagnostik oder Überprüfung des Therapieansprechens gewonnen. Mononukleäre Knochenmarkzellen von 19 alterskorrelierten, hämatologisch gesunden Kontrollpatienten stammten aus humanen Hüftköpfen, die bei Einbau einer totalen Hüft-Endoprothese explantiert wurden (Tabelle 6). Alle Knochenmarkproben wurden frisch verarbeitet, um optimale Überlebensverhältnisse der Zellen zu schaffen und eine unerwünschte Zelltod-Induktion vor Inhibitor-Behandlung zu verhindern. Wenn nicht anderweitig angegeben, betrug die Inhibitor-Konzentration 1 μM . Diese Standarddosis wurde in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zur Bestimmung der Dosis-Wirkungs-Beziehung für ABT-737 ermittelt (59). Der Effekt von ABT-737 auf primäre humane MDS/sAML-Zellen wurde bereits von Mitgliedern der Arbeitsgruppe untersucht. Daher soll in der vorliegenden Arbeit vorrangig auf die Apoptose-Induktion durch den selektiven BCL-2-Inhibitor ABT-199 eingegangen werden. Das günstigere Nebenwirkungsprofil macht diese Substanz besonders attraktiv für eine klinische Anwendung (18). Die klonale Hierarchie im MDS wird durch eine stammzellähnliche Population und eine reifere Zellpopulation beschrieben (27). Um sie zu unterscheiden, wurden in der Durchflusszytometrie CD34^+ Zellen angefärbt, die zum Teil die MDS-verbreitenden Progenitorzellen enthalten (12, 27, 38, 60). Schließlich wurde die Viabilität vor und nach Inhibitor-Behandlung in der Gesamtheit der Knochenmarkzellen und in der Subgruppe der CD34^+ Stamm-/Progenitorzellen durchflusszytometrisch bestimmt.

3.1.1 ABT-199 induziert keine Apoptose in primären Knochenmarkzellen gesunder Kontrollpatienten

Um toxische Effekte des BCL-2-Inhibitors auf die gesunde Rest-Hämatopoese von MDS-Patienten auszuschließen, wurde die Apoptose-Induktion in Knochenmarkzellen einer gesunden Kontrollkohorte analysiert. Die Knochenmarkkapazität verändert sich mit zunehmendem Alter. Daher wurden alterskorrelierte Kontrollen verwendet, um die

MDS-Patientenpopulation möglichst genau nachzuahmen und einen möglicherweise toxischen Effekt von ABT-199 zu überprüfen. Für die Kontrollproben wurde das Knochenmark aus humanen Hüftköpfen gewonnen, die ansonsten nach Implantation einer totalen Hüft-Endoprothese in der Abteilung für Orthopädie verworfen worden wären. Patienten mit hämato-onkologischer Vorerkrankung oder relevanten Blutbild-Veränderungen wurden nicht aufgenommen. Die Häufigkeit CD34⁺ Zellen beträgt in gesundem Knochenmark nur etwa 1-4% aller mononukleären Zellen (61). Aus diesem Grund wurde die CD34⁺ Zellpopulation per MACS-Aufreinigung angereichert, um den Effekt von ABT-199 auf diese zelluläre Subgruppe adäquat darstellen zu können (Abbildung 3). Zudem erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse der gesamten mononukleären Knochenmarkzellen.

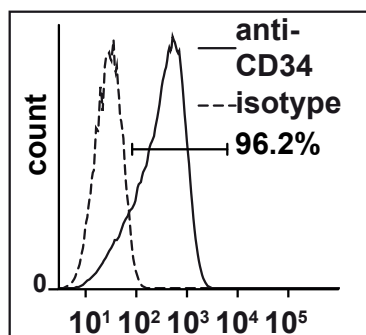


Abbildung 3: Aufreinigung von CD34⁺ Stamm-/Progenitorzellen aus humanen mononukleären Knochenmarkzellen. CD34⁺ Zellen von gesunden Kontrollpatienten wurden durch eine positive Selektion mittels „MACS CD34 MicroBead Kit“ angereichert. Der Reinheitsgrad CD34⁺ mononukleärer Knochenmarkzellen eines individuellen repräsentativen Kontrollpatienten wurde mittels Durchflusszytometrie im Vergleich zur Isotypkontrolle bestimmt.

Da die Untersuchungen am erkrankten Knochenmark einen maximalen Effekt nach Inhibitor-Behandlung für 72h zeigten (Abbildung 5), wurde dieser Messzeitpunkt für das Knochenmark der gesunden Kontrollkohorte übernommen. Um die Wirkung von ABT-199 auf gesunde CD34⁺ Zellen im Zeitverlauf zu untersuchen, wurde die Viabilität dieser Zellpopulation vor Inhibitor-Behandlung und in den Zeitabständen von 24h, 48h und 72h nach Inhibitor-Behandlung durchflusszytometrisch gemessen. In repräsentativen Patientenproben wurde zu keiner Zeit Apoptose durch ABT-199 ausgelöst (Abbildung 4B). Exemplarische FACS-Plots zeigen, dass eine Behandlung mit ABT-199 (1µM) für 72h keinen toxischen Effekt auf die Population der CD34⁺ Stamm- und Progenitorzellen ausübt (Abbildung 4A). Die fehlende Toxizität von ABT-199 auf gesundes Knochenmark konnte auch bei der Untersuchung der Gesamtpopulation mononukleärer Zellen gezeigt werden. Hier wurde weder nach 72h (Abbildung 4C) noch im Zeitverlauf (Abbildung 4D) Apoptose durch den BCL-2-Inhibitor induziert. Somit ist ABT-199 in gesundem Knochenmark weder toxisch für die Gesamtheit mononukleä-

rer Knochenmarkzellen, noch für die CD34⁺ Subpopulation. Diese Ergebnisse bestätigten sich bei einer größeren Kontrollkohorte (n=19) (Abbildungen 6 und 7).

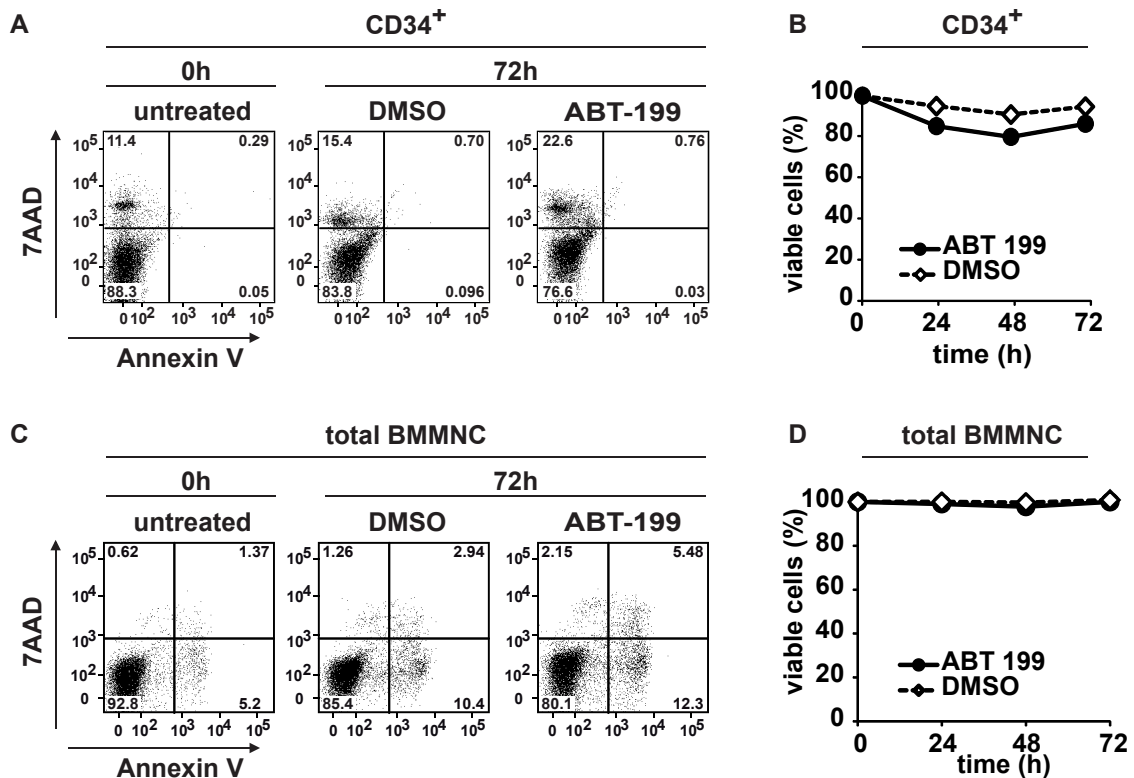


Abbildung 4: ABT-199 ist nicht toxisch für Stamm- und Progenitorzellen sowie die Gesamtheit der Knochenmarkzellen einer gesunden, alterskorrelierten Kontrollkohorte. Als Lösungsmittelkontrolle dienten DMSO-behandelte Zellen. (A) Mononukleäre Knochenmarkzellen eines individuellen gesunden Kontrollpatienten nach Aufreinigung CD34⁺ Knochenmarkzellen bis zu einer Reinheit von >95% wurden mit ABT-199 (1µM) behandelt. Apoptose wurde nach 72 Stunden in der Durchflusszytometrie mittels Färbung auf Annexin V und 7AAD analysiert. (B) Gezeigt wird die Viabilität CD34⁺ Knochenmarkzellen eines individuellen gesunden Kontrollpatienten im Zeitverlauf zu den angegebenen Zeitpunkten nach Behandlung mit ABT-199 (1µM) wie in A. Lebende Zellen wurden als Prozentsatz der lebenden Zellen zu Beginn des Experiments dargestellt. (C) Mononukleäre Knochenmarkzellen eines individuellen alterskorrelierten gesunden Kontrollpatienten wurden mit ABT-199 (1µM) behandelt. Apoptose wurde nach 72 Stunden in der Durchflusszytometrie mittels Färbung auf Annexin V und 7AAD analysiert. (D) Gezeigt wird die Viabilität mononukleärer Knochenmarkzellen eines individuellen gesunden Kontrollpatienten im Zeitverlauf zu den angegebenen Zeitpunkten nach Behandlung mit ABT-199 (1µM) wie in C. Lebende Zellen wurden als Prozentsatz der lebenden Zellen zu Beginn des Experiments dargestellt.

3.1.2 ABT-199 und ABT-737 induzieren schnell und effektiv Apoptose in CD34⁺ Knochenmarkzellen von Hochrisiko-MDS/sAML

Knochenmarkzellen von MDS-Patienten der Hochrisikogruppe weisen eine Resistenz gegenüber dem programmierten Zelltod auf (12, 39). Niedermolekulare Inhibitoren wurden bereits erfolgreich zur Reaktivierung der mitochondrialen Apoptose eingesetzt (16, 18, 35, 36). Deshalb wurde der Einfluss des BH3-Mimetikums ABT-737 und des selektiven BCL-2-Inhibitors ABT-199 auf primäre mononukleäre Knochenmarkzellen von MDS- und sAML-Patienten untersucht. Hierzu wurden die Inhibitoren einmalig in der durch Titrationsversuche bestimmten Standarddosis von 1 µM eingesetzt. Die Halbwertszeit von ABT-199 beträgt 26h *in vivo* (62). Zur Ermittlung der idealen Inku-

bationszeit *in vitro* wurde die Viabilität von CD34⁺ mononukleären Knochenmarkzellen durchflusszytometrisch vor Inhibitor-Behandlung und zu Messpunkten von 24h, 48h und 72h nach Inhibitor-Behandlung bestimmt. Drei exemplarische Patientenproben zeigten, dass beide Inhibitoren im Zeitverlauf nur einen minimalen Effekt auf CD34⁺ Knochenmarkzellen des „low-risk“-Patienten ausüben. Im Knochenmark des „intermediate-risk“-Patienten konnte eine mäßige Zelltod-Induktion durch ABT-199 und ABT-737 festgestellt werden. Hingegen wurde in den Stamm- und Progenitorzellen eines „high-risk/sAML“-Patienten bereits nach 24h effektiv Apoptose ausgelöst (Abbildung 5B). Das Wirkmaximum bei Patienten mit „low-risk“/„intermediate-risk“-MDS zeigte sich, wenn auch in geringerem Ausmaß, nach einer Inkubationszeit von 72h. Es kann also davon ausgegangen werden, dass ein Messzeitpunkt bei 72h am günstigsten für die Diskrimination sensibler und resistenter Proben ist. Deshalb wurde eine Inhibitor-Konzentration von 1 µM bei einer Behandlungsdauer von 72h als Standardbedingung für die folgenden Analysen einer größeren Patientenkohorte gewählt. Repräsentative FACS-Plots zeigen die Viabilität CD34⁺ Zellen vor Inhibitor-Behandlung und 72h nach Behandlung mit ABT-737 (1 µM), ABT-199 (1 µM) und Lösungsmittelkontrolle DMSO (Abbildung 5A). Dabei war, wie bereits für AML-Zelllinien beschrieben (19), die Wirkung von ABT-737 bei breiterem Proteinbindungsspektrum stärker als der Effekt des selektiven BCL-2-Inhibitors ABT-199. Der Vergleich beider Inhibitoren in einer Patientenprobe erlaubt auch den funktionellen Rückschluss, dass die Apoptose-Resistenz in Hochrisiko-MDS/sAML nicht allein durch das anti-apoptische Protein BCL-2 vermittelt wird.

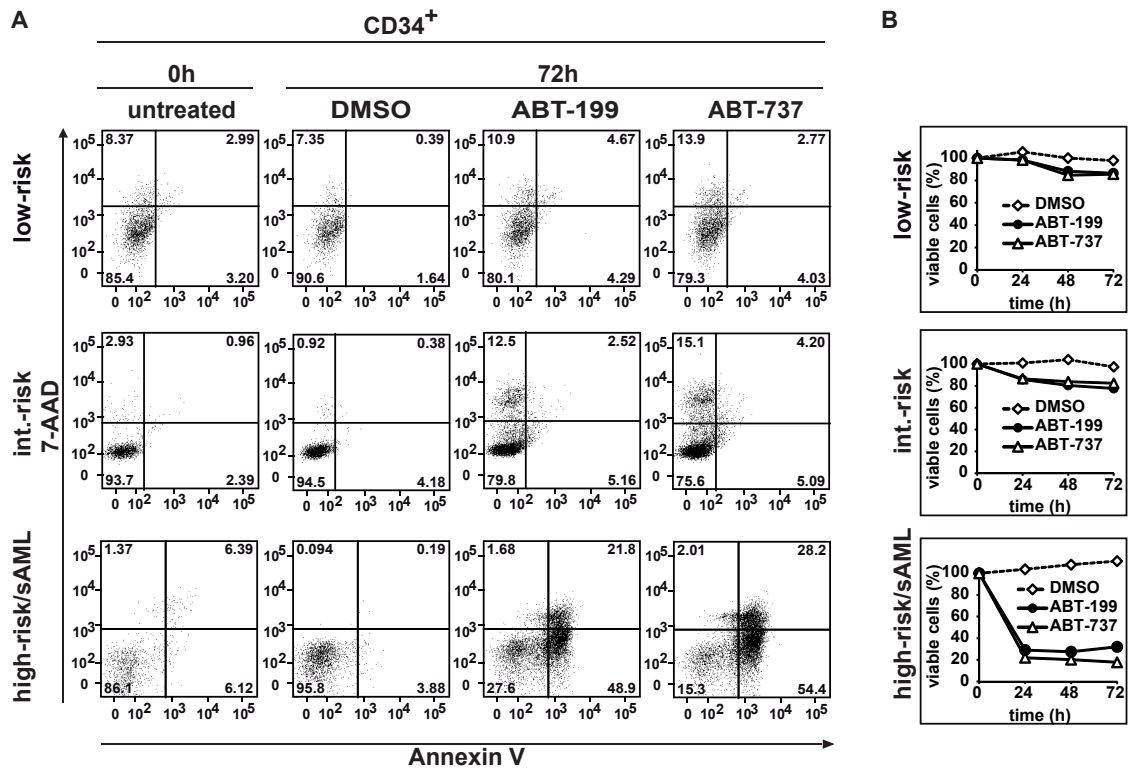


Abbildung 5: ABT-199 und ABT-737 töten Stamm- und Progenitorzellen von Patienten mit „high-risk“-MDS/sAML zeitabhängig. (A) Die Viabilität von CD34⁺ mononukleären Knochenmarkzellen wurde nach Behandlung mit Lösungsmittelkontrolle (DMSO) und nach Inhibitorbehandlung mit ABT-199 (1µM) und ABT-737 (1µM) zu den angegebenen Zeitpunkten in der Durchflusszytometrie mittels Färbung auf Annexin V und 7AAD bestimmt. Dabei handelt es sich um drei repräsentative MDS-Patienten mit der r-WPSS-Klassifikation „low-risk“-MDS, „intermediate-risk“-MDS und „high-risk“-MDS/sAML. (B) Die Viabilität der Zellen, die wie in A mit Lösungsmittelkontrolle (DMSO), ABT-199 und ABT-737 behandelt wurden, wurden zu den angegebenen Zeitpunkten analysiert und als Prozentsatz der lebenden Zellen zu Beginn des Experiments dargestellt.

3.1.3 Reaktivierung der Apoptose durch ABT-199 überwindet die Apoptose-Resistenz in „high-risk“-MDS und sAML

Niedermolekulare Inhibitoren sind ein neuer und vielversprechender Ansatz zur Reaktivierung der mitochondrialen Apoptose in malignen Zellen. Im Gegensatz zu seiner Vorgängersubstanz ABT-737 verursacht der BCL-2-selektive Inhibitor ABT-199 bei ähnlicher Wirkung *in vivo* keine schweren Thrombozytopenien (18). Das günstigere Nebenwirkungsprofil macht ABT-199 zu einer erfolgversprechenden Substanz für eine klinische Anwendung am Patienten. In dieser Arbeit wurde die Toxizität von ABT-199 in 30 primären Knochenmarkproben von MDS/sAML-Patienten untersucht und mit einer Kohorte aus 7 gesunden Kontrollprobanden verglichen. Die Viabilität der Zellen wurde zu den zuvor ermittelten Standardbedingungen, also 72h nach Inhibitor-Behandlung mit 1µM ABT-199, in der Durchflusszytometrie analysiert. Für den Therapieerfolg von ABT-199 ist es entscheidend, die pathologische MDS-Stammzelle zu treffen. Deshalb wurden durchflusszytometrisch CD34⁺ Knochenmarkzellen angefärbt, um den Effekt von ABT-199 in dieser Zellpopulation darzustellen. In diesem Experi-

ment ließ sich abermals feststellen, dass ABT-199 keinen toxischen Effekt auf CD34⁺ Zellen von einer Kohorte aus 7 gesunden Patienten hat (Abbildung 6). Im Vergleich zu gesunden Kontrollen war die Apoptose-Induktion in den Stamm- und Progenitorzellen von Patienten der r-WPSS-Kategorie „intermediate-risk“, „(very) high-risk“ und „sAML“ signifikant erhöht. Zudem konnten signifikante Unterschiede beim Vergleich unterschiedlicher MDS-Risikogruppen nachgewiesen werden, wie beim Vergleich von „(very) low-risk“ mit „intermediate-risk“, (very) high-risk und „sAML“. Außerdem tötete ABT-199 signifikant mehr Zellen in „sAML“-Proben als in Proben von Patienten mit „intermediate-risk“-MDS (Abbildung 6A). In den 24 primären MDS-Patientenproben, bei denen der IPSS-Score berechnet werden konnte, wurden signifikante Unterschiede hinsichtlich der Apoptose-Induktion festgestellt, wenn gesunde Kontrollproben mit „intermediate-risk 1“, „intermediate-risk 2“ und „high-risk“ verglichen wurden. Außerdem zeigte sich ein signifikanter Unterschied beim Vergleich von „low-risk“-MDS mit „high-risk“-MDS (Abbildung 6B). Ein ähnliches Muster konnte beobachtet werden, wenn MDS-Patienten nach der WHO-Klassifikation (2008) eingeteilt wurden. Diese Klassifikation basiert primär auf dem histomorphologischen Befund und beinhaltet keine klinischen Parameter. Signifikante Unterschiede in der Apoptose-Induktion wurden beim Vergleich von gesundem Knochenmark mit Patientenproben der Gruppen „RAEB-1“, „RAEB-2“ und „sAML“ entdeckt. Außerdem wurden in „RAEB-1“ und „sAML“ gegenüber „RARS“ signifikant mehr Zellen durch ABT-199 getötet. Dies zeigte sich auch bei „RCMD“ gegenüber „RAEB-1“ und „sAML“ (Abbildung 6C). Die erhebliche Heterogenität humaner Myelodysplastischer Syndrome wird teilweise durch zytogenetische Aberrationen erklärt, die zunehmend für die Prognoseeinschätzung verwendet werden. Aus diesem Grund wurde unsere Kohorte nach der zytogenetischen Risikoklassifikation von Schanz *et al.* analysiert, um zu testen, ob zytogenetische Aberrationen den Effekt von ABT-199 beeinflussen. Beim Vergleich der Zelltodinduktion in Knochenmarkproben von Patienten mit „günstiger“ Prognose, „intermediärer“ Prognose und „(sehr) ungünstiger“ Prognose konnte ein Trend zum signifikanten Unterschied (einseitige ANOVA $p < 0.054$) festgestellt werden (Abbildung 6D). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Wirkung von ABT-199 in CD34⁺ Zellen mit zunehmender Risikogruppe steigt.

