

Aus der
III. Medizinischen Klinik, Hämatologie und Internistische Onkologie
der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Direktor: Prof. Dr. med. Wolf-Karsten Hofmann)

**In-vitro-Testung von Alvocidib an Knochenmarkstammzellen von
Patienten mit Hochrisiko-MDS**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Alina Wein

aus
Pforzheim
2024

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referent: Prof. Dr. med. Daniel Nowak

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG	3
1.1 Myelodysplastische Neoplasien	3
1.1.1 Pathogenese	3
1.1.2 Klinisches Bild	4
1.1.3 Diagnostik und Klassifikation	4
1.1.4 Prognostische Faktoren	7
1.1.5 Therapie	8
1.2 Zellzyklus und Zellzyklusregulation	12
1.3 Apoptose	13
1.3.1 Extrinsischer Weg	15
1.3.2 Intrinsischer Weg	15
1.3.3 Apoptosedysfunktion in MDS	16
1.3.4 Alvocidib (Flavopiridol)	18
1.3.5 Kombination von Alvocidib und 5-Azacitidin	18
1.4 Zielsetzung	19
2 MATERIAL UND METHODEN	20
2.1 Patienten	20
2.2 Isolation mononukleärer Knochenmarkzellen	20
2.3 Herstellung des Erythrozyten-Lysepuffers	21
2.4 Kryokonservierung	21

2.5	Auftauen kryokonservierter mononukleärer oder CD34+ Zellen.....	22
2.6	Anreicherung von CD34+ Zellen aus mononukleären Zellen	22
2.7	Bestimmung der Zellzahl	23
2.8	Kultivierung von CD34+ Zellen	24
2.9	Ermittlung der Dosis-Wirkungs-Kurven von Alvocidib und 5-Aza	24
2.10	Zellviabilitäts-Assay	25
2.11	Apoptose-Assay	27
2.12	Colony Forming Unit Assays	31
2.12.1	Behandlung mit Alvocidib und 5-Aza.....	32
2.12.2	Kolonisierung.....	32
2.12.3	Durchflusszytometrische Analyse.....	33
2.13	Myeloid Panel Sequenzierung	34
2.14	Klinische Daten.....	35
2.15	Statistische Analyse	35
3	ERGEBNISSE	36
3.1	Dosis-Wirkungs-Kurven von Alvocidib und 5-Aza.....	36
3.2	Zellviabilitäts-Assay	36
3.3	Apoptose-Assay	41
3.4	CFU-Assays	46
3.5	Patientencharakteristika	50
3.6	Zusammenhang zwischen klinischen Parametern und Zellviabilität	51
3.7	Zusammenhang zwischen Überlebenswahrscheinlichkeit und Zellviabilität	55
3.8	Myeloid-Panel-Sequenzierung	56
3.9	Zusammenhang zwischen Mutationsstatus und Zellviabilität	58

4 DISKUSSION	62
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	68
6 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	69
7 TABELLENVERZEICHNIS	70
8 LITERATURVERZEICHNIS.....	71
9 TABELLARISCHER ANHANG.....	76
10 LEBENS LAUF	79
11 DANKSAGUNG	80

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

5-Aza	5-Azacidin
ABB	<i>Annexin binding buffer</i>
AMP	Adenosinmonophosphat
APAF-1	<i>Adapter protein apoptotic protease activating factor 1</i>
ASXL1	<i>Additional Sex Combs-Like 1</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Best.-Nr.	Bestellnummer
BH	<i>BCL-2-Homology</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD34	Oberflächenantigen hämatopoetischer Stammzellen
CD8	Oberflächenantigen zytotoxischer T-Zellen
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i> (Cyclin-abhängige Kinase)
CDKI	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor</i> (CDK-Hemmer)
CDT	Carboxyterminale Domäne
CFU	<i>Colony formation unit</i> (koloniebildende Einheit)
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
DISC	<i>Death-inducing signaling complex</i> (Tod-induzierender Signalkomplex)
DMSO	Dimethylsulfoxid
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FFC	<i>Forward scatter</i>
FKS	Fetales Kälberserum
Hb	Hämoglobin
HMA	<i>Hypomethylating agents</i> (hypomethylierende Substanzen)
HSC	<i>Hematopoietic stem cells</i> (Hämatopoetische Stammzellen)
IC	<i>Inhibitory concentration</i> (Inhibitorische Konzentration)
IPSS-R	<i>Revised international prognostic scoring system</i>
KM	Knochenmark
MACS	<i>Magnetic activated cell sorting</i> (magnetisch aktivierte Zellsortierung)

MDS	Myelodysplastische Neoplasien, ehem. Myelodysplastische Syndrome
MDS-EB	<i>MDS with excess of blasts</i> (MDS mit Blastenexzess)
MDS-MLD	MDS mit Mehrliniendysplasie
MOLM13	Zelllinie (sAML aus MDS)
MOM	<i>Mitochondrial outer membrane</i> (äußere Mitochondrienmembran)
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i> (Boten-Ribonukleinsäure)
NOXA	Antiapoptotisches Protein der Zellzyklusregulation
PBS	<i>Phosphat buffered saline</i>
sAML	Sekundäre akute myeloische Leukämie
SSC	<i>Side scatter</i>

1 EINLEITUNG

1.1 Myelodysplastische Neoplasien

Myelodysplastische Neoplasien (MDS) sind eine heterogene Gruppe maligner klonaler Erkrankungen der hämatopoetischen Stammzellen (HSC), die sich klinisch mit Zytopenien präsentieren und mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer sekundären akuten myeloischen Leukämie (sAML) einhergehen¹. MDS gehören zu den häufigsten malignen hämatologischen Erkrankungen. Die Inzidenz beträgt ca. 4-5/100.000 Einwohner pro Jahr, bei den über 70-Jährigen steigt die Inzidenz auf >30/100.000. Der Erkrankungsgipfel liegt bei ca. 75 Jahren, wobei Männer etwas häufiger betroffen sind als Frauen².

1.1.1 Pathogenese

Die Pathogenese von MDS ist sehr komplex und heterogen. In den letzten Jahren konnten vermehrt molekulargenetische Ursachen gefunden werden. Über einen Zeitraum von mehreren Jahren akkumulieren epigenetische und genomische Veränderungen in HSC. Diese genetisch veränderten HSC werden selektiert und expandieren, womit sie die gesunden blutbildenden Zellen verdrängen^{3,4}. Unterteilt in Risikogruppen nach IPSS-R (*revised international prognostic scoring system*)⁵ geht das *Low-Risk*-MDS mit einer erhöhten Apoptoserate der HSC einher, während sich das *High-Risk*-MDS durch eine vermehrte Expression antiapoptotischer Proteine sowie einer verminderten Apoptoserate auszeichnet^{6,7}. Patienten mit *High-Risk*-MDS haben ein höheres Risiko, eine sAML zu entwickeln und/oder zu sterben⁵.

1.1.2 Klinisches Bild

MDS manifestieren sich zunächst in 70 % der Fälle mit einer Anämie⁸, häufig auch mit Bi- oder Panzytopenie, wenn auch die Thrombo- und Leukopoese betroffen sind. Symptome der Zytopenien reichen von Allgemeinsymptomen wie Abgeschlagenheit oder Fatigue und Müdigkeit über Luftnot, Herzrasen, verstärkte *Angina pectoris* Beschwerden, Blässe der Schleimhäute bis hin zu gastrointestinalen Beschwerden sowie wiederkehrenden Infekten vor allem des Bronchialsystems und der Haut. Ungefähr 40 % der Patienten haben bei Erstdiagnose des MDS eine Thrombozytopenie mit einer Thrombozytenzahl $<100.000/\mu\text{l}$. Blutungskomplikationen sind initial jedoch selten und treten eher im weiteren Verlauf auf^{3,4}.

1.1.3 Diagnostik und Klassifikation

Zur Diagnosestellung des MDS gehört auch der Ausschluss wahrscheinlicher Differenzialdiagnosen. Zu diesen zählen unter anderem die aplastische Anämie, toxische Knochenmarkschäden, reaktive Knochenmarkveränderungen, megaloblastäre Anämien, Immunthrombozytopenien, akute Leukämien sowie myeloproliferative Erkrankungen. Hierfür werden primär ein Differenzialblutbild des peripheren Blutes und eine Knochenmarkpunktion benötigt. Untersucht werden die Zytomorphologie des Blutes und des Knochenmarks. Im Blut- und Knochenmarkausstrich können Dysplasiezeichen (**Tabelle 1**) erkannt und der medulläre Blastenanteil ermittelt werden. Zu den diagnostischen Basiskriterien eines MDS gehört eine konstante Zytopenie (1–3 betroffene Zellreihen: Hämoglobin <10 g/dl, Neutrophile $<1.800/\mu\text{l}$, Thrombozyten $<100.000/\mu\text{l}$), ohne dass andere Ursachen für die Zytopenie vorliegen. MDS-spezifische Merkmale beinhalten dysplastische Veränderungen bei ≥ 10 % der Zellen einer oder mehrerer Zellreihen, das Vorliegen von Ringsideroblasten, eine Blastenvermehrung von 5–19 % und typische chromosomale Veränderungen im Karyotyp, z. B. eine $\text{del}(20q)$ ⁹.

Tabelle 1: Zytomorphologische Kennzeichen von Dysplasie ¹⁰

Dyserythropoese	Dysgranulopoese	Dysthrombopoese
<ul style="list-style-type: none"> - Kernknospung - Internukleäre Brücken - Karyorrhesis - Mehrkernigkeit - Megaloblastoide Veränderungen - Chromatinverklumpung - Atypische Mitosen - Ringsideroblasten - Vakuolisierung - PAS (Periodic acid-Schiff)-Positivität 	<ul style="list-style-type: none"> - Größenveränderungen - Kernhyposegmentierung (Pseudo-Pelger-Huët) - Hypogranulation - Agranulation - Pseudo-Chédiak-Hihashi-Granulation - Blasten - Döhle-Körperchen - Auer-Stäbchen 	<ul style="list-style-type: none"> - Mikromegakaryozyten - Kernhypolobation - Mononukleäre, binukleäre Megakaryozyten - Fehlende Thrombozytenabschilferung

Eine molekulargenetische Analyse und eine Chromosomenanalyse sind zusätzlich nötig, um einerseits das MDS zu klassifizieren und um andererseits eine Prognoseabschätzung vorzunehmen (siehe **1.1.4**). Die Klassifikation der MDS wird aktuell nach der WHO-Klassifikation 2022 vorgenommen ¹¹. Zum Zeitpunkt der Entstehung dieser Arbeit war jedoch die WHO-Klassifikation 2016 aktuell, sodass an dieser Stelle ausschließlich auf diese eingegangen wird ¹². Klassifiziert wird anhand der folgenden Kriterien: Anzahl der dysplastischen Zellreihen, Anzahl der Zytopenien, Anteil von Ringsideroblasten, Anteil von Blasten im Knochenmark und peripherem Blut und dem Karyotyp (**Tabelle 2**).

Tabelle 2: WHO 2016 Klassifikation der MDS ¹²

Kategorie	Dysplastische Reihen	Zytopenien	Ringsideroblasten (% der erythroiden Zellen)	Blasten im Knochenmark (KM) und peripherem Blut (PB)	Karyotyp (konventionelle Bänderung)
MDS mit Einliniendysplasie	1	1 oder 2	<15 % / <5 % ¹	KM <5 %, PB <1 %, keine Auer Stäbchen	Alle, außer del(5q) +/- 1 andere Nicht-Chr. 7 Aberration
MDS mit Mehrliniendysplasie	2 oder 3	1-3	<15 % / <5 % ¹	KM <5 %, PB <1 %, keine Auer Stäbchen	Alle, außer del(5q) +/- 1 andere Nicht-Chr. 7 Aberration
MDS mit Ringsideroblasten					
MDS mit Ringsideroblasten und Einliniendysplasie	1	1 oder 2	≥15 % / ≥5 % ¹	KM <5 %, PB <1 %, keine Auer Stäbchen	Alle, außer del(5q) +/- 1 andere Nicht-Chr. 7 Aberration 5q
MDS mit Ringsideroblasten und Mehrliniendysplasie	2 oder 3	1-3	≥15 % / ≥5 % ¹	KM <5 %, PB <1 %, keine Auer Stäbchen	Alle, außer del(5q) +/- 1 andere Nicht-Chr. 7 Aberration
MDS mit del(5q)	1-3	1-3	Irrelevant	KM <5 %, PB <1 %, keine Auer Stäbchen	del(5q) isoliert oder mit 1 anderen Nicht-Chr. 7 Aberration
MDS mit Blastenexzess					
MDS mit Blastenexzess (1)	0-3	1-3	Irrelevant	KM 5-9 % oder PB 2-4 %, keine Auer Stäbchen	Irrelevant
MDS mit Blastenexzess (2)	0-3	1-3	Irrelevant	KM 10-19 % oder PB 5-19 % oder Auer Stäbchen	Irrelevant
MDS, unklassifizierbar					
mit 1 % peripheren Blasten	1-3	1-3	Irrelevant	KM <5 %, PB=1 % ² , keine Auer Stäbchen	Irrelevant
Mit Einliniendysplasie und Panzytopenie	1	3	Irrelevant	KM <5 %, PB <1 %, keine Auer Stäbchen	Alle, außer del(5q) +/- 1 andere Nicht-Chr. 7 Aberration
Auf der Grundlage definierender zytogenetischer Veränderungen	0	1-3	<15 % ³	KM <5 %, PB <1 %, keine Auer Stäbchen	MDS-definierende Abnormalität

Legende:

¹ falls SF3B1 mutiert

² 1 % periphere Blasten müssen zu 2 verschiedenen Zeitpunkten beurteilt werden

³ Fälle mit ≥15 % Ringsideroblasten haben definitionsgemäß eine signifikante Dyserythropoese und sind daher MDS mit Ringsideroblasten und Einliniendysplasie

1.1.4 Prognostische Faktoren

Mithilfe des *Revised international prognostic scoring system* (IPSS-R) kann anhand der Parameter Hämoglobin, Neutrophile, Thrombozyten, Blasten und einer Risikostratifizierung des Karyotyps eine Prognose über das mediane Überleben und das Risiko für den Übergang in eine sAML abgegeben werden (**Tabelle 3**). Patienten der Risikokategorie *Very Low* haben im Median eine Überlebenszeit von über acht Jahren, während Patienten der Kategorie *Very High* durchschnittlich in weniger als einem Jahr eine AML entwickeln und/oder sterben ⁵. Auch molekulargenetische Faktoren geraten zunehmend in den Fokus einer prognostischen Klassifizierung. So tragen 94% der MDS-Patienten mindestens eine Mutation. Zu den mit einem schlechteren Outcome assoziierten Mutationen zählen u.a. *TP53*, *FLT3*, *KMT2A*, *ASXL1*, *BCOR*, *EZH2*, *NRAS*, *RUNX1*, *STAG2* und *U2AF1* ¹³.

Tabelle 3: IPSS-R ⁵

Score-Punkte							
	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Karyotyp	A	-	B	-	C	D	E
Blasten (%)	≤2	-	>2-<5	-	5-10	>10	-
Hb-Wert (g/dl)	≥10	-	8-<10	<8	-	-	-
Thrombozyten (/nl)	≥100	50-<100	<50	-	-	-	-
Neutrophile (/nl)	≥0,8	<0,8	-	-	-	-	-
Risiko-Score	Punkte						
<i>Very Low risk:</i>	≤1,5						
<i>Low risk:</i>	2-3						
<i>Intermediate risk</i>	3,5-4,5						
<i>High risk</i>	5-6						
<i>Very High risk</i>	>6						

Legende:

A: Sehr gut (-Y, del(11q))

B: Gut (Normal, del(5q), del(12p), del(20q), Doppel-Klon mit del(5q) außer chr7)

C: Intermediär (del(7q), +8, +19, i(17q), andere Einzel- oder Doppel-Klone)

D: Schlecht (-7, inv(3)/t(3q)/del(3q), Doppel-Klon mit -7/del(7q), komplex (3 Aberrationen))

E: Sehr schlecht (komplex >3 Aberrationen)

1.1.5 Therapie

Die Therapie der MDS richtet sich nach dem Risiko-Score des IPSS-R und dem klinischen Zustand des Patienten.

1.1.5.1 Therapie der *Low-Risk*-MDS (IPSS-R *Very Low, Low, Intermediate*)

Abbildung 1 zeigt die verschiedenen Pfade der Therapiemöglichkeiten bei *Low-Risk*-MDS. Bei geringgradigen Zytopenien und gutem Allgemeinzustand ist es möglich, zunächst eine „*watch and wait*“-Strategie zu verfolgen. Die Zytopenien können es jedoch erforderlich machen, supportive Therapiemaßnahmen zu ergreifen. Hierzu gehört vor allem die Transfusion von Erythrozytenkonzentraten als häufig erste Therapiemaßnahme bei Anämien in Abhängigkeit vom klinischen Zustand des Patienten. Thrombozytenkonzentrate bei ausgeprägten Thrombozytopenien sollten individuell erwogen werden. Bei Infektionen sollte frühzeitig die Gabe von Antibiotika erfolgen, Begleiterkrankungen sollten ausreichend therapiert werden ^{4, 14}.

Häufige Transfusionen von Erythrozytenkonzentraten können zu sekundären Hämochromatosen führen, was eine Therapie mit Eisenchelatoren notwendig machen kann ¹⁵⁻¹⁷. Eine weitere Möglichkeit, die Hämatopoese zu fördern, ist die Stimulierung dieser durch erythropoetische Wachstums- und Differenzierungsfaktoren wie Erythropoetin (EPO) oder thrombopoetischen Wachstumsfaktoren wie den Thrombopoetin-Rezeptor-Agonisten Eltrombopag oder Romiplostim.

Für Patienten mit einer singulären Deletion an Chromosom 5 steht die immunmodulierende Substanz Lenalidomid mit dem Ziel einer Transfusionsunabhängigkeit zur Verfügung ^{4, 14}.

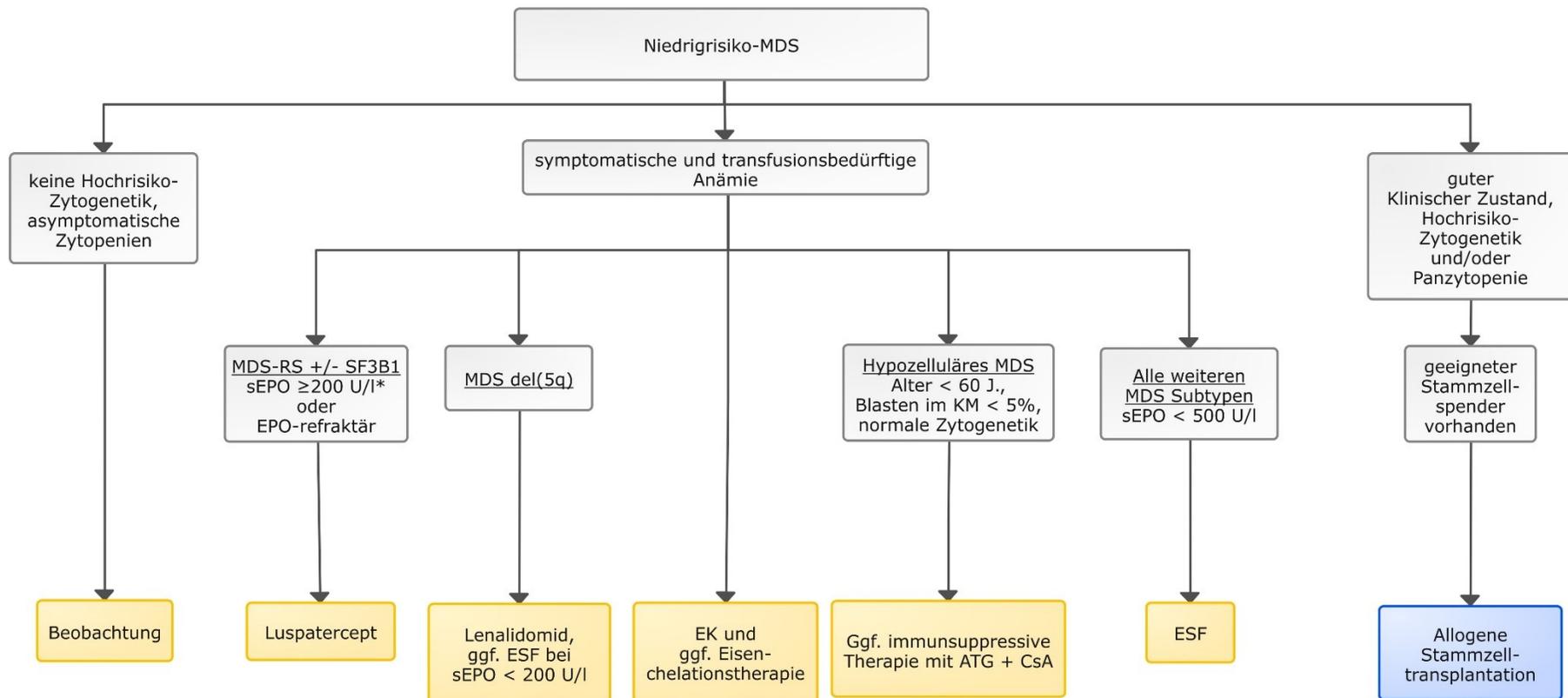


Abbildung 1: Therapieschema Low-Risk-MDS⁴

Legende: gelb: palliativ; blau: kurativ

MDS-RS: MDS mit Ringsideroblasten; SF3B1+ (positiv): Mutation im SF3B1-Gen, SF3B1- (negativ): keine Mutation im SF3B1-Gen (Wildtyp); sEPO: Erythropoetinspiegel im Serum; ATG: Antithymozytenglobulin, CsA: Cyclosporin. ESF: erythropoesestimulierende Faktoren.

Entnommen aus der Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO), abgerufen am 13. April 2023

<https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/myelodysplastische-neoplasien-myelodysplastische-syndrome-mds/@@guideline/html/index.html>

1.1.5.2 Therapie der *High-Risk*-MDS (IPSS-R *High* und *Very High*)

Abbildung 2 zeigt die verschiedenen Pfade der Therapiemöglichkeiten bei *High-Risk*-MDS. Als einzige kurative Therapie der MDS steht die allogene Stammzelltransplantation zur Verfügung und sollte zunächst bei allen Patienten in Erwägung gezogen werden. Sollte diese nicht möglich sein, steht als Standardtherapie die hypomethylierende Substanz (HMA, engl. *hypomethylating agent*) 5-Azacitidin (5-Aza) zur Verfügung^{4, 14}. 5-Aza ist ein Pyrimidin-Analogon, welches anstelle von Cytosin in die DNA eingebaut wird und hierdurch direkt zytotoxisch auf proliferierende Zellen wirkt. Über die Hemmung des Enzyms DNA-Methyltransferase verhindert sie zudem die Methylierung der DNA in CPG-Inseln, wodurch Tumorsuppressorgene reaktiviert werden¹⁸. Eine Therapie mit 5-Aza zeigte im Gesamtüberleben eine Überlegenheit gegenüber einer alleinigen supportiven Therapie. Gegenüber anderen Chemotherapeutika zeigte sich ein Vorteil in Bezug auf medianes Überleben, Transfusionsfreiheit und Verbesserung der peripheren Blutwerte¹⁹. Es sprechen jedoch nur ca. 50% der Patienten initial auf die Therapie an, bei einem Großteil versagt die Therapie sekundär, sodass zusätzliche Therapieoptionen gefunden werden müssen^{19, 20}. Bei einem solchen Therapieversagen kann auf Decitabin, ebenfalls eine hypomethylierende Substanz, zurückgegriffen werden. Decitabin ist nicht zur Initialtherapie empfohlen, kann jedoch als Sekundärtherapie eine Verbesserung der Hämatopoese erzielen²¹. Nach Entwicklung einer Resistenz gegen 5-Aza ist in klinischen Studien oder als individueller Heilversuch die Kombination von HMA mit Venetoclax möglich, welches jedoch nicht als Therapie zugelassen ist. Venetoclax ist ein BCL-2-Inhibitor, welcher in die Regulation der Apoptose eingreift und diese induziert²². In Einzelfällen kann auch eine nicht-intensive Chemotherapie in Erwägung gezogen werden⁴.

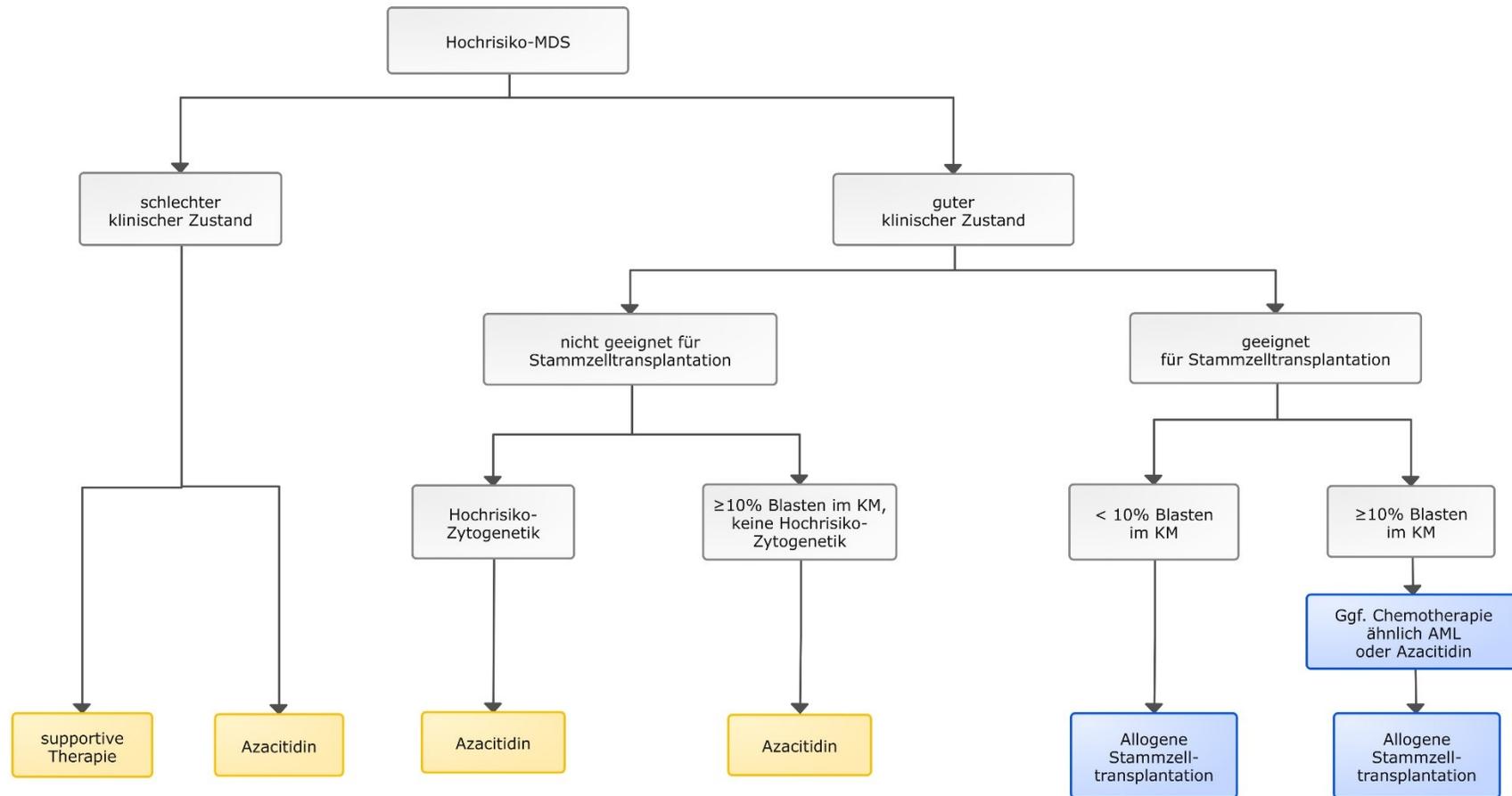


Abbildung 2: Therapieschema High-Risk-MDS⁴

Legende: gelb: palliativ, blau: kurativ

Entnommen aus der Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO), abgerufen am 13. April 2023

<https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/myelodysplastische-neoplasien-myelodysplastische-syndrome-mds/@@guideline/html/index.html>

1.2 Zellzyklus und Zellzyklusregulation

Der Zellzyklus beschreibt die Abfolge verschiedener Prozesse im Leben einer eukaryotischen Zelle zwischen zwei Zellteilungen. Dieser Zyklus unterliegt einer komplexen Regulation, die die Teilungshäufigkeit und -geschwindigkeit der Zelle koordiniert.

