

Aus der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Identifizierung und Charakterisierung von Medikamenten zur synergistischen
Kombination mit Inhibitoren des Menin-MLL-Chromatinkomplexes für die Behandlung
der *NPM1*^{mut} akuten myeloischen Leukämie

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Hanna Luca Stiller
aus Wiesbaden

Mainz, 2023

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. U. Förstermann

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 03. April 2024

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	X
1 Einleitung und Zielsetzung.....	1
2 Literaturdiskussion	3
2.1 Akute myeloische Leukämie (AML)	3
2.1.1 Epidemiologie.....	3
2.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren.....	5
2.1.3 Pathophysiologie.....	6
2.1.4 Symptome und Diagnose	8
2.1.5 Klassifikation	9
2.1.6 Genetische Risikostratifizierung und Prognose.....	12
2.1.7 Aktuelle Therapiestrategien.....	14
2.2 Neue Therapieansätze	16
2.2.1 Der Menin-MLL-Komplex und dessen Inhibition in AML	16
2.2.2 Exportin-1 (XPO1) und dessen pharmakologische Inhibition in der AML	21
3 Material und Methoden	23
3.1 Material.....	23
3.1.1 Zellen.....	23
3.1.2 Primäre Zellen	23
3.1.3 Medien der Zellkultur und Zusätze	24
3.1.4 Niedermolekulare Inhibitoren	24
3.1.5 Chemikalien, Reagenzien und Zusätze.....	25
3.1.6 Puffer.....	26
3.1.7 Primer.....	27
3.1.8 Antikörper	28
3.1.9 Kits	28
3.1.10 Verbrauchsmaterialien	28
3.1.11 Laborgeräte	29
3.1.12 Software	30

3.2	Methoden	31
3.2.1	Methoden der Zellkultur.....	31
3.2.2	Zellproliferationsverhalten der humanen und murinen Zellen	32
3.2.3	Zellproliferationsverhalten in primären Zellen	33
3.2.4	Durchflusszytometrie.....	33
3.2.5	Genexpressionsanalysen	35
3.2.6	Chromatin-Immünpräzipitation (ChIP).....	37
3.2.7	Synergismus-Screen	39
3.2.8	Datenanalyse und Statistik.....	43
4	Ergebnisse	44
4.1	Menin-MLL-Inhibition hemmt selektiv die Proliferation <i>NPM1</i>^{mut} AML-Zellen	44
4.2	Menin-MLL-Inhibition mit Zweitgenerations-Inhibitor MI-538	46
4.2.1	MMi MI-538 zeigt potente Inhibition der Proliferation in <i>NPM1</i> ^{mut} AML	46
4.2.2	Pharmakologische Menin-MLL-Inhibition führt zur Herabregulierung eines leukämogenen Genexpressionsprogramm in <i>NPM1</i> ^{mut} AML	51
4.3	Synergismus-Screen in <i>NPM1</i>^{mut} AML	53
4.3.1	384-Kavitätenplatten stellen ein geeignetes Format zum Screening von Medikamentenkombinationen dar	53
4.3.2	Identifizierung synergistischer pharmakologischer Kombinationspartner von Menin-MLL-Inhibitoren zur Behandlung der <i>NPM1</i> ^{mut} AML	56
4.4	Kombinierte XPO1- und Menin-MLL-Inhibition in <i>NPM1</i>^{mut} AML	59
4.4.1	Validierung der Kombinationstherapie in <i>NPM1</i> ^{mut} AML.....	59
4.4.2	Kombinierte XPO1- und Menin-MLL-Inhibition supprimiert leukämogene Genexpression in <i>NPM1</i> ^{mut} AML	61
4.4.3	Kombinierte XPO1- und Menin-MLL-Inhibition vermittelt Reduktion der Bindung des Menin-MLL-Komplexes an das Chromatin über MI-538.....	63
4.4.4	Kombinierte XPO1- und Menin-MLL-Inhibition induziert die Expression des monozytären Differenzierungsmarker CD11b in <i>NPM1</i> ^{mut} AML	64
4.4.5	Kombinierte XPO1- und Menin-MLL-Inhibition induziert Apoptose in <i>NPM1</i> ^{mut} AML	67
4.4.6	Kombinierte XPO1- und Menin-MLL-Inhibition wirkt synergistisch in primären Zellproben	68
5	Diskussion	69
5.1	Präklinische Entwicklung von synergistischen Kombinationsregimen	69
5.2	Methodische Aspekte der Synergismus-Testung von Menin-MLL-Inhibitoren	72
5.3	Wirkungsmechanismen von kombinierter XPO1- und Menin-MLL-Inhibition bei der Behandlung von <i>NPM1</i>^{mut}- AML	74

5.4	Limitationen und Chancen einer kombinierten XPO1- und Menin- MLL- Inhibition in <i>NPM1</i> ^{mut} - AML	77
5.5	Perspektiven für die Zukunft.....	79
6	Zusammenfassung.....	80
7	Literaturverzeichnis	81
8	Danksagung	90
9	Publikation	92
10	Tabellarischer Lebenslauf	93

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A/G	Immunglobulinbindungsdomänen von Protein A und G
ACS	<i>American Cancer Society</i>
AF10	Kofaktor der MLLT10-Histonlysinmethyltransferase DOT1L
AF4	AF4/FMR2-Familienmitglied 1
AF6	Afadin, Adhärenzverbindung-Bildungsfaktor
AF9	MLLT3-Superelongationskomplex-Untereinheit
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
APL	Akute Promyelozytenleukämie
Ash2L	Set1/Ash2-Histon-Methyltransferase-Komplex-Untereinheit
ASXL1	Polycomb-Gruppenprotein
ATRA	All-trans-Retinsäure
B-RAF	Serin/Threonin-Proteinkinase
BCL-2	Antiapoptotisches Regulatorprotein der BCL-2-Familie
<i>BCOR</i>	POZ/Zinkfinger-Transkriptionsrepressor
<i>BCR-ABL1</i>	Onkogenes Fusionsgen
BET	<i>Bromodomain and Extraterminal Domain Protein</i>
BRD	<i>Bromodomain containing Protein</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
bZIP	<i>Basic Leucine Zipper</i>
c-Kit	Tyrosinkinase
c-Myc	Helix-loop-helix-Transkriptionsfaktor
CAR	<i>Chimeric Antigen Receptor</i>
CBFB-MYH11	Fusionsgen
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDK4/6	Cyclin-abhängige Kinase 4/6
CDK9	Cyclin-abhängige Kinase 9

cDNA	Komplementäre DNA
CEBPA	Transkriptionsfaktor
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronische myeloische Leukämie
CMV	Zytomegalievirus
CR	<i>Complete Remission/</i> Komplettremission
CRh	<i>Complete Remission with Partial Haematologic Recovery</i>
CXCL12	CXC-Motiv-Chemokin 12
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DEK-NUP214	Fusionsgen
DEPC	Diethyldicarbonat
DIC	<i>Disseminated Intravascular Coagulation</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNMT	DNS-Methyltransferase
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPY30	Regulatorische Dpy-30-Histon-Methyltransferase-Komplex-Untereinheit
EC ₅₀	Halbmaximaler Effekt eines Inhibitors
ECHO	Echokardiografie
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHA	<i>European Hematology Association</i>
EKG	Elektrokardiogramm
ELL	Elongationsfaktor der RNA-Polymerase II
ELN	<i>European LeukemiaNet</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
ENL	MLLT1-Superelongationskomplex-Untereinheit
<i>EZH2</i>	Polycomb-Gruppen-Gen

FAB	Französisch-Amerikanisch-Britisch
FKS	Fetales Kälberserum
FLT3	FMS- ähnliche Rezeptortyrosinkinase 3
FLT3L	FMS- ähnliche Rezeptortyrosinkinase 3- Ligand
FOXO	<i>Forkhead-Box-Protein</i>
FSC	Forward Scatter
Fyn	Tyrosinkinase
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GATA2	Transkriptionsfaktor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
H3K27ac	Acetylierung des 27. Lysinrests des Histonprotein H3
H3K4	4. Lysinrest des Histonprotein H3
H3K4me1/2/3	Methylierung des 4. Lysinrests des Histonprotein H3
HCl	Salzsäure
<i>HCT-CI</i>	<i>Hematopoietic Cell Transplantation-specific Comorbidity Index</i>
HDAC	Histon-Deacetylase
HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i>
HOX	Homöobox
HSC	<i>Hematopoietic Stem Cell</i>
<i>IARC</i>	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
IDH1/2	Isocitratdehydrogenase 1/2
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
IMEM	<i>Improved Minimum Essential Medium</i>
ITD	<i>Internal Tandem Duplication</i>
JAK2	Tyrosinkinase
KDM1A	Lysin-spezifische Histon-Demethylase 1A
KI	Kombinationsindex
LEDGF	Linsenepithel-assoziierten Wachstumsfaktor
LiCl	Lithiumchlorid