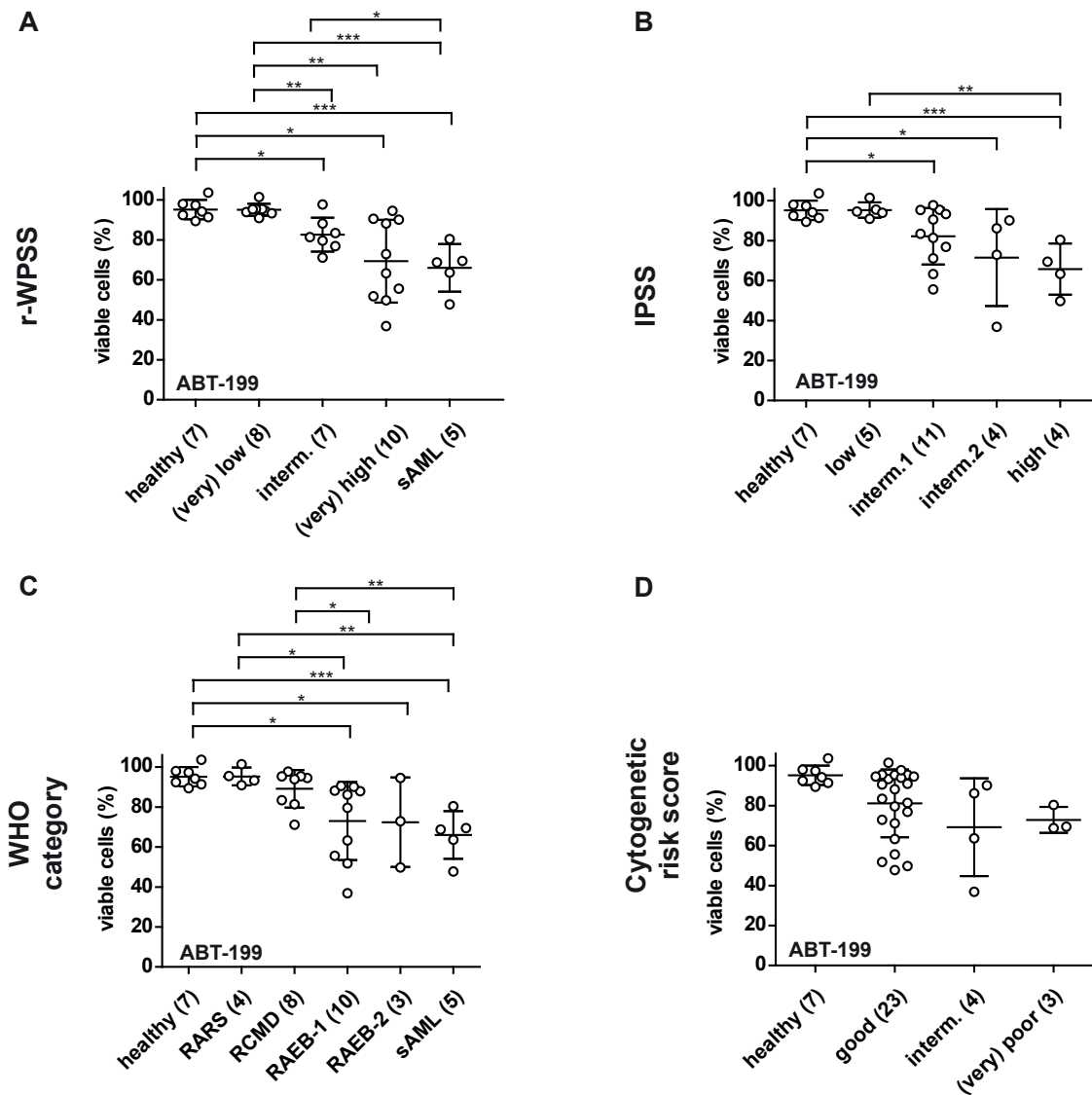


Abbildung 6: Die Wirksamkeit von ABT-199 in Progenitor-/Stammzellen steigt mit der MDS-Risikogruppe. Die Viabilität von CD34⁺ mononukleären Knochenmarkzellen von MDS-Patienten unterschiedlicher Risikogruppen wurde in der Durchflußzytometrie nach Färbung auf Annexin V und 7AAD bestimmt. Gezeigt wird jeweils das Verhältnis zwischen lebenden Zellen nach Inhibitor-Behandlung und lebenden Zellen nach Behandlung mit der Lösungsmittelkontrolle (DMSO) für 72h. Aufgetragen sind zudem der Median und die Standardabweichung. Die Ergebnisse der einseitigen ANOVA werden angegeben. Die Ergebnisse des paarweisen post-hoc *t*-Tests werden in der Abbildung angezeigt (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.005$, *** = $p < 0.0005$). Die paarweisen Differenzen der Mittelwerte mit 95%-Konfidenzintervall sind in Tabelle 10 aufgelistet. **(A)** CD34⁺ mononukleäre Knochenmarkzellen von 7 gesunden Spendern, 8 Patienten der r-WPSS-Kategorie „(very) low-risk“, 7 Patienten der r-WPSS-Kategorie „intermediate-risk“, 10 Patienten der r-WPSS-Kategorie „(very) high-risk“ und 5 Patienten mit sAML aus MDS wurden für 72h mit ABT-199 (1 μ M) oder Lösungsmittelkontrolle (DMSO) behandelt. Der p-Wert der einseitigen ANOVA betrug < 0.0001 . **(B)** CD34⁺ mononukleäre Knochenmarkzellen von 7 gesunden Spendern, 5 Patienten der IPSS-Kategorie „low-risk“, 11 Patienten der IPSS-Kategorie „intermediate-risk 1“, 4 Patienten der IPSS-Kategorie „intermediate-risk 2“ und 4 Patienten der IPSS-Kategorie „high-risk“ wurden für 72h mit ABT-199 (1 μ M) oder Lösungsmittelkontrolle (DMSO) behandelt. Der p-Wert der einseitigen ANOVA betrug 0.0036. **(C)** CD34⁺ mononukleäre Knochenmarkzellen von 7 gesunden Spendern, 4 Patienten der WHO-Kategorie „RARS“, 8 Patienten der WHO-Kategorie „RCMD“, 10 Patienten der WHO-Kategorie „RAEB-1“, 3 Patienten der WHO-Kategorie „RAEB-2“ und 5 Patienten mit sAML wurden für 72h mit ABT-199 (1 μ M) oder Lösungsmittelkontrolle (DMSO) behandelt. Der p-Wert der einseitigen ANOVA betrug 0.0018. **(D)** CD34⁺ mononukleäre Knochenmarkzellen von 7 gesunden Spendern, 23 Patienten mit „günstiger“ Prognose, 4 Patienten mit „intermediärer“ Prognose und 3 Patienten mit „(sehr) ungünstiger“ Prognose nach der zytogenetischen Einteilung von Schanz *et al.* wurden für 72h mit ABT-199 (1 μ M) oder Lösungsmittelkontrolle (DMSO) behandelt. Der p-Wert der einseitigen ANOVA betrug 0.0541.

Das primäre Ziel einer Behandlung mit niedermolekularen Inhibitoren ist es, möglichst gezielt Zelltod in den MDS-Stammzellen zu induzieren. MDS-Zellen reifen zwar aus, tragen dann aber nicht zu einer effektiven Hämatopoese bei. Um zu verstehen, ob ABT-199 auch das Überleben differenzierterer Zellpopulationen beeinflusst, wurde die Apoptose-Induktion ebenfalls in der Gesamtheit der mononukleären Knochenmarkszellen bestimmt. Auch hier zeigte sich, dass das Knochenmark gesunder Spender (n=14) von einer Zelltod-Induktion durch ABT-199 unbeeinflusst bleibt (Abbildung 7). Bei Analyse der Patientendaten nach r-WPSS konnten im Vergleich zu der gesunden Kontrollkohorte signifikante Unterschiede in der Apoptose-Induktion bei Patienten der Risikogruppen „intermediate-risk“, „(very) high-risk“ und „sAML“ festgestellt werden. Außerdem wurde in diesen Patientengruppen auch im Vergleich zu „low-risk“-MDS signifikant mehr Apoptose ausgelöst (Abbildung 7A). Ähnliche Ergebnisse wurden erzielt, wenn die Patienten nach weiteren Klassifikationssystemen eingeteilt wurden. Bei Verwendung des IPSS wurden im Vergleich zu gesunden Spendern bei MDS-Patienten mit „intermediate-risk 1“, „intermediate-risk 2“ und „high-risk“ signifikant mehr Knochenmarkszellen durch ABT-199 getötet. Außerdem ließ sich hier auch ein signifikanter Unterschied beim Vergleich von „low-risk“ mit „intermediate-risk 1“ und „intermediate-risk 2“ feststellen (Abbildung 7B). Wenn Patienten nach histomorphologischen Parametern der WHO-Klassifikation gruppiert wurden, starben „RAEB-1“- und „sAML“-Proben als Reaktion auf ABT-199 signifikant besser ab als gesundes Knochenmark, „RARS“- und „RCMD“-Proben (Abbildung 7C). Für den zytogenetischen Risikoscore nach Schanz *et al.* konnte in der Gesamtheit der Knochenmarkszellen im Vergleich zu gesundem Knochenmark eine signifikante Apoptose-Induktion für MDS-Patienten mit „günstiger“ Prognose, „intermediärer“ Prognose und „(sehr) ungünstiger“ Prognose nachgewiesen werden (Abbildung 7D). Zusammenfassend konnten in allen MDS-Klassifikationssystemen signifikante Unterschiede hinsichtlich der Apoptose-Induktion zwischen Proben niedrigerer und höherer Risikogruppen beobachtet werden. Dies zeigt, dass die Wirkung von ABT-199 auch in der Gesamtheit mononukleärer Knochenmarkszellen mit zunehmender MDS-Risikogruppe steigt.

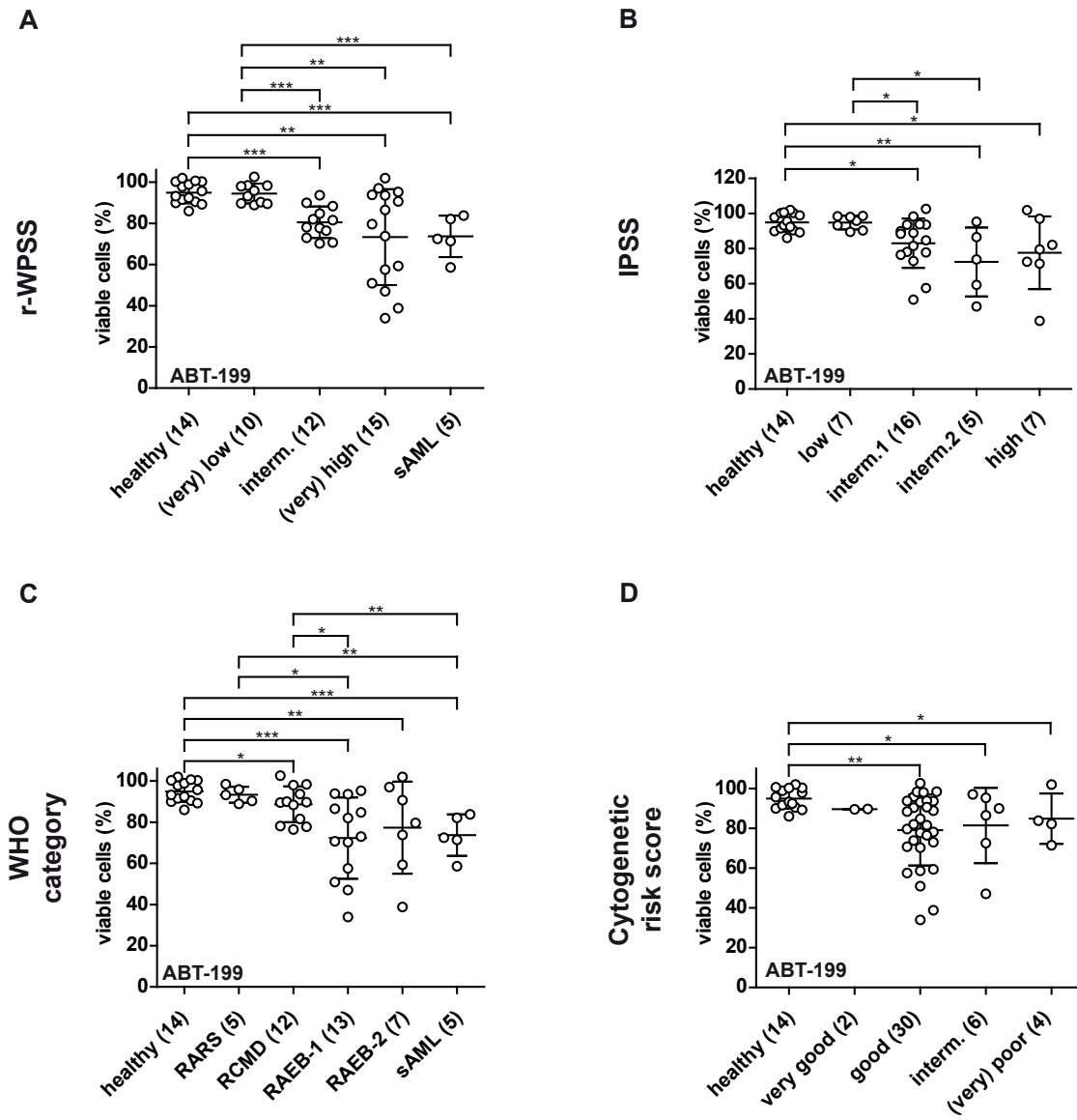


Abbildung 7: Die Wirksamkeit von ABT-199 in reifen Knochenmarkzellen steigt mit der MDS-Risikogruppe. Die Viabilität reifer mononukleärer Knochenmarkzellen von MDS-Patienten unterschiedlicher Risikogruppen wurde in der Durchflußzytometrie nach Färbung auf Annexin V und 7AAD bestimmt. Gezeigt wird jeweils das Verhältnis zwischen lebenden Zellen nach Inhibitor-Behandlung und lebenden Zellen nach Behandlung mit der Lösungsmittelkontrolle (DMSO) für 72h. Aufgetragen sind zudem der Median und die Standardabweichung. Die Ergebnisse der einseitigen ANOVA werden angegeben. Die Ergebnisse des paarweisen post-hoc *t*-Tests werden in der Abbildung angezeigt (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.005$, *** = $p < 0.0005$). Die paarweisen Differenzen der Mittelwerte mit 95%-Konfidenzintervall sind in Tabelle 11 aufgelistet. **(A)** Mononukleäre Knochenmarkzellen von 14 gesunden Spendern, 10 Patienten der r-WPSS-Kategorie „(very) low-risk“, 12 Patienten der r-WPSS-Kategorie „intermediate-risk“, 15 Patienten der r-WPSS-Kategorie „(very) high-risk“ und 5 Patienten mit sAML aus MDS wurden für 72h mit ABT-199 (1 μ M) oder Lösungsmittelkontrolle (DMSO) behandelt. Der p-Wert der einseitigen ANOVA betrug 0.0001. **(B)** Mononukleäre Knochenmarkzellen von 14 gesunden Spendern, 7 Patienten der IPSS-Kategorie „low-risk“, 16 Patienten der IPSS-Kategorie „intermediate-risk 1“, 5 Patienten der IPSS-Kategorie „intermediate-risk 2“ und 7 Patienten der IPSS-Kategorie „high-risk“ wurden für 72h mit ABT-199 (1 μ M) oder Lösungsmittelkontrolle (DMSO) behandelt. Der p-Wert der einseitigen ANOVA betrug 0.0003. **(C)** Mononukleäre Knochenmarkzellen von 14 gesunden Spendern, 5 Patienten der WHO-Kategorie „RARS“, 12 Patienten der WHO-Kategorie „RCMD“, 13 Patienten der WHO-Kategorie „RAEB-1“, 7 Patienten der WHO-Kategorie „RAEB-2“ und 5 Patienten mit sAML wurden für 72h mit ABT-199 (1 μ M) oder Lösungsmittelkontrolle (DMSO) behandelt. Der p-Wert der einseitigen ANOVA betrug 0.0005. **(D)** Mononukleäre Knochenmarkzellen von 14 gesunden Spendern, 2 Patienten mit „sehr günstiger“ Prognose, 30 Patienten mit „günstiger“ Prognose, 6 Patienten mit „intermediärer“ Prognose und 4 Patienten mit „(sehr) ungünstiger“ Prognose nach der zytogenetischen Einteilung von Schanz *et al.* wurden für 72h mit ABT-199 (1 μ M) oder Lösungsmittelkontrolle (DMSO) behandelt. Der p-Wert der einseitigen ANOVA betrug 0.0417.

Im Folgenden sollen die statistischen Methoden zur Ermittlung der Apoptose-Induktion durch ABT-199 kurz erläutert werden. Die Abbildungen 6 und 7 stellen die Toxizität des BCL-2-Inhibitors in verschiedenen MDS-Risikogruppen dar. Aufgrund der vielen Einzelvergleiche würde der *t*-Test für unabhängige Stichproben die Wahrscheinlichkeit für einen Fehler 1. Art, also die Nullhypothese fälschlicherweise abzulehnen, deutlich erhöhen. Stattdessen wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Hierdurch überprüft man mit nur einem Test, ob die Mittelwerte über alle Gruppen gleich sind. Die Ergebnisse der einseitigen ANOVA werden in den Bildunterschriften der Abbildungen 6 und 7 angegeben. Bei einem *p*-Wert <0.05 kann man die Aussage treffen, dass sich mindestens zwei der Gruppen statistisch signifikant voneinander unterscheiden. In diesem Fall wurden paarweise post-hoc Vergleiche der Gruppenmittelwerte mit *t*-Tests durchgeführt, um herauszufinden, welche Gruppen sich genau unterscheiden. Die Resultate dieser sogenannten Bonferroni-Korrektur werden in den Abbildungen 6 und 7 angezeigt. Dieses statistische Verfahren reduziert die Zahl der Tests und sorgt für eine größere Übersichtlichkeit der Grafiken. Alternativ hierzu können die Effektgrößen beschrieben werden, wenn man die paarweisen Differenzen der Mittelwerte mit 95%-Konfidenzintervall angibt. Somit kann man die Unterschiede hinsichtlich der Zelltod-Induktion in einem klinisch relevanten Kontext interpretieren und erhält durch das Konfidenzintervall auch noch zusätzliche Aussagen über die Präzision der Schätzung. Ist der Wert 0 nicht im Konfidenzintervall enthalten, spricht man von einem statistisch signifikanten Ergebnis. Die paarweisen Differenzen der Mittelwerte mit 95%-Konfidenzintervall sind in den Tabellen 10 und 11 aufgelistet.

Ergebnisse

| Abbildung | Gruppenvergleich | Differenz der Mittelwerte | 95%-KI |
|-----------------------------------|---|---------------------------|-----------------|
| 6A | healthy vs. (very) low-risk | 0.1345 | [-19.49;19.76] |
| | healthy vs. intermediate-risk | 12.55 | [-7.712;32.82] |
| | healthy vs. (very) high-risk | 25.83 | [7.151;44.52] |
| | healthy vs. sAML | 29.18 | [6.982;51.38] |
| | (very) low-risk vs. intermediate-risk | 12.42 | [-7.202;32.04] |
| | (very) low-risk vs. (very) high-risk | 25.70 | [7.716;43.68] |
| | (very) low-risk vs. sAML | 29.05 | [7.433;50.66] |
| | intermediate-risk vs. (very) high-risk | 13.28 | [-5.404;31.96] |
| | intermediate-risk vs. sAML | 16.63 | [-5.573;38.83] |
| (very) high-risk vs. sAML | 3.347 | [-17.42;24.11] | |
| 6B | healthy vs. low risk | -1.856 | [-23.60;23.41] |
| | healthy vs. intermediate-risk 1 | 13.00 | [-6.405;32.41] |
| | healthy vs. intermediate-risk 2 | 23.69 | [-1.474;48.85] |
| | healthy vs. high-risk | 29.43 | [4.273;54.59] |
| | low-risk vs. intermediate-risk 1 | 13.10 | [-8.554;34.75] |
| | low-risk vs. intermediate-risk 2 | 23.78 | [-3.148;50.71] |
| | low-risk vs. high-risk | 29.53 | [2.600;56.46] |
| | intermediate-risk 1 vs. intermediate-risk 2 | 10.68 | [-12.75;34.12] |
| | intermediate-risk 1 vs. high-risk | 16.43 | [-7.007;39.87] |
| intermediate-risk 2 vs. high-risk | 5.748 | [-22.64;34.13] | |
| 6C | healthy vs. RARS | -0.1043 | [-27.41;27.20] |
| | healthy vs. RCMD | 6.067 | [-16.48;28.61] |
| | healthy vs. RAEB-1 | 22.18 | [0.7134;43.65] |
| | healthy vs. RAEB-2 | 22.80 | [-7.263;52.85] |
| | healthy vs. sAML | 29.18 | [3.676;54.69] |
| | RARS vs. RCMD | 6.171 | [-20.50;32.85] |
| | RARS vs. RAEB-1 | 22.28 | [-3.486;48.05] |
| | RARS vs. RAEB-2 | 22.90 | [-10.37;56.17] |
| | RARS vs. sAML | 29.29 | [0.06547;58.51] |
| | RCMD vs. RAEB-1 | 16.11 | [-4.549;36.77] |
| | RCMD vs. RAEB-2 | 16.73 | [-12.76;46.22] |
| | RCMD vs. sAML | 23.11 | [-1.718;47.95] |
| | RAEB-1 vs. RAEB-2 | 0.6160 | [-28.06;29.29] |
| RAEB-1 vs. sAML | 7.002 | [-16.86;30.86] | |
| RAEB-2 vs. sAML | 6.386 | [-25.43;38.20] | |
| 6D | healthy vs. good | 14.10 | [-5.180;33.38] |
| | healthy vs. intermediate | 25.99 | [-2.004;53.99] |
| | healthy vs. (very) poor | 22.34 | [-8.485;53.16] |
| | good vs. intermediate | 11.89 | [-12.31;36.09] |
| | good vs. (very) poor | 8.237 | [-19.18;35.66] |
| | intermediate vs. (very) poor | -3.654 | [-37.77;30.46] |

Tabelle 10: Die paarweisen Differenzen der Mittelwerte mit 95%-Konfidenzintervall zu Abbildung 6.

| Abbildung | Gruppenvergleich | Differenz der Mittelwerte | 95%-KI |
|-----------------|---|---------------------------|-----------------|
| 7A | healthy vs. (very) low-risk | 0.4197 | [-15.88;16.72] |
| | healthy vs. intermediate-risk | 14.35 | [-1.140;29.83] |
| | healthy vs. (very) high-risk | 21.58 | [6.947;36.21] |
| | healthy vs. sAML | 21.20 | [0.6852;41.71] |
| | (very) low-risk vs. intermediate-risk | 13.93 | [-2.929;30.78] |
| | (very) low-risk vs. (very) high-risk | 21.16 | [5.085;37.23] |
| | (very) low-risk vs. sAML | 20.78 | [-0.7870;42.34] |
| | intermediate-risk vs. (very) high-risk | 7.230 | [-8.018;22.48] |
| | intermediate-risk vs. sAML | 6.848 | [-14.11;27.80] |
| | (very) high-risk vs. sAML | -0.3813 | [-20.71;19.95] |
| 7B | healthy vs. low risk | 0.05000 | [-17.80;17.90] |
| | healthy vs. intermediate-risk 1 | 11.81 | [-2.302;25.92] |
| | healthy vs. intermediate-risk 2 | 22.50 | [2.414;42.59] |
| | healthy vs. high-risk | 17.26 | [-0.5872;35.11] |
| | low-risk vs. intermediate-risk 1 | 11.76 | [-5.714;29.23] |
| | low-risk vs. intermediate-risk 2 | 22.45 | [-0.1252;45.03] |
| | low-risk vs. high-risk | 17.21 | [-3.398;37.82] |
| | intermediate-risk 1 vs. intermediate-risk 2 | 10.69 | [-9.062;30.45] |
| | intermediate-risk 1 vs. high-risk | 5.453 | [-12.02;22.93] |
| | intermediate-risk 2 vs. high-risk | -5.240 | [-27.82;17.34] |
| 7C | healthy vs. RARS | 1.568 | [-20.37;23.50] |
| | healthy vs. RCMD | 6.222 | [-10.34;22.79] |
| | healthy vs. RAEB-1 | 22.64 | [6.426;38.86] |
| | healthy vs. RAEB-2 | 17.59 | [-1.896;37.08] |
| | healthy vs. sAML | 21.20 | [-0.7400;43.13] |
| | RARS vs. RCMD | 4.654 | [-17.76;27.07] |
| | RARS vs. RAEB-1 | 21.08 | [-1.081;43.23] |
| | RARS vs. RAEB-2 | 16.03 | [-8.627;40.68] |
| | RARS vs. sAML | 19.63 | [-7.001;46.26] |
| | RCMD vs. RAEB-1 | 16.42 | [-0.4333;33.28] |
| | RCMD vs. RAEB-2 | 11.37 | [-8.652;31.40] |
| | RCMD vs. sAML | 14.97 | [-7.437;37.39] |
| | RAEB-1 vs. RAEB-2 | -5.049 | [-24.79;14.69] |
| | RAEB-1 vs. sAML | -1.448 | [-23.60;20.71] |
| RAEB-2 vs. sAML | 3.601 | [-21.05;28.26] | |
| 7D | healthy vs. very good | 5.306 | [-28.48;39.09] |
| | healthy vs. good | 15.80 | [1.336;30.27] |
| | healthy vs. intermediate | 13.50 | [-8.306;35.31] |
| | healthy vs. (very) poor | 10.07 | [-15.27;35.41] |
| | very good vs. good | 10.50 | [-22.15;43.14] |
| | very good vs. intermediate | 8.198 | [-28.30;44.69] |
| | very good vs. (very) poor | 4.762 | [-33.95;43.47] |
| | good vs. intermediate | -2.299 | [-22.29;17.69] |
| | good vs. (very) poor | -5.735 | [-29.53;18.06] |
| | intermediate vs. (very) poor | -3.436 | [-32.29;25.42] |

Tabelle 11: Die paarweisen Differenzen der Mittelwerte mit 95%-Konfidenzintervall zu Abbildung 7.