In Abwesenheit von Stimuli durch Wachstumsfaktoren verbleibt die Zelle in einem Ruhezustand namens G₀, bis ein Signal den Neustart des Zellzyklus einleitet. Wenn dies geschieht, durchläuft die Zelle die Synthese-Phase, auch S-Phase genannt, in der ihr Genom repliziert wird. In der anschließenden G₂-Wachstumsphase erfolgt die Synthese spezifischer Proteine und das Wachstum der Zelle als Vorbereitung auf die nachfolgende M-Phase. In dieser erfolgt schlussendlich die Mitose, in der sich die Mutterzelle in zwei Tochterzellen teilt. Die Zellzahl eines Organismus unterliegt einer Kontrolle, so dass die Zahl der Zellen nicht bei jeder Teilung zunimmt. Diese Kontrolle wird durch Prozesse wie die Apoptose ausgeübt, die in alten oder genetisch veränderten Zellen einen "programmierten Zelltod" auslöst, der die Zelle daran hindert, genetische Fehler weiterzugeben. Es wird angenommen, dass der Verlust der Kontrolle über den Zellzyklus und die daraus resultierende Deregulierung mit der Entstehung von Krebs in Verbindung stehen ²³.

Die Regulation übernehmen verschiedene Gruppen von Enzymen und Proteinen, allen voran die sogenannten *cycline dependent kinases* (CDK, cyclinabhängige Kinasen). Unterteilt in zwei Gruppen regulieren CDK1, 2, 3, 4 und 6 den Zellzyklus direkt selbst, während CDK7, 8 und 9 transkriptionsregulierende Funktionen innehaben. Wie der Name bereits andeutet, benötigen die CDKs als regulatorische Untereinheiten sogenannte Cycline, um aktiviert zu werden ^{24, 25}. Erst gemeinsam als Komplex sind sie in der Lage, Phosphatgruppen von ATP auf Zielproteine zu übertragen, diese zu phosphorylieren und damit Kontrolle über den Zellstoffwechsel und -zyklus auszuüben.

Die CDK9 kommt in zwei Isoformen vor, beide erzeugen ein Heterodimer mit den regulatorischen Cyclinen T1, T2a oder T2b, um die Hauptkomponente des Komplexes des positiven Transkriptionselongationsfaktors b (P-TEFb) zu bilden, der die Transkriptionselongation durch Phosphorylierung der carboxyterminalen Domäne (CTD) der größten Untereinheit der RNA-Polymerase II stimuliert. Die CTD enthält Tandem-Wiederholungen einer 7-Aminosäuresequenz, die durch CDK7 und CDK9 an zwei Stellen

phosphoryliert wird. Diese Phosphorylierungen führen zur Aktivierung der RNA-Polymerase II, sodass die Transkription initiiert wird, und ermöglichen die produktive transkriptionelle Elongation ²⁶. Vor allem die Transkription von instabilen mRNAs (*engl. messenger ribonucleic acid*, Boten-Ribonukleinsäure) wird durch CDK9 vermittelt, unter anderem von zellzyklus- und apoptoseregulierenden Proteinen wie MCL-1 und MYC ²⁷. CDKs wie CDK9 werden selbst durch *cyclin-dependent kinase inhibitors* (CDKIs) gehemmt.

Eine Hemmung der CDK9 verhindert somit die produktive Transkription und ist mit einer globalen Reduktion der mRNA verbunden, einschließlich den eben genannten Genprodukten wie MYC und MCL-1, die, wie man mittlerweile weiß, auch bei der Proliferation und dem Überleben von Krebszellen eine wichtige Rolle spielen ²⁸. Eine Dysregulation dieser Komponente des CDK9-Signalwegs scheint auch bei verschiedenen hämatologischen Malignomen wesentlich beteiligt zu sein ²⁹.

1.3 Apoptose

Apoptose (von altgriechisch ἀπόπτωσης *apóptosis*, von ἀποπίπτειν *apopíptein*, deutsch ‚abfallen‘) beschreibt eine Form des kontrollierten Zelltodes. Sie spielt sowohl eine Schlüsselrolle in der Gewebe- und Organdifferenzierung während der Embryogenese als auch im Gewebeumsatz und der Gewebshomöostase im adulten Organismus. Im Gegensatz zur Nekrose, dem unkontrollierten Absterben von Zellen, sind bei der Apoptose meist einzelne Zellen betroffen, es entsteht keine Zellschwellung und keine Entzündungsreaktion. Der Prozess der Apoptose ist in multizellulären Organismen hochkonserviert und wird genetisch kontrolliert ³⁰.

Generell kann die Apoptose einer Zelle über zwei Wege aktiviert werden. Wenn die Zelle über eine Reihe von intrazellulären Sensoren Schäden erkennt, kann sie selbst Apoptose induzieren. Dieser Mechanismus ist als intrinsischer Weg bekannt. Alternativ kann Apoptose auch durch die Interaktion zwischen einer Zelle des Immunsystems und der geschädigten Zelle ausgelöst werden, dies bezeichnet man als sogenannten extrinsischen Weg der Apoptose ^{31, 32}. Sowohl der intrinsische und der extrinsische Weg der Apoptose arbeiten synergistisch zusammen, um die Homöostase multizellu-

lärer Organismen aufrecht zu erhalten und defekte Zellen aus dem Körper zu entfernen. Man schätzt, dass im menschlichen Körper etwa 1×10^9 Zellen pro Tag den Prozess der Apoptose durchlaufen³³. Wird die Apoptose nicht reguliert, kann dies zu diversen Pathologien führen und zu Erkrankungen beitragen, darunter Alzheimer und maligne Tumorerkrankungen^{34, 35}.

Sowohl im extrinsischen als auch im intrinsischen Signalweg sind als essenzielle Informationsvermittler sogenannte Caspasen beteiligt. Diese sind eine Gruppe von Proteasen (Cystin-Aspartat-Proteasen), die als inaktive Proenzyme (Procaspasen) im Cytosol vorliegen und in zwei Untergruppen unterteilt werden. Die Initiator-Caspasen werden durch Apoptosesignale aktiviert, lagern sich dann zu großen Komplexen zusammen und werden so aktiv. Somit sind sie in der Lage, ihre Hauptaufgabe, die Aktivierung der Effektor-Caspasen, zu erfüllen. Die Effektor-Caspasen wiederum sind Proteasen, welche dann als Katalysator für den Abbau der Zellbestandteile dienen und damit zum Zelltod führen²³.

Über die Aktivierung von Nucleasen und Proteasen führen beide Signalwege zur Schrumpfung der Zelle durch Kondensation des Chromatins, Zerfall des Zytoskeletts, Lösung der Zelle aus ihrer extrazellulären Verbindung mit anderen Zellen oder der Extrazellulärmatrix, der Fragmentierung des Zellkerns sowie dem Zerfall der Zelle in apoptotische Partikel. Letztendlich werden diese Partikel durch Makrophagen und andere Phagozyten phagozytiert³⁶.

1.3.1 Extrinsischer Weg

Durch Bindung von extrazellulären Proteinen, sogenannten „Todesliganden“, an „Todesrezeptoren“ auf der Zelloberfläche wird der extrinsische Weg der Apoptose aktiviert. Die Todesrezeptoren haben als Transmembranproteine auch eine intrazelluläre Komponente, die "Todesdomäne". Diese wird aktiviert, sobald an der extrazellulären ligandenbindenden Domäne Todesliganden wie TNF- α , TRAIL oder Fas-Liganden binden. Die Todesdomäne bindet zunächst intrazelluläre Adapterproteine, die dann ihrerseits Initiator-Caspasen aktivieren, insbesondere Caspase-8. Der hierbei entstehende *death-inducing signaling complex* (DISC) aktiviert anschließend die Effektor-Caspasen und hierdurch eine Kaskade, die dann zur Apoptose der Zelle führt ²³.

Für natürliche Killerzellen und CD8+ (zytotoxische) T-Zellen besteht eine weitere Möglichkeit Apoptose in Zielzellen zu induzieren. Sie erkennen eine Zielzelle und schütten daraufhin die Enzyme Perforin und Granzym B aus. Durch Perforin wird das Eindringen von Granzym B in die Zelle ermöglicht, welches dann die Initiator-Caspasen aktiviert und hieran angeschlossen die Apoptose der Zelle auslöst ³⁷.

1.3.2 Intrinsischer Weg

Der intrinsische oder auch mitochondriale Weg der Apoptose ³⁴ wird von der Zelle selbst ausgelöst, wenn in der Zelle Schäden festgestellt werden.

Eine wichtige Rolle in der Apoptoseregulation des intrinsischen Weges spielt die BCL-2-Proteinfamilie. Zunächst wurde das namensgebende BCL-2 im Zusammenhang mit B-Zell-Lymphomen entdeckt. Im Laufe der Zeit wurden weitere homologe Proteine identifiziert ³⁸⁻⁴⁰. Gemeinsames Merkmal der BCL-2-Familie sind die sogenannten *BCL-2 homology domains* (BH-Domänen). Diese sind einerseits dafür da, die Interaktion der BCL-2-Proteine zu erleichtern und definieren andererseits die Funktion des jeweiligen Proteins in der Apoptoseregulation ^{41, 42}. Grundsätzlich werden die BCL-2-Proteine je nach Funktion und Anzahl der BH-Domänen in drei Untergruppen eingeteilt. Zur proapoptotischen Gruppe gehören Proteine wie BAX und BAK und zur antiapoptotischen Gruppe Proteine wie BCL-2, BCL-X und MCL-1. Die dritte Gruppe besteht aus proapoptotischen Proteinen, die ausschließlich die BH3-Domäne beinhalten. Zu diesen BH3-only-Proteinen gehören unter anderem die Proteine BID, BIM, PUMA und NOXA ⁴³. In der Apoptoseregulation befinden sich die unterschiedlichen Mitglieder dieser Proteine in einer Art Fließgleichgewicht, regulieren sich gegenseitig und beeinflussen so die Aktivierung porenbildender Strukturen ^{44, 45}.

Durch interne Stimuli, wenn beispielsweise Schäden an der DNA festgestellt werden, werden die Mitglieder aus der Gruppe der proapoptotischen BH3-only-Proteine aktiviert. Diese binden dann an die antiapoptotischen BCL-2-Proteine, sodass diese daran gehindert werden, die Gruppe der proapoptotischen BCL-2-Proteine zu blockieren²³. Letzte Instanz der Auslösung der Apoptose im intrinsischen Weg durch BCL-2-Proteine ist dann die Bildung von Poren in der äußeren Mitochondrienmembran (*mitochondrial outer membrane*, MOM) durch Di- und Oligomerisierung der poren-bildenden proapoptotischen BCL-2-Proteine BAX und BAK⁴⁶.

Durch die Destabilisierung der MOM, auch MOMP genannt (*Mitochondrial outer membrane permeabilization*), kommt es zu einer Änderung des Membranpotentials und der Ausschüttung des mitochondrienspezifischen Cytochrom c ins Zytosol^{47, 48}. Dieses bindet an APAF-1 (*adapter protein apoptotic protease activating factor 1*), woraufhin desoxyATP (dATP) gebunden wird und ein Komplex namens „Apoptosom“ gebildet wird⁴⁹. Das Apoptosom bindet wiederum an die Procaspase 9 und katalysiert die Bildung der aktiven Caspase 9. Diese aktiviert die Procaspase 3, welche dann in ihrer aktiven Form als Caspase 3 die Apoptose der Zelle einleitet⁵⁰.

1.3.3 Apoptosedysfunktion in MDS

Die oben beschriebenen Mechanismen der Apoptose und Apoptoseregulation führen – in einem gesunden Organismus – zu einer Homöostase der Gewebszellen. Bei einer Dysfunktion einzelner oder mehrerer Komponenten dieser Regulation kommt das System aus dem Gleichgewicht. Auch bei MDS sind Fehlfunktionen in der Apoptoseregulation beschrieben, die zu den oben beschriebenen Ausprägungen der Erkrankung führen. Nach den Risikogruppen nach IPSS-R⁵ gehen die *Low-Risk*-MDS mit einer erhöhten Apoptoserate der HSC einher, was zu den genannten peripheren Zytopenien führt, während sich die *High-Risk*-MDS durch eine vermehrte Expression antiapoptotischer Proteine sowie einer konsekutiv verminderten Apoptoserate auszeichnen, gekennzeichnet durch einen erhöhten Anteil an Blasten^{6, 7}. Diese Patienten haben ein höheres Risiko, eine sAML zu entwickeln und/oder zu sterben⁵.

Besonders interessant bei MDS sind Teile des intrinsischen Weges der Apoptose, speziell Proteine aus der BCL-2-Familie (siehe **1.3.2**). So konnte in *High-Risk*-MDS-Knochenmarkausstrichen immunzytochemisch eine höhere Expression des antiapoptotischen BCL-2 im Vergleich zu *Low-Risk*-MDS nachgewiesen werden⁵¹.

Das ebenfalls antiapoptotische MCL-1 ist ein kritischer und spezifischer Regulator, der für die Sicherstellung der Homöostase früher hämatopoetischer Vorläufer wesentlich ist ⁵². Bei MDS- Patienten in prognostisch schlechteren Risikogruppen wurde eine höhere MCL-1-Expression gefunden ⁵³. MCL-1 wird durch das Protein NOXA gehemmt ^{54, 55}, welches ebenfalls maßgeblich an der Homöostaseregulation früher hämatopoetischer Progenitorzellen beteiligt ist ⁵².

All diese beschriebenen (Patho-)Mechanismen der Apoptoseregulation bieten die Möglichkeit, medikamentös in den Zellzyklus einzugreifen und Apoptose in Zellen zu induzieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Blockade des antiapoptotischen Proteins BCL-2 in MDS-Progenitorzellen Apoptose induziert ⁵⁶. Zudem wurde nachgewiesen, dass 5-Aza, zusätzlich zu seinen epigenetischen Eigenschaften, durch Induktion der Transkription von NOXA Apoptose in AML-Zellen induziert (**Abbildung 3**) ⁵⁷. Auch in der Zelllinie MOLM13, welche Zellen einer sAML aus MDS entspringt, konnte eine NOXA-Induktion festgestellt werden ⁵⁸. Diese MCL-1-Expression kann über die Inhibition von CDK9 herunterreguliert werden und Apoptose in leukämischen Blasten induzieren ^{59, 60}.

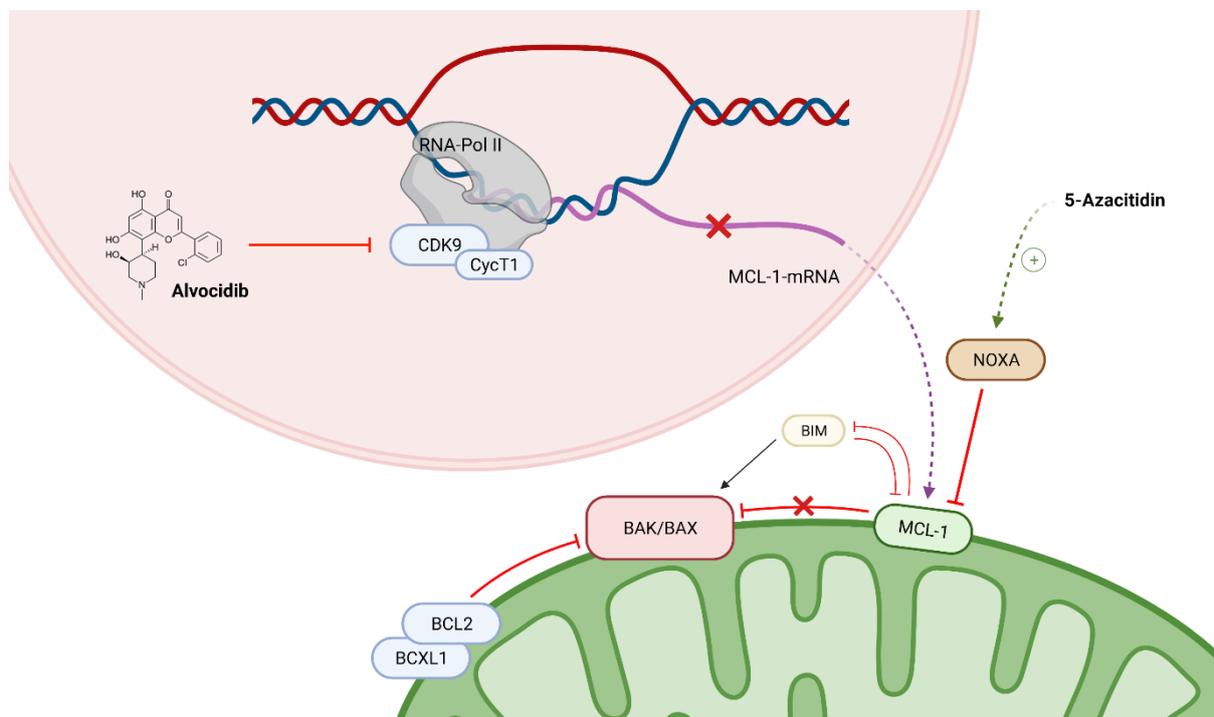


Abbildung 3: Angriffsstellen von Alvocidib und 5-Azaciditin in der Apoptoseregulation (eigene Darstellung, erstellt mit BioRender.com).

1.3.4 Alvocidib (Flavopiridol)

Alvocidib (Flavopiridol, **Abbildung 4**) ist ein solcher *small-molecule*-CDK-Inhibitor⁶¹. Er inhibiert die CDKs 1, 2, 4, 6, 7 und 9, ist gegenüber der CDK9 jedoch am potentesten⁶². Die CDK9-Inhibition durch Alvocidib hemmt während der Transkription die DNA-Elongation durch Phosphorylierung der RNA-Polymerase II, wodurch die Transkription von Zielgenen herunterreguliert wird. Hierdurch wird Alvocidib zum indirekten transkriptionellen Repressor des antiapoptotischen Faktors MCL-1 der BCL-2-Familie⁶⁰,⁶³, wodurch die Hemmung der proapoptotischen Proteine BAX/BAK durch MCL-1 entfällt (**Abbildung 3**) und Apoptose indirekt induziert wird. Klinisch konnte die Wirksamkeit von Alvocidib bereits in verschiedenen soliden Tumoren sowie malignen hämatologischen Neoplasien gezeigt werden^{59, 60}.

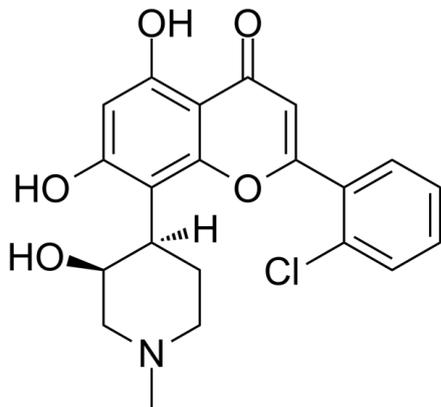


Abbildung 4: Strukturformel von Alvocidib⁶²

1.3.5 Kombination von Alvocidib und 5-Azacitidin

Inhibitoren von Mitgliedern der antiapoptotischen BCL-2-Familie in Kombination mit 5-Aza haben in der jüngeren Vergangenheit eine starke Wirkung gegen AML und *High-Risk*-MDS gezeigt. Es konnte nachgewiesen werden, dass Venetoclax, ein hochselektiver BCL-2-Inhibitor, und 5-Aza in Kombination synergistisch wirken, um AML-Zellen *in vitro* zu eliminieren, und *in vivo* eine synergistische Antitumoraktivität bei AML-Patienten zeigen^{57, 64}. Außerdem zeigten selektive Inhibitoren des antiapoptotischen Proteins MCL-1 allein oder in Kombination mit Venetoclax eine breite Zytotoxizität gegen primäre MDS-Zellen mit niedrigem und hohem Risiko⁶⁵. Da Alvocidib durch die indi-

rekte Hemmung von MCL-1 über die CDK9-Blockade und 5-Aza an zwei Punkten desselben Signalwegs angreift (**Abbildung 3**), bietet dies eine logische Grundlage, um beide Substanzen miteinander zu kombinieren. Es wurde bereits berichtet, dass die Interaktion von NOXA und MCL-1 zu einem proteasomalen Abbau von MCL-1 führt, der AML-Zellen für apoptotische Stimuli sensibilisiert^{66, 67}. Man vermutet, dass die Behandlung mit 5-Aza die Zellen susceptibler für die Behandlung mit Alvocidib machen könnte und die Substanzen womöglich ebenfalls eine synergistische Wirkung besitzen. Ein solcher Synergismus konnte bereits in MOLM13-Zellen *in vitro* sowie in MOLM13-Xenograft-Modellen gezeigt werden, die nacheinander mit 5-Aza und Alvocidib behandelt wurden⁵⁸. Alvocidib wurde bereits in einer klinischen Phase Ib/II-Studie in Patienten mit *High-Risk*-MDS getestet (NCT03593915).

1.4 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, Alvocidib in Kombination mit 5-Aza präklinisch an CD34+ hämatopoetischen Stammzellen von Patienten mit *High-Risk*-MDS zu testen und die Wirksamkeit der Substanzen *in vitro* zu untersuchen.

Hierbei sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- Gibt es eine synergistische Wirkung von Alvocidib und 5-Aza auf CD34+ hämatopoetische Stammzellen?
- Gibt es einen Unterschied zur Wirkung auf gesunde CD34+ Stammzellen?
- Wirkt sich eine Kombination der Substanzen auf die Differenzierung von hämatopoetischen Progenitorzellen in erythropoetische und myeloische Zellen aus?
- Gibt es klinische Parameter, die mit dem Ansprechen auf die Kombination korrelieren und als potenzielle Biomarker in Frage kommen?
- Lassen sich in den getesteten Proben spezielle somatische Mutationen finden? Korrelieren diese mit dem Ansprechen auf die Substanzen und kommen als potenzielle Biomarker in Frage?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Patienten

Es wurden n=45 kryokonservierte Proben aus Knochenmarkpunktionen von Patienten mit MDS verwendet. Die Punktionen wurden zu diagnostischen Zwecken und/oder als Verlaufskontrollen durchgeführt. Für die Diagnostik nicht benötigtes Material wurde anschließend weiterverarbeitet. Die Proben hämatologisch gesunder Probanden stammen aus Knochenmark von Hüftköpfen, welche nach Hüftgelenkersatz-Operationen entnommen und der Forschung zur Verfügung gestellt wurden. Die Nutzung der Proben zu Forschungszwecken erfolgte nach schriftlicher Einverständniserklärung der Patienten und der Genehmigung durch die Medizinische Ethik-Kommission II der Medizinischen Fakultät Mannheim in Form des bestehenden Ethikvotums 2013-509N-MA. Die Auswahl der MDS-Proben erfolgte nach Kriterien des IPSS-R (n=12 *Very High risk*; n=23 *High risk*; n=5 *Intermediate risk*, für n=4 war der IPSS-R nicht anwendbar)⁵. Eine Gesamtübersicht über alle getesteten Patientenproben und deren klinische Parameter ist im Anhang in **Tabelle S1** zu finden.

2.2 Isolation mononukleärer Knochenmarkzellen

Um mononukleäre Zellen (MNCs, engl. *mononuclear cells*) aus Knochenmark zu isolieren, wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Auf ein 50 ml-Röhrchen mit Trennscheibe (Greiner Bio-One, Best.-Nr. 227290) wurden zunächst 15 ml Ficoll-Paque Dichtegradientenmedium (Cytiva, Best.-Nr. 17544203) gegeben und bei 1.000 x g für 1 min zentrifugiert. Das Patientenknorpelmark wurde über ein 100 µm-Zellsieb (Greiner Bio-One, Best.-Nr. 542000) in ein 50 ml-Röhrchen (Greiner Bio-One, Best.-Nr. 227261) gegeben und das gefilterte Knochenmark anschließend mit PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung, engl. *phosphate buffered saline*) (Sigma Aldrich, Best.-Nr. D8537) auf ca. 30 ml verdünnt. Dieses wurde auf ein mit Dichtegradientenmedium gefülltes 50 ml-Röhrchen geschichtet und anschließend bei 1.000 x g für 10 min ohne Bremse zentrifugiert. Der restliche Überstand wurde bis kurz vor oberhalb des sog. „*buffy coats*“, der Leukozytenmanschette, abgesaugt. Die Zellen wurden in ein frisches 50 ml-Röhrchen gekippt und die restlichen Zellen mittels einer Transfer-Pipette mit etwas PBS herausgewaschen. Die geernteten Zellen wurden bei 400 x g

und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet anschließend je nach Größe in 5-10 ml selbsthergestelltem Erythrozyten-Lysepuffer (siehe 2.3) resuspendiert und für 5-7 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde die Lysereaktion mit ca. 10 ml PBS gestoppt und die Zellen ein weiteres Mal bei 400 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in einem definierten Volumen PBS aufgenommen (siehe 2.7). Ein Teil der Zellen (1×10^7 bis maximal 1×10^8 Zellen) wurde zur Isolierung von CD34+ Zellen genutzt (siehe 2.6). Der Rest wurde anschließend viabel kryokonserviert (siehe 2.4).

2.3 Herstellung des Erythrozyten-Lysepuffers

Zur Herstellung des Puffers zum Lysieren von Erythrozyten wurden folgende Substanzen abgewogen und anschließend in 1 L destilliertem Wasser gelöst:

Substanz	Molare Konzentration	Masse/Volumen für 1 L
NH ₄ Cl	1,55 M	82,91 g
NH ₄ HCO ₃	0,1 M	7,91 g
0,5 M EDTA (pH 8,0)	1 mM	2 ml

Der 10-fach-konzentrierte Puffer wurde bei Raumtemperatur gelagert. Zur Herstellung der gebrauchsfertigen Lösung wurde der Puffer 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt und sterilfiltriert (Millipore, Best.-Nr. S2GPT05RE). Bis zur Verwendung wurde der Puffer bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

2.4 Kryokonservierung

Zur Kryokonservierung von CD34+ Zellen oder MNCs wurden maximal 2×10^7 Zellen in ein steriles 1,8 ml-Kryoröhrchen (Nunc, Best.-Nr. 10577391) überführt und bei 400 x g und 4 °C für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml selbsthergestelltem Einfriermedium resuspendiert. Das Einfriermedium bestand aus RPMI-Medium (Sigma-Aldrich, Best.-Nr. R8758), fetalem Kälberserum (FKS) (Gibco, Best.-Nr. 11550356) und Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich, Best.-Nr.

D2650) in einem Verhältnis von 6:3:1. Um die Kryoröhrchen schonend herunterzukühlen, wurden sie über Nacht in einem Mr. Frosty™ Gefrierbehälter (Thermo Scientific, Best.-Nr. 5100-0001) in einem Gefrierschrank bei -80 °C aufbewahrt. Am folgenden Tag wurden die Proben in einen Flüssigstickstofftank überführt.

2.5 Auftauen kryokonservierter mononukleärer oder CD34+ Zellen

Die kryokonservierten MNCs oder CD34+ Zellen wurden zügig mit RPMI-Medium und FKS aufgetaut. Hierzu wurden zunächst 13 ml des RPMI-Mediums mit 1 ml FKS in einem 15 ml-Röhrchen (Greiner Bio-One, Best.-Nr. 188161) gemischt. Hiervon wurden 1 ml mit einer 1 ml-Pipette abgenommen, in das Probenröhrchen gegeben und durch mehrmaliges Aufnehmen und Suspendieren die Probe aufgetaut. Die aufgetaute Probe wurde in das 15 ml-Röhrchen gegeben und anschließend bei 400 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet direkt weiterverarbeitet. CD34+ Zellen wurden direkt kultiviert (siehe 2.8), aus MNCs wurden zunächst CD34+ Zellen angereichert (siehe 2.6) und diese anschließend kultiviert.