LSC	<i>Leukemic Stem Cell</i>
LSD1	Flavin-abhängige Monoaminoxidase
MCL1	Induziertes myeloische Leukämie-Zelldifferenzierungsprotein
MDM2	Doppelminuten-2-Protein
<i>MDR1</i>	Multidrug-Resistance-Gen-1
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MEF2C	Myozyten-spezifischer Enhancer-Faktor 2C
MEIS1	Homöobox-Protein
MEK1	Mitogen-aktivierte Proteinkinase 1
MMi	Menin-MLL-Inhibitor(en)
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MLL	Histinlysin-N-Methyltransferase 2A (KMT2A)
<i>MLL-r</i>	<i>MLL-Rearrangement</i>
MPN	Myeloproliferative Neoplasien
mRNA	<i>Messenger-RNA</i>
mTOR	<i>Mammalian target of Rapamycin</i>
NaCl	Natriumchlorid
NEDD8	<i>Neural-precursor-cell-expressed developmentally down-regulated 8</i>
NES	<i>Nuclear Export Signal</i>
NPM1	Nucleophosmin 1
NRAS	<i>Neuroblastoma-RAS</i>
NTRK3	Tropomyosin-Rezeptorkinase C
NUP	Nucleoporin
p53	Tumorsuppressor
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerasen
PBS	<i>Dulbecco's Phosphate buffered Saline</i>
PBX3	Prä-B-Zell-Leukämie-Transkriptionsfaktor 3
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD-L1	<i>Programmed Cell Death Ligand 1</i>
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase

PLK1	Proteinkinase
PML-RARA	Fusionsgen
PTD	<i>Partial Tandem Duplication</i>
qPCR	Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
RbBP5	Retinoblastom-bindendes Protein 5
RBM15-MKL1	Fusionsonkogen
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Cell Culture Medium</i>
RUNX1	Runt-verwandter Transkriptionsfaktor 1
SCF	<i>Stem Cell Factor</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEPT6	Septin-6
SET	Proteindomäne mit Methytransferaseaktivität
SF3B1	<i>Splicing Factor 3B Subunit 1</i>
SINE	Selektive Inhibitoren des nukleären Exports
SMC1	<i>Structural Maintenance of Chromosomes Protein 1</i>
SOX2	<i>Sex Determining Region Y- Box 2</i>
Src	Tyrosinkinase
SRSF2	<i>Serine And Arginine Rich Splicing Factor 2</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>
STAG2	<i>Stromal Antigen 2</i>
β2M	β-2 Mikroglobulin
SYK	Tyrosinkinase
TAM	Transiente abnormale Myelopoese
TE	TRIS- EDTA
Topo IIα	Topoisomerase IIα
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSS	Transkriptionsstartstellen
U2AF1	<i>U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor 1</i>
UI	<i>Uncertainty Interval</i>
WDR5	WD-Wiederholungs-enthaltendes Protein 5

<i>WHO</i>	<i>World Health Organisation</i>
WT	Wildtyp
WT1	Wilms-Tumor-Protein
XPO1	Exportin-1
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZRSR2	<i>Zinc Finger CCCH-Type, RNA Binding Motif And Serine/Arginine Rich 2</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Überleben von Patienten unter 60 Jahren (A) und über 60 Jahre (B) mit neu diagnostizierter AML am M.D. Anderson Cancer Center zwischen 1970-2015, modifiziert nach Kantarjian, Am J Hematol, 2016 [25].	4
Abbildung 2: Altersabhängiges Gesamtüberleben von 5130 AML-Patienten, die für eine intensive Therapie geeignet waren. Daten aus Studien der Deutsch-Österreichischen Studiengruppe Akute Myeloische Leukämie (AMLSG), modifiziert nach Döhner et al., Internist (Berl), 2015 [10].	5
Abbildung 3: Normale (links) und leukämische (rechts) Hämatopoese, modifiziert nach Khwaja et al., Nat Rev Dis Primers, 2016 [27]. NK-Zelle: Natürliche Killerzelle.	6
Abbildung 4: Die häufigsten Mutationen in der AML sortiert nach funktionellen Gruppen bzw. Signalwegen (links, modifiziert nach Grove et al., Dis Model Mech, 2014. [34]) oder Genen (rechts, modifiziert nach Barbosa et al., Genes Chromosomes Cancer, 2019 [35]). Daten aus The Cancer Genome Atlas Research Network, N Engl J Med, 2013 [8].	7
Abbildung 5: Modell des Menin-MLL-Komplexes in der normalen Hämatopoese, modifiziert nach Dafflon et al., Oncotarget, 2017 [76]. Das N-terminale Ende des Wildtyp-MLLs interagiert über Menin mit LEDGF. Am C-terminalen Ende findet sich die Histonmethylierende SET-Domäne sowie weitere Partner des Komplexes. Es werden nur ausgewählte Partner gezeigt.	18
Abbildung 6: A Modell des Menin-MLL-Komplexes in der <i>MLL-r</i> AML ohne (links) und nach Menin-MLL-Inhibition (rechts), modifiziert nach Krivtsov et al., Cancer Cell, 2019 [100] und Dafflon et al., Oncotarget, 2017 [76]. B <i>Volcano-Plots</i> von RNA-seq-Daten der Zellen OCI-AML 3 (<i>NPM1^{mut}</i>), MV4-11 (<i>MLL</i> -rearrangiert) und MOLM13-Zellen (<i>MLL-r</i>) nach Menin-MLL-Inhibition mit MI-503 (2,5 mM), modifiziert nach Dzama et al., Blood, 2020 [102].	20
Abbildung 7: Modell der NPM1-Lokalisation in der <i>NPM1^{mut}</i> -AML ohne (oben) und nach XPO1-Inhibition (unten), modifiziert nach Brunetti et al., Cancer Cell, 2018 [108]. WT NPM1: Wildtyp NPM1, NPM1c: mutiertes NPM1 mit NES und Lokalisation im Zytoplasma, H3K27ac: Acetylierung des Lysinrests an der N-terminalen Position 27 des Histon-H3-Proteins.	22
Abbildung 8: Versuchsaufbau der Vorbehandlung der Zellen für den anschließenden Synergismus-Screen	41
Abbildung 9: Aufbau der 384-Kavitätenplatte.	42
Abbildung 10: Dosis-Wirkungs-Kurven verschiedener AML-Zelllinien nach vier (A), sieben (B) und elf Tagen (C) Menin-MLL-Inhibition mit MI-503 in neun abstuften Konzentrationen, normalisiert auf DMSO-behandelte Zellen. Die Daten wurden in drei unabhängigen Experimenten mit jeweils technischen Triplikaten erhoben. Die Anzahl lebender Zellen (DAPI-negativ) wurde mittels Durchflusszytometrie erhoben. D EC_{50} -Werte verschiedener AML-Zelllinien nach elf Tagen Menin-MLL-Inhibition mit dem MMI MI-503. Die Werte wurden mittels der Graphpad Prism-Software berechnet.	45
Abbildung 11: Dosis-Wirkungs-Kurven der humanen <i>NPM1^{mut}</i> OCI-AML3-Zellen nach vier (A), sieben (B) und elf (C) Tagen Menin-MLL-Inhibition mit MI-503 oder MI-538, normalisiert auf DMSO-behandelte Zellen. Die Daten wurden in drei unabhängigen Experimenten mit jeweils technischen Triplikaten erhoben. Die Anzahl der lebenden Zellen (DAPI-negativ) wurde mittels Durchflusszytometrie erhoben.	47
Abbildung 12: Dosis-Wirkungs-Kurven der humanen <i>NPM1^{mut}</i> IMS-M2-Zellen nach vier (A), sieben (B) und elf (C) Tagen Menin-MLL-Inhibition mit MI-503 oder MI-538, normalisiert auf DMSO-behandelte Zellen. Die Daten wurden in drei unabhängigen	