3.1.4 ABT-737 und ABT-199 induzieren effektiv Zelltod in Vorläuferzellen von Hochrisiko-MDS/sAML und reduzieren deren Koloniebildung

Myelodysplastische Syndrome sind klonale Erkrankungen, die durch die maligne Transformation einer hämatopoetischen Stammzelle entstehen (4, 5). Um die Krankheit effektiv zu bekämpfen, ist es essenziell, gezielt Apoptose in den pathologischen Stamm- und Progenitorzellen zu induzieren. Die niedermolekularen Inhibitoren ABT-199 und ABT-737 töten effektiv CD34⁺ Knochenmarkszellen von Patienten mit Hochrisiko-MDS und

sAML (Abbildungen 5 und 6). Im Folgenden wurde untersucht, ob diese Substanzen auch die Koloniebildung hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen beeinflussen. Eine geeignete Methode hierfür ist die Methylzellulose-Analyse, welche die Häufigkeits- und Wachstumsverhältnisse hämatopoetischer Progenitorzellen in verschiedenen Entwicklungsstadien darstellt. Methylzellulose ist ein semisolid, mit Zytokinen und Wachstumsfaktoren (rh SCF, rh GM-CSF, rh IL-3, rh EPO) angereichertes Medium. Werden individuelle Progenitorzellen, sogenannte Kolonie-bildenden Zellen (CFCs, Colony-forming Cells) in Methylzellulose kultiviert, proliferieren sie und differenzieren sich. Basierend auf der Morphologie und Zellart der gebildeten Kolonien können die zugrunde liegenden CFCs klassifiziert werden. BFU-E-Kolonien bestehen aus frühen erythroiden Vorläuferzellen. CFU-GM erzeugt eine Kolonie aus mindestens 20 Granulozyten (CFU-G), Makrophagen (CFU-M) oder Zellen beider Linien (CFU-GM). CFU-GEMM entsteht aus einer multipotenten Progenitorzelle und enthält Erythroblasten sowie Zellen aus mindestens zwei anderen Reihen. Zur genauen Untersuchung der Koloniebildung wurden nicht-aufgereinigte mononukleäre Zellen (1×10^4) nach 72-stündiger Behandlung mit ABT-199 ($1 \mu\text{M}$) bzw. ABT-737 ($1 \mu\text{M}$) in der mit Wachstumsfaktoren angereicherten Methylzellulose ausplattiert. DMSO-vorbehandelte Proben dienten dabei als Lösungsmittelkontrolle. Nach 14 Tagen wurden die gebildeten Kolonien (BFU-E, CFU-GM und CFU-GEMM) ausgezählt und die Gesamtkoloniezahl bestimmt. Hier zeigte sich, dass eine pro-apoptotische Behandlung mit ABT-199 bzw. ABT-737 die Stamm-/Vorläuferzellen von Patienten mit Hochrisiko-MDS/sAML so dezimiert, dass es zu einer signifikanten Verminderung in der Koloniebildung kommt (Abbildungen 8A und B, „high-risk“, „sAML“). Wie in den FACS-Analysen war die Koloniezahl in gesunden Knochenmarkzellen nach Behandlung mit ABT-737 bzw. ABT-199 nicht vermindert (Abbildungen 8A und B, „healthy“). Auch in der Gruppe der Patienten mit niedrigem (Abbildungen 8A und B, „low-risk“) oder intermediärem Risiko (Abbildungen 8A und B, „intermediate-risk“) war die Anzahl an Kolonien nach Einsatz der Inhibitoren unverändert. Bei den Patienten mit Hochrisiko-MDS bzw. sAML zeigte sich jedoch eine deutlich verminderte Koloniezahl (Abbildungen 8A und B, „high-risk“, „sAML“). Zusätzlich wurden einige Patientenproben mit beiden Inhibitoren behandelt, um deren Effekt direkt zu vergleichen. Dabei zeigte sich in der Gesamtzahl der Kolonien in Hochrisiko-MDS und sAML eine ähnliche Wirkung der Inhibitoren (Abbildung 8B). Zusammenfassend induzieren ABT-199 und ABT-737 Apoptose im Kompartiment der Stamm- und Progenitorzellen von Hochrisiko-MDS

und sAML und reduzieren hierdurch die Koloniebildung effektiv. Bezüglich ihrer Wirkung zeigten beide Inhibitoren ein ähnliches Potenzial. Gesunde Kontrollen blieben von der Inhibitor-Behandlung unbeeinträchtigt. Auch wenn in den Kurzzeitversuchen ABT-737 einer rein selektiven BCL-2-Inhibition überlegen war, überzeugte ABT-199 in den Langzeitversuchen durch eine effektive Reduktion der Koloniebildungsfähigkeit.

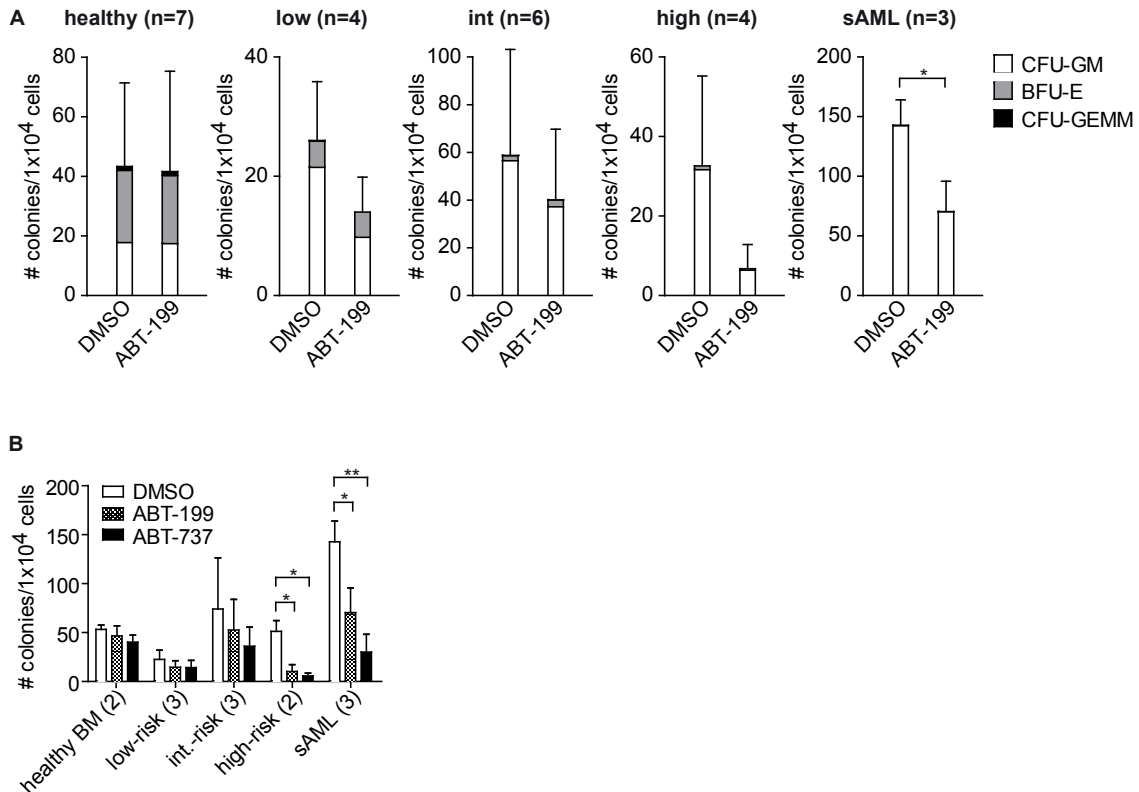


Abbildung 8: ABT-737 und ABT-199 treiben selektiv koloniebildende Stamm-/Progenitorzellen von Hochrisiko-MDS/sAML-Patienten in den Zelltod. Mononukleäre Knochenmarkszellen wurden nach 72-stündiger Behandlung mit ABT-199 (1µM) bzw. ABT-737 (1µM) in die mit Wachstumsfaktoren angereicherte Methylcellulose überführt. Als Lösungsmittelkontrolle dienten DMSO-vorbehandelte Proben. Nach 14 Tagen wurden die gebildeten Kolonien (CFU-GM, CFU-GEMM und BFU-E) ausgezählt und die Gesamtkoloniezahl bestimmt. Die Experimente wurden in Duplikaten durchgeführt, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die Proben wurden nach r-WPSS klassifiziert. Die Anzahl der Replikate ist jeweils angegeben. Die Ergebnisse des paarweisen post-hoc *t*-Tests werden in der Abbildung angezeigt (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.005$, *** = $p < 0.0005$). (A) Gezeigt wird die Gesamtkoloniezahl als gestapeltes Balkendiagramm der einzelnen Koloniearten für die MDS-Risikogruppen bzw. sAML nach Behandlung mit ABT-199 bzw. Lösungsmittelkontrolle (DMSO). (B) Gezeigt wird im direkten Vergleich die Gesamtzahl der Kolonien in Proben von 2 gesunden Patienten, 3 Patienten mit „low-risk“-MDS, 3 Patienten mit „intermediate-risk“-MDS, 2 Patienten mit „high-risk“-MDS und 3 Patienten mit sAML nach paralleler Behandlung mit ABT-199 und ABT-737 bzw. Lösungsmittelkontrolle (DMSO).

3.1.5 Die pro-apoptotische Wirkung von ABT-737 wird durch die protektive Wirkung von Stromazellen nur partiell aufgehoben

Im Knochenmark interagieren mesenchymale Stromazellen eng mit hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen (63-65). Diese Knochenmarksnische bietet für MDS-Zellen ein protektives Milieu (55, 56). Deshalb ist es für eine erfolgreiche MDS-Therapie maßgeblich, auch die Unterstützung durch Stromazellen zu berücksichtigen

(66, 67). Um der Situation *in vivo* möglichst nahe zu kommen, wurden MDS-Zellen in Anwesenheit der murinen Stromazelllinie EL08-1D2 kultiviert und mit ABT-737 (1 μ M) behandelt. EL08-1D2-Zellen unterstützen primitive humane CAFC (Cobblestone Area-forming Cells) (68), begünstigen die humane embryonale Stammzellendifferenzierung in hämatopoetische Zellen und fördern deren Überleben *in vitro* (69, 70). Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zeigten eine signifikante Apoptose-Induktion in CD34⁺ mononukleären Knochenmarkzellen von Patienten mit Hochrisiko-MDS/sAML. Zudem übte ABT-737 selbst keinen toxischen Effekt auf die Stromazellen aus. Um eine valide Aussage bezüglich der Stromazellunterstützung treffen zu können, ist es besonders wichtig, dass man ein und dieselbe Probe mit und ohne Stromazellen kultiviert. Hierfür sollte nun der Effekt von ABT-737 (1 μ M) im direkten Vergleich von drei „high-risk“-MDS/sAML-Proben untersucht werden. Bei Ko-Kultur von CD34⁺ mononukleären Knochenmarkzellen mit der murinen Stromazelllinie EL08-1D2 zeigte sich nach 72h kein statistisch signifikanter Unterschied in der Apoptose-Induktion durch ABT-737 mit oder ohne Stromazellsupport (Abbildung 9). Eine partielle Protektion durch Stromazellen konnte nur in einer Hochrisiko-Probe (Abbildung 9, „high-risk“ #1) beobachtet werden. In zwei anderen Proben (Abbildung 9, „high-risk“ #2 und „sAML“) wurde trotz Stroma-Unterstützung effektiv Apoptose induziert. Man kann also davon ausgehen, dass in Hochrisiko-MDS/sAML auch bei intakter Mikroumgebung *in vivo* eine effektive Apoptose-Induktion durch pro-apoptotische Substanzen möglich ist.

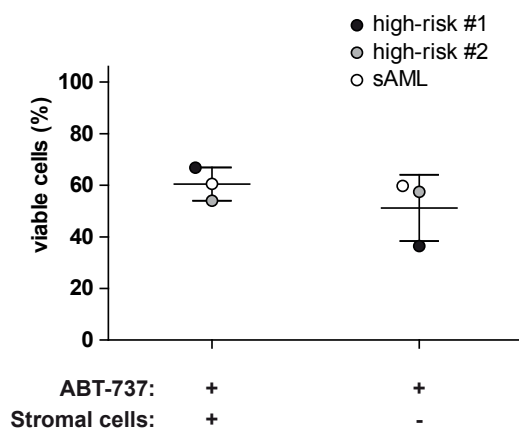


Abbildung 9: Stromazellen vermindern die Apoptose-Induktion in Stamm-/Progenitorzellen von Hochrisiko-MDS/sAML nur geringfügig. CD34⁺ mononukleäre Knochenmarkzellen von 2 Patienten mit Hochrisiko-MDS und 1 Patienten mit sAML wurden in An- und Abwesenheit der Stromazelllinie EL08-1D2 kultiviert und mit ABT-737 (1 μ M) oder Lösungsmittelkontrolle (DMSO) für 72h behandelt. Die Viabilität wurde in der Durchflußzytometrie nach Färbung auf Annexin V und 7AAD bestimmt. Gezeigt wird jeweils das Verhältnis zwischen lebenden Zellen nach Inhibitor-Behandlung und lebenden Zellen nach Behandlung mit der Lösungsmittelkontrolle für 72h. Die Risikostratifizierung erfolgte mittels r-WPSS. Aufgetragen sind zudem der Median und die Standardabweichung. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Apoptose-Induktion mit oder ohne Stromazellunterstützung mit einem p-Wert von 0.3264 im *t*-Test für unabhängige Stichproben.

3.2 Die Ermittlung potenzieller Biomarker für eine Behandlung mit ABT-199 und ABT-737

3.2.1 Die Proteinexpression kritischer BCL-2-Familienmitglieder korreliert mit der Viabilität nach Inhibitor-Behandlung

In Zellkultur-Experimenten und in der Methylzellulose-Analyse konnte gezeigt werden, dass Knochenmarkzellen von Patienten mit Niedrigrisiko-MDS im Vergleich zu Patienten mit Hochrisiko-MDS resistent gegenüber einer Behandlung mit niedermolekularen Inhibitoren sind (Abbildungen 6, 7 und 8). Dabei war das Ansprechen auch innerhalb der Hochrisiko-Gruppe heterogen, einige Patientenproben starben in dieser Gruppe als Reaktion auf ABT-199 deutlich besser ab als andere (Abbildungen 6 und 7). Es ist von großer Bedeutung, die potenziellen Mechanismen besser zu verstehen, die Sensitivität oder Resistenz von Zellen gegenüber einer Inhibitorbehandlung mit ABT-199 und ABT-737 vermitteln. Auch hinsichtlich einer möglichen klinischen Anwendung ist es äußerst relevant, Biomarker zu finden, die das bessere oder schlechtere Ansprechen innerhalb der Hochrisikogruppe erklären. ABT-199 und ABT-737 besitzen ein unterschiedliches Proteinbindungsspektrum. Während ABT-737 die anti-apoptotischen BCL-2-Proteine BCL-2, BCL-X_L und BCL-W hemmt, inhibiert ABT-199 ausschließlich BCL-2. Indem man die Wirksamkeit beider Inhibitoren in einer Patientenprobe vergleicht, können funktionelle Rückschlüsse über die Relevanz der anti-apoptotischen BCL-2-Proteine gezogen werden. Diese theoretischen Überlegungen sollten durch die Quantifizierung relevanter Proteine verifiziert werden. Aus diesem Grund wurde bei einer Kohorte von MDS-Proben die Proteinexpression von BCL-2, BCL-X_L und MCL-1 mittels MFI (Mean Fluorescence Intensity) in der intrazellulären Durchflusszytometrie bestimmt. Gleichzeitig wurden die Patientenproben mit ABT-199 (1µM) und ABT-737 (1µM) behandelt und die Viabilität der Zellen nach 72 Stunden mittels Durchflusszytometrie gemessen. So konnte in jeder Probe die Apoptose-Induktion im Vergleich zur Proteinexpression untersucht werden. In Übereinstimmung mit den Daten aus Zellkultur und der Methylzellulose-Analyse blieben die meisten „low-risk“-Proben unbeeinträchtigt von einer Behandlung mit ABT-199 und ABT-737, wohingegen in den meisten „high-risk“-sAML-Proben effektiv Apoptose induziert wurde (Abbildung 10). Die Resistenz gegenüber der Zelltodinduktion durch ABT-199 oder ABT-737 wurde weitgehend durch die Expression des anti-apoptotischen BCL-2-Proteins MCL-1 bestimmt (Abbildung 10, vgl. #1 - #9). Dies ist dadurch zu erklären, dass beide Inhibitoren MCL-1 nicht inhibieren. Im Vergleich zu „high-risk“-Proben war die Expression von MCL-1

substanziell erhöht in MDS-Proben niedrigerer Risikogruppen. Die kritische Rolle, die MCL-1 in der Apoptose-Resistenz einnimmt, kann auch anhand einer individuellen „high-risk“-Probe mit erhöhter MCL-1-Expression verdeutlicht werden (Abbildung 10, #9). Obwohl die MDS-Probe von einem „high-risk“-Patienten stammte, war sie resistent gegenüber einer Behandlung mit jedem der beiden Inhibitoren. Außerdem konnte in diesem Experiment beobachtet werden, dass die Expression von BCL-X_L die Zelltodinduktion durch ABT-199, nicht aber durch ABT-737 verhindert. Dies lässt sich am Besten an den Proben #2 und #5 veranschaulichen und stimmt mit dem oben beschriebenen Bindungsprofil der beiden Inhibitoren überein. Insgesamt war die Expression von BCL-2 geringer als die BCL-X_L- oder MCL-1-Expression. Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die Expressionsstärke anti-apoptotischer BCL-2-Proteine weitgehend die unterschiedliche Sensitivität von MDS-Zellen gegenüber ABT-199 und ABT-737 bestimmt. Dabei sagen hohe intrazelluläre Proteinlevel von MCL-1 und BCL-X_L Resistenz gegenüber ABT-199 vorher, während die Expression von BCL-2 für Sensitivität gegenüber dem Inhibitor steht. Seinem Bindungsprofil entsprechend gilt für ABT-737 von den untersuchten Proteinen nur eine übermäßige MCL-1-Expression als Resistenzfaktor. Die Expressionsstärke der anti-apoptotischen BCL-2-Proteine BCL-2, BCL-X_L und MCL-1 stellt bei einer klinischen Anwendung der Inhibitoren also eine vielversprechende Möglichkeit für den Einsatz als Biomarker dar.

Ergebnisse

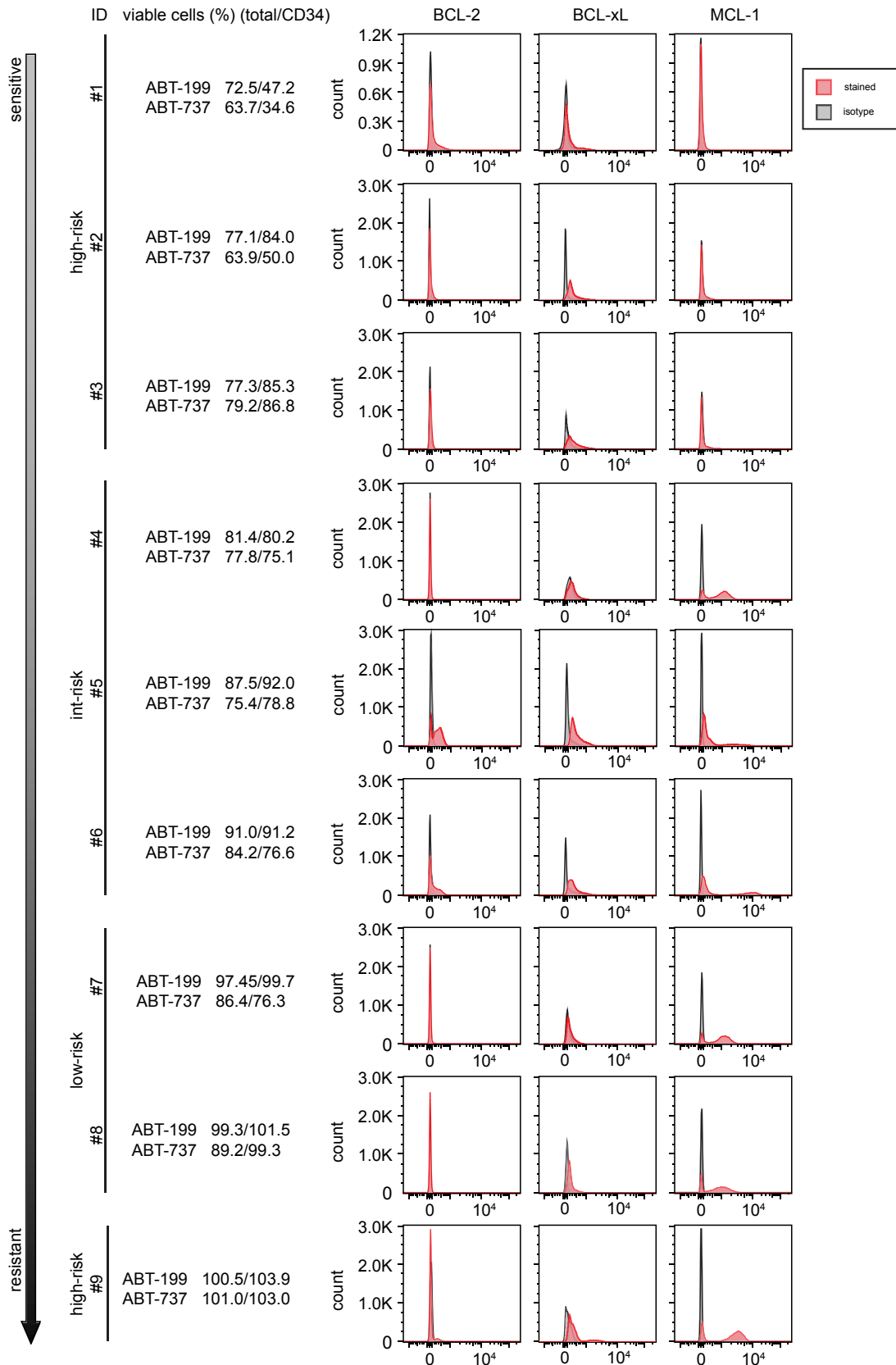


Abbildung 10: Erhöhte MCL-1-Proteinexpression vermittelt Resistenz gegenüber ABT-199 und ABT-737 in primären MDS-Proben. Proteinexpressionslevel von BCL-2, BCL-X_L und MCL-1 wurden mittels intrazellulärer Durchflusszytometrie gemessen, bevor die primären Patientenproben für 72h mit ABT-199 (1µM) bzw. ABT-737 (1µM) behandelt wurden. Gezeigt werden die Isotyp-Kontrollen (grau) und die Expressionslevel des angegebenen Proteins (rot) für jede Patientenprobe. Die Proben wurden anhand der Viabilität mononukleärer Knochenmarkzellen nach 72-stündiger Behandlung mit ABT-199 von sensitiv bis resistent klassifiziert. Die Viabilitätsmessung erfolgte mittels Färbung auf Annexin V und 7AAD. Die Risikogruppen wurden anhand des r-WPSS bestimmt.