2.6 Anreicherung von CD34+ Zellen aus mononukleären Zellen

Zur Anreicherung der CD34+ Zellen aus den aufgetauten oder frisch aus Knochenmark isolierten mononukleären Zellen wurde das „CD34 MicroBead Kit“ (Milteny Biotec, Best.-Nr. 130-046-703) zur MACS-Isolierung (*engl. magnetic activated cell sorting*, magnetisch aktivierte Zellsortierung) genutzt. Dazu wurden die mononukleären Zellen mit magnetischen, CD34-Antikörper-konjugierten Nanopartikeln inkubiert und während des Durchlaufens einer Säule, die sich in einem starken Magneten befindet, herausselektiert. Hierfür wurde das MNC-Zellpellet zügig in 1 ml MACS-Puffer (Miltenyi Biotec, Best.-Nr. 130-091-222) suspendiert und dann weitere 9 ml MACS-Puffer hinzugegeben. Anschließend wurde diese Zellsuspension bei 400 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wurde nun zügig in 300 µl MACS-Puffer suspendiert. Dann wurden 100 µl FcR-Block-Reagenz und 100 µl magnetische CD34-Beads hinzugegeben und das Röhrchen zum Mischen leicht geschüttelt. Die Zellsuspension wurde für insgesamt 30 min im Kühlschrank inkubiert. Nach der Hälfte der Zeit wurde die Suspension erneut geschüttelt. In An-

schluss an die Inkubationszeit wurden 10 ml MACS-Puffer hinzugegeben und die Suspension bei 400 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Währenddessen wurde der Magnetständer (Miltenyi Biotec, Best.-Nr. 130-042-303) mit Magnet (Miltenyi Biotec, Best.-Nr. 130-042-302) vorbereitet und eine Zellseparationssäule (Miltenyi Biotec, Best.-Nr. 130-042-201) mit aufgesetztem 70 µM-Filter (Miltenyi Biotec, Best.-Nr. 130-095-823) in den Magneten eingehängt. Unter die Säule wurde ein 50 ml-Röhrchen platziert, um die durchlaufenden Zellen aufzufangen. Die Säule wurde mit 3 ml MACS-Puffer angefeuchtet. Der Überstand der zentrifugierten Zellsuspension wurde abgenommen und das Zellpellet in 1 ml MACS-Puffer aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde dann auf den Filter gegeben, sodass sie durch die Säule fließen konnte. Das Röhrchen mit den MNCs wurde mit MACS-Buffer ausgewaschen, um damit die restlichen Zellen aufzunehmen und auf die Säule zu geben. Nach vollständigem Durchlaufen durch die Säule wurde diese insgesamt drei Mal mit je 3 ml MACS-Puffer gewaschen. Nach dem Waschen wurde die Säule vom Magneten entfernt und der Magnet weit weggestellt. Die Säule wurde auf ein 15 ml-Röhrchen gestellt und der Filter entfernt. 4 ml MACS-Buffer wurden auf die Säule gegeben und mithilfe eines Kolbens zügig durchgedrückt. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. So wurden die in der Säule aufgefangenen CD34+ Zellen aus der Säule herausgespült. Die aufgefangenen Zellen wurden bei 400 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, das Zellpellet in 1 ml RPMI-Medium aufgenommen und die Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt (siehe 2.7). Die Zellen wurden entweder viabel kryokonserviert (siehe 2.4) oder direkt kultiviert (siehe 2.8)

2.7 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl und Viabilität der Proben wurden entweder maschinell oder von Hand mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Um mithilfe der Neubauer-Zählkammer die Zellzahl zu bestimmen, wurde ein Zellpellet in 1 ml eines Mediums suspendiert. Hiervon wurden 10 µl entnommen und mit 10 µl Trypanblau 0,3 % (Sigma Aldrich, Best.-Nr. T8154) gefärbt. Trypanblau markiert tote Zellen, viable Zellen erscheinen unter dem Mikroskop weiß. Die gefärbten Zellen wurden unter ein Plättchen auf der Neubauer-Zählkammer gegeben. Die Zellzahl ergab sich aus der Anzahl der viablen Zellen aus vier großen Quadraten x 2 (Verdünnung) x 10^4 x 1 ml /4.

Die maschinelle Bestimmung der Viabilität und Zellzahl erfolgte mittels automatisierter Standard-Trypanblau-Methode mit einem „Vi-CELL XR“ (Beckman Coulter). Das Zellpellet wurde zunächst in 1 ml eines Mediums suspendiert. Die Zellsuspension wurde dann in einem Verhältnis von 1:5 mit PBS verdünnt und in gerätespezifische Probenröhrchen (Beckman Coulter, Best.-Nr. 383721) überführt. Die bestimmte Zellzahl wurde in Zellen/ml angegeben.

2.8 Kultivierung von CD34+ Zellen

Die isolierten CD34+ Zellen wurden in einer 6-Well-Platte in 2 ml StemSpan™ SFEM-Kulturmedium (Stemcell™ Technologies, Best.-Nr. 09650) unter Zugabe von 1 % Penicillin/Streptomycin (Gibco, Best.-Nr. 5140122) sowie 1 % StemSpan™ Myeloid Expansion Supplement (Stemcell™ Technologies, Best.-Nr. 02693) für 4-6 Tage im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, bei 400 x g für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet dann in 1 ml Medium resuspendiert, um die Zellzahl maschinell zu bestimmen (siehe 2.7).

2.9 Ermittlung der Dosis-Wirkungs-Kurven von Alvocidib und 5-Aza

Im Zuge von Vorarbeiten zu diesem Projekt wurden Dosis-Wirkungs-Kurven für Alvocidib (Selleckchem, Best.-Nr. V35113) und 5-Aza (Sigma-Aldrich, Best.-Nr. A2385) erstellt. Hierfür wurden CD34+ Zellen von n=16 MDS-Patienten und von n=12 gesunden Personen für 24 h mit Alvocidib bzw. für 48 h mit 5-Aza in jeweils unterschiedlichen Konzentrationen behandelt und anschließend mittels Zellviabilitäts-Assay (siehe 2.10) die inhibitorischen Konzentrationen (*inhibitory concentration, IC*) ermittelt. Da die Substanzen kombiniert werden sollten, wurden für die Experimente die IC₁₀, 20 und 30 gewählt, um die Zytotoxizität der Einzelsubstanzen so gering wie möglich zu halten und Differenzen in der Suszeptibilität der Zellen untersuchen zu können.

2.10 Zellviabilitäts-Assay

Der „Celltiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay“ (Promega, Best.-Nr. G7571) ist ein Verfahren, mithilfe dessen die Viabilität von Zellen bestimmt werden kann. Nach der 72-stündigen Behandlungsdauer wurde zu den Zellen das Celltiter-Glo®-Reagenz hinzugegeben. Dieses enthält einen Lysepuffer, durch den die Zellen lysiert werden. Viable Zellen setzen hierbei ATP (Adenosintriphosphat) frei, welches mit O₂ und dem in dem Reagenz enthaltenen Luciferin unter Katalyse durch das Enzym Luciferase und des Cofaktors Mg²⁺ zu Oxyluciferin, AMP (Adenosinmonophosphat), Pyrophosphat und CO₂ umgesetzt wird (**Abbildung 5**). Dabei wird Licht mit einer Wellenlänge von 560 nm emittiert. Dieses Licht, welches sich in seiner Intensität proportional zur Menge der viablen Zellen verhält, wurde mithilfe eines Luminometers (Tecan Infinite 200 PRO 8, Tecan Group) gemessen.

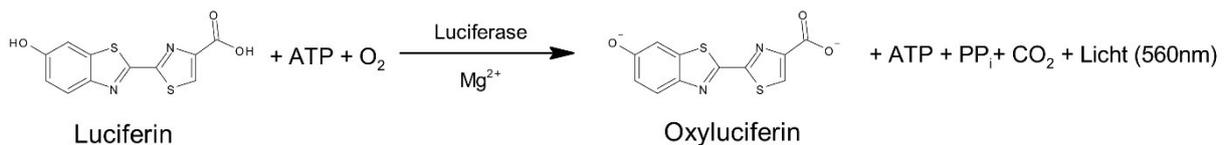


Abbildung 5: Reaktionsmechanismus des Zellviabilitäts-Assays. Die Monoxygenierung von Luciferin wird durch die Luciferase unter Anwesenheit von Sauerstoff, Mg²⁺ und ATP katalysiert (eigene Darstellung).

Für die Behandlung mit den Substanzen Alvocidib und 5-Aza wurden 2,5 x 10⁵ Zellen der kultivierten CD34⁺ Zellen (siehe 2.8) in 5 ml StemSpan™ SFEM-Medium inkl. 1 % Myeloid Expansion Supplement und 1 % Penicillin/Streptomycin suspendiert. Insgesamt drei Behandlungsarme (IC10, IC20 und IC30) mit jeweils drei Replikaten sowie einem Kontrollarm (DMSO) wurden angesetzt. In eine 48-Well-Platte wurden pro Well 7.500 Zellen in einem Volumen von 150 µl verteilt. Zunächst wurden die Zellen 48 h mit 5-Aza inkubiert, anschließend wurde Alvocidib hinzugegeben und für weitere 24 h inkubiert. Die Gesamtbehandlungsdauer mit 5-Aza betrug somit 72 h, für Alvocidib 24 h. Die Substanzen wurden jeweils 1:99 mit dem Lösungsmittel DMSO verdünnt und dann je Substanz 1,5 µl/Well hinzugegeben. Die unbehandelte Kontrolle erhielt in beiden Behandlungsschritten 1,5 µl des Lösungsmittels DMSO. Nach der Zugabe der Medikamente wurden die Platten leicht geschwenkt, um die Substanz besser zu verteilen.

In jedes Well wurden im Verhältnis 1:1 zur Zellsuspension 153 μl des CelltiterGlo®-Reagenz hinzugegeben und für 5 min auf einem Thermomixer Comfort (Eppendorf) bei Raumtemperatur gemixt. Aus jedem Well wurden zwei Duplikate zu je 100 μl in eine 96-Well-Platte übertragen, sodass jeder Behandlungsarm in insgesamt sechs Replikaten gemessen wurde. Zusätzlich wurden zu 4 x 50 μl des verwendeten StemSpan™ SFEM-Mediums je 50 μl des Reagenzes hinzugefügt und zur Bestimmung der Hintergrundlumineszenz mitgemessen.

Zunächst wurde von allen erhaltenen Werten die mittlere Hintergrundlumineszenz abgezogen. Die Zellviabilität in den einzelnen Behandlungsarmen wurde anschließend mithilfe des Programms Microsoft Excel (Microsoft Corporation) ins Verhältnis zum unbehandelten Kontrollarm gesetzt. Statistische Auswertungen (Mittelwerte, Standardabweichungen, Signifikanzen) wurden mithilfe des Programms GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Software) vorgenommen. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von 0,05 gewählt (ns (nicht signifikant), $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$).

2.11 Apoptose-Assay

Der Apoptose-Assay ist eine Analysemethode, die auf dem Verfahren der Durchflusszytometrie basiert. Die Zellen werden in dem Gerät aufgereiht und an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Je nach Ablenkung der Lichtstrahlen können die Größe der Partikel (*forward scatter*, FFC) sowie Granularität der Zelle, Größe und Struktur des Zellkerns und Menge der Vesikel (*side scatter*, SSC) ermittelt werden. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, Zellstrukturen mit fluoreszierenden Substanzen zu markieren und anschließend durchflusszytometrisch zu messen.

Für das Experiment wurde das „Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V APC and SYTOX™ Green for Flow Cytometry“ (Thermo Fisher Scientific, Best.-Nr. V35113) genutzt. Annexin V APC bindet Ca^{2+} abhängig an Phosphatidylserin, einem Phospholipid in der Zellmembran, welches als Apoptosemarker an die äußere Zellmembran transloziert wird ⁶⁸. Der Beginn der Apoptose geht mit einem Verlust der Phospholipid-Asymmetrie der Zellmembran einher, sodass sich Phosphatidylserin vermehrt an der äußeren Membran befindet ⁶⁹. Somit werden durch die Färbung mit Annexin V Zellen identifiziert, welche sich im Prozess der Apoptose befinden.

SYTOX™ Green ist ein grün fluoreszierendes Mittel, welches an Nukleinsäuren bindet. Es durchdringt intakte Zellmembranen lebender Zellen nicht und dringt nur in Zellen ein, deren Integrität der Zellmembran gestört ist, wodurch es als Indikator für die Anzahl der toten Zellen innerhalb einer Zellpopulation eingesetzt werden kann ⁷⁰.

Für die Behandlung mit den Substanzen Alvocidib und 5-Aza wurden $1,34 \times 10^6$ Zellen der kultivierten CD34+ Zellen (siehe **2.8**) in 4 ml StemSpan™ SFEM-Medium inkl. 1 % Myeloid Expansion Supplement und 1 % Penicillin/Streptomycin suspendiert. Insgesamt drei Behandlungsarme (IC10, IC20 und IC30) mit jeweils einem Replikat sowie einem Kontrollarm (DMSO) wurden angesetzt. In eine 24-Well-Platte wurden pro Well 1×10^5 Zellen in einem Volumen von 300 μl verteilt. Zunächst wurden die Zellen 48 h mit 5-Aza inkubiert, anschließend wurde Alvocidib hinzugegeben und für weitere 24 h inkubiert. Die Gesamtbehandlungsdauer mit 5-Aza betrug somit 72 h, für Alvocidib 24 h. Die Substanzen wurden jeweils 1:99 mit dem Lösungsmittel DMSO verdünnt und dann je Substanz 3 μl /Well hinzugegeben. Die unbehandelte Kontrolle erhielt in beiden Behandlungsschritten 3 μl des Lösungsmittels DMSO. Nach 72 h Inkubation wurden die behandelten Zellen geerntet, die Wells zwei Mal mit PBS ausgewaschen und alles

direkt in FACS-Röhrchen (Corning, Best.-Nr. 352054) überführt. Die Wells wurden mikroskopiert und beim Überbleiben von Zellen erneut gewaschen. Die FACS-Röhrchen wurden bei 400 x g für 5 min zentrifugiert und anschließend der Überstand abgenommen.

Zuvor wurde der 5 x konzentrierte Annexin-Binding-Buffer (ABB) 1:4 mit deionisiertem Wasser verdünnt, sodass ein 1 x-konzentrierter ABB verwendet werden konnte. Mit diesem wurden Annexin V APC und SYTOX™ Green jeweils 1:10 verdünnt. Diese verdünnten Lösungen wurden erneut 1:100 mit 1 x ABB verdünnt und damit die endgültige Färbelösung hergestellt. Die zentrifugierten Zellen wurden mit 250 µl gewaschen, mit dem Vortexschüttler 5 s gemischt, anschließend erneut zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Zu den Zellpellets wurden je 100 µl der Färbelösung hinzugefügt, 5 s gevortext und dann für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 400 µl des 1 x ABB hinzugegeben und die FACS-Röhrchen auf Eis gestellt. Die Proben wurden dann im Durchflusszytometer „FACSMelody“ (BD) analysiert und gemessen.

Zur Auswertung der Messungen wurde das Programm FlowJo™ (BD) genutzt. Es wurde die gesamte von FSC und SSC erfasste Population ausgewählt. Für die x-Achse wurde die Fluoreszenzintensität von SYTOX™ Green-markierten Zellen und für die y-Achse die Fluoreszenzintensität der Annexin V-markierten Zellen gewählt (**Abbildung 6**). Die Quadranten wurden automatisch eingeteilt und dann nochmal von Hand korrigiert, um die vier Populationen (Q1: doppelt negativ, Q2: Annexin V positiv, Q3: SYTOX™ Green positiv, Q4: doppelt positiv) voneinander zu trennen. Anschließend wurden die Daten in Excel exportiert und die prozentualen Verhältnisse der Populationen ermittelt. Statistische Auswertungen (Mittelwerte, Standardabweichungen, Signifikanzen) wurden mithilfe des Programms GraphPad Prism 8.4.3 vorgenommen. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von 0,05 gewählt (ns (nicht signifikant), $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$).

Der Versuchsaufbau der Experimente im Zellviabilitäts- und Apoptose-Assay wird in **Abbildung 7** dargestellt.

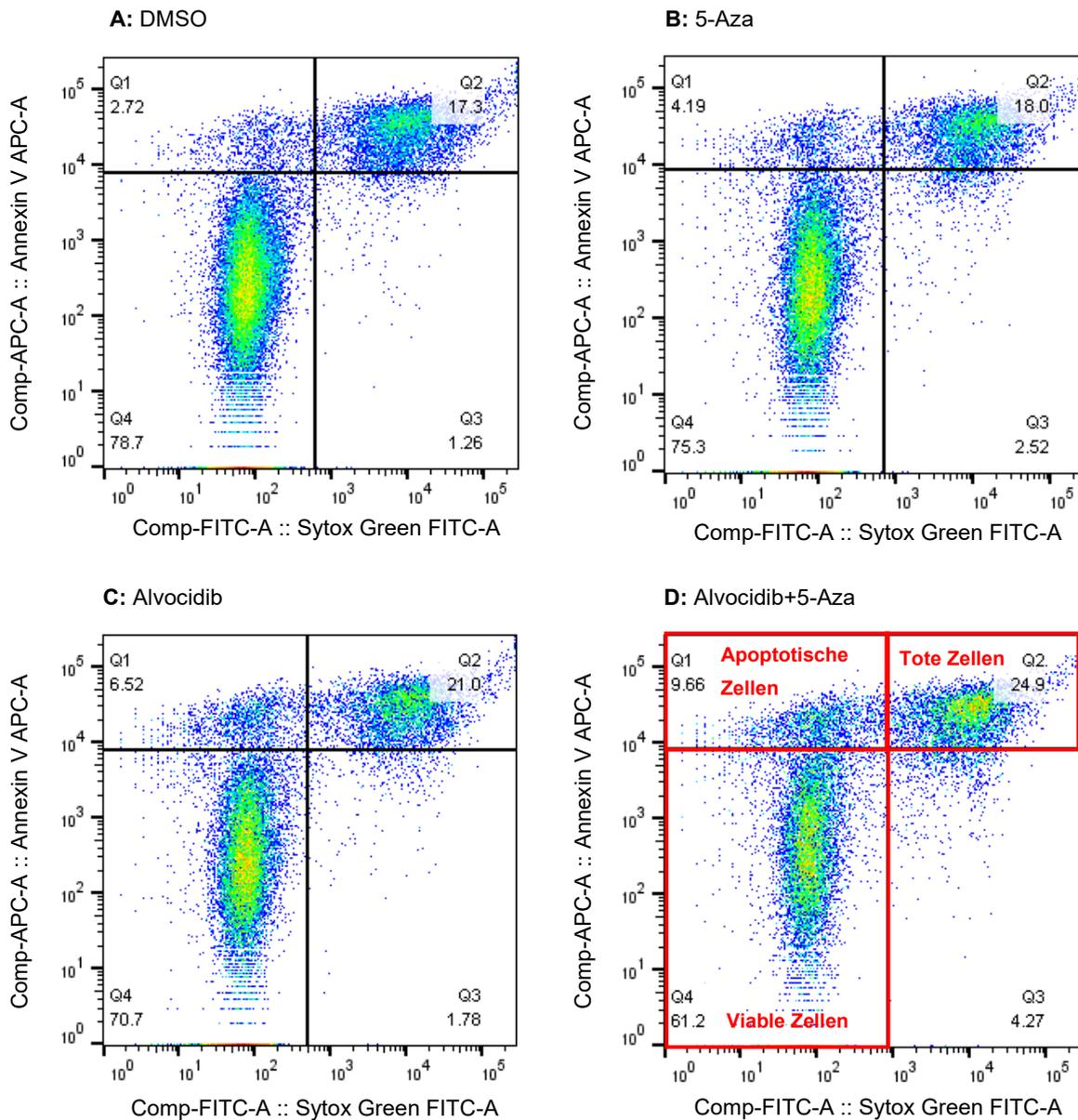


Abbildung 6: Beispiel einer durchflusszytometrischen Analyse im Apoptose-Assay. Darstellung als Dot-plot-Diagramme. Die x-Achsen zeigen die Signalstärke für SYTOX™ Green an, die y-Achsen für Annexin V. Es werden Ergebnisse für die Kontrolle mit DMSO (**A**), die Behandlung mit 5-Aza (**B**), mit Alvocidib (**C**) und mit der Kombination Alvocidib+5-Aza (**D**) gezeigt. Es entstehen maximal drei Zellpopulationen, die in den Quadranten Q1, Q2 und Q4 liegen. Q1: apoptotische Zellen, Q2: tote Zellen; Q4: viable Zellen (**D**).

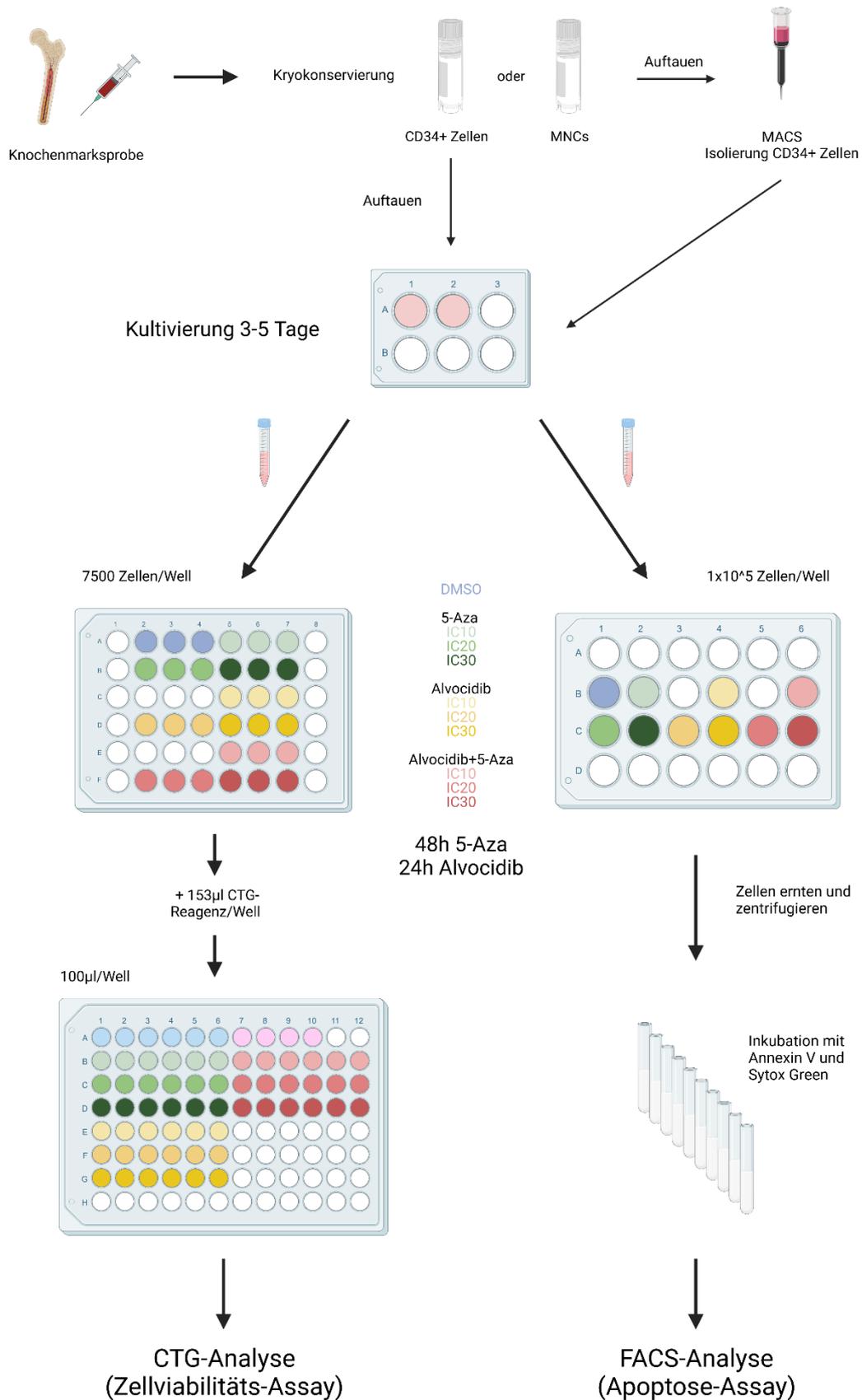


Abbildung 7: Versuchsaufbau Zellviabilitäts-Assay und Apoptose-Assay (erstellt mit BioRender.com)

2.12 Colony Forming Unit Assays

Der CFU-Assay (*colony forming unit*) ist ein Verfahren, mithilfe dessen das Differenzierungsverhalten von Zellen festgestellt werden kann. Da bei MDS die Ausreifung von hämatopoetischen Progenitorzellen in funktionsfähige Blutzellen gestört ist, ist es Ziel des Experiments, die Wirkung der Substanzen Alvocidib und 5-Aza auf die Zelldifferenzierung zu untersuchen. Ausgewählt wurden Proben von 5 Patienten, deren Zellen in der Kombinationsbehandlung im CTG-Assay sensitiv reagiert haben und von denen noch ausreichend CD34+ Zellen zur Verfügung standen (P04, P07, P32, P35, P39). Zudem sollten sie möglichst Träger der ASXL1-Mutation sein, deren Vorhandensein in der statistischen Analyse signifikant mit der Suszeptibilität der Zellen auf die Behandlung korrelierte (siehe 3.9).

Tabelle 4: Charakteristika der für die CFU-Assays ausgewählten Patientenproben

Nr.	Alter	Ge- schlecht	Diagnose	IPSS-R	Karyotyp	KM- Blasten	Muta- tionen
P35	43	m	MDS/MPN-U	<i>High</i>	46,XY[20]	5 %	ASXL1 EZH2 TET2 RUNX1 ZRSR2
P32	76	m	MDS-EB2	<i>Very High</i>	46,XY,t(2;2)(p23;q32)[12], 47,XY,t(2;2)(p23;q32), +8[4], 46,XY[4]	5 %	ASXL1 RUNX1 SRSF2 STAG2
P7	64	m	MDS-EB2	<i>High</i>	46,XY,i(17)(q10)	-	ASXL1 ETV6 SRSF2 NRAS
P4	70	m	MDS-MLD	<i>High</i>	47,XY+8[20]	4 %	ASXL1 EZH2 TET2 RUNX1 ZRSR2 STAG2
P39	73	w	sAML aus MDS	-	-	47 %	TET2 CEBPA BCOR BCORL1 PHF6

2.12.1 Behandlung mit Alvocidib und 5-Aza

Zunächst wurden kryokonservierte MNCs oder CD34+ Zellen aufgetaut (siehe **2.5**). Aus aufgetauten MNCs wurden anschließend mittels MACS-Isolation CD34+ Zellen angereichert (siehe **2.6**). Anschließend wurden die Zellen mit der Neubauer-Zählkammer gezählt (siehe **2.7**), es wurden mindestens $1,2 \times 10^5$ Zellen für die Experimente benötigt. Die CD34+ Zellen wurden in StemSpan™ SFEM II-Kulturmedium (Stemcell™ Technologies, Best.-Nr. 09655) suspendiert und 1 % Myeloid Expansion Supplement und 1 % Penicillin/Streptomycin hinzugegeben, sodass die Zellkonzentration 5×10^4 Zellen pro ml betrug. Von der Zellsuspension wurden 300 µl/Well in eine 24-Well-Platte aliquotiert und damit 15.000 Zellen/Well. Die Zellen wurden mit den IC30-Konzentrationen behandelt (siehe **2.9**). Zunächst wurden die Zellen 48 h mit 5-Aza inkubiert, anschließend wurde Alvocidib hinzugegeben und für weitere 24 h inkubiert. Die Gesamtbehandlungsdauer mit 5-Aza betrug somit 72 h, für Alvocidib 24 h. Die Substanzen wurden jeweils 1:99 mit PBS verdünnt und dann je Substanz 3 µl/Well hinzugegeben. Die unbehandelte Kontrolle erhielt in beiden Behandlungsschritten 3 µl DMSO in PBS 1:99.

2.12.2 Kolonisierung

Nach den 72 h Behandlung wurden alle Zellen eines Behandlungsarmes geerntet und gemeinsam in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Jedes Well wurde zwei Mal mit PBS ausgewaschen. Insgesamt ergaben dies bei vier Behandlungsarmen vier Röhrchen. Die Zellen wurden bei 4 °C und 400 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und 110 µl StemSpan™ SFEM-Medium hinzugegeben und in der Neubauer-Zählkammer gezählt (siehe **2.7**). Das Volumen von 10.500 Zellen wurde berechnet und dieses dann in 5 ml überführt. Zu den Zellen wurden dann 3,5 ml MethoCult™-Medium (Stemcell™ Technologies, Best.-Nr. 04435) hinzugegeben und die Gefäße mindestens 4 s gevortext und mindestens 5 min stehen gelassen, sodass Luftblasen entweichen konnten. Mit einer 5 ml-Spritze mit stumpfer Nadel wurden je 3,4 ml der Zellsuspension aufgezogen. Ohne die Nadel wurden je 1,1 ml in Petrischalen mit einem Durchmesser von 35 mm gegeben, sodass die Oberfläche gleichmäßig bedeckt wurde. Von jeder Patientenprobe gab es also drei Behandlungsarme und eine Kontrolle mit je vier Replikaten. Die kleinen Petrischalen wurden gemeinsam in eine größere Schale gestellt und der Boden mit PBS bedeckt, um Feuchtigkeit zu gewährleisten. Die Zellkulturen wurden dann für 14-16 Tage bei 37 °C inkubiert.