Experimenten mit jeweils technischen Triplikaten erhoben. Anzahl der lebenden Zellen (DAPI-negativ) wurde mittels Durchflusszytometrie erhoben.....	48
Abbildung 13: Dosis-Wirkungs-Kurven der humanen <i>MLL-r</i> MV4-11-Zellen nach vier (A), sieben (B) und elf (C) Tagen Menin-MLL-Inhibition mit MI-503 oder MI-538, normalisiert auf DMSO-behandelte Zellen. Die Daten wurden in drei unabhängigen Experimenten mit jeweils technischen Triplikaten erhoben. Die Anzahl der lebenden Zellen (DAPI-negativ) wurde mittels Durchflusszytometrie erhoben.....	49
Abbildung 14: Dosis-Wirkungs-Kurven der humanen HL60-Zellen (Wildtyp für <i>NPM1</i> und <i>MLL</i>) nach vier (A), sieben (B) und elf (C) Tagen Menin-MLL-Inhibition mit MI-503 oder MI-538, normalisiert auf DMSO-behandelte Zellen. Die Daten wurden in drei unabhängigen Experimenten mit jeweils technischen Triplikaten erhoben. Die Anzahl der lebenden Zellen (DAPI-negativ) wurde mittels Durchflusszytometrie erhoben.....	50
Abbildung 15: Genexpressionsanalyse durch qPCR nach vier Tagen Behandlung mit MI-503, MI-538 oder DMSO (je 2,5 µM) in humanen <i>NPM1^{mut}</i> OCI-AML3-Zellen, normalisiert auf DMSO-behandelte Zellen. Die Daten wurden in zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils technischen Triplikaten erhoben. ns:p > 0,05; *:p < 0,05; **:p < 0,01; ***:p < 0,001; ****:p < 0,0001.....	52
Abbildung 16: A Lebendzellanzahl sowie B Verdopplungszeit der Zelllinien OCI-AML3, IMS-M2 sowie HL-60 nach zwei Tagen Wachstum in einer 96-Kavitäten (grau)- beziehungsweise einer 384-Kavitätenplatte (rot).....	54
Abbildung 17: A Dosis-Wirkungs-Kurve der humanen <i>NPM1^{mut}</i> OCI-AML3-Zellen nach drei Tagen Menin-MLL-Inhibition mit MI-503 in einer 384-Kavitätenplatte, normalisiert auf DMSO-behandelte Zellen. Die Daten wurde in technischen Triplikaten erhoben und die Anzahl der lebenden Zellen (DAPI-negativ) mittels Durchflusszytometrie bestimmt.....	54
Abbildung 18: A Zellzahlen nach Zentrifugation und Auswurf des Mediums von ursprünglich 17 500 ausgesäten lebenden, Trypanblau-exkludierenden <i>NPM1^{mut}</i> OCI-AML3-Zellen. B Standardabweichung der Zellzahlen aus A. Die Anzahl der lebenden Zellen (DAPI-negativ) wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt.....	55
Abbildung 19: Synergismus-Screen in den humanen <i>NPM1^{mut}</i> OCI-AML3-Zellen sowie in den murinen <i>Npm1^{CA/+}Fit3^{ITD/+}</i> AML-Zellen mit anschließender kombinierter Auswertung. Die Zellzahlen wurden mittels Durchflusszytometrie nach DAPI-Färbung (1 µg/ml) bestimmt und die Kombinationsindices mittels der CompuSyn-Software nach der Chou-Talalay- Methode [117] errechnet. Einteilung nach KI-Werten: sehr starker Synergismus (KI<0,1, dunkelrot), starker Synergismus (KI=0,1-0,3, dunkelrot), Synergismus (KI=0,3-0,7, rot), moderater Synergismus (KI=0,7-0,85, lachsfarben), leichter Synergismus (KI=0,85-0,9, rosa), additiv (KI=0,9-1,1, weiß), leichter Antagonismus (KI=1,1-1,2, hellblau), moderater Antagonismus (KI=1,2-1,45, blau), Antagonismus (KI=1,45-3,3, mittelblau), starker Antagonismus (KI=3,3-10, dunkelblau) sowie sehr starker Antagonismus (KI>10, dunkelblau) [117].....	57
Abbildung 20: Synergismus-Screen der <i>NPM1^{mut}</i> IMS-M2 AML-Zellen. Die Zahlen viabler Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie nach DAPI-Färbung (1 µg/ml) gemessen und die Kombinationsindices nach Chou-Talalay- Methode [117] errechnet. Einteilung nach KI-Werten: sehr starker Synergismus (KI<0,1, dunkelrot), starker Synergismus (KI=0,1-0,3, dunkelrot), Synergismus (KI=0,3-0,7, rot), moderater Synergismus (KI=0,7-0,85, lachsfarben), leichter Synergismus (KI=0,85-0,9, rosa), additiv (KI=0,9-1,1, weiß), leichter Antagonismus (KI=1,1-1,2, hellblau), moderater Antagonismus (KI=1,2-1,45, blau), Antagonismus (KI=1,45-3,3, mittelblau), starker Antagonismus (KI=3,3-10, dunkelblau) sowie sehr starker Antagonismus (KI>10, dunkelblau) [117].....	58
Abbildung 21: Dosis-Wirkungs-Kurven der <i>NPM1^{mut}</i> OCI-AML3-Zellen (A), <i>NPM1^{mut}</i> IMS-M2-Zellen (B) und HL-60-Zellen (C) nach Behandlung mit dem MMi MI-538 (2,5 µm, viereinhalb Tage, blau) oder Eltanexor (300 nM, zwei Tage, grün) oder der Kombination	

aus beiden viereinhalb Tage mit MI-538 davon zwei Tage mit Eltanexor (rot). Die gestrichelte Linie zeigt jeweils den EC₅₀-Wert an. Die Daten wurden in drei unabhängigen Experimenten mit jeweils technischen Triplikaten erhoben. Die Anzahl der lebenden Zellen (DAPI-negativ) wurde mittels Durchflusszytometrie erhoben. 60

Abbildung 22: Genexpressionsanalyse durch qPCR nach Behandlung mit MI-538 (2,5 µM, viereinhalb Tage), Eltanexor (300 nM, zwei Tage), Kombination aus MI-538 und Eltanexor (2,5 µM, viereinhalb Tage/300 nM, zwei Tage) oder DMSO (0,1%) als Kontrolle in humanen *NPM1*^{mut} OCI-AML3-Zellen. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression gegenüber β2M, normalisiert auf DMSO-behandelte Zellen. Die Daten wurden in drei unabhängigen Experimenten mit jeweils technischen Triplikaten erhoben. ns: > 0,05; *:p < 0,05; **:p < 0,01; ***:p < 0,001; ****:p < 0,0001. 62

Abbildung 23: Chromatin-Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen Menin und IgG sowie anschließender qPCR nach Behandlung mit MI-538 (2,5 µM, viereinhalb Tage), Eltanexor (300 nM, zwei Tage), Kombination aus MI-538 und Eltanexor (2,5 µM, viereinhalb Tage/300 nM, zwei Tage) oder DMSO (2,5 µM, Kontrolle) in humanen *NPM1*^{mut} OCI-AML3-Zellen. 63

Abbildung 24: A Differenzierung nach Behandlung mit MI-538 (2,5 µM, viereinhalb Tage, blau), Eltanexor (300 nM, zwei Tagen, grün), Kombination aus MI-538 und Eltanexor (2,5 µM, viereinhalb /300 nM, zwei Tagen, rot) oder DMSO (0,1%, Kontrolle, schwarz) bestimmt über die CD11b-Expression. **B** Differenzierung nach viereinhalb Tagen XPO1-Inhibition ansonsten wie A. Die Daten wurden in technischen Duplikaten erhoben. Die Anzahl der lebenden (DAPI-negativ) und CD11b-positiven Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. 65

Abbildung 25: A und B Zusammenfassende Darstellung mittels Gating bestimmter Prozente, dargestellt als Balkendiagramm. Die Daten wurden in technischen Duplikaten erhoben. Die Anzahl der lebenden (DAPI-negativ) und CD11b-positiven Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. ns: > 0,05; *:p < 0,05; **:p < 0,01; ***:p < 0,001; ****:p < 0,0001. 66

Abbildung 26: A Apoptose in *NPM1*^{mut} OCI-AML3-Zellen nach Behandlung mit MI-538 (2,5 µM, viereinhalb Tage), Eltanexor (300 nM, zwei Tage), Kombination aus MI-538 und Eltanexor (2,5 µM, viereinhalb Tage/300 nM, zwei Tage) oder DMSO (0,1%) als Kontrolle nach Annexin-V- und DAPI (1 µg/ml) - Färbung. Die Daten wurden in drei unabhängigen Experimenten mit jeweils technischen Triplikaten erhoben. Die Anzahl der lebenden (DAPI-negativ) und Annexin-V-positiven Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. ns: > 0,05; *:p < 0,05; **:p < 0,01; ***:p < 0,001; ****:p < 0,0001. 67

Abbildung 27: A Dosis-Wirkungs-Kurven einer primären Patientenprobe nach viereinhalb Tagen Behandlung mit dem MMi VTP-50469 (100 nM, blau), zwei Tage Eltanexor (200 nM) oder der Kombination aus beiden (rot). **B** Bestimmung des Synergismus mittels Kombinationsindices der Behandlung aus gemeinsamer XPO1- und Menin-MLL-Inhibition. Die Anzahl der lebenden Zellen (DAPI-negativ) wurde mittels Durchflusszytometrie erhoben. 68

Abbildung 28: Mögliches Modell des synergistischen Mechanismus hinter einer kombinierten XPO1- und Menin-MLL-Inhibition in *NPM1*^{mut} AML. 76

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: ICC-Klassifikation der AML mit Prozentzahlen des benötigten Blastenanteils für die Diagnose adaptiert durch das ELN (modifiziert nach [26, 38]).....	9
Tabelle 2: Genetische Risikostratifizierung bei Erstdiagnose nach der Klassifikation des European LeukemiaNet 2022 ^a (modifiziert nach [38]).....	12
Tabelle 3: Effekt einer XPO1-Inhibition auf molekulare Zielstrukturen der AML (modifiziert nach Wang et al., Stem Cell Investig, 2019 [109]).....	21
Tabelle 4: AML-Zellen	23
Tabelle 5: Primäre Zellen	23
Tabelle 6: Medien	24
Tabelle 7: Niedermolekulare Inhibitoren.....	24
Tabelle 8: Medikamente, Chemikalien, Reagenzien und Zusätze	25
Tabelle 9: Puffer	26
Tabelle 10: qRT-PCR-Primer	27
Tabelle 11: CHIP-Primer	28
Tabelle 12: Antikörper	28
Tabelle 13: Kits.....	28
Tabelle 14: Verbrauchsmaterialien.....	28
Tabelle 15: Laborgeräte	29
Tabelle 16: Software.....	30
Tabelle 17: Einteilung der Substanzen nach Konzentrationsstufen (KS) (vgl. Tabelle 18) ...	39
Tabelle 18: Konzentrations-Stufen (KS).....	41

1 Einleitung und Zielsetzung

Krebserkrankungen sind für eine hohe Morbidität und Mortalität in unserer Gesellschaft verantwortlich [1, 2]. Laut der *International Agency for Research on Cancer (IARC)* der *World Health Organisation (WHO)* waren 2020 weltweit 19,3 Millionen (95% *uncertainty interval (UI)*: 19,0-19,6 Millionen) Menschen von einer Krebsdiagnose betroffen und es wird erwartet, dass diese Zahlen künftig weiter steigen werden [3, 4]. Laut aktuellen Daten des Robert Koch-Instituts (RKI) sind in Deutschland fast jeder 2. Mann (49,3%) sowie mehr als jede 3. Frau (42,3%) im Laufe ihres Lebens von einer Krebserkrankung betroffen [2]. Krebserkrankungen stellen hinter kardiovaskulären Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar [1]. Ungeachtet intensiver Therapieregime erlagen im Jahr 2020 zehn Millionen (95% UI: 9,7-10,2 Millionen) Menschen ihrer Krebserkrankung [3].