Im Folgenden wurde die Beziehung zwischen der Expression der oben genannten anti-apoptotischen BCL-2-Proteine, gemessen mittels intrazellulärer Durchflusszytometrie, und dem Prozentsatz lebender Zellen nach Inhibitor-Behandlung genauer untersucht. Experimente mit 9 primären MDS-Proben zeigen, dass die Proteinexpressionsstärke der BCL-2-Proteine BCL-2, BCL-X_L und MCL-1 mit der Apoptose-Induktion durch ABT-199 und ABT-737 statistisch signifikant korreliert (Abbildung 11). Hierbei handelt es sich um eine Analyse der in Abbildung 10 einzeln aufgeführten Knochenmarkproben unterschiedlicher MDS-Risikogruppen. Gezeigt ist das Verhältnis zwischen lebenden Zellen nach Inhibitor-Behandlung mit ABT-199 (1µM) oder ABT-737 (1µM) und lebenden Zellen nach Behandlung mit der Lösungsmittelkontrolle (DMSO) für 72h. Die Proteinexpression wird dargestellt als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) in Relation zur Isotyp-Kontrolle. Die Assoziationsstärke zwischen MFI-Verhältnis und Viabilität wurde durch den Rangkorrelationskoeffizienten ρ nach Spearman beschrieben. Anschließend wurde der zweiseitige p-Wert mit einem Signifikanzniveau von 0.05 bestimmt. Die funktionelle Beziehung der Parameter wurde durch die Geradengleichung der linearen Regressionsanalyse dargestellt. Die Viabilität unter ABT-199 korrelierte invers mit der Summe der MFI von BCL-X_L und MCL-1, also Proteinen, die von dem Inhibitor unbeeinflusst bleiben (Abbildung 11A). Um das Verhältnis aller untersuchten anti-apoptotischen Proteine und ihren Effekt auf die Inhibitor-Behandlung mit ABT-199 darzustellen, wurde die Viabilität unter ABT-199 mit der Proteinexpression von BCL-2, das von ABT-199 inhibiert wird, im Verhältnis zur Expression von BCL-X_L und MCL-1, die nicht von ABT-199 inhibiert werden, verglichen (Abbildung 11B). Dabei korrelierte die Sensitivität der Zellen gegenüber ABT-199 mit einer in Relation zu BCL-X_L und MCL erhöhten BCL-2-Expression. Schließlich wurde die Viabilität unter ABT-737 und die Proteinexpression von BCL-2 und BCL-X_L, die durch ABT-737 inhibiert werden, und MCL-1, das durch ABT-737 nicht inhibiert wird, untersucht (Abbildung 11C). Auch hier konnte ein positiver Zusammenhang festgestellt werden. Dies zeigt, dass die Sensitivität der MDS-Zellen gegenüber einer Inhibitor-Behandlung mit ABT-199 und ABT-737 von der Proteinexpressionsstärke der inhibierten Proteine (BCL-2 für ABT-199 und BCL-2 und BCL-X_L für ABT-737) abhängt. Die MCL-1-Expression hingegen war ein Resistenzfaktor für beide Inhibitoren. Wenn man einen möglichen Einsatz der anti-apoptotischen BCL-2-Proteine als Biomarker in Erwägung zieht, können mithilfe dieser Methode Patienten mit einer hohen BCL-2- und niedrigen MCL-1-Expression ausgewählt werden, die wahrscheinlich auf eine Behandlung mit ABT-199 ansprechen.

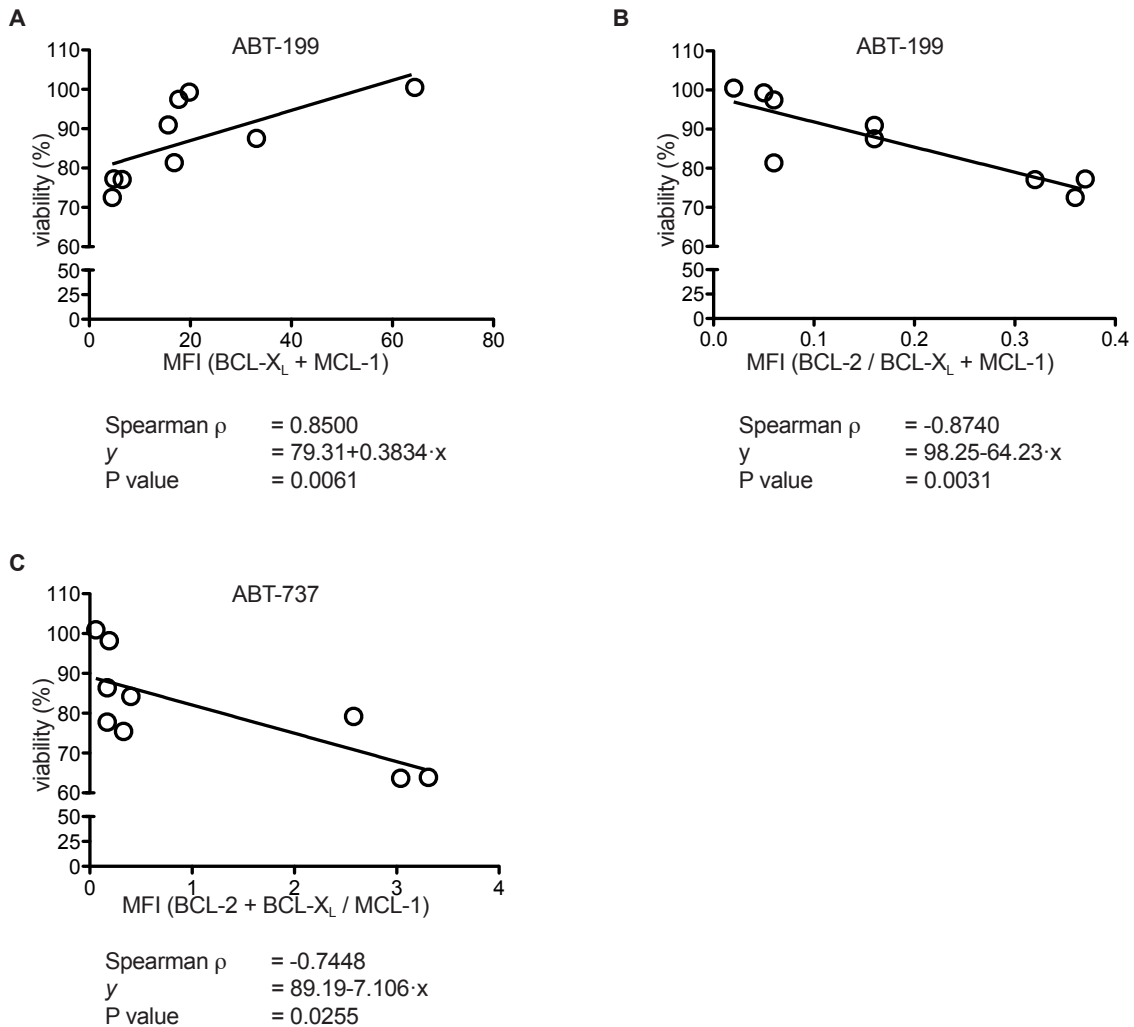


Abbildung 11: Die Proteinexpression kritischer BCL-2-Mitglieder korreliert mit der Viabilität nach Inhibitor-Behandlung mit ABT-199 oder ABT-737 in primären humanen MDS-Proben. Mononukleäre Knochenmarkszellen von insgesamt 9 MDS-Patienten, davon 2 Patienten mit „low-risk“-MDS, 3 Patienten mit „intermediate-risk“-MDS und 4 Patienten mit „high-risk“-MDS, wurden mit dem jeweiligen Inhibitor oder DMSO behandelt. Die Y-Achse zeigt das Verhältnis zwischen lebenden Zellen nach Inhibitor-Behandlung und lebenden Zellen nach Behandlung mit der Lösungsmittelkontrolle für 72h. Die Viabilitätsmessung erfolgte mittels Färbung auf Annexin V und 7AAD. Die Proteinexpression wird auf der X-Achse durch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) analog zu Abbildung 10 dargestellt. Diese wurde im Verhältnis zur jeweiligen Isotyp-Kontrolle berechnet. Die Assoziationsstärke zwischen MFI und Viabilität nach Inhibitor-Behandlung wurde über die Spearman-Korrelation bestimmt und der funktionelle Zusammenhang wurde über eine lineare Regressionsanalyse beschrieben. (A) Die Viabilität nach Behandlung mit ABT-199 (1 μ M) ist gegen die MFI-Summe von BCL- X_L und MCL-1 aufgetragen, um die Proteine darzustellen, die Resistenz gegenüber ABT-199 vermitteln. (B) Die Viabilität nach Behandlung mit ABT-199 (1 μ M) ist gegen die MFI von BCL-2 in Relation zu der MFI-Summe von BCL- X_L und MCL-1 aufgetragen, um die Expression der Proteine darzustellen, die Sensitivität (BCL-2) oder Resistenz (BCL- X_L und MCL-1) gegenüber ABT-199 vermitteln. (C) Die Viabilität nach Behandlung mit ABT-737 (1 μ M) ist gegen die MFI-Summe von BCL-2 und BCL- X_L in Relation zu der MFI von MCL-1 aufgetragen, um die Expression der Proteine darzustellen, die Sensitivität (BCL-2 und BCL- X_L) oder Resistenz (MCL-1) gegenüber ABT-737 vermitteln.

3.2.2 Die Apoptose-Induktion durch ABT-199 in MDS-Progenitorzellen ist unabhängig von prognostisch ungünstigen Mutationen in *RUNX1*, *ASXL1*, *TP53* und *EZH2*

Bei MDS-Patienten gehen somatische Mutationen in den Genen *ASXL1*, *RUNX1*, *TP53* und *EZH2* mit einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben einher (31). MDS-Patienten mit derartigen Mutationen weisen trotz initialem Ansprechen ein schlechteres

Gesamtüberleben unter Standardtherapie mit HMA und nach allogener Stammzelltransplantation auf (32-34). Daher ist es dringend notwendig, neue Therapieoptionen für dieses Patientenkollektiv zu entwickeln. Der selektive BCL-2-Inhibitor ABT-199 induziert effektiv Zelltod in Stamm- und Progenitorzellen von Patienten mit Hochrisiko-MDS- und sAML (Abbildungen 6 und 8). Im Folgenden sollte der Einfluss der Hochrisikomutationen *ASXL1*, *RUNX1*, *TP53* und *EZH2* auf die Apoptose-Induktion mit ABT-199 genauer untersucht werden. Es soll ausgeschlossen werden, dass die oben genannten Aberrationen eine *a priori* Resistenz gegenüber ABT-199 verursachen. Als initiales Screening-Instrument wurden Genexpressionsdaten von einer großen Kohorte von MDS-Patienten (n=90) und gesunden Kontrollprobanden (n=110) analysiert und mutierte und Wildtyp-Proben miteinander verglichen (Abbildung 12A und B). Wildtyppatienten zeigten keine erniedrigten BCL-2-Niveaus (Abbildung 12A). Interessanterweise zeigten sich zudem weder substanzielle Unterschiede zwischen MDS-Patienten und gesunden Kontrollen noch zwischen MDS-Patienten der Niedrigrisiko- und Hochrisiko-Gruppe (Abbildung 12A). Dies lässt vermuten, dass die Sensitivität der Hochrisiko-MDS-Proben für den selektiven BCL-2-Inhibitor ABT-199 nicht allein durch die mRNA-Expression von *BCL-2* bestimmt wird. Posttranskriptionale und posttranslationale Modifikationen können hierbei eine Rolle spielen. Auch muss das Zusammenspiel mehrerer Mitglieder der BCL-2-Familie mit in Betracht gezogen werden. So konnten statistisch signifikante Unterschiede in der Genexpression von *BIM* gemessen werden (Abbildung 12B), das BCL-2 antagonisiert und somit Apoptose-fördernd wirkt. Es wurde bereits beschrieben, dass bei der AML eine vermehrte BIM-Expression über eine verstärkte Stabilisierung von MCL-1 Resistenz gegenüber ABT-199 vermittelt (71). Entsprechend der Apoptose-Dysbalance in MDS (12, 39) war die Genexpression von *BIM* in fortgeschrittenen MDS-Stadien (RAEB-2) im Vergleich zu frühen MDS (RARS, RCMD) ($p=0.021$) oder zu intermediären MDS (RAEB-1) ($p=0.039$) signifikant verringert (Abbildung 12B). Dies stützt die Theorie einer zunehmenden Apoptose-Resistenz im Laufe der MDS-Progression. Das *BIM*-Expressionsmuster war unabhängig vom Mutationsstatus der untersuchten Kohorte (Abbildung 12B). Daraus folgt, dass individuelle somatische Mutationen die *BIM*-Expression in MDS nicht verändern und somit nicht zwangsläufig den Einsatz von ABT-199 in dieser Patientenkohorte ausschließen.

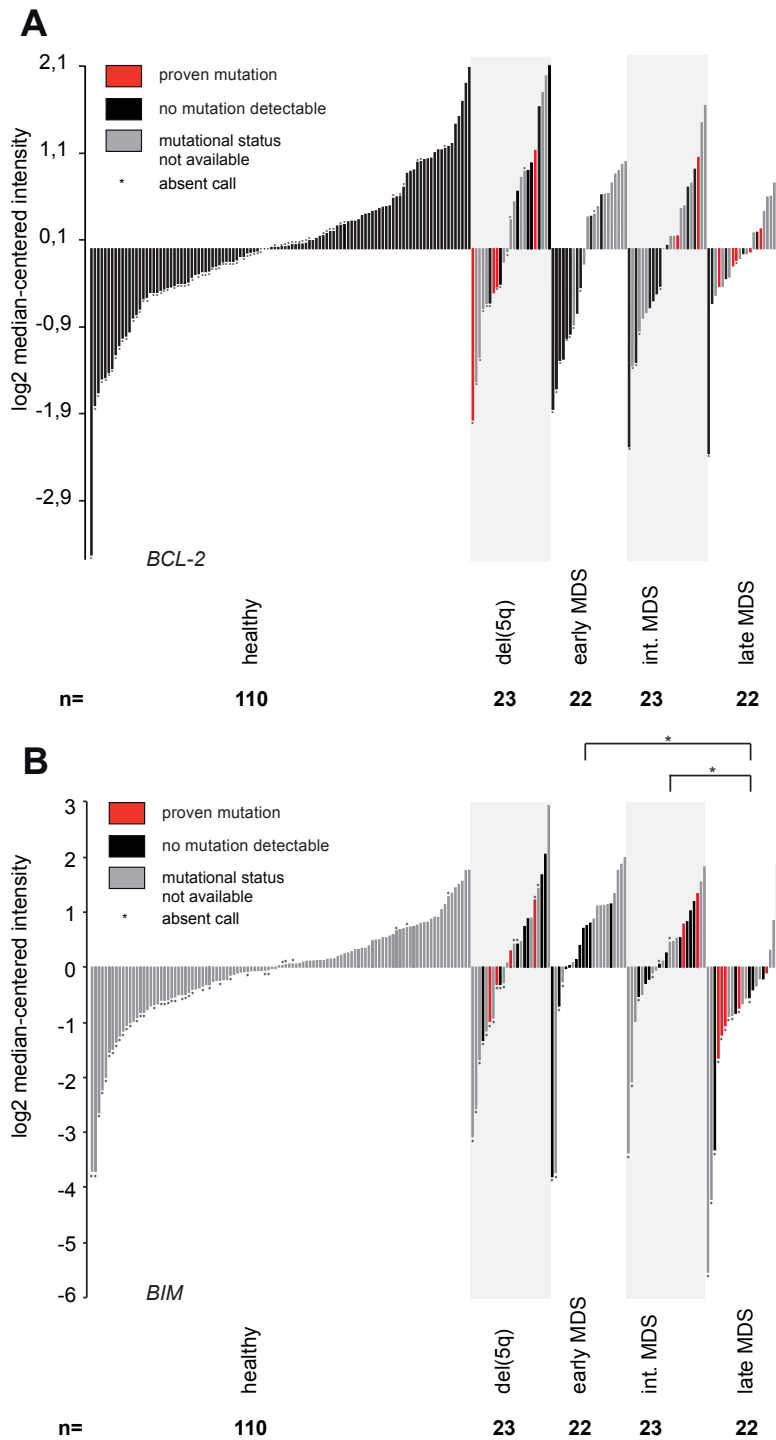


Abbildung 12: Die Genexpressionsanalyse kritischer Mitglieder der BCL-2-Familie zeigt eine reduzierte BIM-Genexpression in fortgeschrittenen MDS-Stadien. Die Genexpression wurde mit dem Human Genome U133 Plus 2.0 Array in 90 primären humanen MDS-Knochenmarkproben und 110 gesunden Kontrollprobanden gemessen. Mutierte Proben werden rot dargestellt und Wildtyp-Proben schwarz. Graue Balken stehen für Patienten ohne verfügbaren Mutationsstatus. Sterne kennzeichnen „absent calls“ mit geringer Signalintensität. Frühe MDS umfassen RARS und RCMD, intermediäres MDS wird durch RAEB-1, spätes MDS durch RAEB-2 definiert. **(A)** Gezeigt wird ein repräsentativer Graph (reporter 207004_at) für die Genexpression von *BCL-2*. Der Mutationsstatus hatte keinen Einfluss auf die *BCL-2*-Expression in MDS mit del(5q) (del(5q) mit Mutation vs. del(5q) ohne Mutation $p=0.16$), MDS-RAEB-1 (MDS-RAEB-1 mit Mutation vs. MDS-RAEB-1 ohne Mutation $p=0.18$), MDS-RAEB-2 (MDS-RAEB-2 mit Mutation vs. MDS-RAEB-2 ohne Mutation $p=0.31$). **(B)** Gezeigt wird ein repräsentativer Graph (reporter 208536_s_at) für die Genexpression von *BIM*. Der Mutationsstatus hatte keinen Einfluss auf die *BIM*-Expression in MDS mit del(5q) (del(5q) mit Mutation vs. del(5q) ohne Mutation $p=0.3$), MDS-RAEB-1 (MDS-RAEB-1 mit Mutation vs. MDS-RAEB-1 ohne Mutation ($p=0.26$) and MDS-RAEB-2 (MDS-RAEB-2 mit Mutation vs. MDS-RAEB-2 ohne Mutation ($p=0.82$)). Unabhängig vom Mutationsstatus ist die *BIM*-Expression in fortge-

schrittenen MDS (MDS-RAEB-2) im Vergleich zu frühen MDS ($p=0.021$) oder intermediären MDS ($p=0.039$) verringert.

Genexpressionsdaten können die Proteinexpression in primären Zellen nur teilweise widerspiegeln. Aus diesem Grund erfolgte zusätzlich die durchflusszytometrische Quantifizierung des anti-apoptotischen Proteins BCL-2 in primären MDS/sAML-Patientenproben mit Mutationen in *ASXL1*, *RUNX1*, *EZH2* oder *TP53* sowie Wildtyp-Patienten (Abbildung 13). In Übereinstimmung mit den Genexpressionsdaten für *BCL-2* (Abbildung 12A) hatte der Mutationsstatus keinen Einfluss auf das Proteinexpressionsniveau von BCL-2 in der Population der CD34⁺ Stamm- und Progenitorzellen.

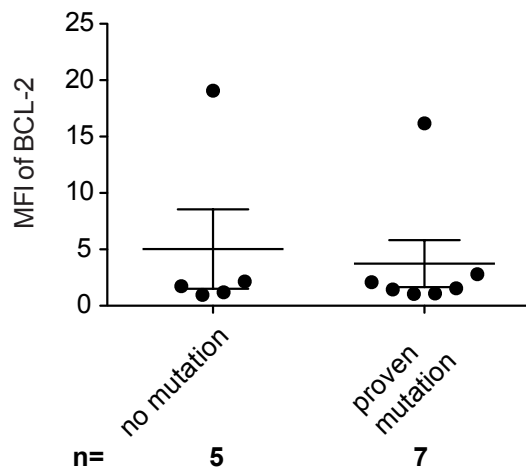


Abbildung 13: MDS-Risikomutationen in *ASXL1*, *RUNX1*, *EZH2* oder *TP53* haben keinen Effekt auf die BCL-2-Proteinexpression primärer MDS-Proben. Gezeigt wird die BCL-2-Proteinexpression durch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von 12 primären MDS/sAML-Proben verschiedener Risikogruppen mit Mutation in *ASXL1* ($n=2$), *ASXL1* und *RUNX1* ($n=3$) oder *TP53* ($n=2$) oder ohne Mutationen ($n=5$) in der intrazellulären Durchflusszytometrie. Die MFI wurde im Verhältnis zur jeweiligen Isotyp-Kontrolle berechnet.

Für *MCL-1* bleibt der Einfluss somatischer Mutationen in *ASXL1*, *RUNX1*, *EZH2* oder *TP53* weitgehend undefiniert. Einige Daten zeigen die Regulation von *MCL-1* durch *TP53* (72) und *EZH2* (73). Außerdem ist die Interaktion zwischen *MCL-1* und *BIM* prädiktiv für die Sensitivität gegenüber einer BCL-2-Inhibition (71, 74). Die Analyse der *MCL-1*-Genexpression ergab bei Vergleich der MDS-Subtypen sowie bei MDS-Patienten mit oder ohne ungünstigem Mutationsstatus keine relevanten Unterschiede (Abbildung 14). Zusammenfassend zeigte sich durch somatische Mutationen in *ASXL1*, *RUNX1*, *TP53* oder *EZH2* keine Veränderung der Genexpression relevanter BCL-2-Mitglieder. Dies lässt vermuten, dass Patienten mit einem ungünstigen Mutationsstatus ebenso sensitiv für eine selektive BCL-2-Inhibition sind wie Wildtyp-Patienten.