2.12.3 Durchflusszytometrische Analyse

Nach 14-16 Tagen wurden die Zellen zur objektiven Analyse der Differenzierung und Proliferation erst geerntet und dann mittels Durchflusszytometrie analysiert. Hierfür wurden sie jeweils in 9 ml einer Lösung aus PBS mit 10 % FKS suspendiert und anschließend bei 4 °C für 5 min bei 400 x g zentrifugiert. Nach der Abnahme des Überstandes wurden 1.050 µl PBS mit 10 % FKS versetzt und damit das jeweilige Zellpellet suspendiert und in ein 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen (Eppendorf, Best.-Nr. 0030123328) überführt. 50 µl der Suspension wurden mit 450 µl PBS suspendiert, um die Zellen maschinell zu zählen (siehe 2.7). Die Zellsuspension wurde in FACS-Röhrchen überführt und dann erneut bei 400 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen mit Antikörpern gefärbt. Hierzu wurde im Vorfeld ein Antikörper-Mix vorbereitet:

Antikörper (Fluorochrom)	Konzentration	Marker für	Firma/Best.-Nr.
CD45 (PE)	1:100	Leukozyten	BD, 555483
CD33 (APC)	1:100	Myeloische Zellen	Biolegend, 303408
CD235a (PerCP/Cy5.5)	2,5:100	Erythroide Zellen	Biolegend, 349110
CD34 (FITC)	1:100	Hämatopoetische Progenitorzellen	Biolegend, 343604
hFcR-Blocker	1:10		Miltenyi Biotec, 130-059-901
FACS-Puffer			

Zur Herstellung des FACS-Puffers wurden 4 ml bovines Serumalbumin (Miltenyi Biotec, Best.-Nr. 130-091-376) und 10 ml einer 2 % Natriumazid (NaN₃) -Lösung, hergestellt aus 1 g NaN₃ in 50 ml destilliertem Wasser, zu 1 L PBS gegeben. Der Puffer wurde anschließend auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt, sterilfiltriert und bis zur Nutzung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

In ein FACS-Röhrchen wurden bei einer Zellzahl <10⁶ Zellen 100 µl des Antikörpermixes hinzugegeben, bei einer Zellzahl ≥10⁶ Zellen 150 µl. Nach sorgfältigem Mischen der Zellen mit den Antikörpern wurden die FACS-Röhrchen auf Eis gestellt und

unter Lichtausschluss für 30 min inkubiert. Nach der Inkubation wurden diese mit Waschpuffer gewaschen und die Zellsuspension ein weiteres Mal 5 min bei 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet gevortext, anschließend wurden 300 µl oder 500 µl FACS-Puffer hinzugegeben, welcher mit dem Farbstoff SYTOX™ Blue Dead Cell Stain (Thermo Fisher Scientific, Best.-Nr. S34857) versetzt wurde (Verhältnis 1:2.000). Dies ist ein Nukleinsäure-Farbstoff mit hoher Affinität, der problemlos in Zellen mit beeinträchtigten Plasmamembranen eindringt, während intakte Zellmembranen nicht durchlässig sind. Somit werden tote Zellen markiert und können gezählt werden. Dann wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie im FACSMelody analysiert.

2.13 Myeloid Panel Sequenzierung

Um den Mutationsstatus der Proben zum jeweiligen Zeitpunkt zu untersuchen, wurde DNA aus MNCs der Patienten isoliert. Die Mutationen wurden durch ein diagnostisches Myeloid-Panel des Münchner Leukämie Labors (MLL, München, Deutschland) untersucht. Die DNA wurde entweder mit dem „AllPrep DNA/RNA mini“ oder „micro“-Kit oder dem „QIAamp DNA Micro Kit“ (Qiagen N.V.) isoliert. Für die Sequenzierung wurden 250 ng genomische DNA aus Patientenproben dem „Nextera DNA Flex Kit“ (Illumina®) unter Verwendung dualer Indizes eingesetzt. Die Anreicherung erfolgte unter Verwendung des „IDT Hybridization Capture“-Protokolls und eines entsprechenden benutzerdefinierten Myeloid-Panels (Integrated DNA Technologies), das die folgenden, häufig in myeloischen Neoplasien mutierten, n=67 Gene enthält: *ASXL1*, *ASXL2*, *ATRX*, *BCOR*, *BCORL1*, *BRAF*, *BRCC3*, *CALR*, *CBL*, *CDH23*, *CDKN2A*, *CEBPA*, *CREBBP*, *CSF3R*, *CSNK1A1*, *CTCF*, *CUX1*, *DDX41*, *DDX54*, *DHX29*, *DNMT3A*, *EP300*, *ETNK1*, *ETV6*, *EZH2*, *FLT3*, *GATA1*, *GATA2*, *GNAS*, *GNB1*, *IDH1*, *IDH2*, *JAK2*, *KDM5A*, *KDM6A*, *KIT*, *KMT2D*, *KRAS*, *MPL*, *MYC*, *NF1*, *NPM1*, *NRAS*, *PHF6*, *PIGA*, *PPM1D*, *PRPF8*, *PTPN11*, *RAD21*, *RUNX1*, *SETBP1*, *SF1*, *SF3A1*, *SF3B1*, *SH2B3*, *SMC1A*, *SMC3*, *SRSF2*, *STAG2*, *SUZ12*, *TET2*, *TP53*, *U2AF1*, *U2AF2*, *WT1*, *ZBTB7A*, *ZRSR2*. Die endgültigen Bibliotheks-Pools wurden auf einer „S4 Nova Seq Flow Cell“ (Illumina®) mit 150 bp *paired-end reads* sequenziert. Die mittlere Sequenziertiefe betrug 1430,199. Die bioinformatische Verarbeitung bestand aus einem Qualitätstrimming mit Seqtk (Version 1.2), gefolgt von einer umfassenden Qualitätskon-

trolle mit dem FastQC-Paket (Version 0.11.5). Zur Filterung relevanter Varianten wurden folgende Kriterien angewandt: nur exonische und Spleißvarianten (sofern kein Eintrag unter "pathogen" in der CLINSIG-Datenbank vorhanden war), synonyme Varianten wurden ausgeschlossen, kein snp137-Eintrag (sofern kein Eintrag unter "pathogen" in der CLINSIG-Datenbank vorhanden war) und PopFreqMax <0,1 (sofern kein Eintrag unter "pathogen" in der CLINSIG-Datenbank vorhanden war).

2.14 Klinische Daten

Zur Analyse klinischer Parameter wurden retrospektiv Patientenakten analysiert und ins Verhältnis zu den Ergebnissen des Zellviabilitäts-Assays gesetzt. Untersucht wurden Zusammenhänge zwischen der Zellviabilität und Alter, Geschlecht, IPSS-R, Karyotyp, Hämoglobin, dem Anteil an Blasten im Knochenmark (KM) sowie stattgehabter Therapien.

2.15 Statistische Analyse

Statistische Analysen wurden mit der Software GraphPad Prism 8.4.3 durchgeführt. Die Arten der statistischen Tests sind in den Legenden der Abbildungen angegeben. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von 0,05 gewählt. Für multivariable Analysen wurde eine binomiale logistische Regressionsanalyse mittels IBM SPSS Statistics Version 28 (IBM) durchgeführt. Die folgenden Parameter wurden als binäre Variablen in das logistische Regressionsmodell aufgenommen: Alter ≥ 70 vs. < 70 Jahre, Geschlecht, IPSS-R *Intermediate/High* vs. IPSS-R *Very High*; ASXL1-, TET2-, RUNX1-, EZH2-, ZRSR2- und STAG2-Mutationen mit den folgenden Variablen: 1=Vorhandensein einer Mutation, 0=keine Mutation.

3 ERGEBNISSE

3.1 Dosis-Wirkungs-Kurven von Alvocidib und 5-Aza

Die Dosis-Wirkungs-Kurven für Alvocidib und 5-Aza werden im Anhang in den **Abbildungen S1+2** abgebildet. **Tabelle 5** zeigt die jeweiligen Stoffmengen für IC10, 20 und 30, welche für die nachfolgenden Experimente genutzt wurden.

Tabelle 5: Ermittelte inhibitorische Konzentrationen für 5-Aza und Alvocidib

	5-Aza	Alvocidib
IC10	6,2 µM	5,5 µM
IC20	14,2 µM	7,1 µM
IC30	25,4 µM	9 µM

3.2 Zellviabilitäts-Assay

Die Ergebnisse des CTG-Assays zur Bestimmung der Zellviabilität an n=45 Patientenproben werden in **Abbildung 8** dargestellt. Es werden jeweils vier Behandlungsarme abgebildet (Kontrollgruppe DMSO, 5-Aza allein, Alvocidib allein, Alvocidib+5-Aza).

In Gruppe IC10 (5-Aza: 6,2 µM, Alvocidib: 5,5 µM) konnte in der Kombination der Substanzen eine mittlere Zellviabilität von $\bar{x}=80,50$ % (SD=7,347) im Verhältnis zur Kontrollgruppe gemessen werden, was signifikant geringer ist als die Viabilität unter der Behandlung mit 5-Aza ($\bar{x}=90,60$ %, $p<0,0001$, SD=5,968) sowie Alvocidib ($\bar{x}=88,28$ %, $p<0,0001$, SD=6,988).

In Gruppe IC20 (5-Aza: 14,2 µM, Alvocidib: 7,1 µM) konnte in der Kombination eine mittlere Zellviabilität von $\bar{x}=67,06$ % (SD=10,92) im Verhältnis zur Kontrollgruppe gemessen werden, was signifikant geringer ist als die Viabilität unter der Behandlung mit 5-Aza ($\bar{x}=82,10$ %, $p<0,0001$, SD=7,254) sowie Alvocidib ($\bar{x}=78,35$ %, $p<0,0001$, SD=9,306).

In Gruppe IC30 (5-Aza: 25,4 µM, Alvocidib: 9 µM) konnte in der Kombination eine mittlere Zellviabilität von $\bar{x}=54,41$ % (SD=12,55) im Verhältnis zur Kontrollgruppe gemessen werden, was signifikant geringer ist als die Viabilität unter der Behandlung mit 5-

Aza ($\bar{x}=73,57$ %, $p<0,0001$, $SD=8,943$) sowie Alvocidib ($\bar{x}=69,56$ %, $p<0,0001$, $SD=12,02$).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass in allen $n=3$ untersuchten Gruppen die Zellviabilität nach der Kombinationsbehandlung signifikant geringer war als nach der Behandlung mit den einzelnen Substanzen. In jeder Gruppe konnte zudem eine additive Wirkung der beiden Substanzen 5-Aza und Alvocidib beobachtet werden. Eine synergistische Wirkung konnte nicht beobachtet werden.

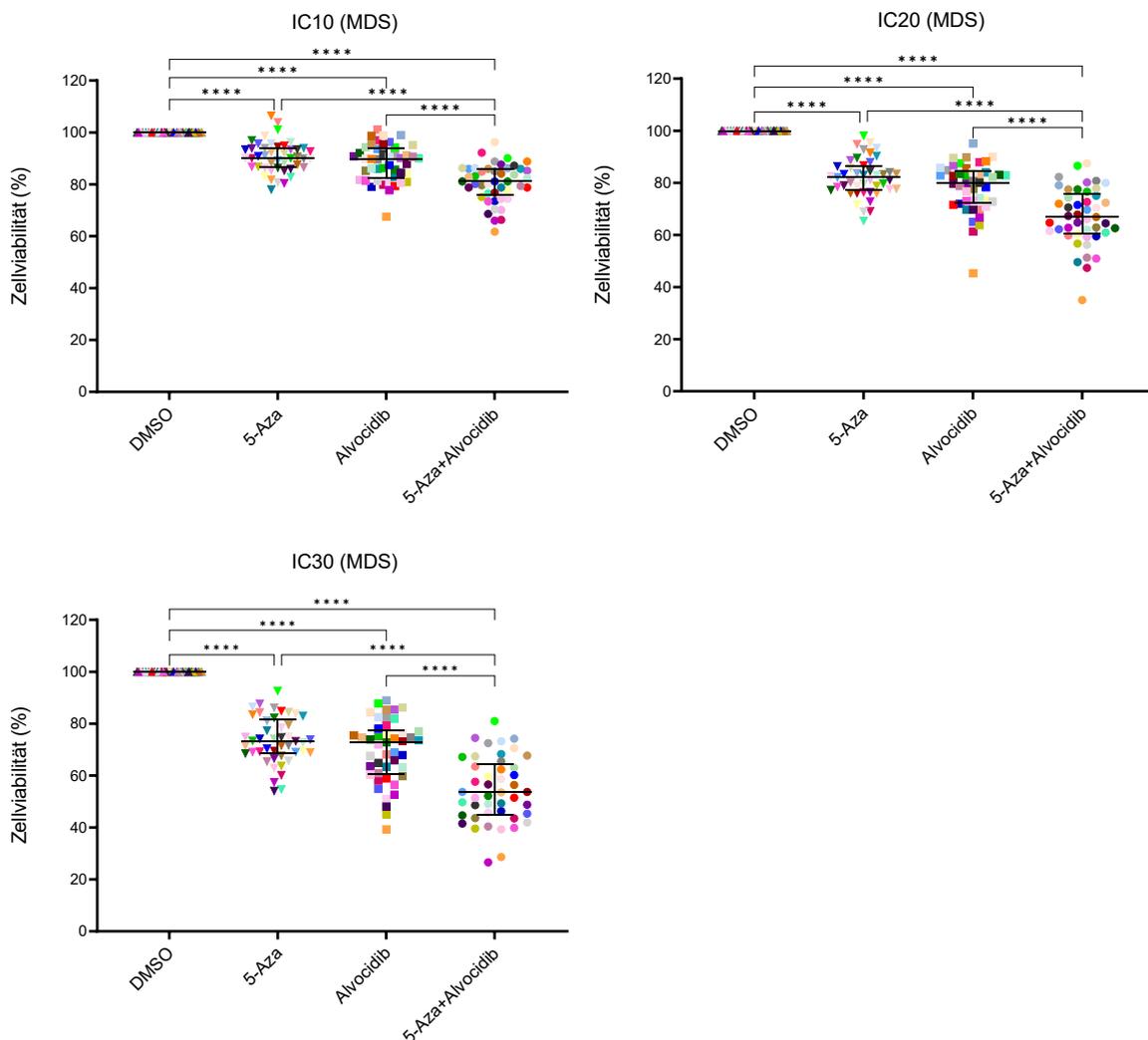


Abbildung 8: Zellviabilität in $n=45$ MDS-Patientenproben nach Behandlung mit 5-Aza, Alvocidib und 5-Aza+Alvocidib⁷¹. Dargestellt wird die Zellviabilität in Prozent bezogen auf die Kontrolle mit DMSO. In drei Behandlungsarmen (IC10, IC20 und IC30) wurde die Zellviabilität nach der Behandlung mit der Kombination von 5-Aza und Alvocidib mit der Behandlung durch die Einzelsubstanzen verglichen. Jede der unterschiedlichen Farben repräsentiert eine Probe. Dargestellt sind zudem der Median und der Interquartilsabstand. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Friedmans Test und Dunn's Multiple Comparison. ns (nicht signifikant), $p>0,05$; * $p\leq 0,05$; ** $p\leq 0,01$; *** $p\leq 0,001$; **** $p\leq 0,0001$.

Die Ergebnisse des CTG-Assays zur Bestimmung der Zellviabilität an n=12 hämatologisch gesunden Proben werden in **Abbildung 9** dargestellt. Es werden jeweils vier Behandlungsarme abgebildet (Kontrollgruppe DMSO, 5-Aza allein, Alvocidib allein, Alvocidib+5-Aza).

In Gruppe IC10 (5-Aza: 6,2 μ M, Alvocidib: 5,5 μ M) konnte in der Kombination der Substanzen eine mittlere Zellviabilität von \bar{x} =85,64 % (SD=4,452) im Verhältnis zur Kontrollgruppe gemessen werden, was signifikant geringer ist als die Viabilität unter der Behandlung mit 5-Aza (\bar{x} =91,94 %, p=0,0177, SD=2,690) nicht jedoch Alvocidib (\bar{x} =90,90 %, p=0,0795, SD=4,847).

In Gruppe IC20 (5-Aza: 14,2 μ M, Alvocidib: 7,1 μ M) konnte in der Kombination eine mittlere Zellviabilität von \bar{x} =73,21 % (SD=6,754) im Verhältnis zur Kontrollgruppe gemessen werden, was signifikant geringer ist als die Viabilität unter der Behandlung mit 5-Aza (\bar{x} =83,52 %, p=0,03, SD=3,653) sowie Alvocidib (\bar{x} =82,07 %, p=0,0494, SD=6,989).

In Gruppe IC30 (5-Aza: 25,4 μ M, Alvocidib: 9 μ M) konnte in der Kombination eine mittlere Zellviabilität von \bar{x} =61,47 % (SD=5,506) im Verhältnis zur Kontrollgruppe gemessen werden, was signifikant geringer ist als die Viabilität unter der Behandlung mit 5-Aza (\bar{x} =76,19%, p=0,03, SD=4,287) sowie Alvocidib (\bar{x} =74,66 %, p=0,0494, SD=5,741).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass in den untersuchten Gruppen IC20 und IC30 die Zellviabilität nach der Kombinationsbehandlung signifikant geringer war als nach der Behandlung mit den einzelnen Substanzen. In diesen beiden Gruppen konnte zudem eine additive Wirkung der beiden Substanzen 5-Aza und Alvocidib beobachtet werden. Eine synergistische Wirkung konnte nicht beobachtet werden.

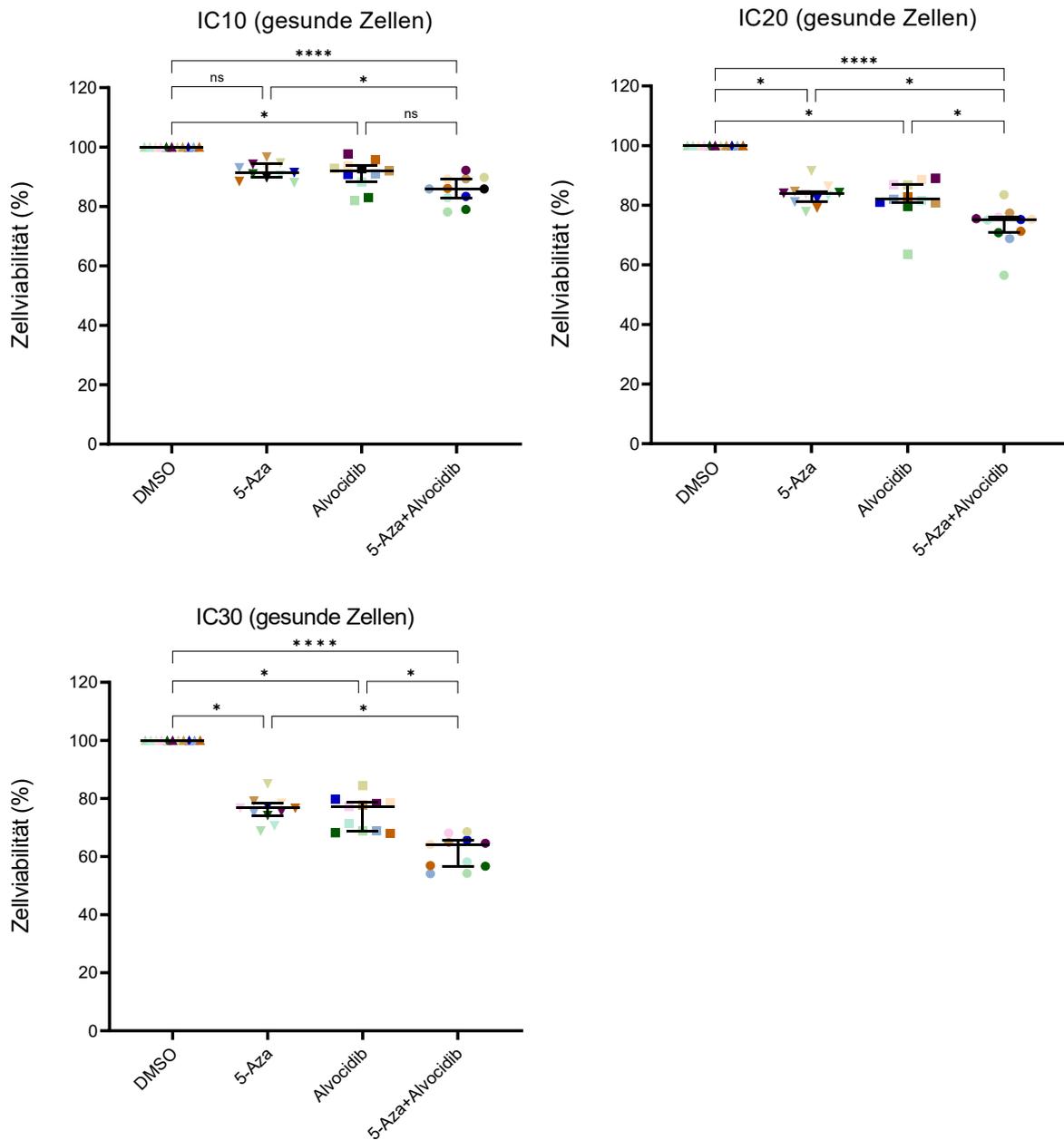


Abbildung 9: Zellviabilitäts-Assay in n=12 Proben gesunder Spender. Dargestellt wird die Zellviabilität in Prozent bezogen auf die Kontrolle mit DMSO. In drei Behandlungsarmen (IC10, IC20 und IC30) wurde die Zellviabilität nach der Behandlung mit der Kombination von 5-Aza und Alvocidib mit der Behandlung durch die Einzelsubstanzen verglichen. Jede der unterschiedlichen Farben repräsentiert eine Probe. Dargestellt sind zudem der Median und der Interquartilsabstand. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Friedmans Test und Dunn's Multiple Comparison. ns (nicht signifikant), $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

In **Abbildung 10** werden die Ergebnisse der Kombinationsbehandlung in IC30 von gesunden und MDS-Zellen gegenübergestellt. Die Zellviabilität der MDS-Proben nach der Behandlung mit 5-Aza und Alvocidib war signifikant geringer als die der gesunden Proben ($p=0,0418$, Mann-Whitney U-Test).

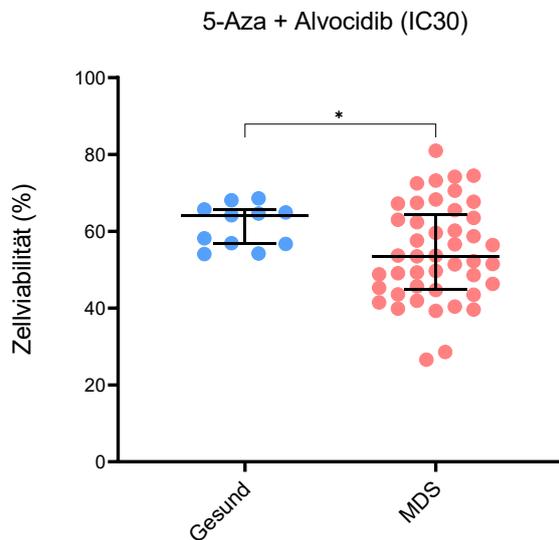


Abbildung 10: Vergleich der Ergebnisse des Zellviabilitäts-Assays zwischen gesunden Zellen und MDS-Proben⁷¹. Dargestellt wird die Zellviabilität in Prozent bezogen auf die Kontrolle nach der Kombinationsbehandlung mit Alvocidib und 5-Aza (IC30). Verglichen werden die Ergebnisse von $n=11$ gesunden Proben (blau) mit $n=45$ MDS-Proben (rot). Die statistische Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney U-Test. ns (nicht signifikant), $p>0,05$; * $p\leq 0,05$; ** $p\leq 0,01$; *** $p\leq 0,001$; **** $p\leq 0,0001$.

3.3 Apoptose-Assay

Die Ergebnisse des Apoptose-Assays zur Bestimmung des Anteils der apoptotischen Zellen von n=24 MDS-Proben werden in **Abbildung 11** dargestellt. Es werden jeweils vier Behandlungsarme abgebildet (Kontrollgruppe DMSO, 5-Aza allein, Alvocidib allein, Alvocidib+5-Aza).

In Gruppe IC10 (5-Aza: 6,2 μ M, Alvocidib: 5,5 μ M) wurde in der Kombination der Substanzen ein mittlerer Anteil apoptotischer Zellen von \bar{x} =9,9 % (SD=6,964) im Verhältnis zur Kontrollgruppe gemessen, was signifikant höher war als der Anteil unter der Behandlung mit 5-Aza (\bar{x} =5,67 %, p =0,0003, SD=3,821) nicht jedoch Alvocidib (\bar{x} =7,834 %, p >0,9999, SD=4,893).

In Gruppe IC20 (5-Aza: 14,2 μ M, Alvocidib: 7,1 μ M) wurde in der Kombination ein mittlerer Anteil apoptotischer Zellen von \bar{x} =10,95 % (SD=6,325) im Verhältnis zur Kontrollgruppe gemessen, was signifikant höher war als der Anteil unter der Behandlung mit 5-Aza (\bar{x} =6,596 %, p =0,0002, SD=4,124), nicht jedoch Alvocidib (\bar{x} =10,06 %, p >0,9999, SD=6,989).

In Gruppe IC30 (5-Aza: 25,4 μ M, Alvocidib: 9 μ M) wurde in der Kombination ein mittlerer Anteil apoptotischer Zellen von \bar{x} =13,84 % (SD=7,847) im Verhältnis zur Kontrollgruppe gemessen, was signifikant höher war als der Anteil unter der Behandlung mit 5-Aza (\bar{x} =6,876 %, p <0,0001, SD=4,211), nicht jedoch Alvocidib (\bar{x} =12,22 %, p >0,9999, SD=6,626).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass in den untersuchten Gruppen IC10, IC20 und IC30 der Anteil apoptotischer Zellen nach der Kombinationsbehandlung signifikant höher war als nach der Behandlung mit 5-Aza, jedoch nicht nach der Behandlung mit Alvocidib. Es wurde keine additive oder synergistische Wirkung der beiden Substanzen beobachtet.

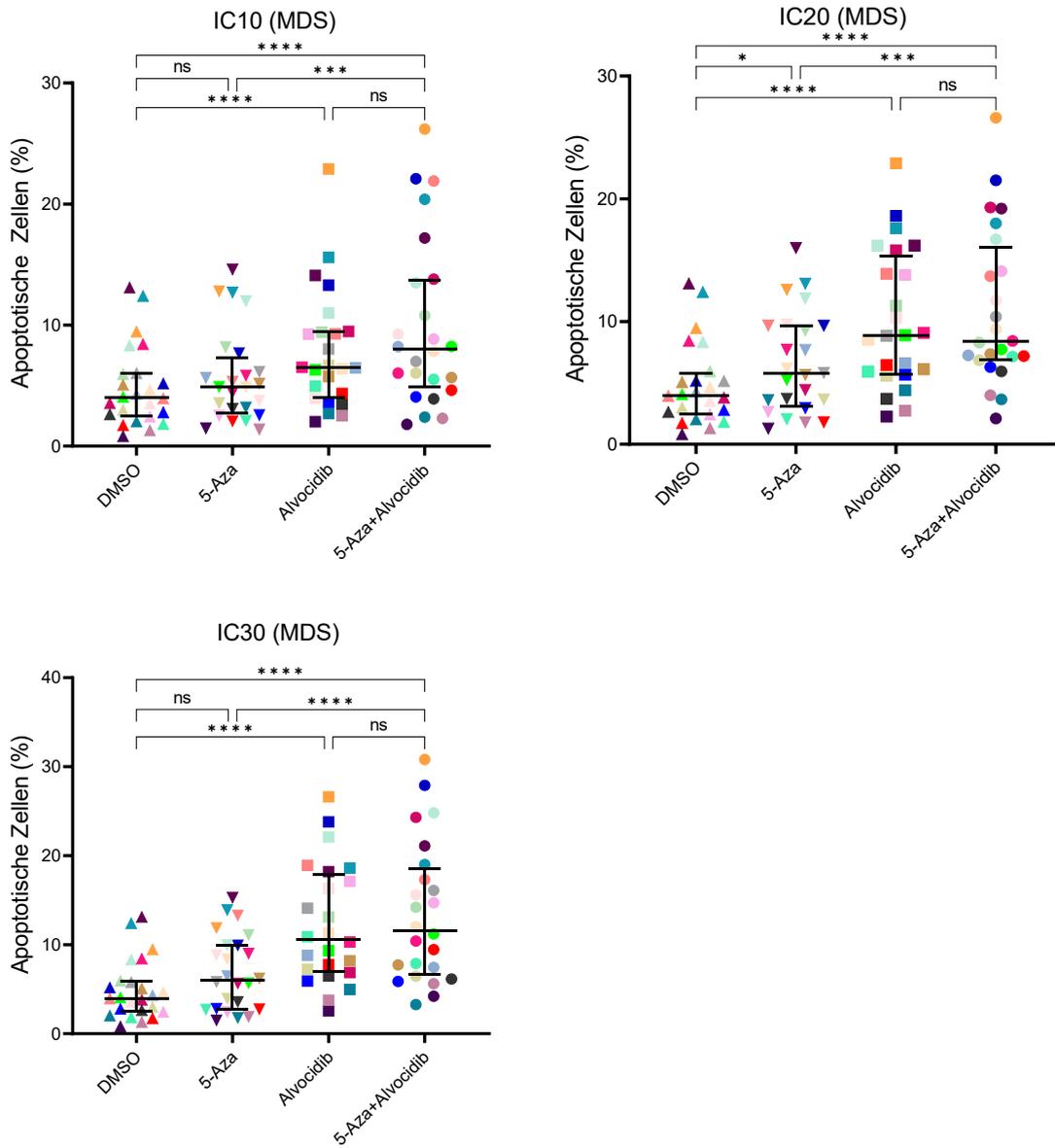


Abbildung 11: Apoptotische Zellen im Apoptose-Assay in MDS-Zellen (n=24) ⁷¹. Dargestellt ist der Anteil der apoptotischen Zellen in Prozent bezogen auf die Gesamtzahl der analysierten Zellen. In drei Behandlungsarmen (IC10, 20 und 30) wurde der Anteil der apoptotischen Zellen nach der Behandlung mit der Kombination von 5-Aza und Alvocidib mit der Behandlung durch die Einzelsubstanzen verglichen. Jede der unterschiedlichen Farben repräsentiert eine Probe. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Friedmans Test und Dunn's Multiple Comparison. ns (nicht signifikant), $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

Die Ergebnisse des Apoptose-Assays zur Bestimmung des Gesamtanteils sowohl der apoptotischen als auch der toten Zellen von n=24 MDS-Proben werden in **Abbildung 12** dargestellt. Es werden jeweils vier Behandlungsarme abgebildet (Kontrollgruppe DMSO, 5-Aza allein, Alvocidib allein, Alvocidib+5-Aza).