Während hämatologische Neoplasien insgesamt zu den selteneren Krebserkrankungen gehören, nimmt ihre Inzidenz mit höherem Lebensalter stark zu [5]. Die heterogene Erkrankungsgruppe der akuten myeloischen Leukämien (AML) stellt dabei eine besondere therapeutische Herausforderung dar [5]. Mit Polychemotherapie-basierter Behandlung steht in der Regel eine kurative Therapieoption zur Verfügung, die jedoch für einen Teil der vornehmlich älteren, komorbiden Patienten aus Gründen der Toxizität oftmals nicht in Betracht kommt [5]. Biologisch leitet sich die AML von hämatopoetischen Progenitorzellen der myeloischen Zellreihe ab, wobei die neoplastischen Zellen eine unkontrollierte Proliferation und eine Blockade in der Differenzierung aufweisen [6]. Unbehandelt führt die AML meist wenige Monate nach der Diagnose zum Tod [7]. Charakteristisch für die neoplastischen Zellen der AML sind rezurrenente somatische (erworbene) Mutationen sowie Chromosomen-Aberrationen [8]. Ungefähr ein Drittel aller Patienten sind von einer Mutation im Nucleophosmin 1- Gen (*NPM1^{mut}*) betroffen [8]. Trotz bedeutender Fortschritte bei der Charakterisierung der AML und daraus resultierender Erkenntnis bezüglich Biologie und Pathophysiologie in den letzten Jahren, hat sich die kurativ intendierte Standardtherapie in den vergangenen 40 Jahren wenig verändert [6]. Rückgrat dieser Therapie bildet bereits seit den frühen 70er-Jahren eine Polychemotherapie mit oder ohne sich anschließender allogener Stammzelltransplantation [6]. Bei einem medianen Erkrankungsalter von 71 Jahren stellt dies viele Betroffene, die aufgrund ihres Alters oder Komorbiditäten keine Chemotherapie erhalten können, vor eine schwierige Situation [9]. Dies spiegelt sich deutlich in den Überlebensraten wider. Aktuell können etwa 40-60% der Menschen unter 60 Jahren und nur 15-20% der Menschen über 60 Jahren geheilt werden [10]. Die AML zeigt also besonders bei älteren Menschen eine ungünstige Prognose auf [11].

Hoffnung erzeugen neuentwickelte Mechanismus-basierte und dabei weniger toxische Therapieansätze. Die Menin-MLL-Interaktion stellt eine kürzlich definierte Vulnerabilität der

NPM1^{mut} AML und damit eine neue medikamentös angreifbare Zielstruktur dieser Leukämien dar [12]. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zeigte sich eine dramatische anti-leukämische Aktivität in aggressiven Leukämiemodellen und primären Patientenproben [12]. Aktuell befinden sich sechs Menin-MLL-Inhibitoren (MMi) in klinischer Phase-I-Testung (NCT04067336, NCT04065399, NCT04752163, NCT04811560, NCT05153330, NCT04988555) mit vielversprechenden ersten Wirksamkeitsdaten [13].

Aufgrund der genetischen und epigenetischen Komplexität der AML ist derzeit jedoch nicht davon auszugehen, dass Einzelsubstanzen bei dieser Erkrankung Langzeitremissionen induzieren können [14]. Aus diesem Grund stellt die Entwicklung von rationalen Kombinationstherapien eines der vorrangigen Ziele der Erforschung dieser Erkrankung dar [14].

Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit war, ob sich für MMi bei der *NPM1*^{mut} AML synergistisch wirkende therapeutische Kombinationspartner definieren lassen. Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von synergistischen, MMi-basierten Kombinationstherapien. Dazu wurde in dieser Arbeit ein Screening-Verfahren entwickelt, um eine Auswahl von Medikamenten in Kombination mit den MMi zu testen, die nahe an der klinischen Zulassung als Einzelsubstanzen stehen. Dadurch soll eine optimale Grundlage für künftige klinische Studien solch innovativer Medikamentenkombinationen entwickelt werden. So sollen dann nur die vielversprechendsten Kombinationen in klinischen Studien untersucht und eine klinische Prüfung von Medikamentenkombinationen vermieden werden, die lediglich additive oder sogar antagonistische Effekte aufweisen.

Darüber hinaus sollte eine Charakterisierung der vielversprechendsten Medikamentenkombination im Hinblick auf die biologischen Effekte in humanen *NPM1*^{mut} AML-Zelllinien erfolgen. Hierbei sollten die antiproliferativen Effekte, die Genexpression, die Chromatin-Regulation sowie das Differenzierungs- und Apoptoseverhalten der Leukämiezellen untersucht werden. Ziel war es, mehr über die Abhängigkeiten dieser Leukämien und der dahinterstehenden Mechanismen zu lernen sowie neue potenzielle Therapieoptionen zu entwickeln. Die Ergebnisse sollten abschließend an primären Patientenproben validiert werden.

2 Literaturdiskussion

2.1 Akute myeloische Leukämie (AML)

Leukämie ist die zusammenfassende und übergeordnete Bezeichnung für eine Gruppe von bösartigen Erkrankungen des blutbildenden Systems [15]. Ihren Namen erhielten die Leukämien (von λευκός, leukós „weiß“ und αἷμα, haima „Blut“ aus dem Altgriechischen) aufgrund der stark erhöhten Leukozytenzahl, die sich bei einigen, allerdings nicht bei allen Patienten finden lässt [16]. Je nach Ursprung der malignen Zellen erfolgt die Einteilung in zwei Hauptgruppen, den myeloischen oder den lymphatischen Leukämien [15]. Anhand des Krankheitsverlaufs wird weiterhin zwischen akuten oder chronischen Leukämien unterschieden [15]. Die Leukämie kann Patienten jedes Alters betreffen [17]. Die verschiedenen Subtypen haben allerdings eine unterschiedliche altersspezifische Verteilung [17]. So findet sich die akute lymphatische Leukämie (ALL) vor allem bei Kindern, während die akute myeloische Leukämie (AML) häufiger ältere Erwachsene betrifft [17]. Die chronische lymphatische (CLL) sowie die chronische myeloische Leukämien (CML) betreffen fast ausschließlich Erwachsene [17]. Laut der *American Cancer Society (ACS)* sind die Leukämien für insgesamt ungefähr 3-4% der diagnostizierten Krebserkrankungen in den USA verantwortlich [18, 19].

Die akuten myeloischen Leukämien (AML) im speziellen sind eine Gruppe maligner Neoplasien der myeloischen Vorläuferzellen, die durch unkontrollierte Proliferation und eine Blockade in der Differenzierung der leukämischen Zellen (Blasten) charakterisiert sind [6]. Durch diese Prozesse kommt es zu einer Akkumulation von Blasten im Knochenmark, was wiederum zu einer Verdrängung der normalen hämatopoetischen Zellen und somit zu hämatopoetischer Insuffizienz führt [6]. Unbehandelt führt die AML in kurzer Zeit zum Tod [6].

2.1.1 Epidemiologie

Das mediane Erkrankungsalter der AML bei Diagnose liegt entsprechend einer Erhebung der *Swedish Acute Leukemia Registry Group* bei 71 Jahren [9]. Die AML tritt also vor allem im späten Erwachsenenalter auf [9, 20, 21]. Insgesamt treten in den USA und Europa ungefähr 3-5 Neuerkrankungen auf 100.000 Einwohner pro Jahr auf, wobei die altersspezifischen Inzidenzen mit zunehmendem Alter deutlich ansteigen [22, 23]. Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen [22, 23].

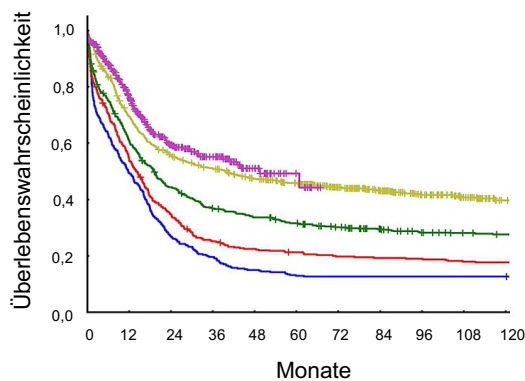
Zusammen mit der CLL hat die AML die höchsten Inzidenzraten aller Leukämien und ist somit die häufigste akute Leukämie im Erwachsenenalter [21]. Darüber hinaus weisen

Patienten mit AML im Vergleich zu anderen Leukämien das kürzeste Überleben und die meisten Leukämie-assoziierten Todesfälle auf [21].