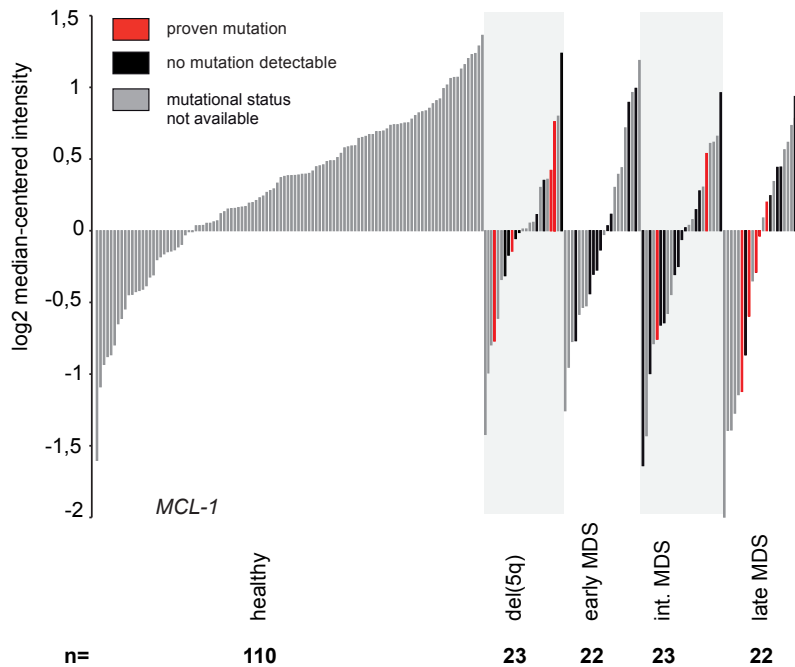


Abbildung 14: Die Genexpressionsanalyse von *MCL-1* in gesunden Kontrollprobanden und MDS-Patienten unterschiedlicher Risikogruppen. Die *MCL-1*-Expression wurde mit dem Human Genome U133 Plus 2.0 Array in 90 primären humanen MDS-Knochenmarkproben und 110 gesunden Kontrollprobanden gemessen. Gezeigt wird ein repräsentativer Graph (reporter 200798_x_at). Mutierte Proben werden rot dargestellt und Wildtyp-Proben schwarz. Graue Balken stehen für Patienten ohne verfügbaren Mutationsstatus. Sterne kennzeichnen „absent calls“ mit geringer Signalintensität. Frühe MDS umfassen RARS und RCMD, intermediäres MDS wird durch RAEB-1, spätes MDS durch RAEB-2 definiert. Der Mutationsstatus hatte keinen Einfluss auf die *MCL-1*-Expression in MDS mit del(5q) (del(5q) mit Mutation vs. del(5q) ohne Mutation $p=0.81$), MDS-RAEB-1 (MDS-RAEB-1 mit Mutation vs. MDS-RAEB-1 ohne Mutation $p=0.83$), MDS-RAEB-2 (MDS-RAEB-2 mit Mutation vs. MDS-RAEB-2 ohne Mutation $p=0.48$).

Anschließend wurde die zytotoxische Wirkung von ABT-199 in 41 primären Knochenmarkproben von MDS/sAML-Patienten untersucht, von denen 21 Patienten eine oder zwei Mutationen in den angegebenen Genen besaßen (Tabellen 7 und 9). Die Mutationsanalysen wurden mittels Sanger-Sequenzierung oder Next-Generation-Sequenzierung durch ein zertifiziertes Labor durchgeführt. Von den 21 Mutationspatienten hatten 7 Patienten (17.1%) eine Mutation in *ASXL1*, 4 Patienten (9.8%) hatten Mutationen in *ASXL1* und *RUNX1*, jeweils 1 Patient (2.4%) hatte eine Mutation in *ASXL1* und *EZH2* oder *ASXL1* und *TP53*. 7 Patienten (17.1%) hatten eine alleinige *TP53*-Mutation und 1 Patient (2.4%) hatte eine alleinige *RUNX1*-Mutation. In Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten (31) besaß diese Patientenkohorte ein reduziertes Gesamtüberleben (Abbildung 15). Die Knochenmarkproben von 7 alterskorrelierten, hämatologisch gesunden Kontrollprobanden stammten aus humanen Hüftköpfen, die orthopädischen Patienten bei Einbau einer totalen Hüft-Endoprothese explantiert wurden. Die Berücksichtigung klinischer Parameter ergab keine relevanten Unterschiede zwischen Patienten mit oder ohne einem prognostisch ungünstigen Mutationsstatus. In der Mutationskohorte wiesen 33% der Patienten einen komplexen Karyotyp auf, in der

Kontrollgruppe 40%. Die Knochenmarkproben wurden den Patienten bei Erstvorstellung oder zu einem beliebigen Zeitpunkt der Behandlung entnommen (Tabelle 8). Bei 29 Patienten war ein komplettes klinisches Follow-up verfügbar (Abbildung 15).

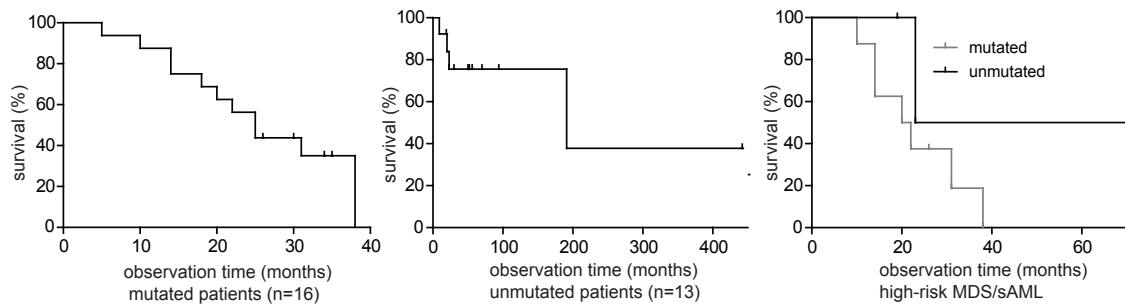


Abbildung 15: Kaplan-Meier-Kurve von 29 MDS/sAML-Patienten, deren Knochenmark in dieser Studie *ex vivo* untersucht wurde. Die Überlebensdaten von 16 Patienten mit ungünstigem Mutationsstatus und 13 Wildtyp-Patienten konnten analysiert werden. Es wurden 4 Patienten mit ungünstigem Mutationsprofil und 9 Wildtyp-Patienten zensiert, die zum Zeitpunkt der Publikation noch lebten. Jeder zensierte Patient wird als Datenpunkt im flachen Teil der Kurve dargestellt. Die Überlebensdaten von 8 Hochrisiko-MDS/sAML-Patienten mit Mutation und 3 Wildtyp-Hochrisiko-MDS/sAML-Patienten werden direkt miteinander verglichen.

Die Viabilität CD34⁺ mononukleärer Knochenmarkszellen wurde 72h nach Inhibitor-Behandlung mit ABT-199 (1µM) oder Lösungsmittelkontrolle DMSO in der Durchflusszytometrie analysiert. Die Risikogruppe der Patienten wurde mittels IPSS bestimmt, sAML wurde als eine medulläre Blastenzahl $\geq 30\%$ definiert. Zunächst wurde das Überleben primärer MDS-/sAML-Knochenmarkszellen von Patienten mit oder ohne Mutationen in *TP53*, *EZH2*, *RUNX1* oder *ASXL1* verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass ABT-199 bei Patienten mit Risiko-Mutationen (Mediane Viabilität 70,8%) im Vergleich zu Wildtyp-Patienten (Mediane Viabilität 85,6%) und im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden (Mediane Viabilität 95,7%) signifikant mehr CD34⁺ Zellen tötet (Abbildung 16A). Bei Betrachtung der einzelnen Mutationen war die Apoptose-Induktion durch ABT-199 unabhängig vom Vorhandensein einer oder zweier Hochrisiko-Mutationen. Keine der einzelnen Mutationen alleine war fähig, die Effektivität von ABT-199 herabzusetzen (Abbildung 16B). Außerdem wurde in der Mutations-Kohorte signifikant mehr Apoptose ausgelöst als bei MDS-Patienten ohne Mutation (Abbildung 16A). Dieser Unterschied könnte darin begründet sein, dass in der Mutations-Kohorte mehr sAML-Patienten waren (Tabelle 8), die generell sensitiver für eine Behandlung mit ABT-199 sind (59). Um eine potenzielle Verzerrung auszuschließen, wurden Proben von Patienten mit intermediären MDS und Hochrisiko-MDS/sAML mit den gleichen Mutationen nebeneinander verglichen. Im direkten Vergleich fiel der zytotoxische Effekt von ABT-199 in Hochrisiko-Proben stärker aus als in int.-II-Proben und war vom

Mutationsstatus unabhängig (Abbildung 16C). Also stellt ein ungünstiges Mutationsprofil keine Einschränkung für den Effekt von ABT-199 in MDS-Progenitorzellen dar.

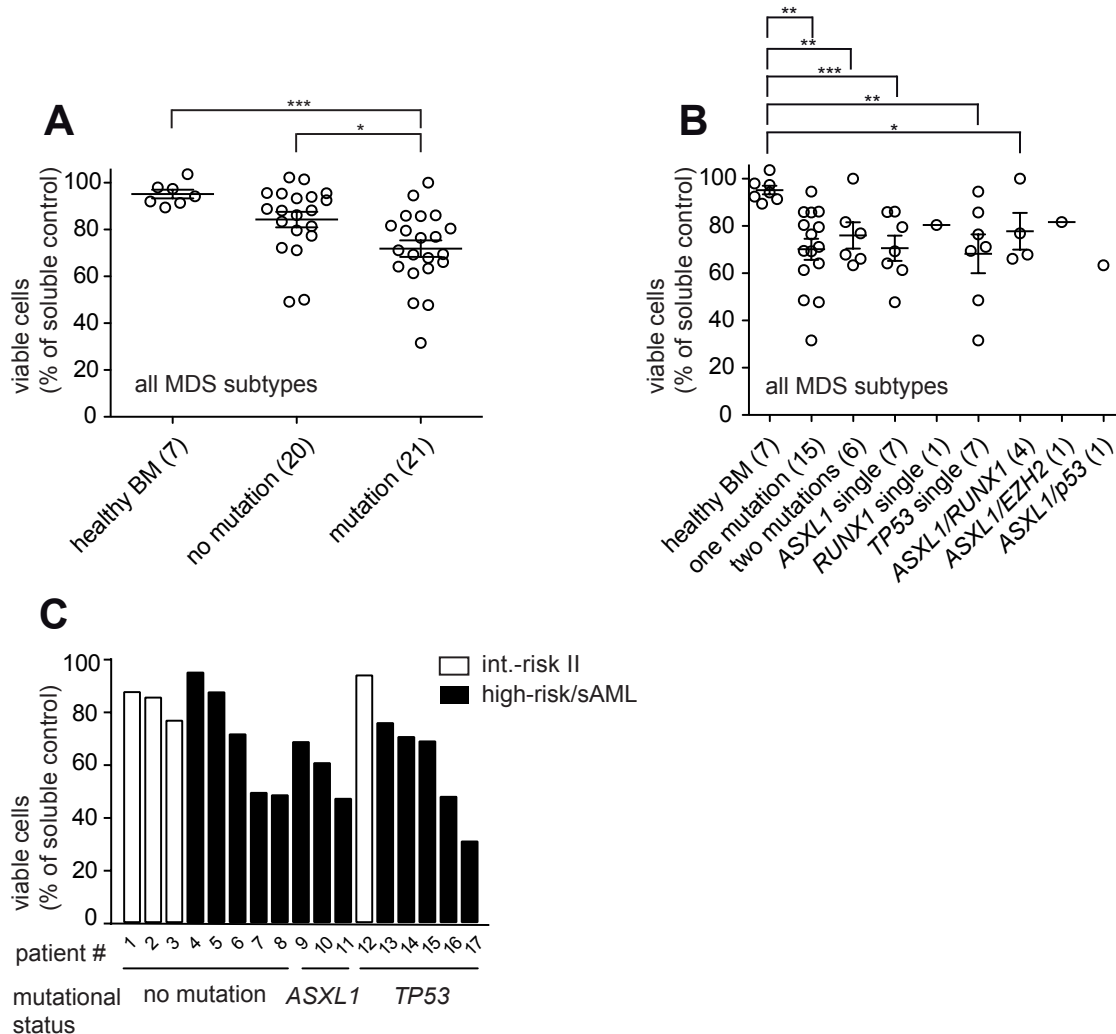


Abbildung 16: Der anti-apoptotische Effekt von ABT-199 auf CD34⁺ Zellen von MDS/sAML-Patienten ist unabhängig von prognostisch ungünstigen Mutationen in *ASXL1*, *RUNX1*, *TP53* und *EZH2*. Die Viabilität von CD34⁺ mononukleären Knochenmarkszellen von MDS-Patienten unterschiedlicher Risikogruppen wurde in der Durchflußzytometrie nach Färbung auf Annexin V und 7AAD bestimmt. Gezeigt wird jeweils das Verhältnis zwischen lebenden Zellen nach Inhibitor-Behandlung und lebenden Zellen nach Behandlung mit der Lösungsmittelkontrolle (DMSO) für 72h. Aufgetragen sind zudem der Median und die Standardabweichung. Die Ergebnisse der einseitigen ANOVA werden angegeben. Die Ergebnisse des paarweisen post-hoc *t*-Tests werden in der Abbildung angezeigt (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.005$, *** = $p < 0.0005$). Die Differenzen der Mittelwerte mit dem 95%-Konfidenzintervall sind in Tabelle 12 aufgelistet. (A) CD34⁺ mononukleäre Knochenmarkszellen von 7 gesunden Spendern, 20 MDS/sAML-Patienten ohne somatische Mutation in *ASXL1*, *RUNX1*, *TP53* und *EZH2* und 21 MDS/sAML-Patienten mit einer somatischen Mutation in den angegebenen Genen wurden für 72h mit ABT-199 (1µM) oder Lösungsmittelkontrolle (DMSO) behandelt. Der p-Wert der einseitigen ANOVA betrug 0.0011. (B) CD34⁺ mononukleäre Knochenmarkszellen von 7 gesunden Spendern, 15 MDS/sAML-Patienten ohne somatische Mutation in *ASXL1*, *RUNX1*, *TP53* und *EZH2*, 21 MDS/sAML-Patienten mit einer somatischen Mutation und 6 Patienten mit zwei Mutationen in *ASXL1*, *RUNX1*, *TP53* oder *EZH2* wurden für 72h mit ABT-199 (1µM) oder Lösungsmittelkontrolle (DMSO) behandelt. Darunter waren 7 Patienten mit einer Mutation in *ASXL1*, 1 Patient mit einer Mutation in *RUNX1*, 7 Patienten mit einer Mutation in *TP53*, 4 Patienten mit Mutationen in *ASXL1* und *RUNX1*, 1 Patient mit Mutationen in *ASXL1* und *EZH2* und 1 Patient mit Mutationen in *ASXL1* und *TP53*. Der p-Wert der einseitigen ANOVA betrug 0.0224. (C) CD34⁺ mononukleäre Knochenmarkszellen von 8 Patienten ohne somatische Mutationen in *ASXL1*, *RUNX1*, *TP53* oder *EZH2*, 3 Patienten mit einer somatischen Mutation in *ASXL1* und 6 Patienten mit einer somatischen Mutation in *TP53* wurden für 72h mit ABT-199 (1µM) oder Lösungsmittelkontrolle (DMSO) behandelt. Jeder Balken steht für das Verhältnis zwischen lebenden Zellen nach Inhibitor-Behandlung und lebenden Zellen nach Behandlung mit DMSO für 72h. Proben von Patienten der IPSS-Kategorie „int.-risk II“ sind weiß, Proben der IPSS-Kategorien „high-risk“ und sAML schwarz dargestellt.

Anschließend wurden die Patientenproben nach ihrer IPSS-Risikogruppe klassifiziert, um den Einfluss von Mutationen auf das Therapieansprechen innerhalb einzelner Risikoklassen darzustellen. Auch hier wurde in den Proben von „high-risk“-MDS/sAML-Patienten signifikant mehr Apoptose ausgelöst als in den Proben von gesunden Kontrollproben und allen niedrigeren MDS-Risikogruppen (Abbildung 17A). Dabei war in den Gruppen „intermediate-risk 1“, „intermediate-risk 2“ und „high-risk“ bei Patienten mit oder ohne Risiko-Mutation kein Unterschied in der Wirksamkeit von ABT-199 festzustellen (Abbildung 17A). Auch das Vorhandensein von mehr als einer Mutation beeinträchtigte nicht den zytotoxischen Effekt von ABT-199 in der Population der Hochrisiko-MDS/sAML-Patienten (Abbildung 17A mit gesonderter Darstellung der int.-II/high-risk-Proben). Weder die gesamte Patientenkohorte (Abbildung 16B) noch die „high-risk“-sAML-Untergruppe (Abbildung 17B) zeigte Unterschiede hinsichtlich des Überlebens unter ABT-199 bei individueller Betrachtung der mutierten Gene. Im Vergleich zur gesunden Kontrollkohorte war die Apoptose-Induktion durch ABT-199 über alle verschiedenen genetischen Aberrationen der Hochrisiko-MDS-Patienten äquivalent (Abbildung 17B). Weil es für eine effektive Therapie von großer Bedeutung ist, das Kompartiment der Stamm- und Progenitorzellen zu treffen, wurde der Langzeiteffekt einer BCL-2-Inhibition über 14 Tage in Methylzellulose untersucht. Hierfür wurden nicht-aufgereinigte mononukleäre Knochenmarkzellen (1×10^4) für 72h mit ABT-199 ($1 \mu\text{M}$) oder Lösungsmittelkontrolle DMSO behandelt, bevor sie in mit Wachstumsfaktoren (rh SCF, rh GM-CSF, rh IL-3, rh EPO) angereicherter Methylzellulose kultiviert wurden. Nach 14 Tagen wurden die Kolonien (CFU-GM, CFU-GEMM und BFU-E) mithilfe eines Lichtmikroskops klassifiziert und ausgezählt. Hier konnte in Knochenmarkproben von Hochrisiko-MDS/sAML-Patienten mit einer *ASXL1*-Mutation (und einer zusätzlichen *RUNX1*-Mutation in zwei Fällen) durch ABT-199 im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle DMSO eine signifikante Reduktion in der Gesamtzahl der Kolonien beobachtet werden (Abbildungen 17C). In Übereinstimmung mit den Daten der Zellkultur wird der zytotoxische Effekt von ABT-199 auf die Koloniebildung durch einen ungünstigen Mutationsstatus nicht beeinträchtigt. Die exzellente Apoptose-Induktion in der Methylzellulose-Analyse lässt vermuten, dass insbesondere MDS-Patienten höherer Risikogruppen mit Risiko-Mutationen von einer Behandlung mit dem BCL-2-selektiven Inhibitor profitieren.

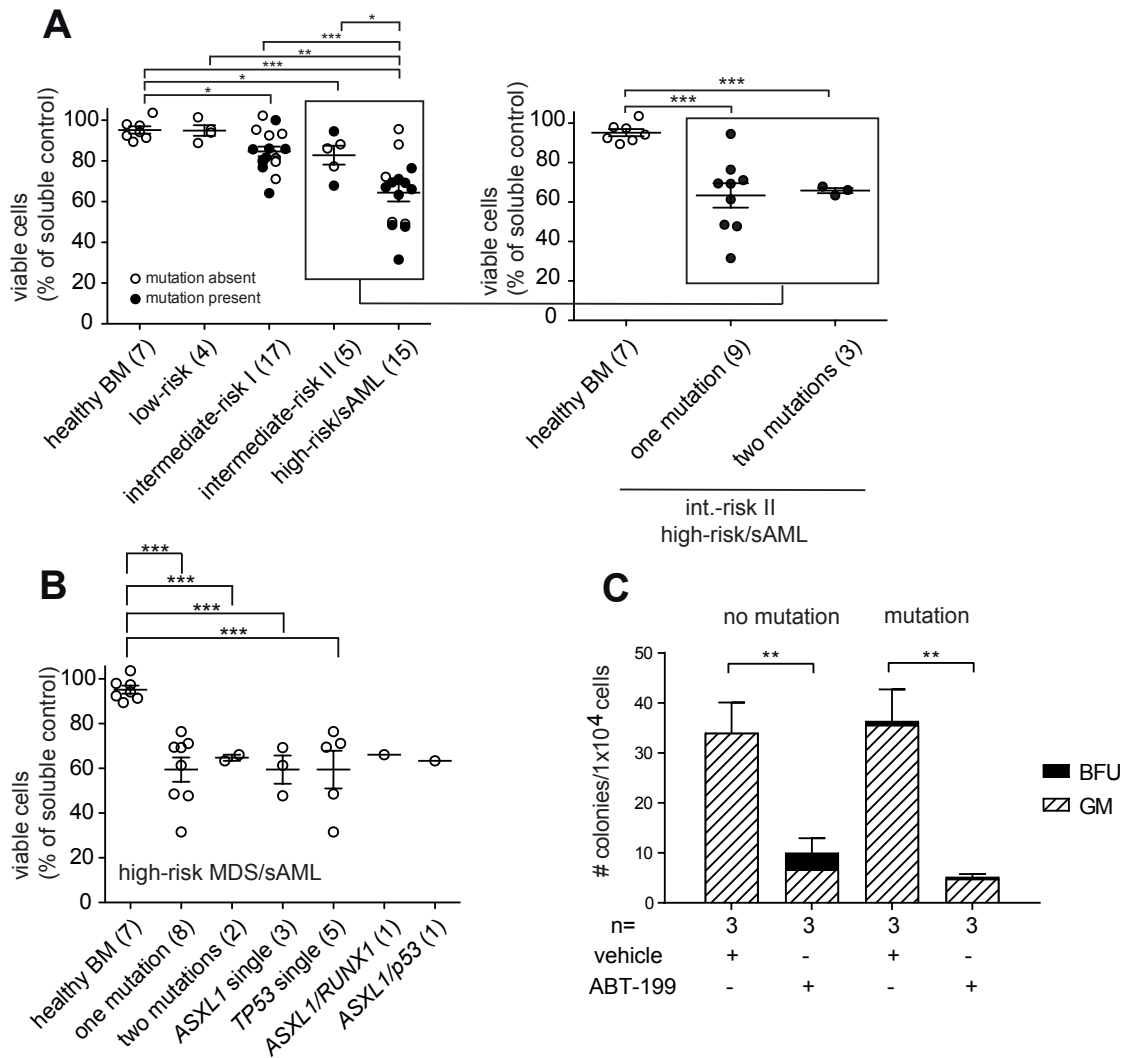


Abbildung 17: Die Toxizität von ABT-199 steigt mit der Krankheitsprogression unabhängig vom Mutationsstatus. (A) CD34⁺ mononukleäre Knochenmarkszellen von 7 gesunden Spendern, 4 Patienten der IPSS-Kategorie „low-risk“, 17 Patienten der IPSS-Kategorie „intermediate-risk 1“, 5 Patienten der IPSS-Kategorie „intermediate-risk 2“ und 15 Patienten der IPSS-Kategorien „high-risk“ und „sAML“ wurden für 72h mit ABT-199 (1µM) oder Lösungsmittelkontrolle (DMSO) behandelt. Dabei wurde sAML als eine medulläre Blastenzahl $\geq 30\%$ definiert. Der p-Wert der einseitigen ANOVA betrug <0.0001 . Der Mutationsstatus der Patienten wird durch eine entsprechende Farbgebung angezeigt. Hierbei steht schwarz für das Vorhandensein von somatischen Mutationen in *ASXL1*, *RUNX1*, *TP53* und *EZH2* und weiß für das Fehlen von Mutationen in diesen Genen. Anschließend wurde die Subgruppe „höhergradiges MDS“ im Detail untersucht. CD34⁺ mononukleäre Knochenmarkszellen von 7 gesunden Spendern, 9 Patienten der IPSS-Kategorien „int.-risk II“ sowie „high-risk“/„sAML“ mit einer somatischen Mutation in *ASXL1*, *RUNX1*, *TP53* oder *EZH2* und 3 Patienten der IPSS-Kategorien „high-risk“/„sAML“ mit zwei somatischen Mutationen in *ASXL1*, *RUNX1*, *TP53* oder *EZH2* wurden für 72h mit ABT-199 (1µM) oder Lösungsmittelkontrolle (DMSO) behandelt. Der p-Wert der einseitigen ANOVA betrug 0.0007. **(B)** CD34⁺ mononukleäre Knochenmarkszellen von 7 gesunden Spendern, 8 Patienten der IPSS-Kategorien „high-risk“/„sAML“ mit einer somatischen Mutation in *ASXL1*, *RUNX1*, *TP53* oder *EZH2* und 2 „high-risk“/„sAML“-Patienten mit zwei Mutationen in *ASXL1*, *RUNX1*, *TP53* oder *EZH2* wurden für 72h mit ABT-199 (1µM) oder Lösungsmittelkontrolle (DMSO) behandelt. Darunter waren 3 Patienten mit einer Mutation in *ASXL1*, 5 Patienten mit einer Mutation in *TP53*, 1 Patient mit Mutationen in *ASXL1* und *RUNX1* und 1 Patient mit Mutationen in *ASXL1* und *TP53*. Der p-Wert der einseitigen ANOVA betrug 0.0002. **(C)** Mononukleäre Knochenmarkszellen (1×10^4) wurden nach 72-stündiger Behandlung mit ABT-199 (1µM) bzw. Lösungsmittelkontrolle (DMSO) in die mit Wachstumsfaktoren angereicherte Methylcellulose überführt. Nach 14 Tagen wurden die gebildeten Kolonien (CFU-GM, CFU-GEMM und BFU-E) ausgezählt und die Gesamtkoloniezahl bestimmt. Die Experimente wurden in Duplikaten durchgeführt, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die Proben wurden nach IPSS klassifiziert. Die Anzahl der Replikate ist angegeben. Die Ergebnisse des paarweisen post-hoc *t*-Tests werden in der Abbildung angezeigt (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.005$, *** = $p < 0.0005$). Die Experimente wurden in Duplikaten durchgeführt. Gezeigt werden die Gesamtkoloniezahlen als gestapeltes Balkendiagramm der einzelnen Kolonietypen für 3 Wildtyp-Patientenproben der IPSS-Kategorien „high-risk“/sAML sowie für 3 Patientenproben der IPSS-Kategorien „high-risk“/sAML mit Hochrisiko-Mutationen nach paralleler Behandlung mit ABT-199 bzw. Lösungsmittelkontrolle (DMSO).