In Gruppe IC10 (5-Aza: 6,2 μ M, Alvocidib: 5,5 μ M) wurde in der Kombination der Substanzen ein mittlerer Anteil apoptotischer und toter Zellen von \bar{x} =27,67 % (SD=13,61) im Verhältnis zur Kontrollgruppe gemessen, was signifikant höher war als der Anteil unter der Behandlung mit 5-Aza (\bar{x} =21,4 %, $p<0,0001$, SD=10,73) nicht jedoch Alvocidib (\bar{x} =24,91 %, $p=0,8766$, SD=13,01).

In Gruppe IC20 (5-Aza: 14,2 μ M, Alvocidib: 7,1 μ M) wurde in der Kombination ein mittlerer Anteil apoptotischer und toter Zellen von \bar{x} =31,69 % (SD=14,16) im Verhältnis zur Kontrollgruppe gemessen, was signifikant höher war als der Anteil unter der Behandlung mit 5-Aza (\bar{x} =23,68 %, $p<0,0001$, SD=10,25) sowie Alvocidib (\bar{x} =28,69 %, $p=0,0311$, SD=13,46).

In Gruppe IC30 (5-Aza: 25,4 μ M, Alvocidib: 9 μ M) wurde in der Kombination ein mittlerer Anteil apoptotischer und toter Zellen von \bar{x} =40,02 % (SD=17,22) im Verhältnis zur Kontrollgruppe gemessen, was signifikant höher war als die Viabilität unter der Behandlung mit 5-Aza (\bar{x} =24,87 %, $p=0,0001$, SD=10,36), nicht jedoch Alvocidib (\bar{x} =35,03 %, $p=0,2650$, SD=15,49).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass in den untersuchten Gruppen IC10, IC20 und IC30 der Anteil apoptotischer und toter Zellen nach der Kombinationsbehandlung signifikant höher war als nach der Behandlung mit 5-Aza. Einzig in der Gruppe IC20 war der Anteil apoptotischer und toter Zellen nach der Kombinationsbehandlung signifikant höher als nach der Behandlung mit Alvocidib. Es wurde eine additive, jedoch keine synergistische Wirkung der beiden Substanzen beobachtet.

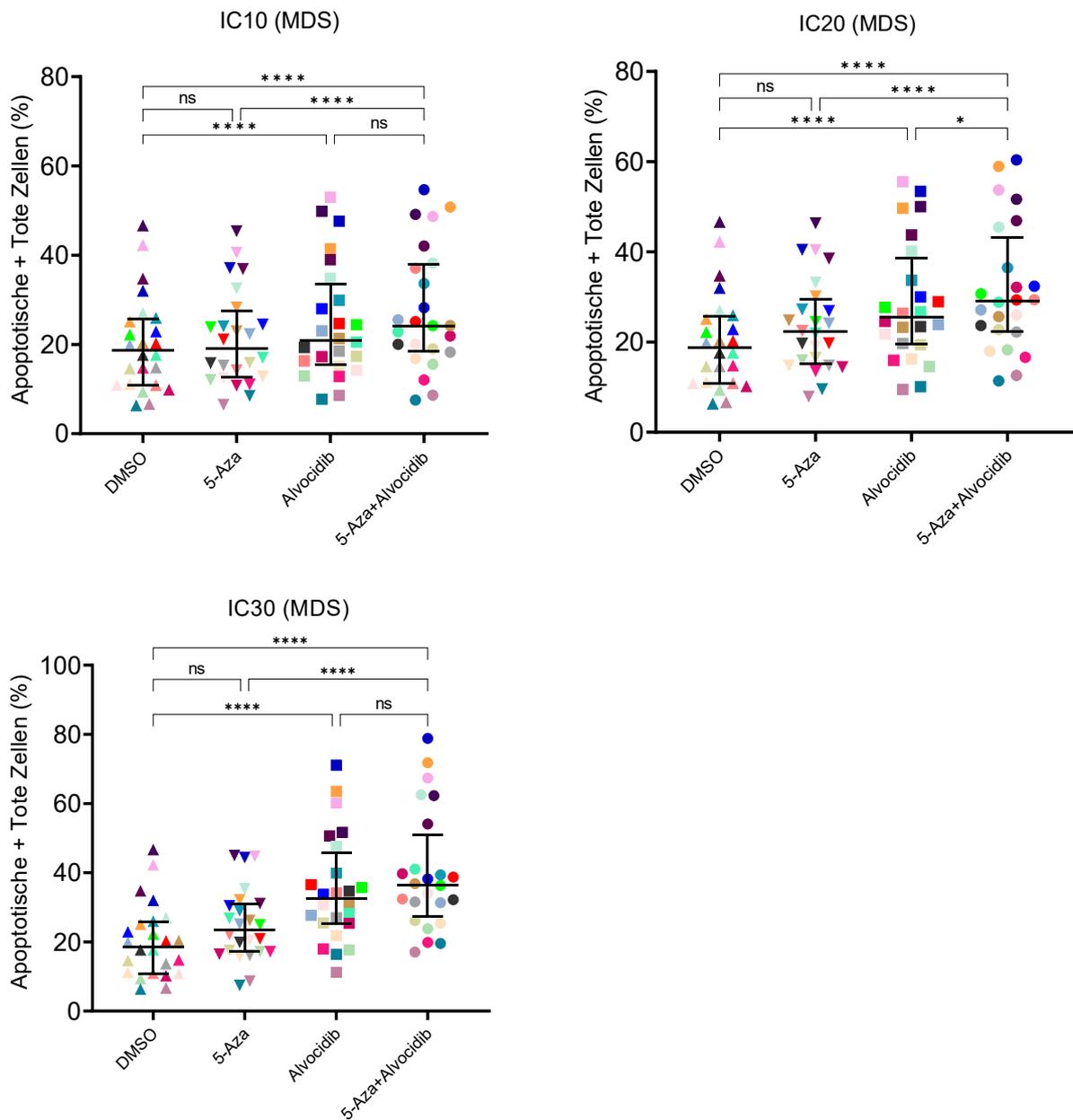


Abbildung 12: Apoptotische und tote Zellen im Apoptose Assay in MDS-Zellen (n=24) ⁷¹. Dargestellt ist der Anteil der apoptotischen und toten Zellen in Prozent bezogen auf die Gesamtzahl der analysierten Zellen. In drei Behandelungsarmen (IC10, 20 und 30) wurde der Anteil der apoptotischen und toten Zellen nach der Behandlung mit der Kombination von 5-Aza und Alvocidib mit der Behandlung durch die Einzelsubstanzen verglichen. Jede der unterschiedlichen Farben repräsentiert eine Probe. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Friedmans Test und Dunn's Multiple Comparison. ns (nicht signifikant), p>0,05; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001.

In **Abbildung 13** werden die Ergebnisse des Apoptose-Assays der Kombinationsbehandlung in IC30 von n=11 gesunden und n=24 MDS-Zellen gegenübergestellt. Der Anteil der apoptotischen und toten Zellen der MDS-Proben nach der Behandlung mit Alvocidib und 5-Aza war signifikant geringer als die der gesunden Proben ($p=0,0418$, Mann-Whitney U-Test). Zwischen dem Anteil der apoptotischen Zellen der MDS-Proben und dem der gesunden Proben nach der Behandlung mit Alvocidib und 5-Aza gab es keinen signifikanten Unterschied.

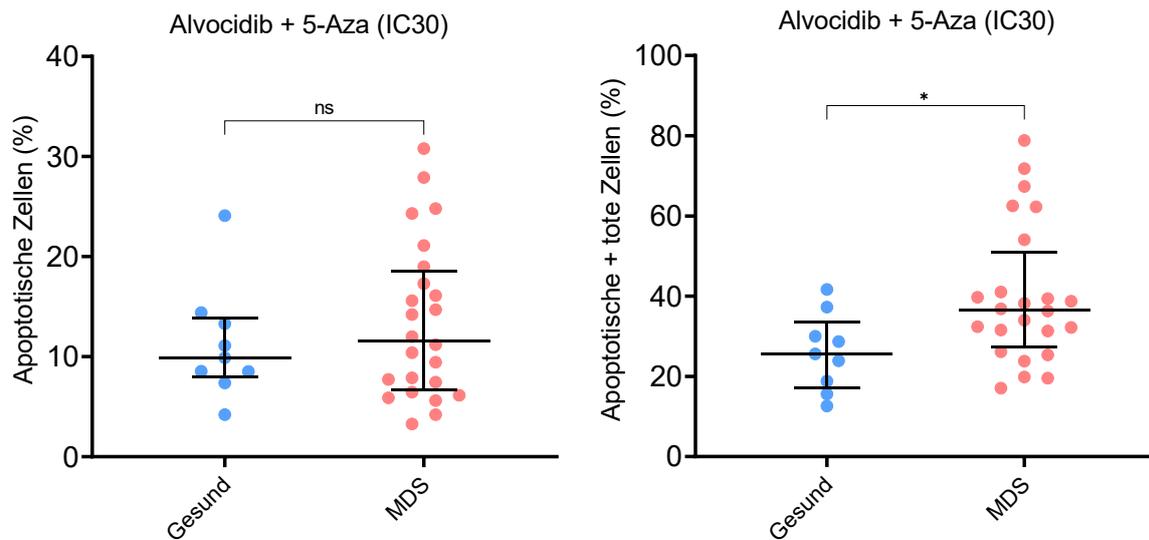


Abbildung 13: Vergleich des Apoptose-Assays zwischen gesunden Zellen und MDS-Proben⁷¹. Dargestellt ist der Anteil der apoptotischen bzw. apoptotischen und toten Zellen in Prozent bezogen auf die Gesamtzahl erkannter Zellen nach der Kombinationsbehandlung mit Alvocidib und 5-Aza (IC30). Verglichen werden die Ergebnisse von n=11 gesunden Proben (blau) mit n=24 MDS-Proben (rot). Gezeigt werden Median und Interquartilsabstände. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney U-Test. ns (nicht signifikant), $p>0,05$; * $p\leq 0,05$; ** $p\leq 0,01$; *** $p\leq 0,001$; **** $p\leq 0,0001$.

3.4 CFU-Assays

Um den Einfluss der Behandlung von HSCs mit der Kombination aus 5-Aza und Alvocidib auf die Differenzierung der verschiedenen Zellreihen zu untersuchen, wurden CFU-Assays von n=5 Patientenproben (P04, P07, P32, P35, P39) mit je vier Replikaten durchgeführt. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse sind in **Abbildung 14** und **Abbildung 15** dargestellt.

Abbildung 14 zeigt die durchflusszytometrische Analyse von erythroiden Zellen der CFU-Assays. Diese wurden mittels CD45 und CD235a bestimmt, wobei CD45- und CD235a+ Zellen als erythroide Zellen gewertet wurden (siehe Quadrant Q1, **Abbildung 14A**). Jeder der Graphen **B-F** stellt die Ergebnisse für je eine Patientenprobe mit je vier Replikaten dar. Bei zwei Patienten konnten signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsarmen festgestellt werden (**Abbildung 14D+F**). Bei P32 (**Abbildung 14D**) war der Anteil der erythroiden Zellen nach der Behandlung mit 5-Aza allein signifikant höher als nach der Behandlung mit Alvocidib und 5-Aza ($p=0,0368$) und als in der Kontrollgruppe (DMSO) ($p=0,0068$). Bei P39 (**Abbildung 14F**) war der Anteil der erythroiden Zellen nach der Behandlung mit Alvocidib und 5-Aza signifikant höher als nach 5-Aza allein ($p=0,0068$). Der Anteil der erythroiden Zellen nach Behandlung mit Alvocidib allein war signifikant höher als nach 5-Aza allein ($p=0,0016$). Bei P04 (**Abbildung 14B**), P07 (**Abbildung 14C**) und P35 (**Abbildung 14E**) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsarmen festgestellt werden.

Abbildung 15 zeigt die durchflusszytometrische Analyse myeloischer Zellen der CFU-Assays. Diese wurden mittels CD45 und CD33 bestimmt, wobei CD45+ und CD33+ Zellen als myeloische Zellen gewertet wurden (siehe Quadrant Q2, **Abbildung 15A**). Jeder der Graphen **B-F** stellt die Ergebnisse für je eine Patientenprobe mit je vier Replikaten dar. Bei drei Patienten konnten signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsarmen festgestellt werden. In P35 (**Abbildung 15D**) konnte nach Behandlung mit Alvocidib und 5-Aza ein signifikant geringerer Anteil der myeloischen Zellen nachgewiesen werden als in der Kontrolle ($p=0,0193$). Auch nach Behandlung mit 5-Aza allein war dieser geringer als in der Kontrolle ($p=0,0190$). In P37 (**Abbildung 15E**) konnte nach Behandlung mit Alvocidib und 5-Aza ein signifikant geringerer Anteil der myeloischen Zellen nachgewiesen werden als in der Kontrolle ($p=0,0389$) und nach 5-Aza allein ($p=0,0192$). In P39 (**Abbildung 15F**) war der Anteil der myeloischen Zellen

nach Alvocidib und 5-Aza signifikant geringer als nach 5-Aza allein ($p=0,0102$). Nach Alvocidib allein war dieser ebenfalls signifikant geringer als nach 5-Aza allein ($p=0,0033$) und als in der Kontrolle ($p=0,0321$). Bei den Patienten P04 (**Abbildung 15B**) und P07 (**Abbildung 15C**) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsarmen festgestellt werden.

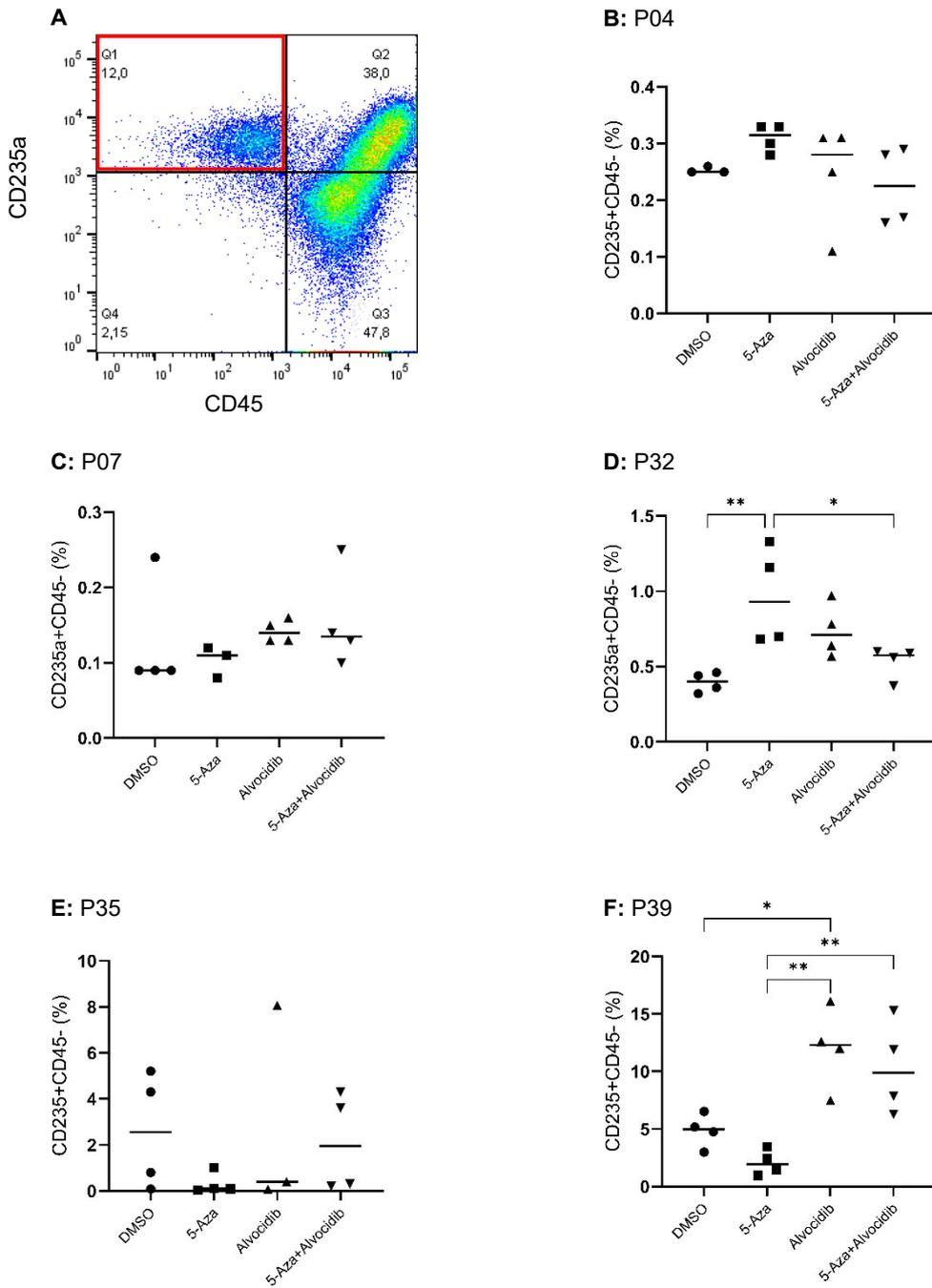


Abbildung 14: Erythroide Zellen nach CFU-Assay. Dargestellt wird der Anteil CD235a+/CD45- Zellen in Prozent bezogen auf die Gesamtzahl der analysierten Zellen nach Kolonisierung und Behandlung mit Alvocidib und/oder 5-Aza (IC30). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Ordinary one-way ANOVA. ns (nicht signifikant); $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

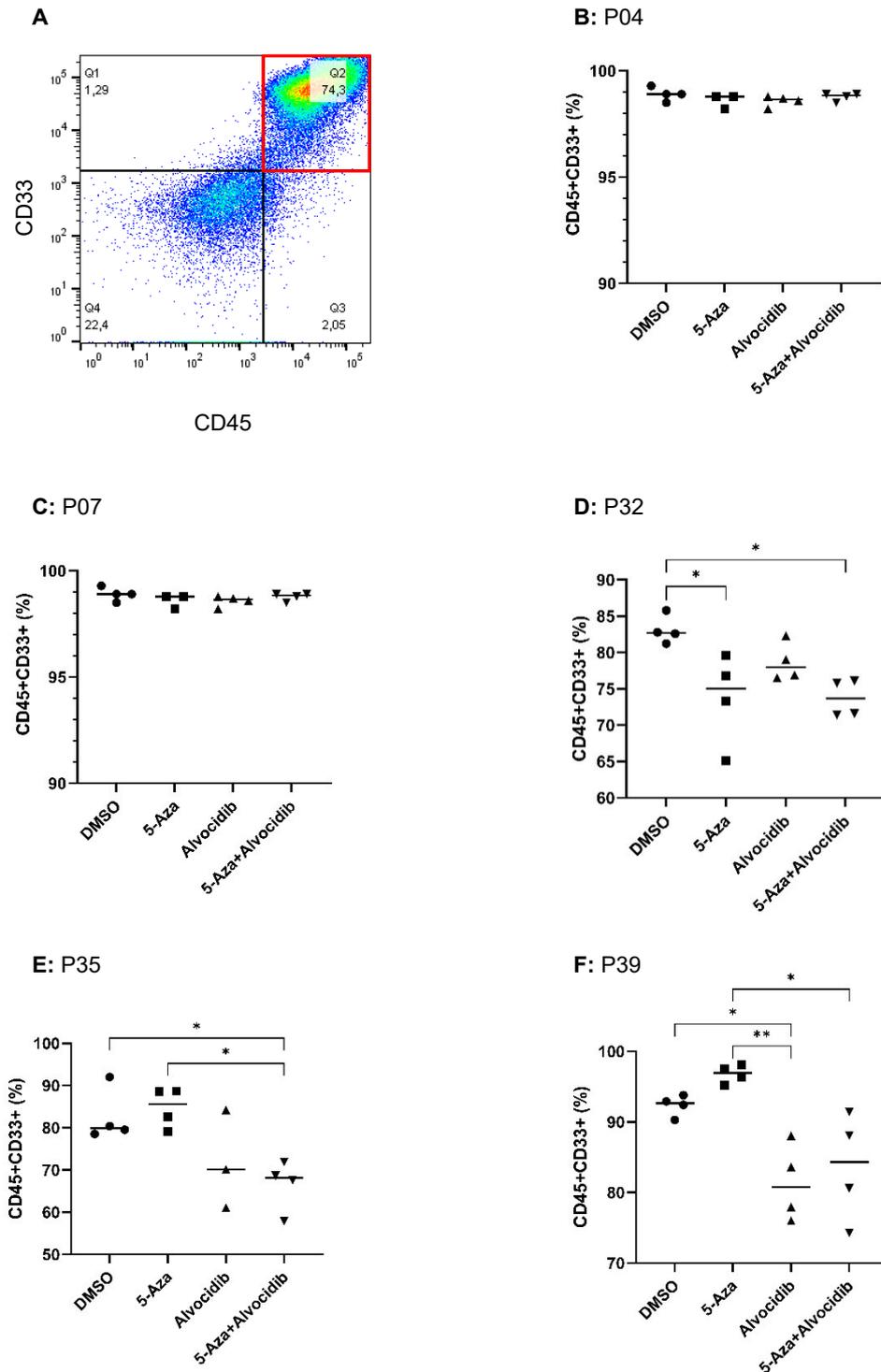


Abbildung 15: Myeloische Zellen nach CFU-Assay. Dargestellt wird der Anteil CD33+/CD45+ Zellen in Prozent bezogen auf die Gesamtzahl der analysierten Zellen nach Kolonisierung und Behandlung mit Alvociclib und/oder 5-Aza (IC30). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Ordinary one-way ANOVA. ns (nicht signifikant); p>0,05; * p≤0,05; ** p≤0,01; *** p≤0,001; **** p≤0,0001.

3.5 Patientencharakteristika

Zur Untersuchung des Zusammenhangs der Suszeptibilität der Zellen mit klinischen Parametern wurden Patientendaten überprüft und in **Tabelle 6** zusammengefasst.

Tabelle 6: Klinische Parameter von n=45 Patientenproben ⁷¹.

Parameter	
Alter	
Median in Jahren (Spannweite)	73 (43-90)
Geschlecht	
Männlich	34
Weiblich	11
WHO-Subtyp 2016	
MDS-MLD	6
MDS-RS-MLD	1
MDS-EB1	10
MDS-EB2	20
MDS/MPN-U	3
CMML-2	1
AML-MRC	2
sAML	2
IPSS-R	
<i>Intermediate</i>	5
<i>High</i>	23
<i>Very High</i>	12
Nicht anwendbar (sAML, AML-MRC)	4
CPSS	
Hoch	1

Abkürzungen: MDS-MLD: MDS mit multilineärer Dysplasie; RS: Ringsideroblasten; MDS-EB: MDS mit Blasten-Exzess; MDS/MPN-U, myelodysplastische/myeloproliferative Neoplasie, unklassifizierbar; CMML: chronische myelomonozytäre Leukämie; sAML: sekundäre AML, AML-MRC: AML mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen; IPSS-R: Revised International Prognostic Scoring System; CPSS: CMML-specific prognostic scoring system.

3.6 Zusammenhang zwischen klinischen Parametern und Zellviabilität

Die Ergebnisse der Assoziationsanalyse zwischen klinischen Parametern und den Resultaten des Zellviabilitäts-Assays sind in **Abbildung 16** dargestellt.

Zwischen der Zellviabilität nach Behandlung mit Alvocidib und dem Alter der Patienten (**Abbildung 16, A1**) ergibt sich ein Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman von $r=0,1863$ ($p=0,2203$). Zwischen der Zellviabilität nach der Kombinationsbehandlung und dem Alter der Patienten (**Abbildung 16, A2**) ergibt sich ein Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman von $r=0,2433$. Die Korrelation ist nicht signifikant ($p=0,1073$).

Ein Zusammenhang zwischen der Zellviabilität nach Behandlung mit Alvocidib und dem Geschlecht der Patienten (**Abbildung 16, B1**) konnte nicht gefunden werden ($p=0,6865$), ebenso wie zwischen der Zellviabilität nach der Kombinationsbehandlung und dem Geschlecht (**Abbildung 16, B2**) ($p=0,5402$).

Der Zusammenhang der Zellviabilität nach Behandlung mit Alvocidib bzw. der Kombinationsbehandlung und dem Anteil der Blasten im Knochenmark in der durchflusszytometrischen Analyse (**Abbildung 16, C1+2**) wurde an $n=41$ Patienten untersucht. Für Alvocidib ergab sich ein negativer Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman von $r=-0,02462$, welcher nicht signifikant war ($p=0,8786$). Für die Kombinationsbehandlung wurde ein negativer Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman von $r=-0,2084$ ermittelt. Die Korrelation war nicht signifikant ($p=0,4727$).