Im Gegensatz dazu macht die AML nur einen relativ geringen Anteil der Leukämien bei Kindern aus [24]. Mit ungefähr 18% der im Kindesalter diagnostizierten Leukämien ist sie gegenüber der ALL deutlich seltener [24].

Trotz zahlreicher Fortschritte im Verständnis der Biologie der AML sind die Behandlungsergebnisse vor allem für ältere Patienten weiterhin unbefriedigend [11]. Während sich das Behandlungsergebnis für Patienten unter 60 Jahren in den letzten Jahrzehnten deutlich verbessert hat, ist die Prognose für die große Anzahl von Patienten über 60 Jahren, die aufgrund von Komorbiditäten oder eines schlechten Allgemeinzustandes keine intensive Chemotherapie erhalten können, weiterhin als sehr ungünstig anzusehen (siehe Abbildung 1) [11]. Aktuell können in Deutschland etwa 40-60% der Menschen unter 60 Jahren und nur 15-20% der Menschen über 60 Jahren geheilt werden (siehe Abbildung 2) [10].

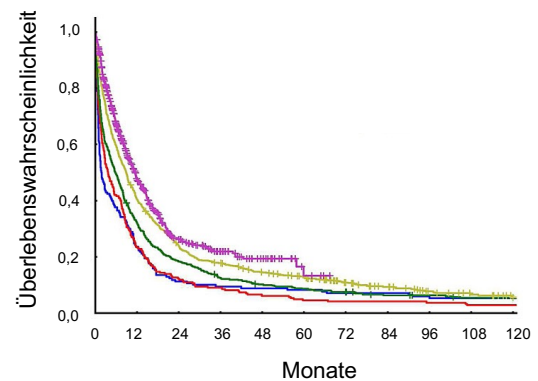
A Unter 60 Jahre



Jahre	Total	±	5-Jahre
1970-79	388	357	13%
1980-89	416	358	21%
1990-99	640	472	32%
2000-09	769	434	46%
2010-15	454	155	49%

$p < 0,001$

B Über 60 Jahre



Jahre	Total	±	5-Jahre	Median (Mo)
1970-79	170	169	8%	1,8
1980-89	245	245	4%	3,6
1990-99	531	508	9%	5,7
2000-09	832	753	13%	8,8
2010-15	612	389	13%	11,5

$p < 0,001$

Abbildung 1: Überleben von Patienten unter 60 Jahren (A) und über 60 Jahre (B) mit neu diagnostizierter AML am M.D. Anderson Cancer Center zwischen 1970-2015, modifiziert nach Kantarjian, Am J Hematol, 2016 [25].

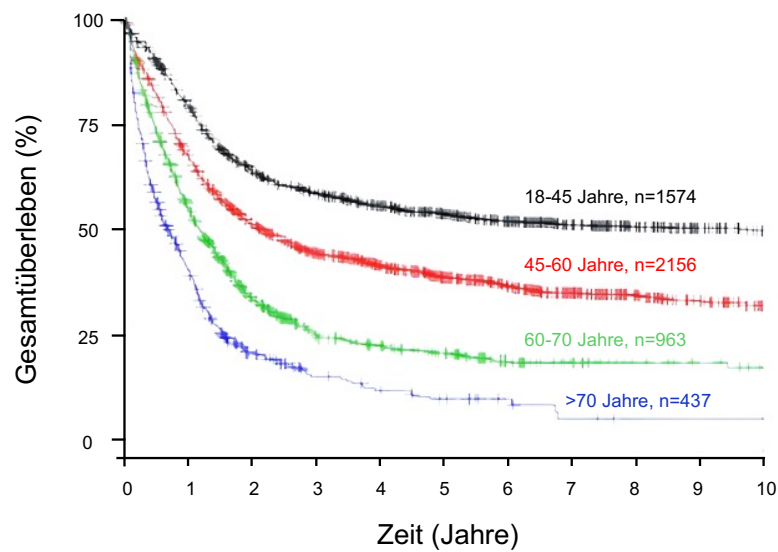


Abbildung 2: Altersabhängiges Gesamtüberleben von 5130 AML-Patienten, die für eine intensive Therapie geeignet waren. Daten aus Studien der Deutsch-Österreichischen Studiengruppe Akute Myeloische Leukämie (AMLSG), modifiziert nach Döhner et al., Internist (Berl), 2015 [10].

2.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Die AML kann entweder *de novo* oder sekundär entstehen [26]. Sekundäre Leukämien entwickeln sich entweder nach einer vorhergegangenen myeloischen Erkrankung wie beispielsweise dem myelodysplastischen Syndrom (MDS), den myeloproliferativen Neoplasien (MPN), einem Overlap-Syndrom aus MDS und MPN oder als Folge einer zytotoxischen Therapie [26].

Während bei einigen Patienten eine therapeutische, berufliche oder ökologische Exposition gegenüber DNS-schädigenden Substanzen nachvollzogen werden kann, lässt sich in den meisten Fällen kein unmittelbarer Auslöser der AML finden [21]. Zu den DNS-schädigenden Substanzen zählen zum Beispiel Zytostatika (insbesondere Alkylanzien oder Topoisomerase-II-Inhibitoren) und ionisierende Strahlung. Darüber hinaus kann auch die Exposition gegenüber anderen Stoffen wie Benzole, Tabak, Pestizide oder Herbizide einen Risikofaktor für die Entwicklung einer AML darstellen [27, 28].

Neben den bereits genannten Risikofaktoren Alter und vorhergegangene MDS oder MPN können zudem auch vererbte genetische Erkrankungen einen Risikofaktor für die Entwicklung einer AML darstellen. Dazu gehören Erkrankungen wie beispielsweise das Down-Syndrom, die Fanconi-Anämie, das Shwachman-Diamond-Syndrom, das Li-Fraumeni-Syndrom und einige weitere [26].

2.1.3 Pathophysiologie

Aktuell wird davon ausgegangen, dass die AML von Leukämie-initiiierenden Zellen sogenannten leukämischen Stammzellen (LSCs) getrieben wird, die über eine unlimitierte Fähigkeit zur Selbsterneuerung verfügen [29, 30]. Diese LSCs können sich entweder aus transformierten hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) oder frühen hämatopoetischen Progenitorzellen, die die Fähigkeit der Selbsterneuerung wieder erworben haben, entwickeln [31]. In der normalen Hämatopoese bringen hämatopoetische Stammzellen (HSCs) mit der Fähigkeit zur Selbsterneuerung sogenannte Progenitorzellen hervor [27]. Diese haben die Fähigkeit zur Selbsterneuerung verloren und verfügen währenddessen aber weiterhin über die Fähigkeit zur ausgedehnten Proliferation [27]. Diese Progenitorzellen produzieren wiederum weiter differenzierte *Precursor*-Zellen und schließlich reife Zellen [27]. AML-Zellen hingegen reifen nicht aus, sodass es zu deren Akkumulation kommt [27]. Es wird angenommen, dass aus wenigen leukämischen Stammzellen AML-Progenitorzellen bzw. AML-Blasten hervorgehen, die die Mehrheit der Leukämiezellpopulation darstellen (siehe Abbildung 3) [27].