Ergebnisse

Analog zur statistischen Auswertung in den Abbildungen 16 und 17 sind die Ergebnisse der einfaktoriellen ANOVA in der Bildunterschrift angegeben. Die Bonferroni-Korrektur wird in den Abbildungen angezeigt. Zusätzlich sind die paarweisen Differenzen der Mittelwerte mit 95%-Konfidenzintervall in Tabelle 12 aufgelistet.

| Abbildung | Gruppenvergleich | Differenz der Mittelwerte | 95%-KI |
|--|---|---------------------------|-----------------|
| 16A | mutation (21) vs. no mutation (20) | -12.46 | [-23.73;-1.193] |
| | mutation (21) vs. healthy BM (7) | -23.33 | [-39.07;-7.88] |
| | no mutation (20) vs. healthy BM (7) | -10.87 | [-26.71;4.973] |
| 16B | healthy BM (7) vs. one mutation (15) | 25.05 | [2.513;47.60] |
| | healthy BM (7) vs. two mutations (6) | 19.2 | [-8.198;46.60] |
| | healthy BM (7) vs. ASXL1 single (7) | 24.61 | [-1.714;50.93] |
| | healthy BM (7) vs. TP53 single (7) | 26.97 | [0.6464;53.29] |
| | healthy BM (7) vs. ASXL1/RUNX1 (4) | 17.46 | [-13.41;48.32] |
| | one mutation (15) vs. two mutations (6) | -5.855 | [-29.64;17.93] |
| | one mutation (15) vs. ASXL1 single (7) | -0.4458 | [-22.99;22.10] |
| | one mutation (15) vs. TP53 single (7) | 1.914 | [-20.63;24.46] |
| | one mutation (15) vs. ASXL1/RUNX1 (4) | -7.596 | [-35.31;20.12] |
| | two mutations (6) vs. ASXL1 single (7) | 5.41 | [-21.99;32.81] |
| | two mutations (6) vs. TP53 single (7) | 7.77 | [-19.63;35.17] |
| | two mutations (6) vs. ASXL1/RUNX1 (4) | -1.741 | [-33.53;30.05] |
| | ASXL1 single (7) vs. TP53 single (7) | 2.36 | [-23.96;28.68] |
| | ASXL1 single (7) vs. ASXL1/RUNX1 (4) | -7.15 | [-38.02;23.72] |
| | TP53 single (7) vs. ASXL1/RUNX1 (4) | -9.51 | [-40.38;21.36] |
| 17A | healthy BM (7) vs. low risk (4) | 0.2507 | [-21.84;22.34] |
| | healthy BM (7) vs. intermediate risk I (17) | 10.52 | [-5.311;26.34] |
| | healthy BM (7) vs. intermediate risk II (5) | 12.38 | [-8.257;33.02] |
| | healthy BM (7) vs. high risk/sAML (15) | 30.79 | [14.66;46.93] |
| | low risk (4) vs. intermediate risk I (17) | 10.27 | [-9.320;29.85] |
| | low risk (4) vs. intermediate risk II (5) | 12.13 | [-11.51;35.77] |
| | low risk (4) vs. high risk/sAML (15) | 30.54 | [10.71;50.38] |
| | intermediate risk I (17) vs. intermediate risk II (5) | 1.863 | [-16.07;19.79] |
| | intermediate risk I (17) vs. high risk/sAML (15) | 20.28 | [7.792;32.76] |
| intermediate risk II (5) vs. high risk/sAML (15) | 18.41 | [0.2140;36.61] | |
| 17A (klein) | healthy BM (7) vs. one mutation (9) | 31.84 | [13.69;49.99] |
| | healthy BM (7) vs. two mutations (3) | 29.44 | [4.540;54.25] |
| | one mutation (9) vs two mutations (3) | -2.442 | [-26.45;54.25] |
| 17B | healthy BM (7) vs. one mutation (8) | 35.74 | [14.26;57.22] |
| | healthy BM (7) vs. two mutations (2) | 30.44 | [-2.835;63.72] |
| | healthy BM (7) vs. ASXL1 single (3) | 35.74 | [7.100;64.38] |
| | healthy BM (7) vs. TP53 single (5) | 35.73 | [11.43;60.04] |
| | one mutation (8) vs. two mutations (2) | -5.295 | [-38.11;27.52] |
| | one mutation (8) vs. ASXL1 single (3) | 0.003334 | [-28.09;28.10] |
| | one mutation (8) vs. TP53 single (5) | -0.001999 | [-23.66;23.66] |
| | two mutations (2) vs. ASXL1 single (3) | 5.298 | [-32.59;43.18] |
| two mutations (2) vs. TP53 single (5) | 5.293 | [-29.43;40.02] | |

Tabelle 12: Die paarweisen Differenzen der Mittelwerte mit 95%-Konfidenzintervall zu den Abbildung 16 und 17.

Um potenzielle Biomarker für die Sensitivität von MDS-Patienten mit einem ungünstigen Mutationsprofil für ABT-199 zu evaluieren, wurden in den CD34⁺ Stamm- und Progenitorzellen durchflusszytometrisch die Expression zentraler BCL-2-Proteine und die Viabilität nach Inhibitor-Behandlung bestimmt (Abbildung 18). Gezeigt wird das Verhältnis zwischen lebenden Zellen nach Inhibitor-Behandlung mit ABT-199 (1 μ M) und lebenden Zellen nach Behandlung mit der Lösungsmittelkontrolle (DMSO) für 72h. Die Proteinexpression wird dargestellt als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) in Relation zur Isotyp-Kontrolle. Die Assoziationsstärke zwischen MFI-Verhältnis und Viabilität wurde durch den Rangkorrelationskoeffizienten ρ nach Spearman beschrieben. Anschließend wurde der zweiseitige p-Wert mit einem Signifikanzniveau von 0.05 bestimmt. Die funktionelle Beziehung der Parameter wurde durch die Geradengleichung der linearen Regressionsanalyse dargestellt. Diese Analyse zeigt, dass - unabhängig vom Mutationsstatus - die BCL-2-Expression ein gutes Ansprechen auf ABT-199 vorhersagt (Abbildung 18A), während die Expression von BCL-X_L und MCL-1 Resistenz gegenüber ABT-199 vermitteln (Abbildung 18B und C). Außerdem zeigen diese Daten, dass die Analyse auf Proteinebene eine bessere Vorhersagekraft besitzt als auf mRNA-Ebene. Zusammenfassend sind Mutationen in *TP53*, *EZH2*, *RUNX1* oder *ASXL1* kein Ausschlusskriterium für eine Behandlung mit dem selektiven BCL-2-Inhibitor ABT-199.

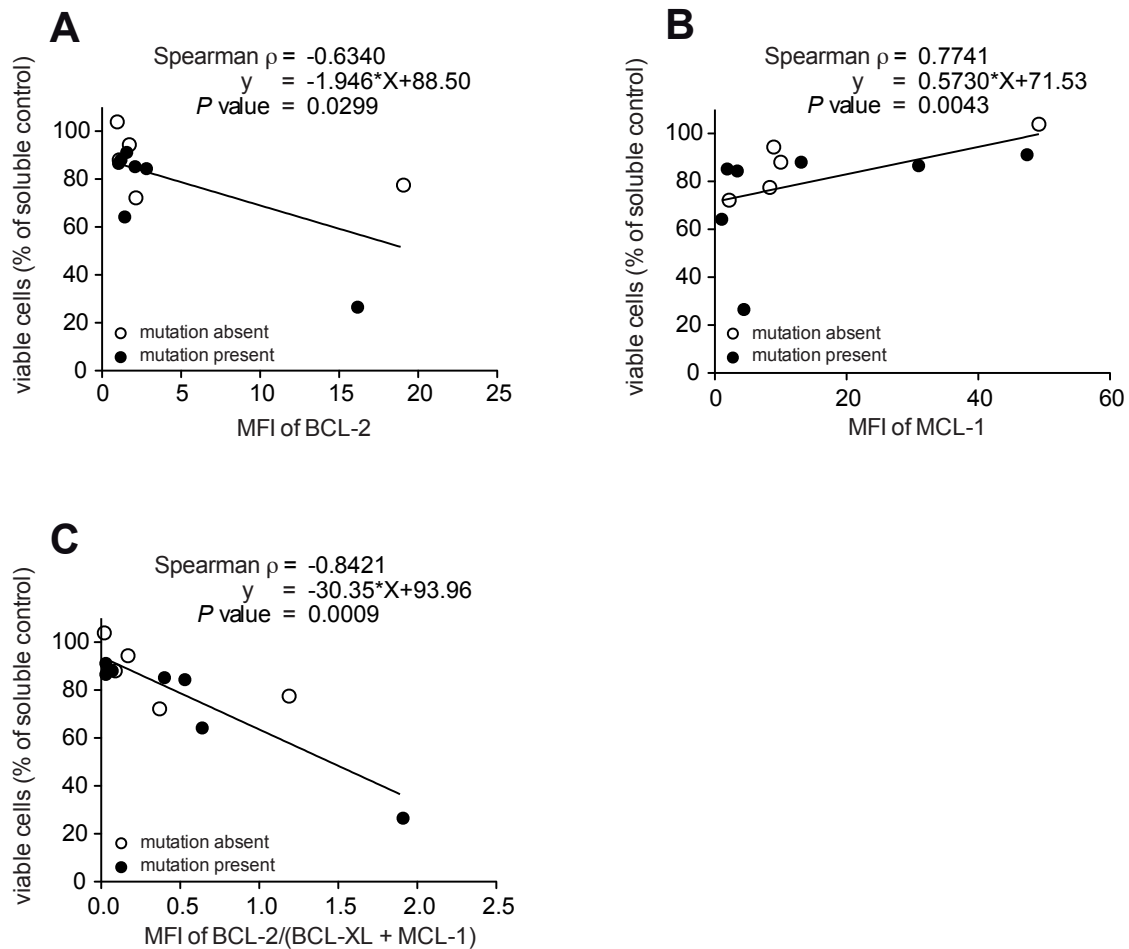


Abbildung 18: BCL-2, BCL-X_L und MCL-1 als Biomarker für eine erfolgreiche Behandlung mit ABT-199 in Patienten mit einem ungünstigen Mutationsprofil. Mononukleäre Knochenmarkszellen von 12 Hochrisiko-MDS-Patienten mit (n=8) oder ohne (n=4) ungünstigem Mutationsstatus wurden mit ABT-199 (1 μ M) oder DMSO behandelt. Die Y-Achse zeigt das Verhältnis zwischen lebenden Zellen nach Inhibitor-Behandlung und lebenden Zellen nach Behandlung mit der Lösungsmittelkontrolle für 72h. Die Viabilitätsmessung erfolgte mittels Färbung auf Annexin V und 7AAD. Die Proteinexpression wird auf der X-Achse durch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) dargestellt. Diese wurde im Verhältnis zur jeweiligen Isotyp-Kontrolle berechnet. Die Assoziationsstärke zwischen MFI und Viabilität nach Inhibitor-Behandlung wurde über die Spearman-Korrelation bestimmt und der funktionelle Zusammenhang wurde über eine lineare Regressionsanalyse beschrieben. Der Mutationsstatus der Patienten wird durch eine entsprechende Farbgebung angezeigt. Hierbei steht schwarz für das Vorhandensein von somatischen Mutationen in *ASXL1*, *RUNX1*, *TP53* und *EZH2* und weiß für das Fehlen von Mutationen in diesen Genen. (A) Die Viabilität nach Behandlung mit ABT-199 (1 μ M) ist gegen die MFI-Summe von BCL-2 aufgetragen. (B) Die Viabilität nach Behandlung mit ABT-199 (1 μ M) ist gegen die MFI von MCL-1 aufgetragen. (C) Die Viabilität nach Behandlung mit ABT-199 (1 μ M) ist gegen die MFI von BCL-2 in Relation zu der MFI-Summe von BCL-X_L und MCL-1 aufgetragen, um die Expression der Proteine darzustellen, die Sensitivität (BCL-2) oder Resistenz (BCL-X_L und MCL-1) gegenüber ABT-199 vermitteln.

4 Diskussion

Das Knochenmark von MDS-Patienten der Hochrisikogruppe ist durch eine erworbene Resistenz gegenüber dem programmierten Zelltod gekennzeichnet (5, 12, 38, 41, 75-78). Die vorliegende Dissertation zeigt, dass die Apoptose in mononukleären Knochenmarkszellen von Patienten mit Hochrisiko-MDS und sAML durch ABT-199 und ABT-737 erfolgreich reaktiviert werden kann (Abbildungen 5-8). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass diese Zellen verstärkt apoptotischem Stress ausgesetzt sind (4) und somit ein erhöhtes „Priming“ für den Zelltod besitzen (79). Das sogenannte „BH3-Profilings“ ist eine vielversprechende Methode, um die Abhängigkeit einer Zelle von spezifischen BCL-2-Proteinen zu bestimmen und ihre Apoptose-Sensitivität, also ihr „Priming“, zu messen. Das Ansprechen von AML-Patienten auf Chemotherapie korrelierte mit dem Ausmaß ihres „mitochondrialen Primings“ *in vitro* (79, 80). Außerdem konnte mit dieser Methode die Sensitivität von Tumorzellen für eine pro-apoptotische Intervention mit ABT-737 vorhergesagt werden (79). Diese Ergebnisse und die vorliegende Arbeit zeigen, dass die Apoptose-Resistenz, vermittelt durch anti-apoptotische BCL-2-Proteine, eine zentrale Eigenschaft von AML- und Hochrisiko-MDS-Zellen ist. Das Ausmaß der Apoptose-Induktion durch ABT-199 in mononukleären Knochenmarkszellen ist primär abhängig vom Krankheitsstadium der MDS-Patienten. Ungeachtet des verwendeten Klassifikationssystems (r-WPSS, IPSS, WHO-Klassifikation von 2008, Zytogenetik nach Schanz *et al.*, Abbildungen 6 und 7) sind die klinischen Kategorien „Hochrisiko-MDS“ und „sAML“ valide Parameter, um die Patientengruppe mit der höchsten Sensitivität für eine pro-apoptotische Behandlung zu identifizieren. Da die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Knochenmarkproben bei Erstdiagnose, unter Erstlinientherapie oder nach Therapieversagen entnommen wurden, scheint die vorausgegangene Behandlung für die Inhibitor-Wirkung nicht maßgeblich entscheidend zu sein. Die selektive Toxizität von ABT-199 und ABT-737 für Hochrisiko-MDS/sAML-Zellen lässt vermuten, dass der klinische Parameter „Hochrisiko-MDS“ dem „mitochondrialen Priming“ von AML-Zellen entspricht (15, 79, 80). Eine pro-apoptotische Behandlung induziert selektiv Zelltod in leukämischen Vorläuferzellen und Blasten von Hochrisiko-MDS- und sAML-Patienten (Abbildungen 5, 6 und 8). Dieser Aspekt ist von großer Bedeutung, da sich die MDS-Ursprungszelle vermutlich innerhalb der CD34⁺ Subpopulation befindet (27). In vor kurzem veröffentlichten Daten war ABT-199 hochgradig toxisch für Blasten aus AML- und CML-Zelllinien sowie aus primärem

Patientenmaterial (81, 82). In Übereinstimmung damit sterben Knochenmarkszellen von sAML-Patienten, die ja eine erhöhte medulläre Blastenzahl aufweisen, besonders gut als Reaktion auf ABT-199 ab. Ähnliche Ergebnisse wurden von einem MDS-Mausmodell berichtet, wo ABT-737 Apoptose in Leukämie-initiierenden Zellen und primitiven Lin⁻/Sca1⁺/Kit⁺ Zellen auslöste (83, 84). Trotz des erfolgreichen Einsatzes der Inhibitoren *in vivo* im Mausmodell ist es essenziell, den Effekt von ABT-199 und ABT-737 an einer großen Kohorte primärer Patientenproben aus verschiedenen MDS-Krankheitsstadien zu untersuchen. Nur so kann man der klinischen, molekularen und zytogenetischen Heterogenität dieser Erkrankung gerecht werden. Auch Zelllinien eignen sich nur bedingt zur Erforschung der Krankheit. Bei Untersuchung des DNA-Profiles von 31 angeblichen MDS-Zelllinien hielten nur drei von ihnen der Überprüfung stand (85). Vorarbeiten der Arbeitsgruppe untersuchten bereits ausführlich den Effekt des BH3-Mimetikums ABT-737, das die anti-apoptotischen Proteine BCL-2, BCL-X_L und BCL-W inhibiert, in primären Knochenmarkproben von MDS-Patienten und Kontrollprobanden (59). Daher wurde der Schwerpunkt der vorliegenden Dissertation auf die Wirkung des BCL-2-selektiven Inhibitors ABT-199 sowie auf wesentliche Vergleichspunkte beider Inhibitoren gelegt. Weder ABT-199 noch ABT-737 sind toxisch für gesunde mononukleäre Knochenmarkszellen (Abbildung 8), was auf ein breites therapeutisches Fenster hindeutet. Dieser Aspekt ist von großer Relevanz, um die gesunde Rest-Hämatopoese der Patienten zu schützen. In den Proben von MDS/sAML-Patienten fällt die Apoptose-Induktion durch den BCL-2-selektiven Inhibitor ABT-199 etwas geringer als durch das BH3-Mimetikum ABT-737 (Abbildungen 5 und 8). Dies lässt einen protektiven Effekt der anti-apoptotischen Proteine BCL-X_L und BCL-W vermuten, die lediglich durch ABT-737 inhibiert werden. Auch für AML-Zelllinien besaß ABT-737 als Einzelsubstanz und in Kombination mit Azacitidin eine höhere Toxizität als ABT-199 (19). Dennoch ist die Zelltod-Induktion durch ABT-199 in mononukleären Knochenmarkszellen von Hochrisiko-MDS/sAML-Patienten signifikant höher als bei gesunden Kontrollen oder bei Patienten mit Niedrigrisiko-MDS (Abbildungen 5-8). Beim Vergleich der Wirksamkeit beider Inhibitoren kommt der funktionellen Methylzellulose-Analyse große Bedeutung zu. Im Knochenmark von Hochrisiko-MDS/sAML bewirkt die Zellto- dinduktion durch ABT-199 und ABT-737 im Kompartiment der Stamm- und Progenitorzellen eine effektive Verringerung der Koloniebildung (Abbildung 8). Obwohl die Inhibitor-Behandlung immer für 72 h durchgeführt wird, fällt der zytotoxische Effekt von ABT-199 in der Methylzellulose-Analyse ausgeprägter aus als in der Durch-

flusszytometrie. Wenn man die Wirkung der Inhibitoren in den gleichen Patientenproben untersucht, ist ABT-737 in der Methylzellulose-Analyse nur geringfügig potenter als ABT-199 (Abbildung 8B). Diese Ergebnisse sind von großem Stellenwert für die weitere klinische Etablierung des BCL-2-Inhibitors, da sie einen deutlich sichtbaren Langzeiteffekt von ABT-199 auf hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen postulieren. Außerdem wurde eine enge Interaktion zwischen hämatopoetischen Progenitorzellen und mesenchymalen Stromazellen beschrieben (63-65). Um den Bedingungen *in vivo* näher zu kommen, wurde ein Teil der primären Knochenmarkproben mit der Stromazelllinie EL08-1D2 ko-kultiviert und pro-apoptotisch behandelt. Trotz der potenziellen Limitation einer murinen Zelllinie üben Stromazellen einen protektiven Effekt auf eine Probe aus (Abbildung 9). Bei Betrachtung mehrerer Proben von Hochrisiko-MDS/sAML-Patienten lässt sich jedoch kein signifikanter Unterschied in der Apoptose-Induktion mit oder ohne Ko-Kultur von Stromazellen feststellen. Dies lässt auf eine zellintrinsische Aktivierung der Apoptose schließen. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Apoptose-Induktion durch pro-apoptotische Substanzen auch bei intakter Mikroumgebung *in vivo* möglich ist. Betrachtet man die Mechanismen genauer, die Resistenz gegenüber ABT-199 oder ABT-737 vermitteln, nimmt die verstärkte Expression des anti-apoptotischen Proteins MCL-1 eine zentrale Rolle ein (74). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen waren die in der vorliegenden Arbeit untersuchten MDS-Proben mit einer hohen MCL-1-Expression resistent gegenüber einer pro-apoptotischen Intervention mit beiden Inhibitoren (Abbildungen 10 und 11). Eine Erklärung für den weitgehend gruppenspezifischen Effekt von ABT-199 könnte sein, dass die meisten Niedrigrisiko-MDS-Proben im Vergleich zu Hochrisiko-MDS-Proben eine erhöhte MCL-1-Expression aufweisen (Abbildung 10). Diese Hypothese sollte weiterführend anhand einer größeren Kohorte von MDS-Patienten validiert werden. Bemerkenswerterweise liegen auch in individuellen Hochrisiko-MDS-Proben erhöhte MCL-1-Spiegel vor; dies spricht für die MCL-1-Überexpression als primären Resistenzfaktor unabhängig von der Risikogruppe. Auch in AML-Proben waren interindividuelle Unterschiede in der Expression von BCL-2-Proteinen vorhanden. Hier variierte die BCL-2-Expression substanziell zwischen Proben einer FAB-Untergruppe (19). Wenn man die relative Proteinexpression betrachtet, fällt die BCL-2-Expression im Vergleich zur Expression von BCL-X_L oder MCL-1 geringer aus. Dies weist darauf hin, dass sogar geringe Spiegel dieses Proteins MDS-Zellen vor dem Zelltod schützen können. Angesichts der kritischen Rolle von MCL-1 als Resistenzfaktor ist die durchflusszytometri-