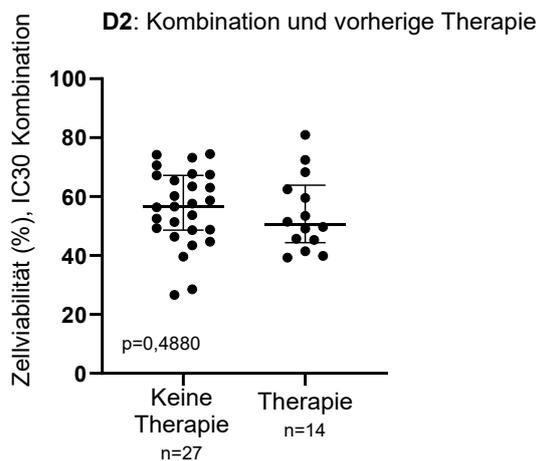
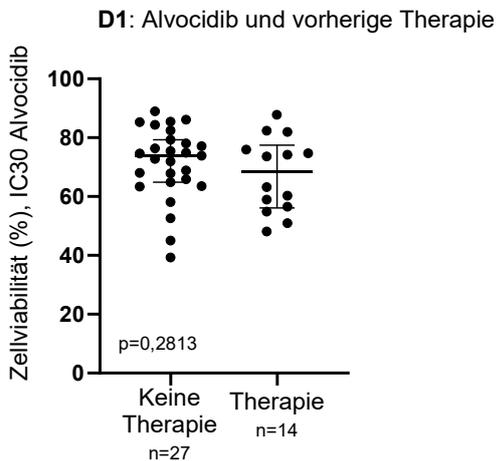
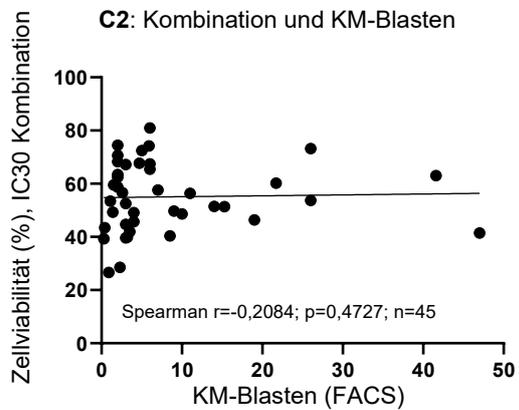
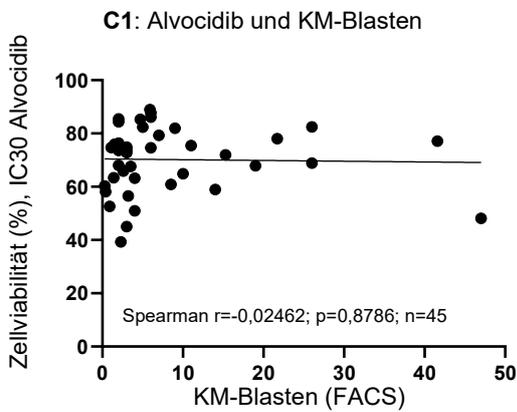
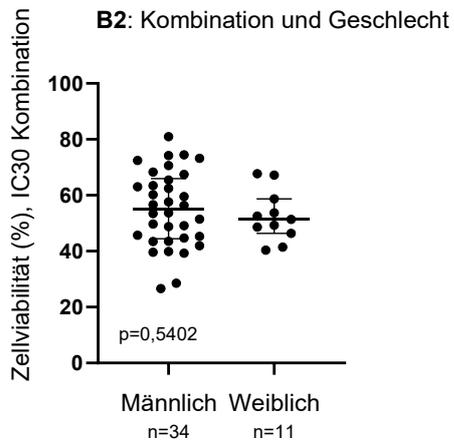
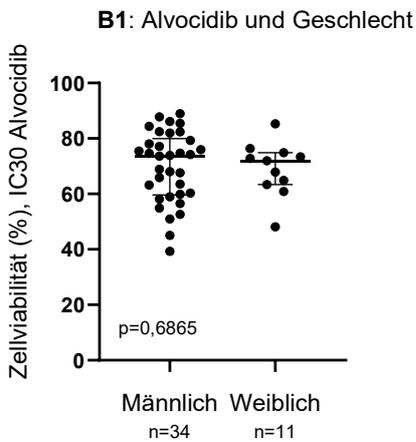
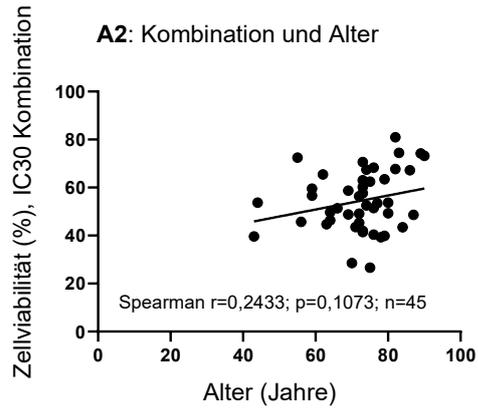
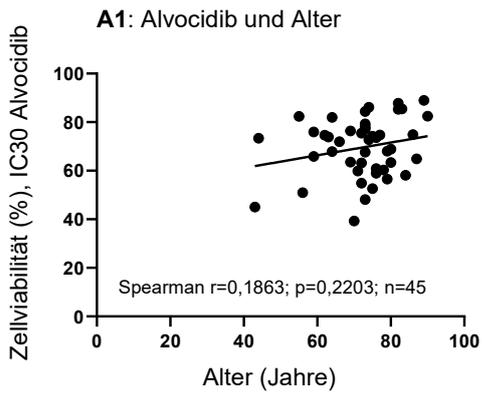
Auch zwischen der Zellviabilität nach Behandlung mit Alvocidib und einer vorausgegangenen Therapie (**Abbildung 16, D1**) konnte kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden ($p=0,2813$), ebenso nicht nach der Kombinationsbehandlung (**Abbildung 16, D2**) ($p=0,4880$).

Es konnte kein Unterschied zwischen der Zellviabilität bei aberranten und normalem Karyotyp festgestellt werden, weder nach Behandlung mit Alvocidib (**Abbildung 16, E1**) ($p=0,4134$) noch nach der Kombinationsbehandlung (**Abbildung 16, E2**) ($p=0,7296$).

Zwischen der Zellviabilität und der Einteilung der Patienten nach IPSS-R gab es keine signifikanten Zusammenhänge, weder nach Behandlung mit Alvocidib (**Abbildung 16, F1**) ($p=0,7660$) noch nach der Kombinationsbehandlung (**Abbildung 16, F2**) ($p=0,1543$).

An $n=44$ Patienten wurde der Zusammenhang zwischen dem Hämoglobin-Wert zum Zeitpunkt der Probenentnahme bzw. Knochenmarkpunktion und der Zellviabilität untersucht. Nach Behandlung mit Alvocidib (**Abbildung 16, G1**) ergab sich ein Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman von $r=0,1689$, welcher nicht signifikant war ($p=0,2731$) und nach der Kombinationsbehandlung (**Abbildung 16, G2**) einen Rangkorrelationskoeffizient von $r=0,0700$. Auch hier konnte keine Signifikanz nachgewiesen werden ($p=0,6530$).

Zusammenfassend konnte zwischen der Zellviabilität nach der Behandlung mit Alvocidib oder der Kombinationsbehandlung und keinem der klinischen Parameter ein signifikanter Zusammenhang hergestellt werden.



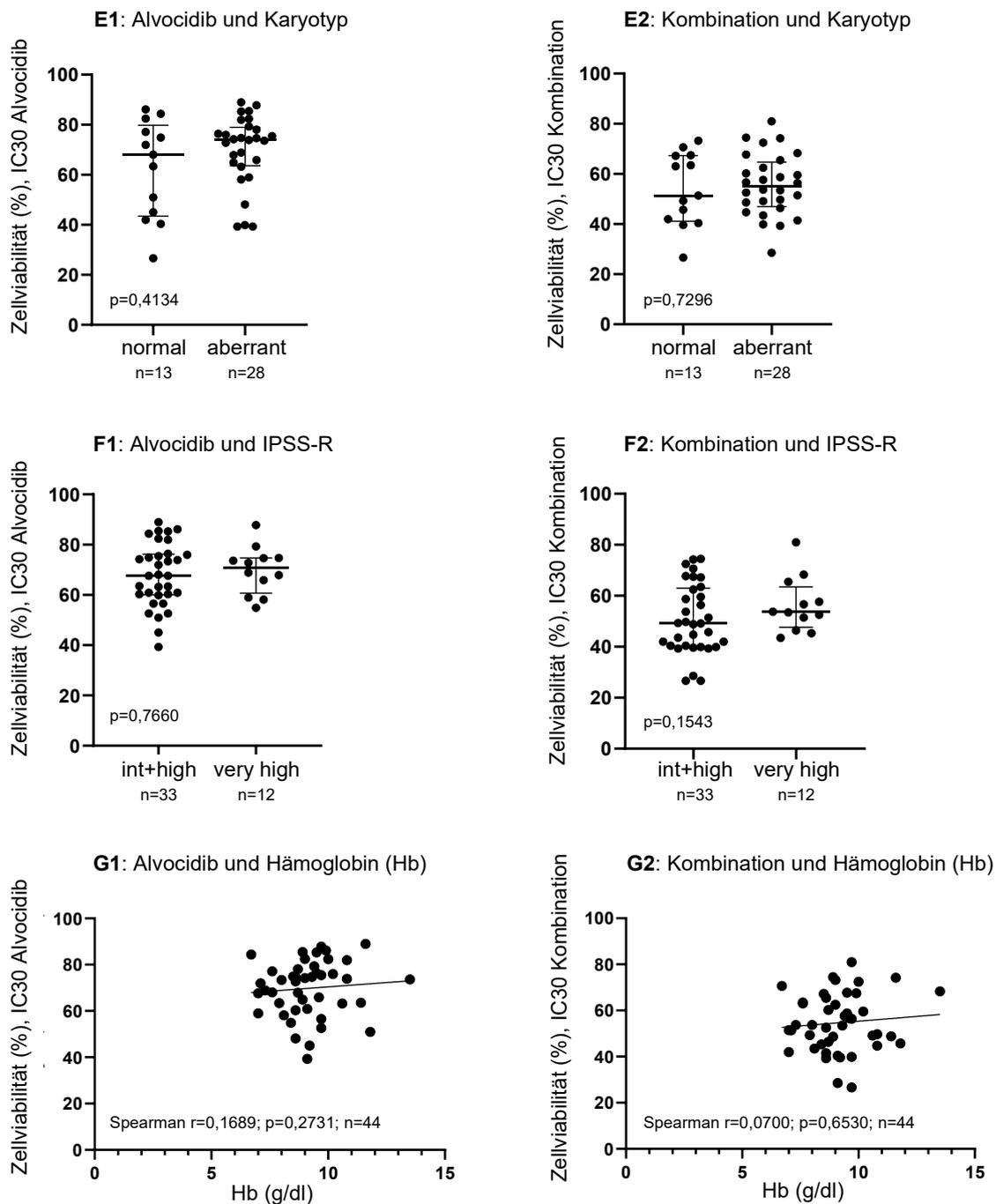


Abbildung 16: Zusammenhang zwischen klinischen Parametern und Zellviabilität. Dargestellt sind die Zusammenhänge zwischen der Zellviabilität nach der Behandlung mit Alvocidib (IC30) bzw. der Kombination von 5-Aza und Alvocidib (IC30) und Alter (A1+A2), Geschlecht (B1+B2), Anteil der KM-Blasen (C1+C2), vorausgegangener MDS-Therapie (D1+D2), Karyotyp (E1+E2), IPSS-R (F1+F2) sowie Hämoglobin (Hb) zum Zeitpunkt der KM-Punktion (G1+G2). B, D, E und F werden mit Median und Interquartilsabständen dargestellt.

3.7 Zusammenhang zwischen Überlebenswahrscheinlichkeit und Zellviabilität

In **Abbildung 17** wird die Überlebenswahrscheinlichkeit von $n=45$ Patienten ab dem Zeitpunkt der Probenentnahme in Form von Kaplan-Meier-Kurven in Zusammenhang mit der Suszeptibilität der Zellen auf die Behandlung mit Alvocidib (IC30) bzw. der Kombination von Alvocidib und 5-Aza (IC30) *in vitro* gesetzt. Hierfür wurden die Patienten in zwei Gruppen geteilt. Als suszeptibel gewertet wurden die Patienten mit einer Zellviabilität unter dem Mittelwert, als nicht suszeptibel die Patienten mit einer Zellviabilität über dem Mittelwert. Zwischen den Überlebenskurven konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Alvocidib: $p=0,5443$, Kombination: $p=0,6529$).

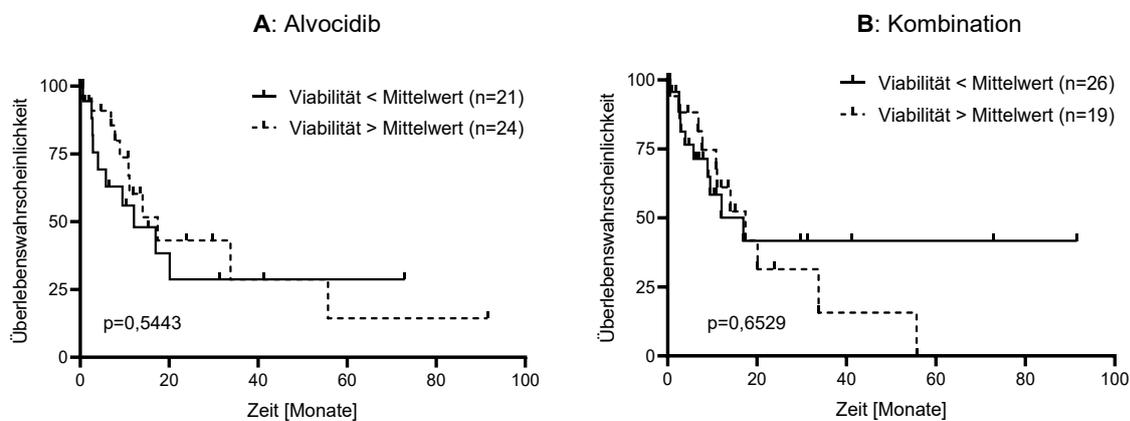


Abbildung 17: Zusammenhang zwischen Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten und Suszeptibilität der Zellen auf die Behandlung. Gezeigt wird die Assoziation der Überlebenswahrscheinlichkeit mit der Suszeptibilität der Zellen auf die Behandlung mit Alvocidib (**A**) und der Kombinationsbehandlung (Alvocidib und 5-Aza) (**B**). Die Daten werden als Kaplan-Meier-Kurven dargestellt. Die Analyse erfolgte mittels Log-Rank-Test.

3.8 Myeloid-Panel-Sequenzierung

Zur Erfassung von pathogenen Mutationen wurden n=40 Proben einer Myeloid-Panel-Sequenzierung unterzogen, von n=5 Patienten wurde der Mutationsstatus aus klinischen Aufzeichnungen ermittelt. Die Ergebnisse der Sequenzierung werden in **Abbildung 18** als Onkoplot dargestellt. Von n=45 Patientenproben wiesen 44 (98%) mindestens eine MDS-typische Mutation auf. Am häufigsten war die Mutation *ASXL1* (39%), gefolgt von *RUNX1* und *TET2* (je 32%). In **Abbildung 19** und **Abbildung 20** werden die Mutationsprofile aufgeteilt nach Respondern und Non-Respondern dargestellt. Die Einteilung erfolgte auf Basis der mittels Zellviabilitäts-Assay bestimmten mittleren Zellviabilität. Hierbei zeigte sich, dass in beiden Responder-Gruppen bestimmte Gene häufiger auftraten als in den Non-Responder-Gruppen, darunter *ASXL1*, *EZH2*, *TET2*, *RUNX1*, *ZRSR2* und *STAG2*.

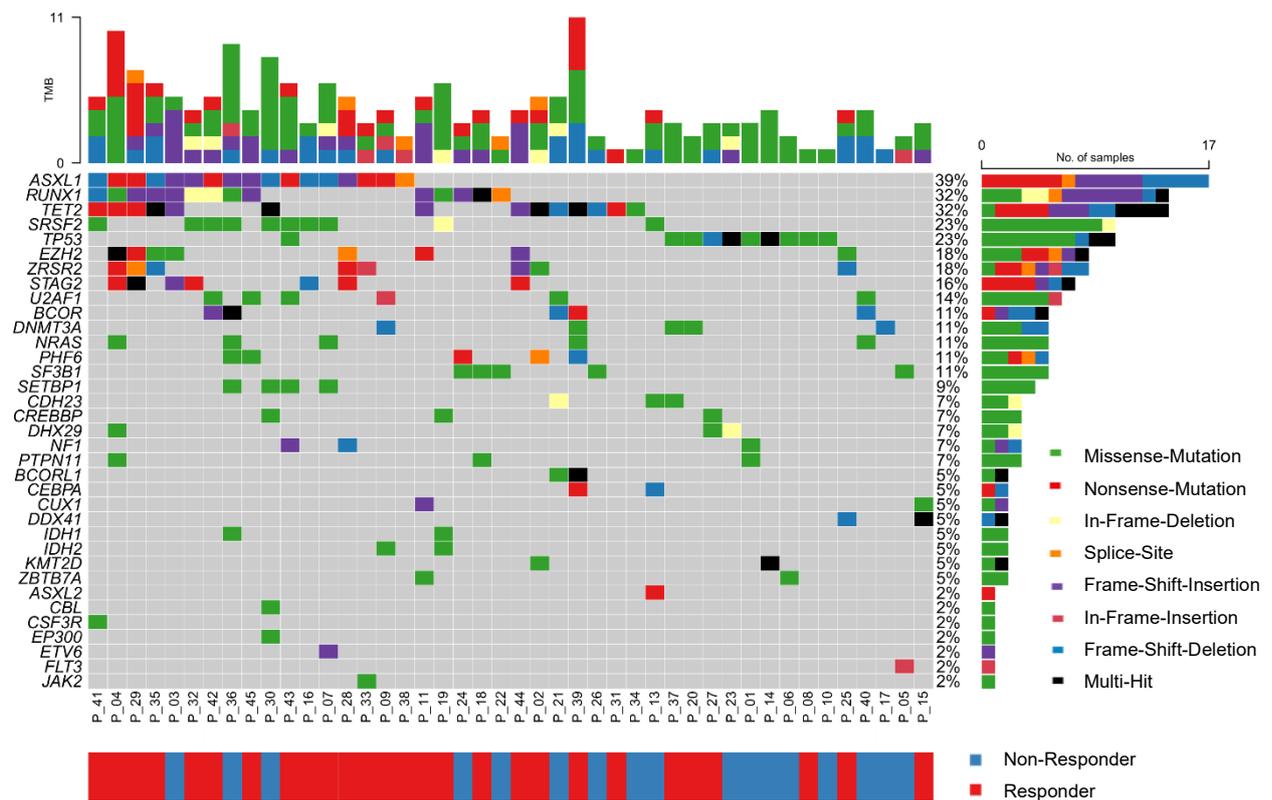


Abbildung 18: Ergebnisse des Myeloid-Panel-Sequenzierung von n=45 Patientenproben⁷¹. Dargestellt sind n=44 mutationstragende Proben, in einer der Proben konnte keine Mutation nachgewiesen werden. Die Mutationen sind nach Häufigkeit absteigend aufgelistet. Dargestellt sind zudem die Art der Mutation und die Einteilung der Patienten in Responder und Non-Responder im Zellviabilitäts-Assay.

Alvocidib

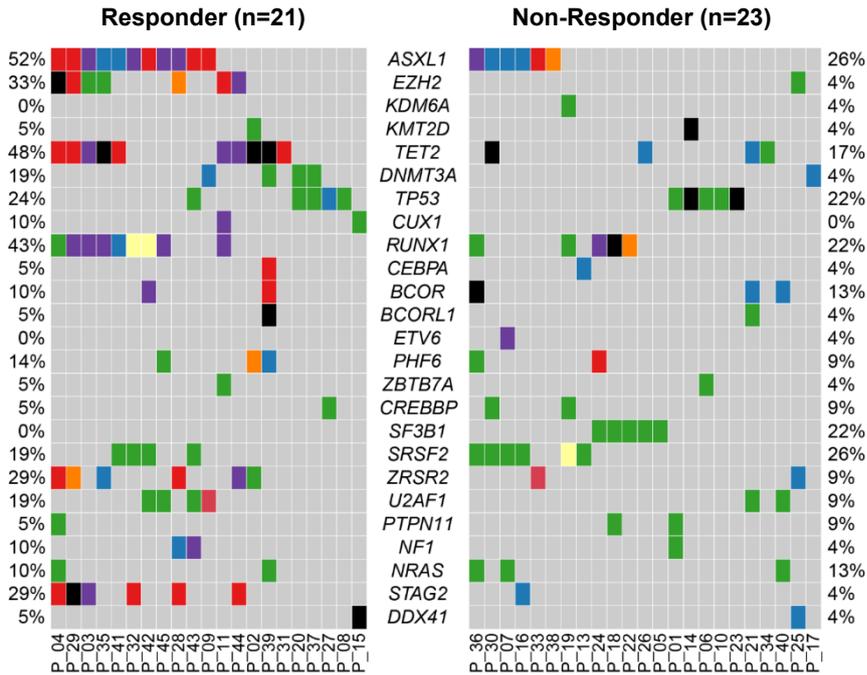


Abbildung 19: Mutationsprofile von Respondern und Non-Respondern (Alvocidib) ⁷¹. Die Einteilung erfolgte auf Basis der mittels Zellviabilitäts-Assay bestimmten mittleren Zellviabilität im Behandlungsarm Alvocidib (IC30).

Kombination

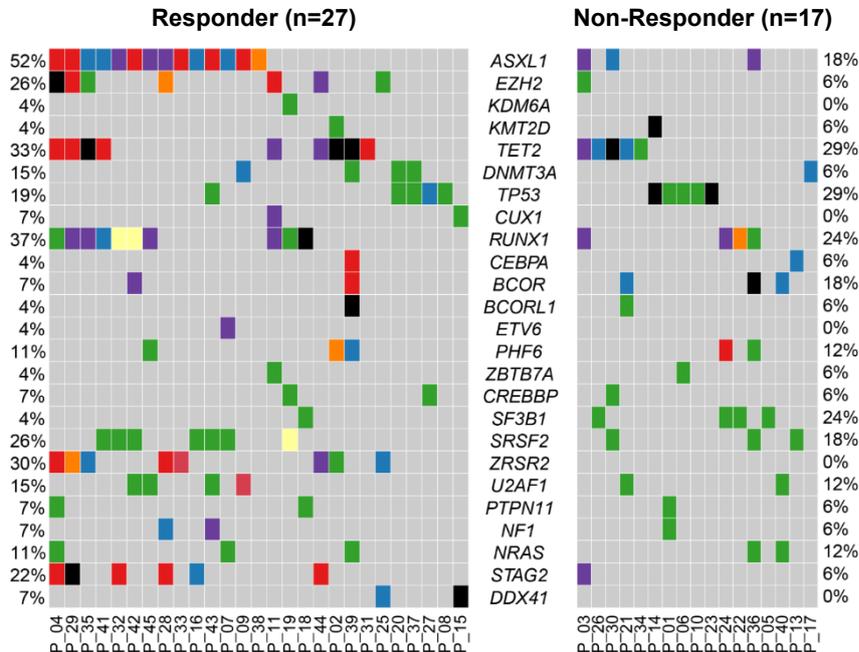


Abbildung 20: Mutationsprofile von Respondern und Non-Respondern (Kombination) ⁷¹. Die Einteilung erfolgte auf Basis der mittels Zellviabilitäts-Assay bestimmten mittleren Zellviabilität im Behandlungsarm Alvocidib+5-Aza (IC30).

3.9 Zusammenhang zwischen Mutationsstatus und Zellviabilität

Um herauszufinden, ob es einen Zusammenhang zwischen der Suszeptibilität der MDS-Proben auf die Behandlung mit Alvocidib und/oder 5-Aza und dem Auftreten bestimmter Mutationen gibt, wurde das Vorhandensein von Mutationen der Gene ASXL1, ZRSR2, EZH2, RUNX1, TET2 und STAG2 ins Verhältnis zu den Resultaten des Zellviabilitäts-Assays nach Behandlung mit Alvocidib (IC30) (**Abbildung 21**), der Kombination von Alvocidib und 5-Aza (IC30) (**Abbildung 22**) sowie der Behandlung mit 5-Aza (IC30) (**Abbildung 23**) gesetzt. Die ausgewählten Mutationen kamen in den Responder-Gruppen häufiger vor als in den Non-Responder-Gruppen (**Abbildung 19** und **Abbildung 20**). Gegenüber der Alvocidib-Behandlung wurde eine höhere Suszeptibilität in Proben gefunden, die Mutationen in ASXL1 ($p=0,0100$), ZRSR2 ($p=0,0035$), EZH2 ($p=0,0020$), TET2 ($p=0,0252$) und STAG2 ($p=0,0104$) trugen. Eine signifikant höhere Suszeptibilität in der Kombinations-Behandlung wurde für das Vorhandensein von Mutationen in den Genen ASXL1 ($p=0,0037$), ZRSR2 ($p=0,0068$) and EZH2 ($p=0,0193$) nachgewiesen. Keine der Mutationen zeigte einen Zusammenhang mit einer erhöhten Suszeptibilität der Proben gegenüber der Behandlung mit ausschließlich 5-Aza.

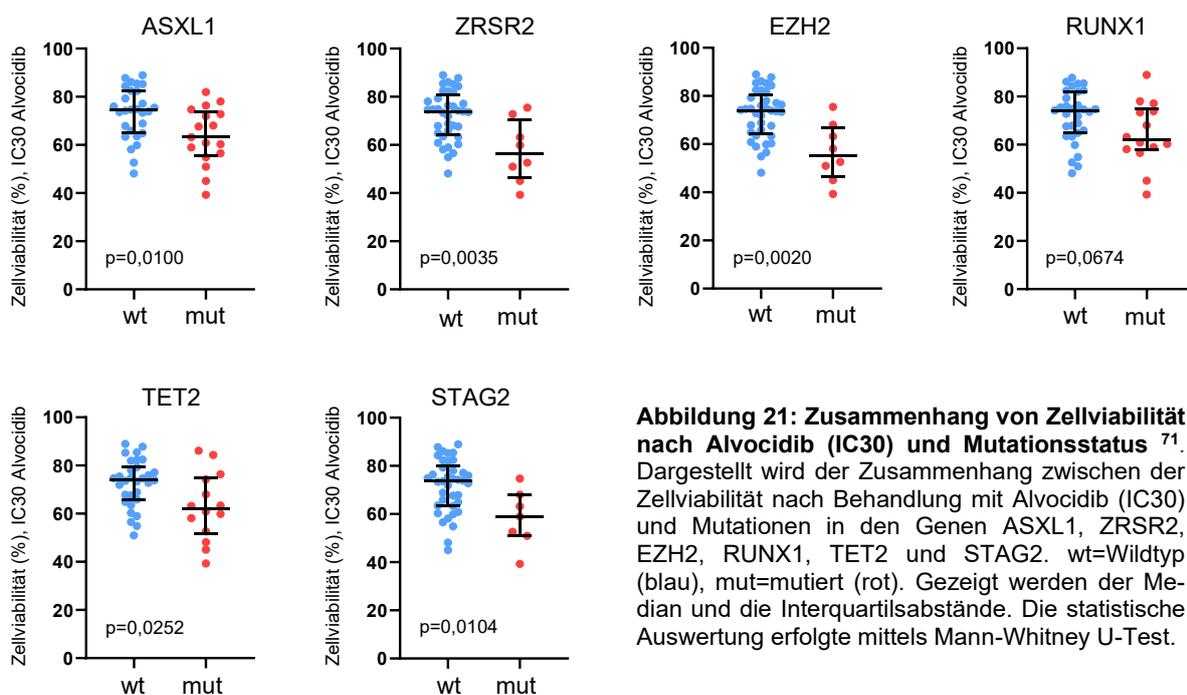


Abbildung 21: Zusammenhang von Zellviabilität nach Alvocidib (IC30) und Mutationsstatus⁷¹. Dargestellt wird der Zusammenhang zwischen der Zellviabilität nach Behandlung mit Alvocidib (IC30) und Mutationen in den Genen ASXL1, ZRSR2, EZH2, RUNX1, TET2 und STAG2. wt=Wildtyp (blau), mut=mutiert (rot). Gezeigt werden der Median und die Interquartilsabstände. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney U-Test.

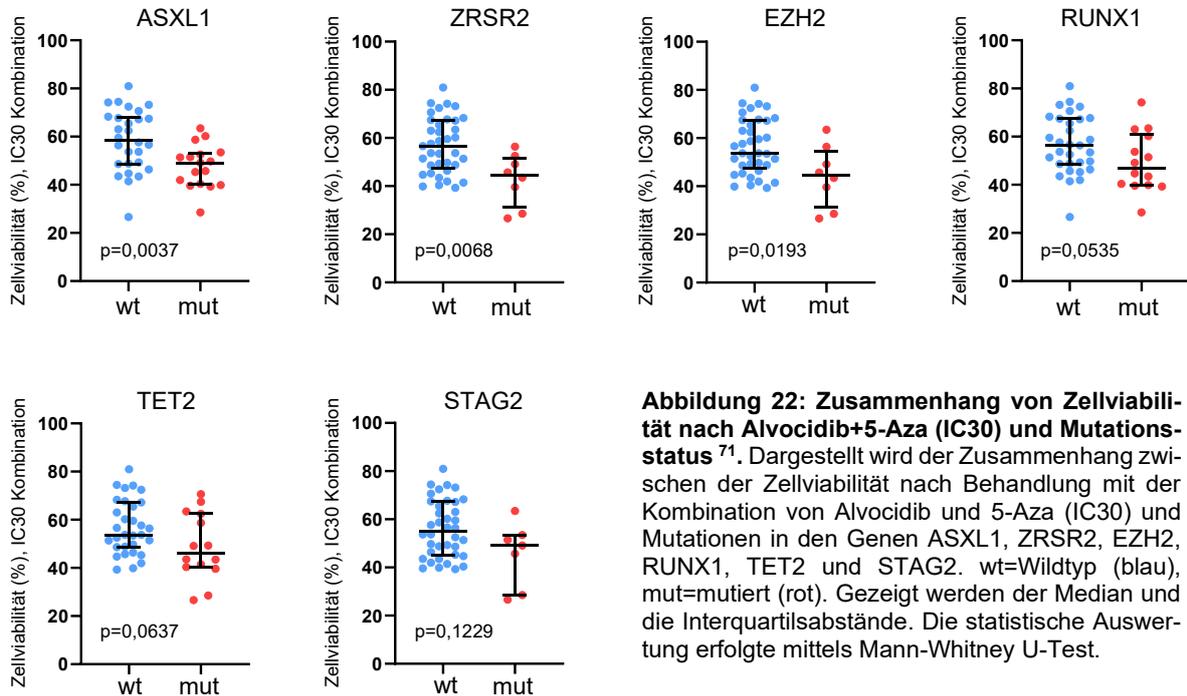


Abbildung 22: Zusammenhang von Zellviabilität nach Alvocidib+5-Aza (IC30) und Mutationsstatus⁷¹. Dargestellt wird der Zusammenhang zwischen der Zellviabilität nach Behandlung mit der Kombination von Alvocidib und 5-Aza (IC30) und Mutationen in den Genen ASXL1, ZRSR2, EZH2, RUNX1, TET2 und STAG2. wt=Wildtyp (blau), mut=mutiert (rot). Gezeigt werden der Median und die Interquartilsabstände. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney U-Test.