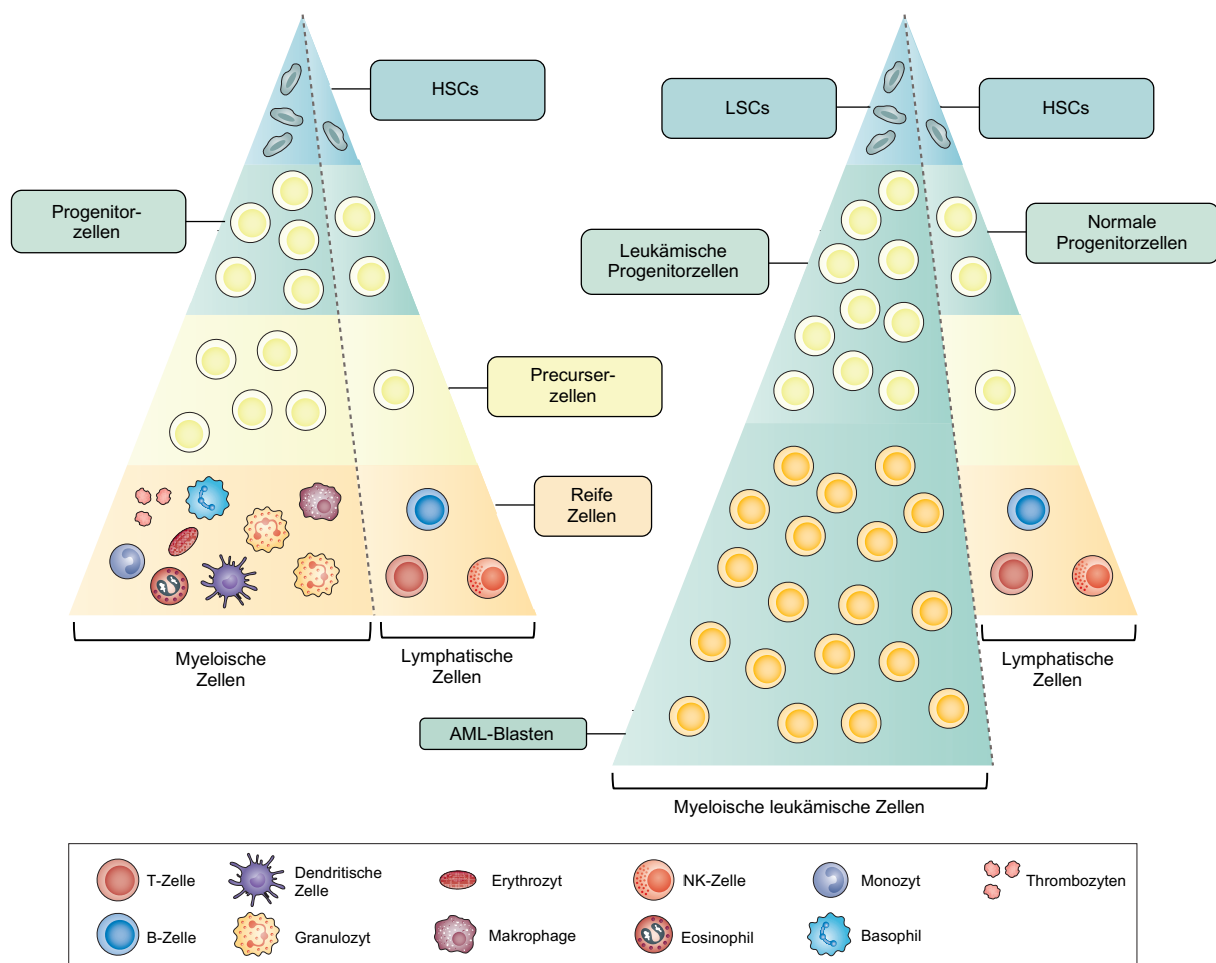


Abbildung 3: Normale (links) und leukämische (rechts) Hämatopoese, modifiziert nach Khwaja et al., Nat Rev Dis Primers, 2016 [27]. NK-Zelle: Natürliche Killerzelle.

Auf molekularer Ebene stellt die AML eine sehr heterogene Erkrankung dar, die durch zahlreiche wiederkehrende Chromosomen-Aberrationen und Gen-Mutationen charakterisiert ist [8, 32]. Während sich bei den Mutationen häufig Punktmutationen, Sequenzinsertionen oder -deletionen finden, reichen die chromosomalen Aberrationen über ein Spektrum von Translokationen über Rearrangierungen bis zu einem Verlust oder Zugewinn einzelner Teile oder gesamter Chromosomen [8, 32]. Aktuell geht man davon aus, dass die AML von mindestens zwei verschiedenen Mutationen getrieben wird (*Two-hit*-Hypothese) [33], wobei sich in neueren Sequenzierungs-Studien im Mittel mehr als drei Treibermutationen finden [32]. Ursprünglich wurden die Treiberläsionen in zwei Klassen eingeteilt [33]. Mutationen der Klasse I führen zu einem Wachstumsvorteil und Mutationen der Klasse II beeinträchtigen die Differenzierung der undifferenzierten myeloischen Progenitorzellen [33]. Diese Mutationen sind somatisch [32] und finden sich nur in den malignen Zellen, nicht in der Keimbahn. Sie treiben die maligne Transformation des betroffenen malignen Klons voran [32].

In einer umfassenden Sequenzierungsarbeit von AML-Patientenproben fanden die Autoren in fast jeder AML mindestens eine Mutation der für die Pathogenese relevanten neun Klassen [8]. Dazu gehören Mutationen in Genen der Signaltransduktion (in 59% der Proben; z.B. *FLT3*, *NRAS*), der DNS-Methylierung (in 44%, z.B. *DNMT3A*, *IDH1/2*), des Gens *NPM1* (in 27%), in Chromatin-Modifikatoren (in 30%, z.B. *MLL*), in myeloischen Transkriptionsfaktoren (in 22%, z.B. *RUNX1*, *CEBPA*), Fusionen von Genen der Transkriptionsfaktoren (in 18%, z.B. *PML-RARA*), Mutationen in Tumorsuppressorgenen (in 16%, z.B. *TP53*, *WT1*), in Spliceosomen (in 14%, z.B. *SF3B1*) und im Kohesin-Komplex (13%, z.B. *SMC1S*) (siehe Abbildung 4) [8].

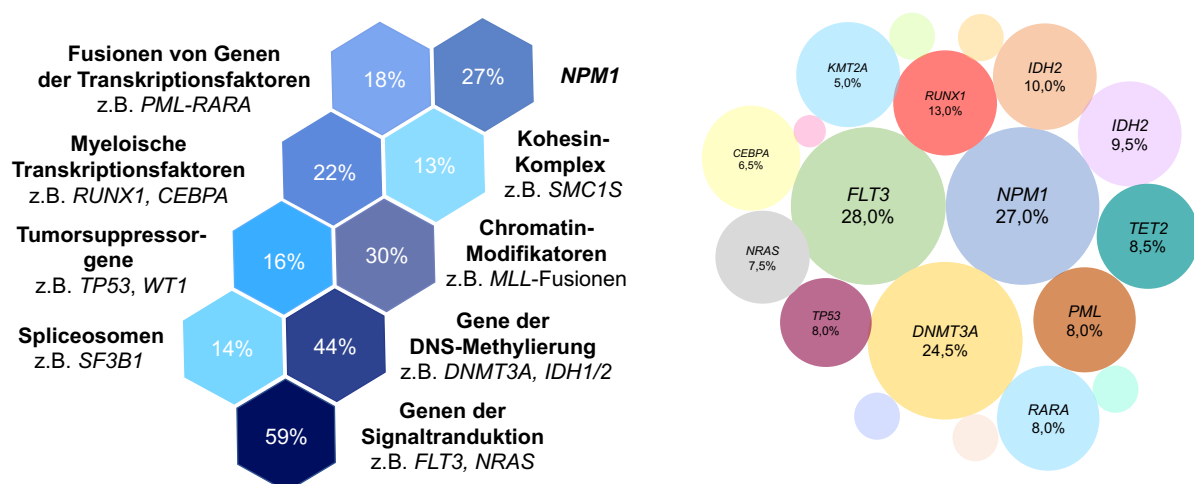


Abbildung 4: Die häufigsten Mutationen in der AML sortiert nach funktionellen Gruppen bzw. Signalwegen (links, modifiziert nach Grove et al., Dis Model Mech, 2014. [34]) oder Genen (rechts, modifiziert nach Barbosa et al., Genes Chromosomes Cancer, 2019 [35]). Daten aus The Cancer Genome Atlas Research Network, N Engl J Med, 2013 [8].

Einige Mutationen fanden sich häufig in Verbindung mit anderen, sodass man eine biologische Verbindung zwischen den Genen und Kategorien vermuten kann [8]. Besonders auffällig ist zudem, dass ungefähr 70% der wiederkehrenden Mutationen bei AML-Patienten Regulatoren der Genexpression wie epigenetische Proteine, Transkriptionsfaktoren und Teile der Spliceosomen betreffen [36]. Das zeigt, dass die Epigenetik eine entscheidende Rolle in der AML-Pathogenese spielt [36]. Durch Bestimmung all dieser beschriebenen Marker lassen sich prognostische Aussagen treffen [8].

2.1.4 Symptome und Diagnose

Durch die unkontrollierte, klonale Proliferation myeloischer Blasten bei der AML, wird die gesunde Hämatopoese zunehmend aus dem Knochenmark verdrängt [27]. Infolgedessen zeigen die Patienten häufig Symptome, die aus einer hämatopoetischen Insuffizienz resultieren [27]. Bei einigen Patienten resultiert im peripheren Blut eine Panzytopenie [27]. Die Patienten entwickeln daraufhin verschiedene Symptome wie Abgeschlagenheit, Appetitverlust oder Kurzatmigkeit aufgrund der Anämie, opportunistische Infektionen aufgrund der Neutropenie [27] oder (petechiale) Blutungen aufgrund der Thrombozytopenie [6, 27]. Einige Patienten zeigen außerdem plasmatische Gerinnungsstörungen inklusive Hyperfibrinolyse [27].

Neben den Befunden in Knochenmark und Blut können eine Lymphadenopathie und auch eine Hepatosplenomegalie auftreten [27]. Seltener lassen sich extramedulläre Manifestationen an der Haut, den Meningen oder anderen Weichteilen finden [27]. Eine Komplikation der AML ist die Hyperleukozytose [27]. Davon spricht man bei Leukozytenzahlen von mehr als 100.000/ μ l [27]. Diese steht mit weiteren Komplikationen wie dem Leukostasesyndrom, dem Tumorlysesyndrom oder einer disseminierten intravasalen Koagulopathie (DIC) in Verbindung [37], die prognostisch ungünstig und mit einer hohen initialen Letalität assoziiert sind [27, 37].