sche Quantifizierung anti-apoptotischer Proteine eine geeignete Methode, um die Patienten zu identifizieren, die mit großer Wahrscheinlichkeit von einer Behandlung mit ABT-199 profitieren. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit ein FACS-Protokoll für das hämatologische Routinelabor des Klinikums rechts der Isar der TU München etabliert. Bei allen MDS/sAML-Patienten kann nun standardmäßig die Expression der anti-apoptotischen Proteine BCL-2, BCL-X_L und MCL-1 im Knochenmark bestimmt werden. Beim Einsatz von Venetoclax im Rahmen von Studien können somit Therapieansprechen und intrazelluläre Proteinbestimmung korreliert werden. Die Prognose von MDS-Patienten wird unter anderem durch molekulargenetische und zytogenetische Parameter beeinflusst. So stellt das Vorliegen somatischer Mutationen in den Genen *TP53*, *EZH2*, *RUNX1* oder *ASXL1* einen negativen prognostischen Faktor für das Gesamtüberleben der Patienten dar (31). MDS-Patienten mit derartigen Mutationen weisen trotz initialem Ansprechen ein schlechteres Gesamtüberleben unter Standardtherapie mit HMA und nach allogener Stammzelltransplantation auf (32-34). Bei Patienten mit de-novo-AML waren Mutationen in *ASXL1* mit primärer Chemoresistenz assoziiert (86). Auf funktioneller Ebene sind enge Interaktionen zwischen TP53, RUNX1, EZH2 und BCL-2 bekannt (87, 88). Die exakten molekularbiologischen Vorgänge nach BCL-2-Inhibition sind jedoch insbesondere im vorliegenden Patientenkollektiv noch zu untersuchen. Diese Arbeit zeigt, dass die Apoptose-Induktion durch ABT-199 unabhängig von den prognostisch relevanten Mutationen in *TP53*, *EZH2*, *RUNX1* oder *ASXL1* ist (Abbildungen 16 und 17). Dies stimmt mit kürzlich veröffentlichten Daten von CLL-Patienten überein, die eine TP53-unabhängige Wirkung von ABT-199 *in vitro* und *in vivo* postulieren (35, 36). Die pro-apoptotische Intervention mit ABT-199 scheint also auch bei MDS/sAML-Patienten mit Hochrisikomutationen eine sinnvolle Therapiestrategie zu sein. Dies ist von großer Bedeutung, da aktuelle Therapiestrategien wie demethylierende Substanzen in diesem Kollektiv nur ein begrenztes Ansprechen besitzen (34). Ein weiterer positiver Aspekt von ABT-199 ist, dass der Inhibitor die Toxizität von Azacitidin und MEK-Inhibitoren verstärkt (19, 81, 89). Zusammenfassend ist die selektive BCL-2-Inhibition eine aussichtsreiche Therapiestrategie für MDS-Patienten der Hochrisikogruppe zur Verzögerung der Krankheitsprogression. Eine Behandlung mit ABT-199 könnte auch zur Überbrückung bis zur allogenen Stammzelltransplantation eingesetzt werden. Eine pro-apoptotische Intervention mit ABT-199 sollte, als Einzelsubstanz oder in Kombination mit den genannten Wirkstoffen, in klinischen Studien für dieses Patientenkollektiv weiter evaluiert werden.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation zeigt, dass die pharmakologische Inhibition anti-apoptotischer BCL-2-Proteine die erworbene Apoptose-Resistenz in mononukleären Knochenmarkszellen von Patienten mit Hochrisiko-MDS und sAML überwinden kann. Die Zelltod-Induktion wurde mithilfe des selektiven BCL-2-Inhibitors ABT-199 (1 μ M) in einer Kohorte von 51 MDS/sAML-Patienten durchgeführt. In einigen Proben wurde auch der BCL-2/BCL-X_L/BCL-W-Inhibitor ABT-737 (1 μ M) eingesetzt, um funktionelle Rückschlüsse auf die Relevanz spezifischer BCL-2-Proteine zu ziehen. Das Knochenmark einer Kontrollkohorte aus 19 alterskorrelierten, gesunden Probanden blieb von der Inhibitor-Behandlung weitgehend unbeeinflusst. Dagegen induzierte ABT-199 effektiv Apoptose in mononukleären Knochenmarkszellen von Hochrisiko-MDS- und sAML-Patienten. Hier war ABT-199 besonders toxisch für die Population der hämatologischen Stamm- und Progenitorzellen. Dies zeigte sich durchflusszytometrisch an der Reduktion der CD34⁺ Zellen und an der Verringerung der Koloniebildungsfähigkeit in der Methylzellulose-Analyse. Eine pro-apoptotische Intervention war auch bei Ko-Kultur mit Stromazellen wirksam. Außerdem korrelierte das Ausmaß der Zelltod-Induktion signifikant mit der Expressionsstärke zentraler anti-apoptotischer Proteine. Zellen waren umso sensibler für ABT-199, je höher die Expression von BCL-2 und je niedriger die Expression von BCL-X_L und MCL-1 waren. Auf dieser Grundlage wurde ein FACS-Protokoll für das hämatologische Routinelabor des Klinikums rechts der Isar der TU München etabliert. Darüberhinaus war der Effekt des BCL-2-Inhibitors ABT-199 unabhängig von prognostisch ungünstigen Mutationen in *ASXL1*, *RUNX1*, *TP53* oder *EZH2*. Diese Untersuchung wurde mit 41 Patientenproben durchgeführt. Zusammenfassend sprechen diese Daten für die pro-apoptotische Intervention mit ABT-199 als potentes Mittel, um die Apoptose-Resistenz in Hochrisiko-MDS und sAML zu überwinden. Die selektive BCL-2-Inhibition scheint damit eine vielversprechende Therapieoption für fortgeschrittene MDS-Erkrankungen zu sein und sollte in klinischen Studien weiter evaluiert werden. Teile der vorliegenden Arbeit wurden in *Leukemia* sowie in *Oncotarget* publiziert (59, 90).

6 Literaturverzeichnis

1. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000;407(6805):770-776.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674.
3. Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*. 2006;25(34):4798-4811.
4. Raza A, Galili N. The genetic basis of phenotypic heterogeneity in myelodysplastic syndromes. *Nature reviews Cancer*. 2012;12(12):849-859.
5. Corey SJ, Minden MD, Barber DL, Kantarjian H, Wang JC, Schimmer AD. Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases. *Nature reviews Cancer*. 2007;7(2):118-129.
6. Kadia TM, Jabbour E, Kantarjian H. Failure of hypomethylating agent-based therapy in myelodysplastic syndromes. *Seminars in oncology*. 2011;38(5):682-692.
7. Marsden VS, Strasser A. Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. *Annual review of immunology*. 2003;21:71-105.
8. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 2007;26(9):1324-1337.
9. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature reviews Cancer*. 2002;2(9):647-656.
10. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014;15(1):49-63.
11. Strasser A, Harris AW, Bath ML, Cory S. Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature*. 1990;348(6299):331-333.
12. Parker JE, Mufti GJ, Rasool F, Mijovic A, Devereux S, Pagliuca A. The role of apoptosis, proliferation, and the Bcl-2-related proteins in the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia secondary to MDS. *Blood*. 2000;96(12):3932-3938.
13. Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DJ, Belli BA, Bruncko M, Deckwerth TL, Dinges J, Hajduk PJ, Joseph MK, Kitada S, Korsmeyer SJ, Kunzer AR, Letai A, Li C, Mitten MJ, Nettesheim DG, Ng S, Nimmer PM, O'Connor JM, Oleksijew A, Petros AM, Reed JC, Shen W, Tahir SK, Thompson CB, Tomaselli KJ, Wang B, Wendt MD, Zhang H, Fesik SW, Rosenberg SH. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature*. 2005;435(7042):677-681.
14. Letai A. BCL-2: found bound and drugged! *Trends in molecular medicine*. 2005;11(10):442-444.
15. Konopleva M, Contractor R, Tsao T, Samudio I, Ruvolo PP, Kitada S, Deng X, Zhai D, Shi YX, Sneed T, Verhaegen M, Soengas M, Ruvolo VR, McQueen T, Schober WD, Watt JC, Jiffar T, Ling X, Marini FC, Harris D, Dietrich M, Estrov Z, McCubrey J, May WS, Reed JC, Andreeff M. Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia. *Cancer cell*. 2006;10(5):375-388.
16. Roberts AW, Seymour JF, Brown JR, Wierda WG, Kipps TJ, Khaw SL, Carney DA, He SZ, Huang DC, Xiong H, Cui Y, Busman TA, McKeegan EM, Krivoshik AP, Enschede SH, Humerickhouse R. Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: results of a phase I study of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(5):488-496.

17. Wilson WH, O'Connor OA, Czuczman MS, LaCasce AS, Gerecitano JF, Leonard JP, Tulpule A, Dunleavy K, Xiong H, Chiu YL, Cui Y, Busman T, Elmore SW, Rosenberg SH, Krivoshik AP, Enschede SH, Humerickhouse RA. 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. *The Lancet Oncology*. 2010;11(12):1149-1159.
18. Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, Ackler SL, Catron ND, Chen J, Dayton BD, Ding H, Enschede SH, Fairbrother WJ, Huang DC, Hymowitz SG, Jin S, Khaw SL, Kovar PJ, Lam LT, Lee J, Maecker HL, Marsh KC, Mason KD, Mitten MJ, Nimmer PM, Oleksijew A, Park CH, Park CM, Phillips DC, Roberts AW, Sampath D, Seymour JF, Smith ML, Sullivan GM, Tahir SK, Tse C, Wendt MD, Xiao Y, Xue JC, Zhang H, Humerickhouse RA, Rosenberg SH, Elmore SW. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nature medicine*. 2013;19(2):202-208.
19. Bogenberger JM, Kornblau SM, Pierceall WE, Lena R, Chow D, Shi CX, Mantei J, Ahmann G, Gonzales IM, Choudhary A, Valdez R, Camoriano J, Fauble V, Tiedemann RE, Qiu YH, Coombes KR, Cardone M, Braggio E, Yin H, Azorsa DO, Mesa RA, Stewart AK, Tibes R. BCL-2 family proteins as 5-Azacytidine-sensitizing targets and determinants of response in myeloid malignancies. *Leukemia*. 2014;28(8):1657-1665.
20. Stilgenbauer S, Eichhorst B, Schetelig J, Coutre S, Seymour JF, Munir T, Puvvada SD, Wendtner CM, Roberts AW, Jurczak W, Mulligan SP, Bottcher S, Mobasher M, Zhu M, Desai M, Chyla B, Verdugo M, Enschede SH, Cerri E, Humerickhouse R, Gordon G, Hallek M, Wierda WG. Venetoclax in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a multicentre, open-label, phase 2 study. *The Lancet Oncology*. 2016;17(6):768-778.
21. Beschluss des Gemeinsamen Bundesausschusses über eine Änderung der Arzneimittel-Richtlinie (AM-RL): Anlage XII - Beschlüsse über die Nutzenbewertung von Arzneimitteln mit neuen Wirkstoffen nach § 35a SGB V – Venetoclax vom 15. Juni 2017.
22. Tefferi A, Vardiman JW. Myelodysplastic syndromes. *The New England journal of medicine*. 2009;361(19):1872-1885.
23. Neukirchen J, Schoonen WM, Strupp C, Gattermann N, Aul C, Haas R, Germing U. Incidence and prevalence of myelodysplastic syndromes: data from the Dusseldorf MDS-registry. *Leukemia research*. 2011;35(12):1591-1596.
24. Ma X, Does M, Raza A, Mayne ST. Myelodysplastic syndromes: incidence and survival in the United States. *Cancer*. 2007;109(8):1536-1542.
25. Nimer SD. Myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2008;111(10):4841-4851.
26. Jaiswal S, Ebert BL. MDS is a stem cell disorder after all. *Cancer cell*. 2014;25(6):713-714.
27. Woll PS, Kjallquist U, Chowdhury O, Doolittle H, Wedge DC, Thongjuea S, Erlandsson R, Ngara M, Anderson K, Deng Q, Mead AJ, Stenson L, Giustacchini A, Duarte S, Giannoulatou E, Taylor S, Karimi M, Scharenberg C, Mortera-Blanco T, Macaulay IC, Clark SA, Dybedal I, Josefsen D, Fenaux P, Hokland P, Holm MS, Cazzola M, Malcovati L, Tauro S, Bowen D, Boultonwood J, Pellagatti A, Pimanda JE, Unnikrishnan A, Vyas P, Gohring G, Schlegelberger B, Tobiasson M, Kvalheim G, Constantinescu SN, Nerlov C, Nilsson L, Campbell PJ, Sandberg R, Papaemmanuil E, Hellstrom-Lindberg E, Linnarsson S, Jacobsen SE. Myelodysplastic syndromes are propagated by rare and distinct human cancer stem cells in vivo. *Cancer cell*. 2014;25(6):794-808.
28. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, Tauro S, Gundem G, Van Loo P, Yoon CJ, Ellis P, Wedge DC, Pellagatti A, Shlien A, Groves MJ, Forbes SA, Raine K, Hinton J,

- Mudie LJ, McLaren S, Hardy C, Latimer C, Della Porta MG, O'Meara S, Ambaglio I, Galli A, Butler AP, Walldin G, Teague JW, Quek L, Sternberg A, Gambacorti-Passerini C, Cross NC, Green AR, Boulwood J, Vyas P, Hellstrom-Lindberg E, Bowen D, Cazzola M, Stratton MR, Campbell PJ, Chronic Myeloid Disorders Working Group of the International Cancer Genome C. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2013;122(22):3616-3627; quiz 3699.
29. Walter MJ, Shen D, Shao J, Ding L, White BS, Kandoth C, Miller CA, Niu B, McLellan MD, Dees ND, Fulton R, Elliot K, Heath S, Grillo M, Westervelt P, Link DC, DiPersio JF, Mardis E, Ley TJ, Wilson RK, Graubert TA. Clonal diversity of recurrently mutated genes in myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2013;27(6):1275-1282.
30. Walter MJ, Shen D, Ding L, Shao J, Koboldt DC, Chen K, Larson DE, McLellan MD, Dooling D, Abbott R, Fulton R, Magrini V, Schmidt H, Kalicki-Weizer J, O'Laughlin M, Fan X, Grillo M, Witowski S, Heath S, Frater JL, Eades W, Tomasson M, Westervelt P, DiPersio JF, Link DC, Mardis ER, Ley TJ, Wilson RK, Graubert TA. Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*. 2012;366(12):1090-1098.
31. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, Galili N, Nilsson B, Garcia-Manero G, Kantarjian H, Raza A, Levine RL, Neuberg D, Ebert BL. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *The New England journal of medicine*. 2011;364(26):2496-2506.
32. Traina F, Visconte V, Elson P, Tabarrokhi A, Jankowska AM, Hasrouni E, Sugimoto Y, Szpurka H, Makishima H, O'Keefe CL, Sekeres MA, Advani AS, Kalaycio M, Copelan EA, Sauntharajah Y, Olalla Saad ST, Maciejewski JP, Tiu RV. Impact of molecular mutations on treatment response to DNMT inhibitors in myelodysplasia and related neoplasms. *Leukemia*. 2014;28(1):78-87.
33. Bejar R, Lord A, Stevenson K, Bar-Natan M, Perez-Ladaga A, Zaneveld J, Wang H, Caughey B, Stojanov P, Getz G, Garcia-Manero G, Kantarjian H, Chen R, Stone RM, Neuberg D, Steensma DP, Ebert BL. TET2 mutations predict response to hypomethylating agents in myelodysplastic syndrome patients. *Blood*. 2014;124(17):2705-2712.
34. Müller-Thomas C, Rudelius M, Rondak IC, Haferlach T, Schanz J, Huberle C, Schmidt B, Blaser R, Kremer M, Peschel C, Germing U, Platzbecker U, Gotze K. Response to azacitidine is independent of p53 expression in higher-risk myelodysplastic syndromes and secondary acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2014;99(10):e179-181.
35. Anderson MA, Deng J, Seymour JF, Tam C, Kim SY, Fein J, Yu L, Brown JR, Westerman D, Si EG, Majewski IJ, Segal D, Heitner Enschede SL, Huang DC, Davids MS, Letai A, Roberts AW. The BCL2 selective inhibitor venetoclax induces rapid onset apoptosis of CLL cells in patients via a TP53-independent mechanism. *Blood*. 2016;127(25):3215-3224.
36. Roberts AW, Davids MS, Pagel JM, Kahl BS, Puvvada SD, Gerecitano JF, Kipps TJ, Anderson MA, Brown JR, Gressick L, Wong S, Dunbar M, Zhu M, Desai MB, Cerri E, Heitner Enschede S, Humerickhouse RA, Wierda WG, Seymour JF. Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *The New England journal of medicine*. 2016;374(4):311-322.
37. Shetty V, Hussaini S, Broady-Robinson L, Allampallam K, Mundle S, Borok R, Broderick E, Mazzoran L, Zorat F, Raza A. Intramedullary apoptosis of hematopoietic cells in myelodysplastic syndrome patients can be massive: apoptotic cells recovered from high-density fraction of bone marrow aspirates. *Blood*. 2000;96(4):1388-1392.

38. Albitar M, Manshouri T, Shen Y, Liu D, Beran M, Kantarjian HM, Rogers A, Jilani I, Lin CW, Pierce S, Freireich EJ, Estey EH. Myelodysplastic syndrome is not merely "preleukemia". *Blood*. 2002;100(3):791-798.
39. Invernizzi R, Pecci A, Bellotti L, Ascari E. Expression of p53, bcl-2 and ras oncoproteins and apoptosis levels in acute leukaemias and myelodysplastic syndromes. *Leukemia & lymphoma*. 2001;42(3):481-489.
40. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellstrom-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937-951.
41. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, Sanz M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier D, Ohyashiki K, Toyama K, Aul C, Mufti G, Bennett J. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997;89(6):2079-2088.
42. Schanz J, Tuchler H, Sole F, Mallo M, Luno E, Cervera J, Granada I, Hildebrandt B, Slovak ML, Ohyashiki K, Steidl C, Fonatsch C, Pfeilstocker M, Nosslinger T, Valent P, Giagounidis A, Aul C, Lubbert M, Stauder R, Krieger O, Garcia-Manero G, Faderl S, Pierce S, Le Beau MM, Bennett JM, Greenberg P, Germing U, Haase D. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(8):820-829.
43. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Sole F, Bennett JM, Bowen D, Fenaux P, Dreyfus F, Kantarjian H, Kuendgen A, Levis A, Malcovati L, Cazzola M, Cermak J, Fonatsch C, Le Beau MM, Slovak ML, Krieger O, Luebbert M, Maciejewski J, Magalhaes SM, Miyazaki Y, Pfeilstocker M, Sekeres M, Sperr WR, Stauder R, Tauro S, Valent P, Vallespi T, van de Loosdrecht AA, Germing U, Haase D. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012;120(12):2454-2465.
44. Malcovati L, Della Porta MG, Strupp C, Ambaglio I, Kuendgen A, Nachtkamp K, Travaglino E, Invernizzi R, Pascutto C, Lazzarino M, Germing U, Cazzola M. Impact of the degree of anemia on the outcome of patients with myelodysplastic syndrome and its integration into the WHO classification-based Prognostic Scoring System (WPSS). *Haematologica*. 2011;96(10):1433-1440.
45. Giagounidis A, Mufti GJ, Fenaux P, Germing U, List A, MacBeth KJ. Lenalidomide as a disease-modifying agent in patients with del(5q) myelodysplastic syndromes: linking mechanism of action to clinical outcomes. *Annals of hematology*. 2014;93(1):1-11.
46. List A, Dewald G, Bennett J, Giagounidis A, Raza A, Feldman E, Powell B, Greenberg P, Thomas D, Stone R, Reeder C, Wride K, Patin J, Schmidt M, Zeldis J, Knight R, Myelodysplastic Syndrome-003 Study I. Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *The New England journal of medicine*. 2006;355(14):1456-1465.
47. Sierra J, Perez WS, Rozman C, Carreras E, Klein JP, Rizzo JD, Davies SM, Lazarus HM, Bredeson CN, Marks DI, Canals C, Boogaerts MA, Goldman J, Champlin RE, Keating A, Weisdorf DJ, de Witte TM, Horowitz MM. Bone marrow transplantation from HLA-identical siblings as treatment for myelodysplasia. *Blood*. 2002;100(6):1997-2004.
48. Malcovati L, Hellstrom-Lindberg E, Bowen D, Ades L, Cermak J, Del Canizo C, Della Porta MG, Fenaux P, Gattermann N, Germing U, Jansen JH, Mittelman M, Mufti G, Platzbecker U, Sanz GF, Selleslag D, Skov-Holm M, Stauder R, Symeonidis A, van de Loosdrecht AA, de Witte T, Cazzola M, European Leukemia N. Diagnosis and

- treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet. *Blood*. 2013;122(17):2943-2964.
49. Luger S, Sacks N. Bone marrow transplantation for myelodysplastic syndrome--who? when? and which? *Bone marrow transplantation*. 2002;30(4):199-206.
 50. Gore SD, Baylin S, Sugar E, Carraway H, Miller CB, Carducci M, Grever M, Galm O, Dausies T, Karp JE, Rudek MA, Zhao M, Smith BD, Manning J, Jiemjit A, Dover G, Mays A, Zwiebel J, Murgo A, Weng LJ, Herman JG. Combined DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in the treatment of myeloid neoplasms. *Cancer research*. 2006;66(12):6361-6369.
 51. Khan R, Schmidt-Mende J, Karimi M, Gogvadze V, Hassan M, Ekstrom TJ, Zhivotovsky B, Hellstrom-Lindberg E. Hypomethylation and apoptosis in 5-azacytidine-treated myeloid cells. *Experimental hematology*. 2008;36(2):149-157.
 52. Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Finelli C, Giagounidis A, Schoch R, Gattermann N, Sanz G, List A, Gore SD, Seymour JF, Bennett JM, Byrd J, Backstrom J, Zimmerman L, McKenzie D, Beach C, Silverman LR, International Vidaza High-Risk MDSSSG. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *The Lancet Oncology*. 2009;10(3):223-232.
 53. Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, Kornblith AB, Holland JC, Odchimar-Reissig R, Stone RM, Nelson D, Powell BL, DeCastro CM, Ellerton J, Larson RA, Schiffer CA, Holland JF. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2002;20(10):2429-2440.
 54. Prebet T, Gore SD, Esterni B, Gardin C, Itzykson R, Thepot S, Dreyfus F, Rauzy OB, Recher C, Ades L, Quesnel B, Beach CL, Fenaux P, Vey N. Outcome of high-risk myelodysplastic syndrome after azacitidine treatment failure. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(24):3322-3327.
 55. Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(2):93-106.
 56. Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*. 2006;441(7097):1075-1079.
 57. Oostendorp RA, Robin C, Steinhoff C, Marz S, Brauer R, Nuber UA, Dzierzak EA, Peschel C. Long-term maintenance of hematopoietic stem cells does not require contact with embryo-derived stromal cells in cocultures. *Stem cells*. 2005;23(6):842-851.
 58. Oostendorp RA, Medvinsky AJ, Kusadasi N, Nakayama N, Harvey K, Orelio C, Ottersbach K, Covey T, Ploemacher RE, Saris C, Dzierzak E. Embryonal subregion-derived stromal cell lines from novel temperature-sensitive SV40 T antigen transgenic mice support hematopoiesis. *Journal of cell science*. 2002;115(Pt 10):2099-2108.
 59. Jilg S, Reidel V, Muller-Thomas C, Konig J, Schauwecker J, Hockendorf U, Huberle C, Gorka O, Schmidt B, Burgkart R, Ruland J, Kolb HJ, Peschel C, Oostendorp RA, Gotze KS, Jost PJ. Blockade of BCL-2 proteins efficiently induces apoptosis in progenitor cells of high-risk myelodysplastic syndromes patients. *Leukemia*. 2016;30(1):112-123.
 60. Pang WW, Pluvinae JV, Price EA, Sridhar K, Arber DA, Greenberg PL, Schrier SL, Park CY, Weissman IL. Hematopoietic stem cell and progenitor cell mechanisms in myelodysplastic syndromes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(8):3011-3016.
 61. Servida F, Soligo D, Caneva L, Bertolini F, de Harven E, Campiglio S, Corsini C, Deliliers GL. Functional and morphological characterization of immunomagnetically selected CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Stem cells*. 1996;14(4):430-438.

