

Christina Schmidt

Dr. med.

## **BCL-2 inhibition synergizes with dual targeting of FLT3 and AXL in FLT3 wildtype AML via downregulation of MCL-1**

Fach: Innere Medizin

Doktorvater: Prof. Dr. Carsten Müller-Tidow

Akute myeloische Leukämie entsteht durch abnormale Proliferation leukämischer Stamm- und Vorläuferzellen im Knochenmark. Die wirksamste Behandlung besteht in einer hochdosierten Chemotherapie, allerdings sind Therapieoptionen für ältere und multimorbide Patient:innen, die die starken Nebenwirkungen nicht tolerieren können, eingeschränkt. Für diese Patient:innengruppe werden niedrigdosierte Chemotherapie oder hypomethylierende Substanzen eingesetzt. Im Jahr 2018 wurde ein neues Medikament für die Therapie der akuten myeloischen Leukämie zugelassen: Venetoclax. Venetoclax hemmt das anti-apoptotische Protein BCL-2 und Studien belegten die gute Wirksamkeit gegen akute myeloische Leukämie. Die Wirkung des Medikaments ist jedoch stärker, wenn es in Kombination mit anderen Substanzen gegeben wird. Da Azacitidin bereits länger bei älteren und unfitten Patient:innen zugelassen ist, eignet es sich für die Kombinationstherapie mit Venetoclax, welche mittlerweile den Standardansatz für Erkrankte, die keine hochdosierte Chemotherapie erhalten können, darstellt. Allerdings wurde bisher nie systematisch untersucht, welches Medikament der beste Kombinationspartner für Venetoclax wäre. Zudem stellen Rezidive und refraktäre Krankheit weiterhin große Herausforderungen in der Behandlung der akuten myeloischen Leukämie dar.

Das Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, welche Medikamente synergistisch mit Venetoclax gegen akute myeloische Leukämie wirken und den Wirkmechanismus einer ausgewählten effizienten Kombination näher zu erforschen. Außerdem sollte untersucht werden, wie die Kombinationstherapie genutzt werden kann, um Resistenz gegen Venetoclax zu verhindern oder zu überwinden.

Um Medikamente zu finden, die synergistisch mit Venetoclax wirken, wurden 64 Substanzen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen in verschiedenen Dosierungen mit Venetoclax in einem Medikamentenscreen kombiniert. Insgesamt wurden 31 Proben von Patient:innen für 48 Stunden behandelt und dann Synergiemaßzahlen berechnet. Die Medikamentenkombination, auf die sich diese Arbeit konzentrierte, wurde in Zelllinien und primären Proben weiter erforscht. Zur mechanistischen Analyse wurden intrazelluläre Signalwege, Proteinphosphorylierungen und proteasomaler Abbau untersucht. Um sich dem Problem der Resistenz gegen Venetoclax zu nähern, wurden sensible und resistente Zelllinien- und Patient:innenproben verglichen und die Wirkung der Medikamentenkombination auf diese Proben untersucht. Außerdem wurden die Medikamente

in einem Xenograft-Model getestet und vier Patient:innen bekamen die Medikamentenkombination im Rahmen eines individuellen Heilversuchs.

Die Medikamente mit der stärksten synergistischen Wirkung mit Venetoclax im Medikamentenscreen waren ein Inhibitor des anti-apoptischen Proteins MCL-1, ein Bromodomäneninhibitor und Gilteritinib, ein FLT3-Kinaseinhibitor. Diese Arbeit konzentrierte sich auf den Synergismus von Venetoclax und Gilteritinib. Die Synergie dieser Medikamente war in akuter myeloischer Leukämie mit FLT3-Wildtyp-Status und in Hochrisiko-Proben, z.B. mit TP53-Mutation oder komplexem Karyotyp, besonders ausgeprägt. Gilteritinib und Venetoclax verminderten die Zellviabilität, induzierten Apoptose und reduzierten die Koloniebildungskapazität in FLT3-Wildtyp-Leukämiezelllinien. Die Medikamentenkombination reduzierte die Phosphorylierung ERKs mit nachfolgender verminderter Phosphorylierung und Inaktivierung GSK3s. Dadurch wurde MCL-1 weniger an Threonin 163 und mehr an Serin 159 phosphoryliert. Die veränderte Phosphorylierung des anti-apoptischen Proteins induzierte dessen proteasomalen Abbau. Also wirkte Gilteritinib indirekt auf MCL-1 und erhöhte so die Wirkung der BCL-2-Hemmung.

Der Synergismus der Inhibition von BCL-2 und FLT3 in der FLT3-Wildtyp akuter myeloischer Leukämie war Gilteritinib-spezifisch und wurde nicht bei anderen FLT3-Inhibitoren gefunden. Dies liegt an den spezifischen Zielmolekülen von Gilteritinib, welches sowohl FLT3 als auch AXL, eine Kinase, die in akuter myeloischer Leukämie verstärkt aktiv ist, hemmt. Die Hemmung der AXL-Kinase trug zum proteasomalen Abbau des Proteins MCL-1 bei.

Gilteritinib war in einer Zelllinie mit Resistenz gegen Venetoclax und Azacitidin und in Patient:innenproben mit refraktärer FLT3-Wildtyp akuter myeloischer Leukämie unter Therapie mit Venetoclax und Azacitidin wirksam. Proteomanalysen zeigten, dass FLT3- und MAPK-Signalwege in der resistenten Zelllinie und in Patient:innenproben mit geringem in vitro Ansprechen auf Venetoclax und Azacitidin verstärkt exprimiert werden. Außerdem war MCL-1 in der resistenten Zelllinie hochreguliert. Die Bedeutung von FLT3 Signalwegaktivierung und MCL-1 in resistenten Zellen könnte die Wirkung von Gilteritinib in Proben nach Rezidiv oder refraktärer Erkrankung erklären.

Gilteritinib und Venetoclax hemmten das Einnisten leukämischer Zellen in das Knochenmark von Mäusen in einem Xenograft-Model für akute myeloische Leukämie mit TP53-Mutation und FLT3-Wildtyp. Außerdem verminderte die Medikamentenkombination die Vermehrung der leukämischen Blasten bei vier mehrfach vorbehandelten Patient:innen mit Rezidiv oder refraktärer Erkrankung unter Venetoclax und Azacitidin.

Zusammenfassend könnte die Kombination von Gilteritinib und Venetoclax eine vielversprechende Therapieoption für Patient:innen mit akuter myeloischer Leukämie mit FLT3 Wildtyp darstellen, deren Wirksamkeit in klinischen Studien untersucht werden sollte.