Zur Diagnosestellung wird in der Regel initial ein Differenzialblutbild angefertigt. Per Definition besteht eine AML, wenn 20% oder mehr der kernhaltigen Zellen im peripheren Blut und/oder im Knochenmark myeloischen Blasten entsprechen [26]. Der myeloische Ursprung der Zellen kann mittels Immunphänotypisierung sicher nachgewiesen werden [27]. Beim Nachweis von definierten rekurrenten genetischen Veränderungen besteht - entsprechend der aktuellen ICC-Klassifikation - bereits beim Nachweis von 10% Blastenanteil eine AML (siehe Tabelle 1) [26]. Auch wenn der Blastenanteil im peripheren Blut 20% bereits übersteigt, ist in aller Regel eine Materialgewinnung von Knochenmark zur Therapieplanung anzustreben [6, 27]. An dieser gewonnenen Zellprobe erfolgen zytogenetische und

molekulargenetische Analysen zur Prognoseabschätzung und als Grundlage der Therapieplanung (vgl. Kapitel 2.1.5) [38].

Zur weiteren Therapieplanung werden bei Diagnose noch einige weitere Tests durchgeführt. Diese umfassen beispielsweise die Prüfung des Performance-Status (*Eastern Cooperative Oncology Group-Score*, kurz *ECOG-Score*) und die Abklärung von etwaigen Komorbiditäten [38]. Zudem sollte vor Einleitung der potenziell teratogenen und keimzellschädigenden Therapie ein Schwangerschaftstest erfolgen und bei bestehendem Kinderwunsch fertilitätserhaltende Maßnahmen wie die Oozyten- oder Spermienkryokonservierung besprochen werden [38, 39]. Bei Verdacht auf eine Beteiligung des zentralen Nervensystems (ZNS) sollte außerdem eine Lumbalpunktion mit anschließender Liquorzytologie durchgeführt werden [38]. Um ein möglichst genaues Bild des aktuellen Gesundheitsstaus des Patienten zu erhalten, wird zusätzlich ein Röntgen-Thorax, ein 12-Kanal Elektrokardiogramm (EKG) und eine Echokardiographie durchgeführt [38]. Es wird zudem der HLA- und CMV-Status erhoben, falls der Patient im Verlauf seiner Erkrankung eine allogene Stammzelltransplantation benötigt [38].

2.1.5 Klassifikation

Die AML wird anhand ihrer Morphologie, ihres Immunphänotyps, ihrer Genetik sowie ihren klinischen Merkmalen in verschiedenen AML-Subentitäten eingeteilt (siehe Tabelle 1). Dies erfolgt heutzutage nach der *International Consensus Classification (ICC)*, die im Jahr 2022 herausgegeben wurde und sich auch in den Empfehlungen des European LeukemiaNet (ELN) adaptiert wiederfindet [26, 38]. Diese Klassifikation löste die zuvor bestehende WHO-Klassifikation von 2016 ab [40].

Tabelle 1: *ICC*-Klassifikation der AML mit Prozentzahlen des benötigten Blastenteils für die Diagnose adaptiert durch das ELN (modifiziert nach [26, 38]).

Akute myeloische Leukämie (AML) und verwandte Neoplasien
<u>AML mit rekurrenten genetischen Anomalien (erfordert $\geq 10\%$ Blasten in KM oder PB)*</u>
Akute promyelozytäre Leukämie (APL) mit $t(15;17)(q24.1;q21.2)/PML::RARA\ddagger$
AML mit $t(8;21)(q22;q22.1)/RUNX1::RUNX1T1$
AML mit $inv(16)(p13.1q22)$ oder $t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB::MYH11$
AML mit $t(9;11)(p21.3;q23.3)/MLLT3::KMT2A\ddagger$
AML mit $t(6;9)(p22.3;q34.1)/DEK::NUP214$
AML mit $inv(3)(q21.3q26.2)$ oder $t(3;3)(q21.3;q26.2)/GATA2; MECOM(EVI1) \S$
AML mit anderen seltenen rekurrenten Translokationen
AML mit mutiertem <i>NPM1</i>
AML mit <i>in-frame bZIP CEBPA</i> - Mutationen ¶
AML mit $t(9;22)(q34.1;q11.2)/BCR::ABL1^*$

Kategorien mit der Bezeichnung AML (wenn $\geq 20\%$ Blasten in KM oder PB) oder MDS/AML (wenn 10-19% Blasten in KM oder PB)

AML und MDS/AML mit mutiertem *TP53* #

AML und MDS/AML mit Myelodysplasie-bezogenen Genmutationen

- Definiert durch Mutationen in *ASXL1*, *BCOR*, *EZH2*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *STAG2*, *U2AF1* oder *ZRSR2*

AML mit Myelodysplasie-bezogenen zytogenetischen Anomalien

AML nicht anderweitig spezifiziert

Myeloisches Sarkom

Akute Leukämie mit gemischter Linienzugehörigkeit

Akute undifferenzierte Leukämie

MPAL mit t(9;22)(q34.1;q11.2)/*BCR::ABL1*

MPAL mit t(v;11q23.3)/*KMT2A*-rearrangiert

MPAL, B/myeloisch, nicht anderweitig spezifiziert

MPAL, T/myeloisch, nicht anderweitig spezifiziert

Myeloische Proliferationen im Zusammenhang mit Down-Syndrom

Transiente abnorme Myelopoese im Zusammenhang mit Down-Syndrom

Myeloische Leukämie im Zusammenhang mit Down-Syndrom

Blastische plasmazytoide dendritische Zellneoplasie

Diagnostische Merkmale††

Therapiebezogen‡‡

- Vorangegangene Chemotherapie, Strahlentherapie, Immuneingriffe

Progression von MDS

- MDS sollte durch Standarddiagnostik und 3 Monate vor der AML-Diagnose bestätigt werden

Entwicklung aus MDS/MPN (Typ angeben)

- MDS/MPN sollte durch Standarddiagnostik und 3 Monate vor der AML-Diagnose bestätigt werden

Keimbahnprädisposition (Typ angeben)

KM: Knochenmark, PB: Peripheres Blut, MPAL: *mixed phenotype acute leukemia*.

*Eine Blastenzahl von $\geq 10\%$ im Knochenmark oder peripheren Blut ist erforderlich, außer bei AML mit t(9;22)(q34.1;q11.2)/*BCR::ABL1*, bei der eine Blastenzahl von $\geq 20\%$ im Knochenmark oder peripheren Blut erforderlich ist, da sie sich mit der Progression einer chronischen myeloischen Leukämie, *BCR::ABL1*-positiv, überschneidet.

†Andere wiederkehrende Translokationen, an denen *RARA* beteiligt ist, sollten entsprechend gemeldet werden: z. B. APL mit t(1;17)(q42.3;q21.2)/*IRF2BP2::RARA*; APL mit t(5;17)(q35.1;q21.2)/*NPM1::RARA*; APL mit t(11;17)(q23.2;q21.2)/*ZBTB16::RARA*; APL mit

kryptischer $inv(17)$ oder $del(17)(q21.2q21.2)/STAT5B::RARA$; $STAT3::RARA$; andere Gene, die selten mit *RARA* rearrangiert sind: *TBL1XR1* (3q26.3); *FIP1L1* (4q12); *BCOR* (Xp11.4).

‡Andere wiederkehrende Translokationen, an denen *KMT2A* beteiligt ist, sollten entsprechend gemeldet werden: z. B. AML mit $t(4;11)(q21.3;q23.3)/AFF1::KMT2A$; AML mit $t(6;11)(q27;q23.3)/AFDN::KMT2A$; AML mit $(10;11)(p12.3;q23.3)/MLLT10::KMT2A$; AML mit $t(10;11)(q21.3;q23.3)/TET1::KMT2A$; AML mit $t(11;19)(q23.3;p13.1)/KMT2A::ELL$; AML mit $t(11;19)(q23.3;p13.3)/KMT2A::MLLT1$.

§Andere wiederkehrende Translokationen mit *MECOM* sollten entsprechend gemeldet werden: z. B. AML mit $t(2;3)(p11.23;q26.2)/MECOM::?$; AML mit $t(3;8)(q26.2;q24.2)/MYC, MECOM$; AML mit $t(3;12)(q26.2;p13.2)/ETV6::MECOM$; AML mit $t(3;21)(q26.2;q22.1)/MECOM::RUNX1$.

||Andere seltene wiederkehrende Translokationen: AML mit $t(1;3)(p36.3;q21.3)/PRDM16::RPN1$; AML (megakaryoblastisch) mit $t(1;22)(p13.3;q13.1)/RBM15::MRTFA$; AML mit $t(3;5)(q25.3;q35.1)/NPM1::MLF1$; AML mit $t(5;11)(q35.2;p15.4)/NUP98::NSD1$; AML mit $t(7;12)(q36.3;p13.2)/ETV6::MNX1$; AML mit $t(8;16)(p11.2;p13.3)/KAT6A::CREBBP$; AML mit $t(10;11)(p12.3;q14.2)/PICALM::MLLT10$; AML mit $t(11;12)(p15.4;p13.3)/NUP98::KMD5A$; AML mit *NUP98* und anderen Partnern; AML mit $t(16;21)(p11.2;q22.2)/FUS::ERG$; AML mit $t(16;21)(q24.3;q22.1)/RUNX1::CBFA2T3$; AML mit $inv(16)(p13.3q24.3)/CBFA2T3::GLIS2$.