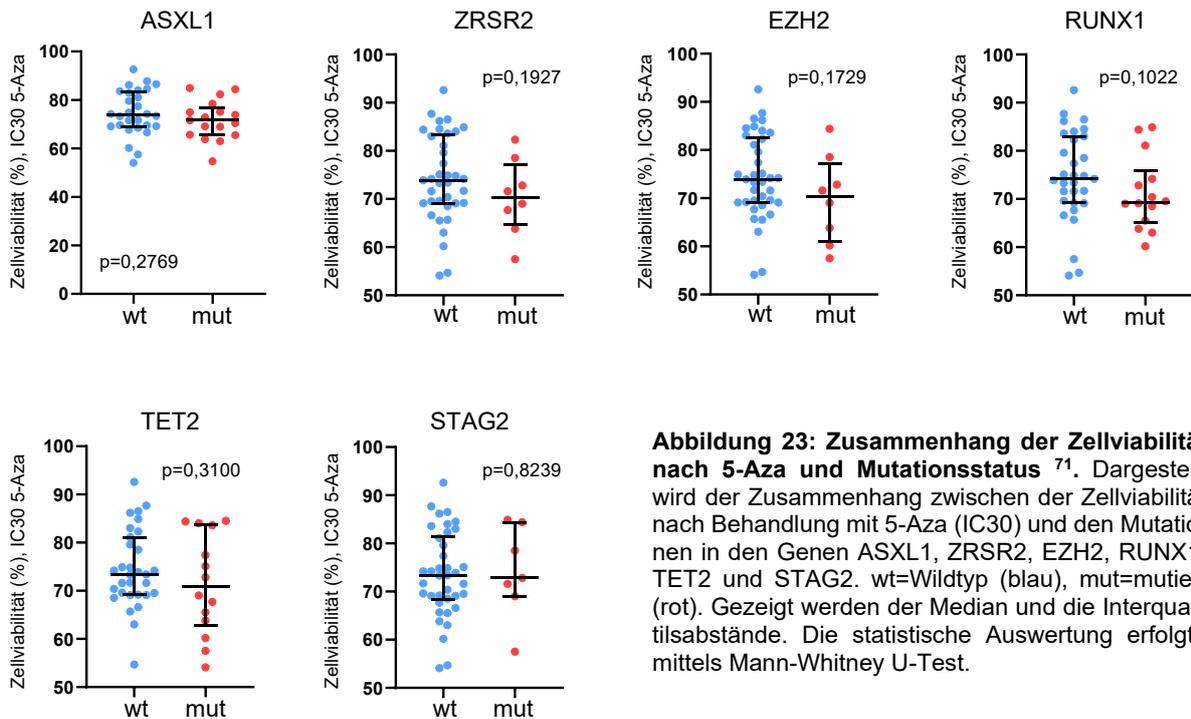


Abbildung 23: Zusammenhang der Zellviabilität nach 5-Aza und Mutationsstatus⁷¹. Dargestellt wird der Zusammenhang zwischen der Zellviabilität nach Behandlung mit 5-Aza (IC30) und den Mutationen in den Genen ASXL1, ZRSR2, EZH2, RUNX1, TET2 und STAG2. wt=Wildtyp (blau), mut=mutiert (rot). Gezeigt werden der Median und die Interquartilsabstände. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney U-Test.

Um den Einfluss möglicher Störfaktoren zu untersuchen, wurden multivariable Analysen durchgeführt. Als Kovariablen wurden Alter (≥ 70 vs. < 70 Jahre), Geschlecht, IPSS-R sowie Mutationen in den Genen *ASXL1*, *ZRSR2*, *TET2*, *RUNX1*, *EZH2* und *STAG2* in die Analyse eingeschlossen. Die Analyse wurde sowohl für die Behandlung mit Alvocidib allein (**Tabelle 7**) als auch für die Behandlung mit der Kombination von Alvocidib und 5-Aza (**Tabelle 8**) durchgeführt. Mit einem relativen Risiko von 0,058 und einem 95%-Konfidenzintervall von [0,004;0,815] konnte das Vorhandensein einer Mutation im Gen *ASXL1* als unabhängiger Faktor für eine erhöhte Suszeptibilität der MDS-Proben auf die Behandlung mit Alvocidib und 5-Aza identifiziert werden ($p=0,035$).

Tabelle 7: Multivariable Analyse der gewählten Parameter für die Behandlung mit Alvocidib allein ⁷¹. Die Tabelle zeigt das relative Risiko, die Grenzen des 95%-Konfidenzintervalls sowie die Signifikanz mittels p-Wert.

Parameter	Relatives Risiko	95% KI (Untergrenze)	95% KI (Obergrenze)	p-Wert
Alter ≥ 70 vs. < 70	1.350	0.208	8.758	0.753
männlich vs. weiblich	0.476	0.054	4.168	0.503
IPSS-R <i>Very High</i> vs. <i>Intermediate/High</i>	0.211	0.022	1.998	0.175
ASXL1	0.261	0.041	1.678	0.157
TET2	0.169	0.016	1.813	0.142
RUNX1	0.200	0.022	1.807	0.152
EZH2	0.145	0.002	12.195	0.393
ZRSR2	0.784	0.037	16.648	0.875
STAG2	1.339	0.047	37.833	0.864

Tabelle 8: Multivariable Analyse der gewählten Parameter für die Behandlung mit Alvocidib und 5-Aza⁷¹.
 Die Tabelle zeigt das relative Risiko, die Grenzen des 95%-Konfidenzintervalls sowie die Signifikanz mittels p-Wert.

Parameter	Relatives Risiko	95% KI (Untergrenze)	95% KI (Obergrenze)	p-Wert
Alter ≥ 70 vs. < 70	2.617	0.352	19.425	0.347
männlich vs. weiblich	2.857	0.212	38.478	0.429
IPSS-R <i>Very High vs. Intermediate/High</i>	0.138	0.015	1.239	0.077
ASXL1	0.058	0.004	0.815	0.035
TET2	2.587	0.060	110.653	0.620
RUNX1	0.087	0.005	1.383	0.084
EZH2	1.974	0.007	543.378	0.812
ZRSR2	0.000	0.000	-	0.998
STAG2	6.377	0.110	370.146	0.371

4 DISKUSSION

MDS sind eine heterogene Gruppe maligner klonaler Erkrankungen der HSCs, die sich klinisch mit Zytopenien präsentieren und mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer sAML einhergehen¹. Als Standardtherapie steht die hypomethylierende Substanz 5-Aza zur Verfügung. Zusätzlich zu den epigenetischen Eigenschaften induziert 5-Aza die Transkription des proapoptotischen Proteins NOXA, wodurch das antiapoptotische Protein MCL-1 gehemmt wird. Die Therapie mit 5-Aza bewirkt nur in der Hälfte der Fälle überhaupt ein Ansprechen und versagt häufig sekundär^{19,20}. Aus diesem Grund ist es indiziert, zusätzliche oder alternative Behandlungsmethoden zu finden. In dieser Arbeit wurde die Wirkung des CDK-Inhibitors Alvocidib in Kombination mit 5-Aza auf Knochenmarkproben von *High-Risk*-MDS-Patienten untersucht. Die CDK9-Inhibition durch Alvocidib hemmt während der Transkription die DNA-Elongation durch Phosphorylierung der RNA-Polymerase II, wodurch die Transkription des antiapoptotischen Proteins MCL-1 herunterreguliert wird^{60,63}. Somit entfällt die Hemmung der proapoptotischen Proteine BAX/BAK durch MCL-1. Da Alvocidib und 5-Aza an zwei Punkten des MCL-1-Signalwegs angreifen, bietet dies eine logische Grundlage, um die beiden Substanzen zu kombinieren.

Zur Untersuchung der Wirksamkeit wurden Zellviabilitäts- und Apoptose-Assays an CD34+ Knochenmarkzellen von n=45 Patienten mit *High-Risk*-MDS und n=12 hämatologisch gesunden Proben durchgeführt. Die Substanzen Alvocidib und 5-Aza wurden sowohl einzeln als auch sequenziell in Kombination getestet. Dabei konnte für beide Substanzen eine positive Korrelation zwischen Dosis und Wirksamkeit bestätigt werden. In Kombination zeigten Alvocidib und 5-Aza sowohl im Zellviabilitäts- als auch im Apoptose-Assay eine additive Wirkung. Die synergistische Wirkung der beiden Substanzen in MOLM13-Zellen aus der Publikation von Kim et al.⁵⁸ konnte in dieser Arbeit jedoch nicht bestätigt werden. In der Arbeit von Kim et al. wurde jedoch als Messmethode ein Assay angewendet, bei dem als direkter Indikator für proapoptotische Aktivität die Aktivität der Effektorcaspasen Caspase 3 und Caspase 7 gemessen wird. Im Gegensatz hierzu wird in dem von uns verwendeten Zellviabilitäts-Assay die Zellviabilität nach der Behandlung gemessen. Eine direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist somit nicht gegeben. Im von uns zudem genutzten Apoptose-Assay wird zwar auch das Ausmaß der Apoptose gemessen, es gibt jedoch noch weitere Unterschiede zur

Arbeit von Kim et al. In der Publikation von Kim et al. wurden Zelllinien verwendet, wir nutzten im Gegensatz dazu aber primäres Patientenmaterial. Die Zellen aus den primären Proben sind individuell in ihrer genetischen Zusammensetzung, die Zelllinie in der Arbeit von Kim et al. wiederum entstammt aus einem Zellklon eines einzigen Patienten und die Zellen sind daher genetisch identisch. Zelllinien sind immortalisiert, sie sind stabiler und haben eine längere Lebensdauer als primäres Patientenmaterial. Im Unterschied zu Zelllinien repräsentieren die in dieser Arbeit verwendeten Patientenproben die Heterogenität und Realität der Patienten und ihrer Erkrankung. Dies ist ein Vorteil dieser Arbeit, da so eine bessere Übertragbarkeit auf die Klinik möglich ist und in weiteren Untersuchungen genauere Aussagen über das Therapieansprechen gemacht werden können.

Ein Ziel der Therapie von MDS-Patienten ist es, die durch die Erkrankung entstehenden Zytopenien zu verbessern und damit auch klinische Symptome zu lindern. Um zu untersuchen, ob die sequenzielle Behandlung mit Alvocidib und 5-Aza den Differenzierungsprozess der Hämatopoese *in vitro* beeinflusst, wurden mit n=5 Patientenproben, die im Zellviabilitäts-Assay suszeptibel waren, CFU-Assays durchgeführt. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse waren sehr heterogen. In lediglich einer Probe war der Anteil der Erythropoese nach der Kombinationsbehandlung signifikant höher als nach der Behandlung mit 5-Aza allein, die keinen Effekt auf die Erythropoese zeigte. Hier lässt sich als Ursache dieses Effektes die Gabe von Alvocidib vermuten, da auch die erythroiden Zellen nach der Behandlung mit Alvocidib allein stark erhöht waren. Erklärungsansätze hierfür existieren bisher nicht. Um Mechanismen und Signalwege für das Ansprechen der Erythropoese dieses Patienten auf die Behandlung mit Alvocidib zu finden, sind mehr Versuche notwendig, um weitere Responder zu finden. In einer weiteren Patientenprobe konnte ein deutlicher Effekt von 5-Aza allein auf die Erythropoese gezeigt werden. Dies bestätigt vorangegangene Arbeiten, in denen eine Steigerung der Erythropoese in Patienten nach Behandlung mit 5-Aza erzielt werden konnte ¹⁹. Unter Alvocidib schien die Erythropoese ebenfalls anzusteigen, jedoch war dies nicht signifikant. Auch spiegeln sich die Effekte nicht in einer additiven Wirkung der Substanzen wider, was aufgrund der Heterogenität der Erkrankung auch im Ansprechen auf Therapien durchaus plausibel ist. Bei der Untersuchung der myeloischen Zellpopulation zeigten sich in n=3 Patientenproben signifikante Effekte auf deren Ausreifung. In allen drei war die Myelopoese nach Behandlung

mit Alvocidib und 5-Aza geringer als ohne Behandlung. In zwei Proben war dieser Effekt auch signifikant stärker als nach Behandlung mit 5-Aza allein. Dies ist als positiv zu werten, da das Ziel einer Behandlung bei *High-Risk*-MDS auch die Reduktion der Krankheitslast im Sinne einer übermäßigen Produktion unreifer myeloischer Zellen darstellt. Alle n=5 im CFU-Assay untersuchten Proben waren im Zellviabilitäts-Assay suszeptibel gegenüber Alvocidib und 5-Aza, nicht alle zeigten jedoch Verbesserung der Hämatopoese im Sinne einer gesteigerten Erythropoese und/oder einer Verringerung der Myelopoese im CFU-Assay. Eine erhöhte Apoptoserate von CD34+ Zellen *in vitro* geht also nicht zwingend mit einer Verbesserung einer gesunden Hämatopoese *in vitro* einher. Es gilt, herauszufinden, bei welchen Patienten ein gemeinsamer Effekt auftritt und bei welchen nicht und ob dieser auf hochwachsende gesunde Hämatopoese zurückzuführen sind. Dies kann man mittels Zytologie und *Myeloid-Panel*-Sequenzierung untersuchen. Hierfür ist jedoch eine größere Patientenkohorte notwendig. Hierbei wäre es dann auch möglich, zu beurteilen, ob Zellen mit bestimmten Mutationen herausselektiert werden und eine klonale Evolution stattfindet.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, zu klären, warum die Zellen einiger Patienten suszeptibler oder resistenter als andere gegenüber der Behandlung mit Alvocidib allein oder in Kombination mit 5-Aza sind. Im Vergleich zu den gesunden Zellen zeigten die MDS-Zellen im Zellviabilitäts- und Apoptose-Assay ein signifikant besseres Ansprechen auf die Kombination von Alvocidib und 5-Aza. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Substanzen spezifisch auf die in MDS vorliegenden Pathomechanismen wirken, wie die genannte MCL-1-Überexpression in höheren MDS-Risikogruppen⁵³. Die Vermutung liegt nahe, dass auch die Heterogenität im Ansprechen auf Alvocidib und die Kombinationsbehandlung durch die Unterschiede in der MCL-1-Abhängigkeit der MDS-Proben erklärt werden könnte, also der Abhängigkeit der Apoptose von der Expression von MCL-1. Dies wurde in weiteren Experimenten unserer Arbeitsgruppe untersucht und veröffentlicht⁷¹. Zwischen der MCL-1-Abhängigkeit und der Zellviabilität nach der Behandlung mit Alvocidib und der Kombinationstherapie ließ sich eine negative Korrelation ermitteln, was darauf hindeutet, dass MCL-1-abhängige Proben tatsächlich empfindlicher auf die Behandlung mit Alvocidib und der Kombination mit 5-Aza reagierten. Dieser Zusammenhang war bei der Kombinationsbehandlung ausgeprägter, erreichte aber keine Signifikanz. Die MCL-1-Abhängigkeit spiegelt die Empfindlichkeit von *High-Risk*-MDS-Proben gegenüber der Behandlung mit Alvocidib und

Alvocidib und 5-Aza also nicht vollständig wider. In einer klinischen Phase-2-Studie, in der Alvocidib in Kombination mit den Chemotherapeutika Cytarabin und Mitoxantron in refraktärer AML/AML-Rezidiven untersucht wurde, konnten jedoch die höchsten Remissionsraten in den Patienten gefunden werden, die die stärkste MCL-1-Abhängigkeit zeigten ⁷². Es konnte aber kein Zusammenhang zwischen kompletter Remission und zunehmender MCL-1-Abhängigkeit beobachtet werden, was vermutlich auf die kleine Patientenkohorte zurückzuführen ist ⁷³. Nach aktuellem Kenntnisstand und trotz der Tatsache, dass Alvocidib ein unspezifischer Inhibitor von CDKs ist, ist MCL-1 derzeit der einzige potenzielle Biomarker für das Ansprechen auf Alvocidib. Daher ist die Suche nach weiteren Biomarkern nötig, deren Auftreten mit einem höheren Ansprechen auf Alvocidib oder Alvocidib und 5-Aza assoziiert sind. Um dies zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit als Parameter zunächst klinische Informationen herangezogen. Hierfür wurden Patientendaten retrospektiv analysiert und in Korrelation zur Suszeptibilität im Zellviabilitäts-Assay gesetzt. Analysiert wurden Geschlecht, Alter, IPSS-R, KM-Blasten zum Zeitpunkt der Punktion in Prozent, Hämoglobin zum Zeitpunkt der Knochenmarkpunktion, stattgehabte Therapien und der Karyotyp. Zudem wurde auch das mittlere Überleben der Patienten ab Zeitpunkt der Punktion mit einer über- oder unterdurchschnittlichen Zellviabilität im Zellviabilitäts-Assay in Zusammenhang gesetzt. Keiner der untersuchten Parameter zeigte einen signifikanten Zusammenhang zwischen der *in vitro*-Suszeptibilität auf die Behandlung mit Alvocidib oder der Kombination Alvocidib und 5-Aza mit deren Auftreten oder der Stärke. Ein klinischer Biomarker, der potenziell Patienten identifizieren könnte, die von einer Behandlung mit Alvocidib oder der Kombination von Alvocidib und 5-Aza profitieren könnten, konnte in den *in vitro*-Experimenten somit nicht identifiziert werden.

Um weitere potenzielle Biomarker zu identifizieren, wurde der Mutationsstatus der Patientenproben bestimmt. Mittels einer Myeloid-Panel-Sequenzierung wurde in Knochenmark-MNCs nach den am häufigsten mutierten Genen in malignen hämatologischen Neoplasien (n=67) gesucht. 98% der Proben wiesen einzelne oder mehrere somatische Mutationen auf. Durch die Korrelation der Mutationsprofile der analysierten Patientenproben mit der nach Behandlung bestimmten Zellviabilität konnte in einer multivariablen Analyse gezeigt werden, dass ASXL1-Mutationen ein unabhängiger Prädiktor für eine erhöhte zytotoxische Aktivität der Medikamentenkombination sind.

ASXL1 (*additional sex combs-like 1*) ist eines der am häufigsten in malignen hämatopoetischen Neoplasien mutierten Gene. Als Chromatin-Modifizierer spielt sein Genprodukt eine wichtige Rolle in der epigenetischen Kontrolle der Genexpression und interagiert mit vielen verschiedenen genexpressionsregulierenden Proteinen ⁷⁴. Es konnte unter anderem gezeigt werden, dass ASXL1 mit dem RNA-Polymerase II-Komplex interagiert. Mutationen in ASXL1 aktivieren den P-TEFb (CDK9/cyclin T1-Komplex), welcher die RNA-Polymerase II stimuliert. Alvocidib unterdrückt über die CDK9-Inhibition die Aktivität der RNA-Polymerase II ⁷⁵. Es gibt zudem auch Berichte darüber, dass ein ASXL1-Verlust in gesunden HSCs Apoptose auslöst ⁷⁶. Dies bietet eine plausible Erklärung dafür, dass die ASXL1-Mutation im MDS einen pathomechanistisch relevanten Angriffspunkt für Alvocidib bietet, wodurch die Wahrscheinlichkeit steigt, dass Apoptose induziert wird. Es stellt sich die Frage, ob das Vorhandensein einer ASXL1-Mutation auch mit messbaren molekularen Veränderungen in der Zelle einhergeht, die durch die gesteigerte Aktivität der RNA-Polymerase II entstehen und die die erhöhte Wirksamkeit von Alvocidib erklären könnten.

Weitere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen jedoch keine erhöhte MCL-1-Expression, sondern eine signifikant erhöhte mRNA-Expression des proapoptotischen Proteins NOXA in MDS-HSCs mit ASXL1-Mutation ⁷¹. Da NOXA als hochselektiver Antagonist von MCL-1 dessen Stabilität und Halbwertszeit senkt ⁷⁷, könnte NOXAs Überexpression die hemmende Wirkung von Alvocidib auf die MCL-1-Expression in ASXL1-mutierten MDS-Zellen potenzieren. Dies entspricht dem vermuteten Wirkmechanismus, nach welchem 5-Aza als Induktor von NOXA in Kombination mit Alvocidib eine erhöhte Apoptose induziert.

Dies steht im Gegensatz zu vorherigen Arbeiten, laut deren Ergebnisse die Abwesenheit von NOXA keinen statistischen Einfluss auf die Apoptoserate in MDS hat. In diesen Arbeiten wurde auch gezeigt, dass eine Überexpression des antiapoptotischen Proteins BCL-2 Apoptose in MDS-Maus-Modellen inhibiert, Zytopenien verbessert und einen Progress in eine sAML verzögert ^{78, 79}. Es wurde zudem gezeigt, dass Alvocidib die Expression von BCL-2 in leukämischen Blasten von Patienten mit refraktärer Leukämie induziert ⁸⁰. Dies scheint zwar dem zuvor beschriebenen vermuteten Wirkmechanismus über NOXA zu widersprechen, angesichts der Ergebnisse aus Slape et al. und Guirguis et al. ^{78, 79} könnte dies jedoch eine weitere Erklärung für die Wirksamkeit von Alvocidib darstellen.

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten beruhen ausschließlich auf *in vitro*-Experimenten. Auch wenn sich hieraus Indizien und Hinweise auf Mechanismen und Wirksamkeiten ergeben haben, können diese nicht die Realität des komplexen Zusammenspiels eines gesamten Organismus *in vivo* abbilden. Eine direkte Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen ist daher nicht möglich. Ein Versuch der Validierung der Ergebnisse kann mittels Tierversuche in MDS-Xenograft-Modellen erfolgen. In Zusammenarbeit mit einer weiteren Arbeitsgruppe haben wir einen ähnlichen Ansatz verfolgt und transgene ASXL1^{Y588X}-Mäuse mit den Substanzen Alvocidib und 5-Aza behandelt. Im Rahmen dieser Studie konnte eine erhöhte Wirksamkeit von Alvocidib und der Kombination von Alvocidib und 5-Aza und, im Zuge dessen, die spezifische Eliminierung von ASXL1-mutierten Zellen im Knochenmark bestätigt werden ⁷¹.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die vorliegenden Ergebnisse eine Grundlage für die klinische Erprobung der Kombination von Alvocidib und 5-Aza in Patienten mit MDS aus höheren IPSS-R-Risikogruppen bieten. Hierbei sollte ein besonderes Augenmerk auf ASXL1-Mutationen als potenzieller Biomarker für susceptible Patienten gelegt und dieser Ansatz weiter evaluiert werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Myelodysplastische Neoplasien (MDS) sind eine Gruppe maligner Erkrankungen der Hämatopoese. Das prognostisch ungünstige *High-Risk*-MDS geht mit einer verminderten Apoptoserate und einer erhöhten Wahrscheinlichkeit, eine akute myeloische Leukämie zu entwickeln, einher. Zur Behandlung ist die Substanz 5-Azacitidin etabliert, welche jedoch häufig primär oder sekundär versagt. Frühere Arbeiten legen nahe, dass der CDK9-Inhibitor Alvocidib und 5-Azacitidin aufgrund gemeinsamer Angriffspunkte in der Apoptoseregulation eine synergistische Wirkung zeigen. Ziel dieser Arbeit war es, die Kombination der beiden Substanzen Alvocidib und 5-Azacitidin an CD34+ hämatopoetischen Stammzellen von *High-Risk*-MDS-Patienten und gesunden Personen zu testen und zu ermitteln, ob eine synergistische Wirkung vorliegt und ob es Biomarker gibt, die mit einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber den Substanzen korrelieren. CD34+ Zellen aus kryokonservierten Knochenmark-Proben von n=45 MDS-Patienten sowie n=12 gesunden Spendern wurden kultiviert und mit den Substanzen Alvocidib und 5-Azacitidin sowohl einzeln als auch in Kombination behandelt. Anschließend wurde die Zellviabilität mittels des „*Luminescent Cell Viability Assay*“ und die Anzahl der apoptotischen Zellen durchflusszytometrisch gemessen und das Verhältnis zur unbehandelten Kontrollgruppe ermittelt. Mittels *Myeloid-Panel*-Sequenzierung wurde der Mutationsstatus der Patienten erhoben und in Relation zur Zellviabilität nach Behandlung gesetzt. In der MDS-Kohorte zeigten sich eine signifikant geringere Zellviabilität und eine höhere Apoptoserate nach der Kombinationsbehandlung im Vergleich zur Behandlung mit den einzelnen Substanzen. Die Zellviabilität war in der Gruppe mit der höchsten Dosierung im Mittel am niedrigsten und der Anteil der apoptotischen Zellen im Apoptose-Assay am höchsten. Alvocidib und 5-Azacitidin zeigten eine additive Wirkung auf die Zellen. Im Vergleich zur gesunden Kohorte war die Zellviabilität in der MDS-Kohorte signifikant geringer und die Apoptoserate signifikant höher. In einer multivariablen Analyse wurde das Vorliegen von ASXL1-Mutationen als unabhängiger Faktor für eine erhöhte Sensitivität der MDS-Proben gegenüber der Behandlung mit 5-Azacitidin und Alvocidib identifiziert. Die ASXL1-Mutation bietet mit der Inhibition von Apoptose über einen gemeinsamen Signalweg mit Alvocidib einen für die Substanz pathomechanistisch relevanten Angriffspunkt. Die vorliegenden Ergebnisse liefern eine Grundlage für die weitere klinische Erprobung der Kombination von Alvocidib und 5-Azacitidin in Patienten mit *High-Risk*-MDS und der Hinzunahme des ASXL1-Mutationsstatus als Stratifikationsmarker.