62. Jones AK, Freise KJ, Agarwal SK, Humerickhouse RA, Wong SL, Salem AH. Clinical Predictors of Venetoclax Pharmacokinetics in Chronic Lymphocytic Leukemia and Non-Hodgkin's Lymphoma Patients: a Pooled Population Pharmacokinetic Analysis. *The AAPS journal*. 2016.
63. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*. 2003;425(6960):836-841.
64. Raaijmakers MH, Scadden DT. Evolving concepts on the microenvironmental niche for hematopoietic stem cells. *Current opinion in hematology*. 2008;15(4):301-306.
65. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringhurst FR, Milner LA, Kronenberg HM, Scadden DT. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*. 2003;425(6960):841-846.
66. Li X, Deeg HJ. Murine xenogeneic models of myelodysplastic syndrome: an essential role for stroma cells. *Exp Hematol*. 2014;42(1):4-10.
67. Raaijmakers MH, Mukherjee S, Guo S, Zhang S, Kobayashi T, Schoonmaker JA, Ebert BL, Al-Shahrour F, Hasserjian RP, Scadden EO, Aung Z, Matza M, Merckenschlager M, Lin C, Rommens JM, Scadden DT. Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature*. 2010;464(7290):852-857.
68. Kusadasi N, Oostendorp RA, Koevoet WJ, Dzierzak EA, Ploemacher RE. Stromal cells from murine embryonic aorta-gonad-mesonephros region, liver and gut mesentery expand human umbilical cord blood-derived CAFC(week6) in extended long-term cultures. *Leukemia*. 2002;16(9):1782-1790.
69. Oostendorp RA, Harvey KN, Kusadasi N, de Bruijn MF, Saris C, Ploemacher RE, Medvinsky AL, Dzierzak EA. Stromal cell lines from mouse aorta-gonads-mesonephros subregions are potent supporters of hematopoietic stem cell activity. *Blood*. 2002;99(4):1183-1189.
70. Parmar A, Marz S, Rushton S, Holzwarth C, Lind K, Kayser S, Dohner K, Peschel C, Oostendorp RA, Gotze KS. Stromal niche cells protect early leukemic FLT3-ITD+ progenitor cells against first-generation FLT3 tyrosine kinase inhibitors. *Cancer research*. 2011;71(13):4696-4706.
71. Niu X, Zhao J, Ma J, Xie C, Edwards H, Wang G, Caldwell JT, Xiang S, Zhang X, Chu R, Wang ZJ, Lin H, Taub JW, Ge Y. Binding of Released Bim to Mcl-1 is a Mechanism of Intrinsic Resistance to ABT-199 which can be Overcome by Combination with Daunorubicin or Cytarabine in AML Cells. *Clin Cancer Res*. 2016;22(17):4440-4451.
72. Tagscherer KE, Fassl A, Sinkovic T, Combs SE, Roth W. p53-dependent regulation of Mcl-1 contributes to synergistic cell death by ionizing radiation and the Bcl-2/Bcl-XL inhibitor ABT-737. *Apoptosis*. 2012;17(2):187-199.
73. Tiffen JC, Gunatilake D, Gallagher SJ, Gowrishankar K, Heinemann A, Cullinane C, Dutton-Regester K, Pupo GM, Strbenac D, Yang JY, Madore J, Mann GJ, Hayward NK, McArthur GA, Filipp FV, Hersey P. Targeting activating mutations of EZH2 leads to potent cell growth inhibition in human melanoma by derepression of tumor suppressor genes. *Oncotarget*. 2015;6(29):27023-27036.
74. Choudhary GS, Al-Harbi S, Mazumder S, Hill BT, Smith MR, Bodo J, Hsi ED, Almasan A. MCL-1 and BCL-xL-dependent resistance to the BCL-2 inhibitor ABT-199 can be overcome by preventing PI3K/AKT/mTOR activation in lymphoid malignancies. *Cell death & disease*. 2015;6:e1593.
75. Raza A, Gezer S, Mundle S, Gao XZ, Alvi S, Borok R, Rifkin S, Iftikhar A, Shetty V, Parcharidou A, et al. Apoptosis in bone marrow biopsy samples involving stromal and hematopoietic cells in 50 patients with myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1995;86(1):268-276.

76. Bogdanovic AD, Trpinac DP, Jankovic GM, Bumbasirevic VZ, Obradovic M, Colovic MD. Incidence and role of apoptosis in myelodysplastic syndrome: morphological and ultrastructural assessment. *Leukemia*. 1997;11(5):656-659.
77. Raza A, Alvi S, Broady-Robinson L, Showel M, Cartlidge J, Mundle SD, Shetty VT, Borok RZ, Dar SE, Chopra HK, Span L, Parcharidou A, Hines C, Gezer S, Venugopal P, Loew J, Showel J, Alston D, Hernandez B, Rifkin S, Robin E, Shah R, Gregory SA. Cell cycle kinetic studies in 68 patients with myelodysplastic syndromes following intravenous iodo- and/or bromodeoxyuridine. *Experimental hematology*. 1997;25(6):530-535.
78. Parker JE, Mufti GJ. Ineffective haemopoiesis and apoptosis in myelodysplastic syndromes. *British journal of haematology*. 1998;101(2):220-230.
79. Vo TT, Ryan J, Carrasco R, Neuberg D, Rossi DJ, Stone RM, Deangelo DJ, Frattini MG, Letai A. Relative mitochondrial priming of myeloblasts and normal HSCs determines chemotherapeutic success in AML. *Cell*. 2012;151(2):344-355.
80. Ni Chonghaile T, Sarosiek KA, Vo TT, Ryan JA, Tammareddi A, Moore Vdel G, Deng J, Anderson KC, Richardson P, Tai YT, Mitsiades CS, Matulonis UA, Drapkin R, Stone R, Deangelo DJ, McConkey DJ, Sallan SE, Silverman L, Hirsch MS, Carrasco DR, Letai A. Pretreatment mitochondrial priming correlates with clinical response to cytotoxic chemotherapy. *Science*. 2011;334(6059):1129-1133.
81. Pan R, Hogdal LJ, Benito JM, Bucci D, Han L, Borthakur G, Cortes J, DeAngelo DJ, Debose L, Mu H, Dohner H, Gaidzik VI, Galinsky I, Golfman LS, Haferlach T, Harutyunyan KG, Hu J, Levenson JD, Marcucci G, Muschen M, Newman R, Park E, Ruvolo PP, Ruvolo V, Ryan J, Schindela S, Zweidler-McKay P, Stone RM, Kantarjian H, Andreeff M, Konopleva M, Letai AG. Selective BCL-2 inhibition by ABT-199 causes on-target cell death in acute myeloid leukemia. *Cancer discovery*. 2014;4(3):362-375.
82. Mak DH, Wang RY, Schober WD, Konopleva M, Cortes J, Kantarjian H, Andreeff M, Carter BZ. Activation of apoptosis signaling eliminates CD34+ progenitor cells in blast crisis CML independent of response to tyrosine kinase inhibitors. *Leukemia*. 2012;26(4):788-794.
83. Beurlet S, Omidvar N, Gorombeï P, Krief P, Le Pogam C, Setterblad N, de la Grange P, Leboeuf C, Janin A, Noguera ME, Hervatin F, Sarda-Mantel L, Konopleva M, Andreeff M, Tu AW, Fan AC, Felsher DW, Whetton A, Pla M, West R, Fenaux P, Chomienne C, Padua RA. BCL-2 inhibition with ABT-737 prolongs survival in an NRAS/BCL-2 mouse model of AML by targeting primitive LSK and progenitor cells. *Blood*. 2013;122(16):2864-2876.
84. Omidvar N, Kogan S, Beurlet S, le Pogam C, Janin A, West R, Noguera ME, Reboul M, Soulie A, Leboeuf C, Setterblad N, Felsher D, Lagasse E, Mohamedali A, Thomas NS, Fenaux P, Fontenay M, Pla M, Mufti GJ, Weissman I, Chomienne C, Padua RA. BCL-2 and mutant NRAS interact physically and functionally in a mouse model of progressive myelodysplasia. *Cancer research*. 2007;67(24):11657-11667.
85. Drexler HG, Dirks WG, Macleod RA. Many are called MDS cell lines: one is chosen. *Leukemia research*. 2009;33(8):1011-1016.
86. Brown FC, Cifani P, Drill E, He J, Still E, Zhong S, Balasubramanian S, Pavlick D, Yilmazel B, Knapp KM, Alonzo TA, Meshinchi S, Stone RM, Kornblau SM, Marcucci G, Gams AS, Byrd JC, Gonen M, Levine RL, Kentsis A. Genomics of primary chemoresistance and remission induction failure in paediatric and adult acute myeloid leukaemia. *British journal of haematology*. 2017;176(1):86-91.
87. Goyama S, Schibler J, Cunningham L, Zhang Y, Rao Y, Nishimoto N, Nakagawa M, Olsson A, Wunderlich M, Link KA, Mizukawa B, Grimes HL, Kurokawa M, Liu PP,

- Huang G, Mulloy JC. Transcription factor RUNX1 promotes survival of acute myeloid leukemia cells. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(9):3876-3888.
88. Beguelin W, Popovic R, Teater M, Jiang Y, Bunting KL, Rosen M, Shen H, Yang SN, Wang L, Ezponda T, Martinez-Garcia E, Zhang H, Zheng Y, Verma SK, McCabe MT, Ott HM, Van Aller GS, Kruger RG, Liu Y, McHugh CF, Scott DW, Chung YR, Kelleher N, Shaknovich R, Creasy CL, Gascoyne RD, Wong KK, Cerchiatti L, Levine RL, Abdel-Wahab O, Licht JD, Elemento O, Melnick AM. EZH2 is required for germinal center formation and somatic EZH2 mutations promote lymphoid transformation. *Cancer cell*. 2013;23(5):677-692.
89. Konopleva M, Milella M, Ruvolo P, Watts JC, Ricciardi MR, Korchin B, McQueen T, Bornmann W, Tsao T, Bergamo P, Mak DH, Chen W, McCubrey J, Tafuri A, Andreeff M. MEK inhibition enhances ABT-737-induced leukemia cell apoptosis via prevention of ERK-activated MCL-1 induction and modulation of MCL-1/BIM complex. *Leukemia*. 2012;26(4):778-787.
90. Reidel V, Kauschinger J, Hauch RT, Muller-Thomas C, Nadarajah N, Burgkart R, Schmidt B, Hempel D, Jacob A, Slotta-Huspenina J, Hockendorf U, Peschel C, Kern W, Haferlach T, Gotze KS, Jilg S, Jost PJ. Selective inhibition of BCL-2 is a promising target in patients with high-risk myelodysplastic syndromes and adverse mutational profile. *Oncotarget*. 2018;9(25):17270-17281.

7 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|--|
| 7AAD | 7-Aminoactinomycin D |
| AML | Akute myeloische Leukämie |
| ANOVA | Analysis of Variance |
| APAF-1 | Apoptotic Protease-activating Factor 1 |
| ASXL1 | Additional Sex Combs-like 1 |
| BAD | BCL-2 Antagonist of Cell Death |
| BAK | BCL-2 Antagonist/Killer |
| BAX | BCL-2-associated X Protein |
| BCL-2 | B-Cell Lymphoma 2 |
| BCR | B-Cell Receptor |
| BFU-E | Burst forming Unit-Erythrocyte |
| BH | BCL-2 Homology |
| (t)BID | (Truncated) BH3-interacting Domain Death Antagonist |
| BIK | BCL-2-interacting Killer |
| BIM | BCL-2-interacting Mediator of Cell Death |
| BIR | Baculoviral IAP Repeat |
| BMF | BCL-2-modifying Factor |
| BMMNC | Bone Marrow mononuclear Cells |
| BOK | BCL-2-related ovarian Killer Protein |
| bzw. | Beziehungsweise |
| ca. | circa |
| CAFC | Cobblestone Area-forming Cell |
| CARD | Caspase Recruitment Domain |
| Caspase | CysteinyI-aspartat-specific Protease |
| CD95L | CD95 Ligand |
| CFC | Colony-forming Cell |
| CFU-GEMM | Colony forming Unit-Granulocyte, Erythrocyte, Macrophage, Megakaryocyte |
| CFU-GM | Colony forming Unit-Granulocyte, Macrophage |
| CLL | Chronische lymphatische Leukämie |
| DD | Death Domain |
| DISC | Death-inducing signaling Complex |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|---|
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Deoxyribonucleic Acid |
| DNMT | DNA-Methyltransferase |
| EC ₅₀ | Mittlere effektive Konzentration |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EZH2 | Enhancer of Zeste Homologue 2 |
| FAB | French American British |
| FACS | Fluorescence-activated Cell Sorting |
| FADD | Fas associated Death Domain |
| FcR | Fc-Rezeptor |
| g | Fallbeschleunigung |
| HMA | Hypomethylating Agent |
| HRK | Harakiri |
| IAP | Inhibitor of Apoptosis Protein |
| IC ₅₀ | Mittlere inhibitorische Konzentration |
| IPSS | International Prognostic Scoring System |
| IPSS-R | International Prognostic Scoring System-Revised |
| K _i | Inhibitor-Konstante |
| KI | Konfidenzintervall |
| MACS | Magnetic activated Cell Sorting |
| MCL-1 | Myeloid Cell Leukemia Sequence 1 |
| MDS | Myelodysplastische Syndrome |
| MDS-U | Unklassifizierte MDS |
| MEK | Mitogen-activated Protein/Extracellular Signal-regulated Kinase |
| MFI | Mean Fluorescence Intensity |
| mg | Milligramm |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| MLL | Münchener Leukämielabor |
| mM | Millimolar |
| n.a. | Not applicable |
| n.d. | Not done |
| NHEJ | Non-homologous End joining |
| NK-Zellen | Natural Killer-Zellen |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|--|
| NMR | Nuclear magnetic Resonance |
| PBMNC | Peripheral Blood Mononuclear Cell |
| PBS | Phosphat-gepufferte Saline |
| PUMA | P53 upregulated Modulator of Apoptosis |
| RA | Refraktäre Anämie |
| RAEB-1 | Refraktäre Anämie mit Blastenexzess 1 |
| RAEB-2 | Refraktäre Anämie mit Blastenexzess 2 |
| RARS | Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten |
| RCMD | Refraktäre Zytopenie mit multilineären Dysplasien |
| RCUD | Refraktäre Zytopenie mit unilineärer Dysplasie |
| rh EPO | Recombinant Human Erythropoietin |
| rh G-CSF | Recombinant human Granulocyte Colony-stimulating Factor |
| rh GM-CSF | Recombinant Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor |
| rh IL-3 | Recombinant human Interleukin-3 |
| rh IL-6 | Recombinant human Interleukin-6 |
| rh SCF | Recombinant human Stem-Cell Factor |
| RN | Refraktäre Neutropenie |
| RT | Refraktäre Thrombopenie |
| RUNX1 | Runt-related Transcription Factor 1 |
| r-WPSS | Revised WHO Prognostic Scoring System |
| sAML | Sekundäre akute myeloische Leukämie aus MDS |
| SCLC | Small Cell Lung Cancer |
| SF3B1 | Splicing Factor 3B Subunit 1 |
| sgRNA | Single-guide RNA |
| SMAC/DIABLO | Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/ Direct IAP-binding Protein with low PI |
| TET2 | Tet Methylcytosine Dioxygenase 2 |
| TM | Transmembrandomäne |
| TNF- α | Tumor Necrosis Factor- α |
| TNF-R | Tumor Necrosis Factor Receptor |
| TNFR1 | TNF Receptor 1 |
| TP53 | Tumor Protein 53 |
| TRAIL | TNF-related Apoptosis-inducing Ligand |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|--|
| TRAIL-R1 | TNF-related Apoptosis-inducing Ligand Receptor 1 |
| TRAIL-R2 | TNF-related Apoptosis-inducing Ligand Receptor 2 |
| vgl. | Vergleiche |
| vs. | Versus |
| WHO | World Health Organization |
| μl | Mikroliter |
| μM | Mikromolar |

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die BCL-2-Familie als Gruppe pro- und anti-apoptotischer Proteine.

Abbildung 2: Die stadienabhängige Fehlregulation der Apoptose im Knochenmark von MDS-Patienten.

Abbildung 3: Aufreinigung von CD34⁺ Stamm-/Progenitorzellen aus humanen mononukleären Knochenmarkzellen.

Abbildung 4: ABT-199 ist nicht toxisch für Stamm- und Progenitorzellen sowie die Gesamtheit der Knochenmarkzellen einer gesunden, alterskorrelierten Kontrollkohorte.

Abbildung 5: ABT-199 und ABT-737 töten Stamm- und Progenitorzellen von Patienten mit „high-risk“-MDS/sAML zeitabhängig.

Abbildung 6: Die Wirksamkeit von ABT-199 in Progenitor-/Stammzellen steigt mit der MDS-Risikogruppe.

Abbildung 7: Die Wirksamkeit von ABT-199 in reifen Knochenmarkzellen steigt mit der MDS-Risikogruppe.

Abbildung 8: ABT-737 und ABT-199 treiben selektiv koloniebildende Stamm-/Progenitorzellen von Hochrisiko-MDS/sAML-Patienten in den Zelltod.

Abbildung 9: Stromazellen vermindern die Apoptose-Induktion in Stamm-/Progenitorzellen von Hochrisiko-MDS/sAML nur geringfügig.

Abbildung 10: Erhöhte MCL-1-Proteinexpression vermittelt Resistenz gegenüber ABT-199 und ABT-737 in primären MDS-Proben.

Abbildung 11: Die Proteinexpression kritischer BCL-2-Mitglieder korreliert mit der Viabilität nach Inhibitor-Behandlung mit ABT-199 oder ABT-737 in primären humanen MDS-Proben.

Abbildung 12: Die Genexpressionsanalyse kritischer Mitglieder der BCL-2-Familie zeigt eine reduzierte *BIM*-Genexpression in fortgeschrittenen MDS-Stadien.

Abbildung 13: MDS-Risikomutationen in *ASXL1*, *RUNX1*, *EZH2* oder *TP53* haben keinen Effekt auf die BCL-2-Proteinexpression primärer MDS-Proben.

Abbildung 14: Die Genexpressionsanalyse von *MCL-1* in gesunden Kontrollprobanden und MDS-Patienten unterschiedlicher Risikogruppen.

Abbildung 15: Kaplan-Meier-Kurve von 29 MDS/sAML-Patienten, deren Knochenmark in dieser Studie *ex vivo* untersucht wurde.

Abbildung 16: Der anti-apoptotische Effekt von ABT-199 auf CD34⁺ Zellen von MDS/sAML-Patienten ist unabhängig von prognostisch ungünstigen Mutationen in *ASXL1*, *RUNX1*, *TP53* und *EZH2*.

Abbildung 17: Die Toxizität von ABT-199 steigt mit der Krankheitsprogression unabhängig vom Mutationsstatus.

Abbildung 18: BCL-2, BCL-X_L und MCL-1 als Biomarker für eine erfolgreiche Behandlung mit ABT-199 in Patienten mit einem ungünstigen Mutationsprofil.

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: WHO-Klassifikation Myelodysplastischer Syndrome (2008) (40).

Tabelle 2: Definition des IPSS nach Greenberg *et al.* (1997) (41).

Tabelle 3: Definition des r-WPSS (44).

Tabelle 4: Zytogenetische Risikogruppen nach Schanz *et al.* (2012) (42) und Greenberg *et al.* (2012) (4343).

Tabelle 5: Klinische Charakteristika des Patientenkollektivs für die Inhibition anti-apoptotischer Proteine.

Tabelle 6: Verteilung des mittleren Alters und des Geschlechts des Patientenkollektivs für die Inhibition anti-apoptotischer Proteine.

Tabelle 7: Klinische Charakteristika des Patientenkollektivs für die Mutationsanalysen.

Tabelle 8: Verteilung der klinischen und molekularen Charakteristika des Kollektivs für die Mutationsanalysen.

Tabelle 9: Verteilung des Mutationsstatus von *ASXL1*, *RUNX1*, *TP53* und *EZH2* bei MDS- und sAML-Patienten für die Mutationsanalysen.

Tabelle 10: Die paarweisen Differenzen der Mittelwerte mit 95%-Konfidenzintervall zu Abbildung 6.

Tabelle 11: Die paarweisen Differenzen der Mittelwerte mit 95%-Konfidenzintervall zu Abbildung 7.

Tabelle 12: Die paarweisen Differenzen der Mittelwerte mit 95%-Konfidenzintervall zu den Abbildungen 16 und 17.

10 Danksagung

Mein Dank gilt zuerst den zahlreichen Patienten und gesunden Kontrollprobanden, die ihr Knochenmark der MDS-Forschung spendeten und damit diese Arbeit überhaupt möglich machten. Ich danke Univ.-Prof. Dr. Christian Peschel und Univ.-Prof. Dr. Florian Bassermann, die es mir ermöglichten, die vorliegende Dissertation an ihrer Klinik durchzuführen. Im Besonderen gilt mein Dank Prof. Dr. Philipp Jost für die Vergabe dieses vielseitigen Themas und für die stets exzellente Betreuung während der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit. Vor allem bedanke ich mich bei meiner Betreuerin Dr. med. Stefanie Jilg, die mich mit höchstem Engagement förderte und die mir jede nur denkbare fachliche und persönliche Unterstützung zukommen ließ. Ein großer Dank gilt den Kollegen der gesamten Arbeitsgruppe für ihre Unterstützung und für das hervorragende Arbeitsklima. Hervorheben möchte ich Ulrike Höckendorf, deren Expertise mir bei zahlreichen technischen Fragen behilflich war. Bei meinen Kollegen Johanna Kauschinger, Richard Hauch und Lars Buschhorn bedanke ich mich ganz herzlich für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Atmosphäre im Team. Außerdem möchte ich mich bei der Leiterin des MDS-Zentrums Prof. Dr. Katharina Götze für ihre fachkundige Unterstützung bedanken. Großer Dank gilt auch unseren Kooperationspartnern Dr. med. Catharina Müller-Thomas, Dr. med. Burkhard Schmidt, Prof. Dr. Dr. Torsten Haferlach und Dr. med. Frauke Bellos für die Vermittlung der MDS-Proben, Dr. med. Johannes Schauwecker für die Organisation der humanen Hüftkopfe und PD Dr. Robert Oostendorp für die Bereitstellung der Stromazelllinie EL08-1D2. Des Weiteren danke ich den Mitarbeitern des WEHI, die uns freundlicherweise den MCL-1-Antikörper für die intrazelluläre Durchflusszytometrie zur Verfügung stellten. Außerdem bedanke ich mich herzlich bei DGHO und GMIHO für die großzügige Unterstützung durch das Promotionsstipendium und die Möglichkeit, meine Projektergebnisse bei der Jahrestagung der DGHO 2016 zu präsentieren. Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, insbesondere bei meinen Eltern Rosmarie und Klaus Reidel, sowie bei meinem Ehemann Johannes Dill für ihre bedingungslose Unterstützung und Liebe bedanken.