6 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Therapieschema Low-Risk-MDS	9
Abbildung 2: Therapieschema High-Risk-MDS	11
Abbildung 3: Angriffsstellen von Alvocidib und 5-Azacidin in der Apoptoseregulation	17
Abbildung 4: Strukturformel von Alvocidib	18
Abbildung 5: Reaktionsmechanismus des Zellviabilitäts-Assays.....	25
Abbildung 6: Beispiel einer durchflusszytometrischen Analyse im Apoptose-Assay..	29
Abbildung 7: Versuchsaufbau Zellviabilitäts-Assay und Apoptose-Assay	30
Abbildung 8: Zellviabilität in n=45 MDS-Patientenproben nach Behandlung mit 5-Aza, Alvocidib und 5-Aza+Alvocidib.....	37
Abbildung 9: Zellviabilitäts-Assay in n=12 Proben gesunder Spender.....	39
Abbildung 10: Vergleich der Ergebnisse des Zellviabilitäts-Assays zwischen gesunden Zellen und MDS-Proben.	40
Abbildung 11: Apoptotische Zellen im Apoptose-Assay in MDS-Zellen (n=24)	42
Abbildung 12: Apoptotische und tote Zellen im Apoptose Assay in MDS-Zellen	44
Abbildung 13: Vergleich des Apoptose-Assays zwischen gesunden Zellen und MDS- Proben	45
Abbildung 14: Erythroide Zellen nach CFU-Assay.....	48
Abbildung 15: Myeloische Zellen nach CFU-Assay	49
Abbildung 16: Zusammenhang zwischen klinischen Parametern und Zellviabilität ..	54
Abbildung 17: Zusammenhang zwischen Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten und Suszeptibilität der Zellen auf die Behandlung.....	55
Abbildung 18: Ergebnisse des Myeloid-Panel-Sequencing.	56
Abbildung 19: Mutationsprofile von Respondern und Non-Respondern (Alvocidib) .	57
Abbildung 20: Mutationsprofile von Respondern und Non-Respondern (Kombination)	57
Abbildung 21: Zusammenhang von Zellviabilität nach Alvocidib (IC30) und Mutationsstatus	58
Abbildung 22: Zusammenhang von Zellviabilität nach Alvocidib+5-Aza (IC30) und Mutationsstatus.	59
Abbildung 23: Zusammenhang der Zellviabilität nach 5-Aza und Mutationsstatus ...	59

7 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Zytomorphologische Kennzeichen von Dysplasie.....	5
Tabelle 2: WHO 2016 Klassifikation der MDS	6
Tabelle 3: IPSS-R.....	7
Tabelle 4: Charakteristika der für die CFU-Assays ausgewählten Patientenproben. 31	
Tabelle 5: Ermittelte inhibitorische Konzentrationen für 5-Aza und Alvocidib	36
Tabelle 6: Klinische Parameter von n=45 Patientenproben.....	50
Tabelle 7: Multivariable Analyse der gewählten Parameter für die Behandlung mit Alvocidib allein.....	60
Tabelle 8: Multivariable Analyse der gewählten Parameter für die Behandlung mit Alvocidib und 5-Aza.....	61

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Cazzola M: Myelodysplastic Syndromes. *New England Journal of Medicine*, 383: 1358-1374, 2020 10.1056/NEJMra1904794
2. Neukirchen J, Schoonen WM, Strupp C, Gattermann N, Aul C, Haas R, et al.: Incidence and prevalence of myelodysplastic syndromes: data from the Düsseldorf MDS-registry. *Leuk Res*, 35: 1591-1596, 2011 10.1016/j.leukres.2011.06.001
3. Sekeres MA, Taylor J: Diagnosis and Treatment of Myelodysplastic Syndromes: A Review. *Jama*, 328: 872-880, 2022 10.1001/jama.2022.14578
4. Hofmann WK, Platzbecker U, Götze K, Haase D, Thol F, Stauder R, et al.: Leitlinie: Myelodysplastische Neoplasien (Myelodysplastische Syndrome, MDS), Available at: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/myelodysplastische-neoplasien-myelodysplastische-syndrome-mds/@@guideline/html/index.html>. Accessed 13. April 2023
5. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, et al.: Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*, 120: 2454-2465, 2012 10.1182/blood-2012-03-420489
6. 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*, 11: 656-659, 1997 10.1038/sj.leu.2400640
7. Parker JE, Fishlock KL, Mijovic A, Czepulkowski B, Pagliuca A, Mufti GJ: 'Low-risk' myelodysplastic syndrome is associated with excessive apoptosis and an increased ratio of pro- versus anti-apoptotic bcl-2-related proteins. *Br J Haematol*, 103: 1075-1082, 1998 10.1046/j.1365-2141.1998.01114.x
8. Stauder R, Valent P, Theurl I: Anemia at older age: etiologies, clinical implications, and management. *Blood*, 131: 505-514, 2018 10.1182/blood-2017-07-746446
9. Thol F, Heuser M, Ganser A: Myelodysplastische Syndrome. *Der Internist*, 56: 364-373, 2015 10.1007/s00108-014-3598-3
10. Metzgeroth G, Fabarius A, Jann J-C, Hastka J, Neuendorff NR, Krämer A, et al.: 2. Diagnose und WHO-Klassifikation myeloischer Neoplasien. In: *Myeloische Neoplasien*. edited by Wolf-Karsten H, Carsten M-T, Berlin, Boston, De Gruyter, 2020, pp 43-130
11. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, et al.: The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*, 36: 1703-1719, 2022 10.1038/s41375-022-01613-1
12. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al.: The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127: 2391-2405, 2016 10.1182/blood-2016-03-643544
13. Bernard E, Tuechler H, Greenberg PL, Hasserjian RP, Arango Ossa JE, Nannya Y, et al.: Molecular International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. *NEJM Evidence*, 1, 2022 10.1056/EVIDoa2200008
14. Malcovati L, Hellström-Lindberg E, Bowen D, Adès L, Cermak J, del Cañizo C, et al.: Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet. *Blood*, 122: 2943-2964, 2013 10.1182/blood-2013-03-492884
15. List AF, Baer MR, Steensma DP, Raza A, Esposito J, Martinez-Lopez N, et al.: Deferasirox reduces serum ferritin and labile plasma iron in RBC transfusion-dependent patients with myelodysplastic syndrome. *J Clin Oncol*, 30: 2134-2139, 2012 10.1200/JCO.2010.34.1222
16. Nolte F, Hochsmann B, Giagounidis A, Lubbert M, Platzbecker U, Haase D, et al.: Results from a 1-year, open-label, single arm, multi-center trial evaluating the efficacy and safety of oral Deferasirox in patients diagnosed with low and int-1 risk myelodysplastic syndrome (MDS) and transfusion-dependent iron overload. *Ann Hematol*, 92: 191-198, 2013 10.1007/s00277-012-1594-z

17. Wermke M, Eckoldt J, Gotze KS, Klein SA, Bug G, de Wreede LC, et al.: Enhanced labile plasma iron and outcome in acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndrome after allogeneic haemopoietic cell transplantation (ALLIVE): a prospective, multicentre, observational trial. *Lancet Haematol*, 5: e201-e210, 2018 10.1016/S2352-3026(18)30036-X
18. Stresemann C, Brueckner B, Musch T, Stopper H, Lyko F: Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines. *Cancer Res*, 66: 2794-2800, 2006 10.1158/0008-5472.Can-05-2821
19. Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Finelli C, Giagounidis A, et al.: Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol*, 10: 223-232, 2009 10.1016/S1470-2045(09)70003-8
20. Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, Kornblith AB, Holland JC, Odchimar-Reissig R, et al.: Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol*, 20: 2429-2440, 2002 10.1200/jco.2002.04.117
21. Lubbert M, Suci S, Baila L, Ruter BH, Platzbecker U, Giagounidis A, et al.: Low-dose decitabine versus best supportive care in elderly patients with intermediate- or high-risk myelodysplastic syndrome (MDS) ineligible for intensive chemotherapy: final results of the randomized phase III study of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Leukemia Group and the German MDS Study Group. *J Clin Oncol*, 29: 1987-1996, 2011 10.1200/JCO.2010.30.9245
22. DiNardo CD, Rausch CR, Benton C, Kadia T, Jain N, Pemmaraju N, et al.: Clinical experience with the BCL2-inhibitor venetoclax in combination therapy for relapsed and refractory acute myeloid leukemia and related myeloid malignancies. *Am J Hematol*, 93: 401-407, 2018 10.1002/ajh.25000
23. Alberts B: *Molecular biology of the cell*, Sixth edition. Ed., New York, NY, Garland Science, Taylor and Francis Group, 2015
24. Shapiro GI: Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. *J Clin Oncol*, 24: 1770-1783, 2006 10.1200/jco.2005.03.7689
25. Sridhar J, Akula N, Pattabiraman N: Selectivity and potency of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Aaps j*, 8: E204-221, 2006 10.1208/aapsj080125
26. Price DH: P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol*, 20: 2629-2634, 2000 10.1128/mcb.20.8.2629-2634.2000
27. Lam LT, Pickeral OK, Peng AC, Rosenwald A, Hurt EM, Giltane JM, et al.: Genomic-scale measurement of mRNA turnover and the mechanisms of action of the anti-cancer drug flavopiridol. *Genome Biol*, 2: Research0041, 2001 10.1186/gb-2001-2-10-research0041
28. De Falco G, Giordano A: CDK9: from basal transcription to cancer and AIDS. *Cancer Biol Ther*, 1: 342-347, 2002
29. Franco LC, Morales F, Boffo S, Giordano A: CDK9: A key player in cancer and other diseases. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119: 1273-1284, 2018 <https://doi.org/10.1002/jcb.26293>
30. Lockshin RA, Zakeri Z: Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol*, 36: 2405-2419, 2004 10.1016/j.biocel.2004.04.011
31. Sica A, Wang JM, Colotta F, Dejana E, Mantovani A, Oppenheim JJ, et al.: Monocyte chemotactic and activating factor gene expression induced in endothelial cells by IL-1 and tumor necrosis factor. *J Immunol*, 144: 3034-3038, 1990
32. Oppenheim RW, Flavell RA, Vinsant S, Prevette D, Kuan CY, Rakic P: Programmed cell death of developing mammalian neurons after genetic deletion of caspases. *J Neurosci*, 21: 4752-4760, 2001 10.1523/jneurosci.21-13-04752.2001
33. Elliott MR, Ravichandran KS: Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease. *J Cell Biol*, 189: 1059-1070, 2010 10.1083/jcb.201004096
34. Igney FH, Krammer PH: Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*, 2: 277-288, 2002 10.1038/nrc776

35. Dickson DW: Apoptotic mechanisms in Alzheimer neurofibrillary degeneration: cause or effect? *J Clin Invest*, 114: 23-27, 2004 10.1172/jci22317
36. Cavalcante GC, Schaap AP, Cabral GF, Santana-da-Silva MN, Pinto P, Vidal AF, et al.: A Cell's Fate: An Overview of the Molecular Biology and Genetics of Apoptosis. *Int J Mol Sci*, 20, 2019 10.3390/ijms20174133
37. Voskoboinik I, Whisstock JC, Trapani JA: Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat Rev Immunol*, 15: 388-400, 2015 10.1038/nri3839
38. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM: Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science*, 226: 1097-1099, 1984 10.1126/science.6093263
39. Tsujimoto Y: Stress-resistance conferred by high level of bcl-2 alpha protein in human B lymphoblastoid cell. *Oncogene*, 4: 1331-1336, 1989
40. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM: Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science*, 228: 1440-1443, 1985 10.1126/science.3874430
41. Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ: BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature*, 369: 321-323, 1994 10.1038/369321a0
42. Petros AM, Medek A, Nettlesheim DG, Kim DH, Yoon HS, Swift K, et al.: Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 3012-3017, 2001 10.1073/pnas.041619798
43. Warren CFA, Wong-Brown MW, Bowden NA: BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. *Cell Death Dis*, 10: 177, 2019 10.1038/s41419-019-1407-6
44. Certo M, Del Gaizo Moore V, Nishino M, Wei G, Korsmeyer S, Armstrong SA, et al.: Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell*, 9: 351-365, 2006 10.1016/j.ccr.2006.03.027
45. van Delft MF, Huang DC: How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis. *Cell Res*, 16: 203-213, 2006 10.1038/sj.cr.7310028
46. Westphal D, Kluck RM, Dewson G: Building blocks of the apoptotic pore: how Bax and Bak are activated and oligomerize during apoptosis. *Cell Death Differ*, 21: 196-205, 2014 10.1038/cdd.2013.139
47. Wang X: The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, 15: 2922-2933, 2001
48. Newmeyer DD, Ferguson-Miller S: Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell*, 112: 481-490, 2003 10.1016/s0092-8674(03)00116-8
49. Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW: Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell*, 9: 423-432, 2002 10.1016/s1097-2765(02)00442-2
50. Cain K, Bratton SB, Cohen GM: The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie*, 84: 203-214, 2002 10.1016/s0300-9084(02)01376-7
51. 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. *Leuk Lymphoma*, 42: 481-489, 2001 10.3109/10428190109064605
52. Opferman JT, Iwasaki H, Ong CC, Suh H, Mizuno S, Akashi K, et al.: Obligate role of anti-apoptotic MCL-1 in the survival of hematopoietic stem cells. *Science*, 307: 1101-1104, 2005 10.1126/science.1106114
53. Economopoulou C, Pappa V, Papageorgiou S, Kotsioti F, Economopoulou P, Charitidou E, et al.: Cell cycle and apoptosis regulatory gene expression in the bone marrow of patients with de novo myelodysplastic syndromes (MDS). *Ann Hematol*, 89: 349-358, 2010 10.1007/s00277-009-0835-2
54. Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JL, Hinds MG, et al.: Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell*, 17: 393-403, 2005 10.1016/j.molcel.2004.12.030
55. Czabotar PE, Lee EF, van Delft MF, Day CL, Smith BJ, Huang DC, et al.: Structural insights into the degradation of Mcl-1 induced by BH3 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 6217-6222, 2007 10.1073/pnas.0701297104

56. Jilg S, Reidel V, Muller-Thomas C, Konig J, Schauwecker J, Hockendorf U, et al.: Blockade of BCL-2 proteins efficiently induces apoptosis in progenitor cells of high-risk myelodysplastic syndromes patients. *Leukemia*, 30: 112-123, 2016 10.1038/leu.2015.179
57. Jin S, Cojocari D, Purkal JJ, Popovic R, Talaty NN, Xiao Y, et al.: 5-Azacytidine Induces NOXA to Prime AML Cells for Venetoclax-Mediated Apoptosis. *Clin Cancer Res*, 26: 3371-3383, 2020 10.1158/1078-0432.CCR-19-1900
58. Kim W, Whatcott C, Siddiqui-Jain A, Anthony S, Bearss DJ, Warner SL: The CDK9 Inhibitor, Alvocidib, Potentiates the Non-Clinical Activity of Azacytidine or Decitabine in an MCL-1-Dependent Fashion, Supporting Clinical Exploration of a Decitabine and Alvocidib Combination. *Blood*, 132: 4355-4355, 2018 10.1182/blood-2018-99-119793
59. Yin T, Lallena MJ, Kreklau EL, Fales KR, Carballares S, Torrrres R, et al.: A novel CDK9 inhibitor shows potent antitumor efficacy in preclinical hematologic tumor models. *Mol Cancer Ther*, 13: 1442-1456, 2014 10.1158/1535-7163.Mct-13-0849
60. Boffo S, Damato A, Alfano L, Giordano A: CDK9 inhibitors in acute myeloid leukemia. *J Exp Clin Cancer Res*, 37: 36, 2018 10.1186/s13046-018-0704-8
61. Yeh YY, Chen R, Hessler J, Mahoney E, Lehman AM, Heerema NA, et al.: Up-regulation of CDK9 kinase activity and Mcl-1 stability contributes to the acquired resistance to cyclin-dependent kinase inhibitors in leukemia. *Oncotarget*, 6: 2667-2679, 2015 10.18632/oncotarget.2096
62. Chemicals S: Flavopiridol (L86-8275) Produktinformationen, Available at: <https://www.selleckchem.com/products/Flavopiridol.html>. Accessed 04. März 2023
63. Chen R, Keating MJ, Gandhi V, Plunkett W: Transcription inhibition by flavopiridol: mechanism of chronic lymphocytic leukemia cell death. *Blood*, 106: 2513-2519, 2005 10.1182/blood-2005-04-1678
64. Mei M, Aldoss I, Marcucci G, Pullarkat V: Hypomethylating agents in combination with venetoclax for acute myeloid leukemia: Update on clinical trial data and practical considerations for use. *Am J Hematol*, 94: 358-362, 2019 10.1002/ajh.25369
65. Fischer M, Song Y, Gbyli R, Arrate M, Villaume M, Childress M, et al.: MCL1 dependence across MDS subtypes and dual inhibition of MCL1 and BCL2 in MISTRG6 mice. bioRxiv, 2020 10.1101/2020.06.05.133090
66. Arai S, Varkaris A, Nouri M, Chen S, Xie L, Balk SP: MARCH5 mediates NOXA-dependent MCL1 degradation driven by kinase inhibitors and integrated stress response activation. *Elife*, 9, 2020 10.7554/eLife.54954
67. Chiou JT, Huang NC, Huang CH, Wang LJ, Lee YC, Shi YJ, et al.: NOXA-mediated degradation of MCL1 and BCL2L1 causes apoptosis of daunorubicin-treated human acute myeloid leukemia cells. *J Cell Physiol*, 236: 7356-7375, 2021 10.1002/jcp.30407
68. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH: Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, 84: 1415-1420, 1994
69. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM: Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol*, 148: 2207-2216, 1992
70. Thakur S, Cattoni DI, Nollmann M: The fluorescence properties and binding mechanism of SYTOX green, a bright, low photo-damage DNA intercalating agent. *Eur Biophys J*, 44: 337-348, 2015 10.1007/s00249-015-1027-8
71. Riabov V, Xu Q, Schmitt N, Streuer A, Ge G, Bolanos L, et al.: ASXL1 mutations are associated with a response to alvocidib and 5-azacytidine combination in myelodysplastic neoplasms. *Haematologica*, 2023 10.3324/haematol.2023.282921
72. Zeidner JF, Lin TL, Vigil CE, Fine G, Yair Levy M, Nazha A, et al.: A prospective biomarker analysis of alvocidib followed by cytarabine and mitoxantrone in MCL-1-dependent relapsed/refractory acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J*, 11: 175, 2021 10.1038/s41408-021-00568-3
73. Zeidner JF, Lee DJ, Frattini M, Fine GD, Costas J, Kolibaba K, et al.: Phase I Study of Alvocidib Followed by 7+3 (Cytarabine + Daunorubicin) in Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res*, 27: 60-69, 2021 10.1158/1078-0432.Ccr-20-2649

74. Asada S, Fujino T, Goyama S, Kitamura T: The role of ASXL1 in hematopoiesis and myeloid malignancies. *Cell Mol Life Sci*, 76: 2511-2523, 2019 10.1007/s00018-019-03084-7
75. Yang H, Kurtenbach S, Guo Y, Lohse I, Durante MA, Li J, et al.: Gain of function of ASXL1 truncating protein in the pathogenesis of myeloid malignancies. *Blood*, 131: 328-341, 2018 10.1182/blood-2017-06-789669
76. Hilgendorf S, Folkerts H, Schuringa JJ, Vellenga E: Loss of ASXL1 triggers an apoptotic response in human hematopoietic stem and progenitor cells. *Exp Hematol*, 44: 1188-1196.e1186, 2016 10.1016/j.exphem.2016.08.011
77. Guikema JE, Amiot M, Eldering E: Exploiting the pro-apoptotic function of NOXA as a therapeutic modality in cancer. *Expert Opin Ther Targets*, 21: 767-779, 2017 10.1080/14728222.2017.1349754
78. Slape CI, Saw J, Jowett JB, Aplan PD, Strasser A, Jane SM, et al.: Inhibition of apoptosis by BCL2 prevents leukemic transformation of a murine myelodysplastic syndrome. *Blood*, 120: 2475-2483, 2012 10.1182/blood-2012-05-430736
79. Guirguis AA, Slape CI, Failla LM, Saw J, Tremblay CS, Powell DR, et al.: PUMA promotes apoptosis of hematopoietic progenitors driving leukemic progression in a mouse model of myelodysplasia. *Cell Death Differ*, 23: 1049-1059, 2016 10.1038/cdd.2015.159
80. Nelson DM, Joseph B, Hillion J, Segal J, Karp JE, Resar LM: Flavopiridol induces BCL-2 expression and represses oncogenic transcription factors in leukemic blasts from adults with refractory acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*, 52: 1999-2006, 2011 10.3109/10428194.2011.591012

9 TABELLARISCHER ANHANG

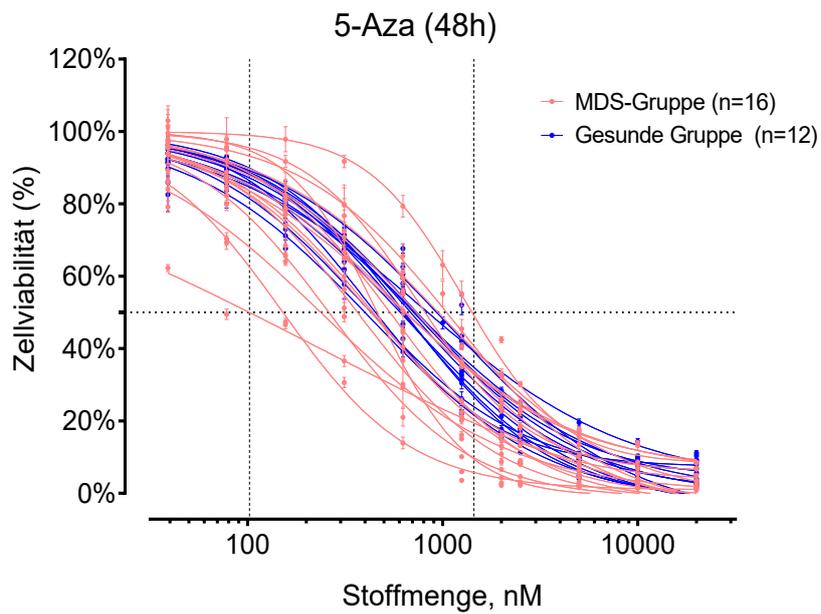


Abbildung S1: Dosis-Wirkungs-Kurve von 5-Aza, ermittelt mittels n=16 Patientenproben und n=12 gesunden Proben ⁷¹.

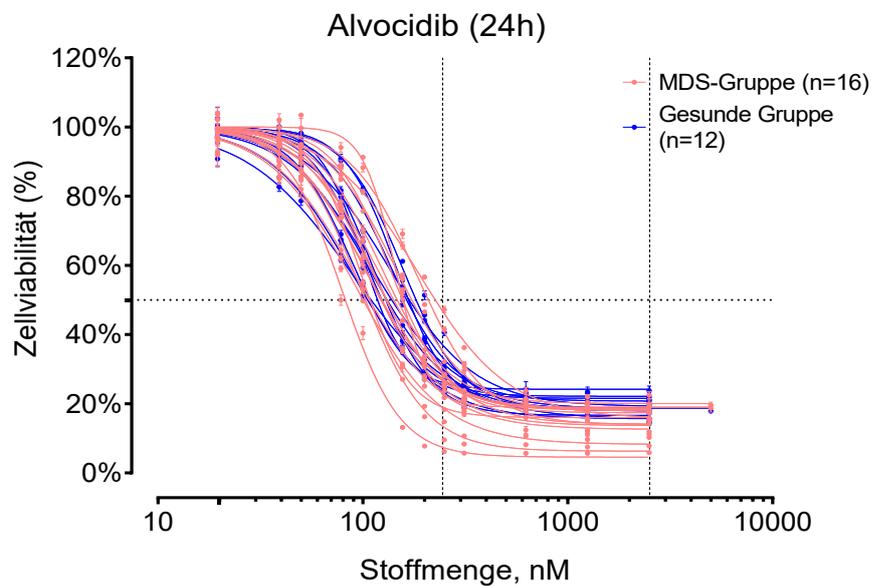


Abbildung S2: Dosis-Wirkungs-Kurve von Alvocidib, ermittelt mittels n=16 Patientenproben und n=12 gesunden Proben ⁷¹.

Patient	Alter (Jahre)	Ge-schlecht	Subtyp (WHO 2016)	IPSS-R	Mutationen
P01	55	m	MDS-EB2	<i>high</i>	NF1, PTPN11, TP53
P02	71	m	MDS-EB2	<i>high</i>	ZRSR2, KMT2D, TET2, PHF6
P03	79	m	MDS-EB1	<i>high</i>	ASXL1, TET2, RUNX1, STAG2, EZH2
P04	70	m	MDS-MLD	<i>high</i>	ASXL1, TET2, RUNX1, STAG2, ZRSR2, EZH2, DHX29, NRAS, PTPN11
P05	59	m	MDS-EB1	<i>high</i>	SF3B1, FLT3-ITD
P06	82	m	MDS-EB2	<i>very high</i>	TP53, ZBTB7A
P07	64	m	MDS-EB2	<i>high</i>	ASXL1, SRSF2, SETBP1, ETV6, NRAS
P08	80	m	MDS-EB2	<i>very high</i>	TP53
P09	72	m	MDS-EB2	<i>very high</i>	ASXL1, DNMT3A, U2AF1, IDH2
P10	83	m	MDS-MLD	<i>high</i>	TP53
P11	84	m	MDS-EB2	<i>very high</i>	TET2, RUNX1, EZH2, CUX1, ZBTB7A
P12	76	m	MDS-EB2	<i>very high</i>	Keine Mutationen
P13	86	w	MDS/MPN unclassifiable	<i>high</i>	SRSF2, CEBPA, CDH23, ASXL2
P14	73	m	MDS-MLD	<i>very high</i>	KMT2D, TP53
P15	69	m	MDS-EB2	<i>intermediate</i>	CUX1, DDX41
P16	77	m	MDS-EB1	<i>very high</i>	ASXL1, SRSF2, STAG2
P17	62	m	MDS-EB2	<i>very high</i>	DNMT3A
P18	44	w	MDS-EB1	<i>high</i>	RUNX1, SF3B1, PTPN11
P19	63	m	MDS-EB1	<i>high</i>	RUNX1, SRSF2, CREBBP, IDH1, IDH2
P20	64	w	MDS-EB2	<i>very high</i>	TP53, DNMT3A
P21	74	m	MDS-EB2	<i>high</i>	TET2, BCOR, CDH23, U2AF1, BCORL1
P22	73	m	AML-MRC	<i>n.a.</i>	SF3B1, RUNX1
P23	82	w	MDS-MLD	<i>high</i>	TP53, DHX29
P24	89	m	MDS-EB1	<i>high</i>	RUNX1, SF3B1, PHF6
P25	72	m	MDS-EB2	<i>high</i>	ZRSR2, DDX41, EZH2

P26	73	m	MDS-EB1	<i>high</i>	TET2, SF3B1
P27	59	m	MDS-EB1	<i>very high</i>	TP53, CREBBP, DHX29
P28	56	m	MDS-EB2	<i>high</i>	ASXL1, STAG2, ZRSR2, NF1, EZH2
P29	72	m	MDS-EB1	<i>high</i>	ASXL1, TET2, RUNX1, STAG2, EZH2, ZRSR2
P30	69	w	MDS/MPN unklassifizierbar	<i>intermediate</i>	ASXL1, TET2, SRSF2, SETBP1, CREBBP, EP300, CBL
P31	80	w	MDS-EB2	<i>high</i>	TET2
P32	76	m	MDS-EB2	<i>very high</i>	ASXL1, RUNX1, SRSF2, STAG2
P33	74	w	MDS-EB2	<i>very high</i>	ASXL1, ZRSR2, JAK2
P34	75	m	MDS-MLD	<i>high</i>	TET2
P35	43	m	MDS/MPNu	<i>high</i>	ASXL1, TET2, RUNX1, ZRSR2, EZH2
P36	73	m	sAML	<i>n.a.</i>	ASXL1, RUNX1, SRSF2, BCOR, SETBP1, PHF6, NRAS, IDH1
P37	87	w	CMML-II	<i>CPSS high</i>	TP53, DNMT3A, CDH23
P38	66	w	MDS-EB2	<i>high</i>	ASXL1
P39	73	w	sAML	<i>n.a.</i>	TET2, CEBPA, BCOR, PHF6, BCORL1, DNMT3A, NRAS
P40	90	m	AML-MRC	<i>n.a.</i>	BCOR, U2AF1, NRAS
P41	76	w	MDS-EB2	<i>high</i>	ASXL1, CSF3R, RUNX1, SRSF2, TET2
P42	78	m	MDS-RS-MLD	<i>intermediate</i>	ASXL1, RUNX1, SRSF2, U2AF1, BCOR
P43	73	m	MDS-EB2	<i>intermediate</i>	ASXL1, NF1, SETBP1, SRSF2, TP53, U2AF1
P44	75	m	MDS-MLD	<i>intermediate</i>	EZH2, STAG2, TET2, ZRSR2
P45	79	m	MDS-EB1	<i>high</i>	ASXL1, PHF6, RUNX1, U2AF1

Tabelle S1: Individuelle Patientencharakteristika ⁷¹

10 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Wein, Alina
Geburtsdatum: 23.06.1998
Geburtsort: Pforzheim

SCHULISCHER WERDEGANG

2008 – 2016 Johannes-Kepler-Gymnasium, Leonberg
24.06.2016 Abitur

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS 2017/18 Beginn des Studiums der Humanmedizin
an der Universität Heidelberg
2017 – 2019 Grundstudium
05.09.2019 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2019 – 2022 Hauptstudium
13.10.2022 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05.06.2024 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

PUBLIKATION

Riabov, V., Xu, Q., Schmitt, N., Streuer, A., Ge, G., Bolanos, L., Wunderlich, M., Jann, J.C., **Wein, A.**, Altrock, E., *et al.* (2023). ASXL1 mutations are associated with a response to alvocidib and 5-azacytidine combination in myelodysplastic neoplasms. *Haematologica*. 10.3324/haematol.2023.282921. (Impact factor: 10,1)

11 DANKSAGUNG

Zunächst bedanke ich mich herzlich beim Direktor der III. Medizinischen Klinik, Prof. Dr. med. Wolf-Karsten Hofmann für die Überlassung der Doktorarbeit.

Bedanken möchte ich mich sehr herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Daniel Nowak, für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seinem Labor anzufertigen. Er hat mich in allen Belangen unterstützt und war für Fragen und Diskussionen immer ansprechbar.

Ein großer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. sc. hum. Nanni Schmitt für die ausgezeichnete Betreuung und die kritische Durchsicht meiner Doktorarbeit. Sie war immer eine vertrauensvolle Ansprechpartnerin für wissenschaftliche und persönliche Belange, hat mir wertvolle Ratschläge gegeben und ich konnte auf ihre Unterstützung zählen.

Für die hervorragende Zusammenarbeit und Unterstützung bedanke ich mich bei Dr. med. Qingyu Xu, die mich bei meinen Experimenten begleitet und mich in die Laborarbeit eingeführt hat. Dr. sc. hum. Vladimir Ryabov, Dr. sc. hum. Eva Altroch, M. Sc. Arwin Mehralivand sowie Dr. med. Alexander Streuer danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit, die nützlichen Ratschläge und den ein oder anderen Spaß.

Bedanken möchte ich mich zudem bei Dr. rer. med. Felicitas Rapp für die kritische Durchsicht meiner Doktorarbeit und die wertvollen Kommentare.

Ein besonderer Dank gilt den Mitarbeiter*innen des gesamten Labors, ganz besonders Verena Nowak, Iris Palme, Julia Obländer und Nadine Weimer, auf deren Hilfe ich immer zählen konnte, was mir die Arbeit im Labor sehr erleichtert hat.

All meinen Freunden danke ich für die gesamte Studienzeit, die vielen Erinnerungen, und das gemeinsame Durchstehen von guten und schlechten Zeiten. Ein großer Dank gilt meinem Freund Lennart Moormann für seine Unterstützung und den großen Rückhalt.

Zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie, bei meinen Eltern Andrea und Andreas Wein und meiner Schwester Anja Wein. Danke, dass ihr immer für mich da seid. Ohne euch wäre ich nicht da, wo ich jetzt bin. Danke für die unglaubliche Unterstützung über all die Jahre und die Sicherheit, die ihr mir gegeben habt.