¶|AML mit *In-Frame*-Mutation in der bZIP-Domäne des *CEBPA*-Gens, entweder monoallel oder biallelisch.

#Das Vorhandensein einer pathogenen somatischen *TP53*-Mutation (mit einem Varianten-Allel-Anteil von mindestens 10%, mit oder ohne Verlust des Wildtyp-*TP53*-Allels) definiert die Entität AML mit mutiertem *TP53*.

**Zytogenetische Anomalien, die für die Diagnose einer AML mit MDS-bezogenen zytogenetischen Anomalien ausreichen und Abwesenheit anderer AML-definierender Krankheitskategorien. Komplexer Karyotyp: ≥ 3 unverbundene Chromosomenanomalien bei Abwesenheit anderer klassenbestimmender rekurrenter genetischer Anomalien; exklusive hyperdiploide Karyotypen mit drei oder mehr Trisomien (oder Polysomien) ohne strukturelle Anomalien. Unbalancierte klonale Anomalien: $del(5q)/t(5q)/add(5q)$; $-7/del(7q)$; $+8$; $del(12p)/t(12p)/(add)(12p)$; $i(17q)$, $-17/add(17p)$ oder $del(17p)$; $del(20q)$; und/oder $idic(X)(q13)$.

††Beispiele: AML mit Myelodysplasie-bezogener zytogenetischer Anomalie, therapiebezogen; AML mit Myelodysplasie-bezogener Genmutation, früheres myelodysplastisches Syndrom; AML mit Myelodysplasie-bezogener Genmutation, Keimbahn-*RUNX1*-Mutation.

‡‡Vorherige Therapie für nicht-myeloische Neoplasmen.

2.1.6 Genetische Risikostratifizierung und Prognose

Es gibt einige prognostische Faktoren, die für den Verlauf der AML bezogen auf das Ereignis-freie Überleben sowie das Gesamtüberleben relevant sind. Diese lassen sich in Patienten- und AML-assoziierte genetische Faktoren einteilen [39]. Der wichtigste Patienten-assoziierte prognostische Parameter ist das Alter wie weiter oben bereits ausführlich dargestellt [10].

Weitere Patienten-assoziierte prognostische Faktoren sind der Performance-Status sowie spezielle Komorbiditäten, da diese die Verträglichkeit der Therapie (meist Chemotherapie) beeinflussen [39].

Bezüglich AML-assoziiertes genetischer Faktoren lassen sich ebenfalls wichtige prognostische Erkenntnisse gewinnen [41]. Besonders relevant bei Diagnose sind die zytogenetischen sowie molekulargenetischen Besonderheiten der leukämischen Zellen [38] (siehe Tabelle 1).

Zur einheitlichen Bewertung der Risiken, die sich aus diesen genetischen Besonderheiten der leukämischen Zellen ergeben, hat das ELN 2010 erstmalig Empfehlungen entwickelt, die 2017 sowie 2022 aktualisiert wurden [38, 39, 42]. Diese genetische Risikostratifizierung teilt die AML nach spezifischen genetischen Besonderheiten in die drei Gruppen, günstig, intermediär und ungünstig, ein (Tabelle 2) [38]. Diese Einteilung nach ELN 2022 basiert hauptsächlich auf der Grundlage von Ergebnissen, die bei intensiv behandelten Patienten (Chemotherapie) beobachtet wurden [38].

Tabelle 2: Genetische Risikostratifizierung bei Erstdiagnose nach der Klassifikation des European LeukemiaNet 2022^a (modifiziert nach [38]).

Risikokategorie	Aberrationen
Günstig	t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1::RUNX1T1</i> ^{b,c}
	inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22) / <i>CBFB::MYH1</i> ^{b,c}
	Mutiertes <i>NPM1</i> ^{b,d} ohne <i>FLT3</i> -ITD
	bZIP <i>in-frame</i> mutiertes <i>CEBPA</i> ^e
Intermediär	Mutiertes <i>NPM1</i> ^{b,d} mit <i>FLT3</i> -ITD
	Wildtyp- <i>NPM1</i> mit <i>FLT3</i> -ITD
	t(9;11)(p21.3;q23.3) / <i>MLL3::KMT2A</i> ^{b,f}
	Zytogenetische Aberrationen, die nicht als günstig oder ungünstig eingestuft sind
Ungünstig	t(6;9)(p23;q34.1) / <i>DEK-NUP214</i>
	t(v;11q23.3) / <i>KMT2A (MLL)</i> -rearrangiert ^g

	t(9;22)(q34.1;q11.2) / <i>BCR::ABL1</i>
	t(8;16)(p11;p13) / <i>KAT6A:CREBBP</i>
	inv(3)(q21.3q26.2) oder t(3;3)(q21.3;q26.2) / <i>GATA2, MECOM (EVI1)</i>
	T83q26.2;v) / <i>MECOM (EVI1)</i> -rearrangiert
	-5 oder del(5q); -7; -17 / abn(17p)
	komplexer Karyotyp ^h (≥3 Aberrationen), monosomaler Karyotyp ⁱ
	Mutiertes <i>ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1</i> oder <i>ZRSR2</i> ^j
	Mutiertes <i>TP53</i> ^k
ITD: <i>Internal tandem duplication</i>	

^aHäufigkeiten, Ansprechraten und Ergebnismaße sollten nach Risikokategorien und, falls ausreichend Zahlen verfügbar sind, nach spezifischen genetischen Läsionen angegeben werden.

^bHauptsächlich basierend auf Ergebnissen, die bei intensiv behandelten Patienten beobachtet wurden. Die anfängliche Risikozuweisung kann sich im Laufe der Behandlung auf der Grundlage der Ergebnisse von Analysen der messbaren Resterkrankung ändern.

^cDas gleichzeitige Vorliegen einer *KIT*- und/oder *FLT3*-Genmutation ändert die Risikoeinschätzung nicht.

^dAML mit *NPM1*-Mutation und zytogenetischen Anomalien mit ungünstigem Risiko werden als ungünstiges Risiko eingestuft.

^eNur *In-frame*-Mutationen, die die *basic leucine zipper* (bZIP)-Region von *CEBPA* betreffen, unabhängig davon, ob sie als monoallelische oder biallelische Mutationen auftreten, wurden mit einem günstigen Ergebnis in Verbindung gebracht.

^fDas Vorhandensein von t(9;11)(p21.3;q23.3) hat Vorrang vor gleichzeitig vorkommenden seltenen Genmutationen mit ungünstigem Risiko.

^gOhne partielle Tandemduplikation (PTD) von *KMT2A*.

^hKomplexer Karyotyp: ≥3 nicht zusammenhängende Chromosomenanomalien in Abwesenheit anderer klassenbestimmender wiederkehrender genetischen Anomalien; schließt hyperdiploide Karyotypen mit drei oder mehr Trisomien (oder Polysomien) ohne strukturelle Anomalien aus.

ⁱMonosomaler Karyotyp: Vorhandensein von zwei oder mehr ausgeprägten Monosomien (ohne Verlust von X oder Y) oder einer einzigen autosomalen Monosomie in Kombination mit mindestens einer strukturellen Chromosomenanomalie (ausgenommen *Core binding factor*-AML).

^jVorläufig sollten diese Marker nicht als ungünstiger prognostischer Marker verwendet werden, wenn sie gleichzeitig mit AML-Subtypen mit günstigem Risiko auftreten.

^k*TP53*-Mutation mit einer Allelfrequenz von mindestens 10 %, unabhängig vom *TP53*-Allel-Status (mono- oder biallelische Mutation); *TP53*-Mutationen sind signifikant mit AML mit komplexem und monosomalem Karyotyp.

2.1.7 Aktuelle Therapiestrategien

Das Rückgrat der Behandlung für Patienten, die eine intensive Therapie erhalten, hat sich trotz vieler neuer Erkenntnisse über die AML seit über 40 Jahren wenig verändert [6]. Diese kurativ intendierte Behandlung ist immer noch eine Polychemotherapie mit oder ohne konsolidierende allogene Stammzelltransplantation [6]. Patienten, die unter Berücksichtigung von Komorbiditäten und Lebensalter für eine solch intensive Behandlung geeignet sind, erhalten zunächst eine Induktionstherapie nach dem so genannten „7+3“-Schema [43]. Dieses Schema besteht aus einer kontinuierlichen Gabe von Cytarabin (100-200 mg/m² Körperoberfläche) über 7 Tage sowie einer zusätzlichen intravenösen Gabe eines Anthrazyklins wie Daunorubicin oder Idarubicin (≥ 60 mg/m² Daunorubicin oder 12 mg/m² Idarubicin) an 3 aufeinanderfolgenden Tagen [43]. Das Ziel der Induktionstherapie ist es, eine komplette Remission (*complete remission*, CR) zu erzielen [27]. Bei jungen Patienten kann durch das 7+3 Schema in 60-85% der Fälle eine CR erreicht werden [43]. Ältere Patienten über 60 Jahre erreichen hingegen eine CR nur in 40-60% der Fälle [43].

Für einige Patienten eignet sich beim Vorliegen spezifischer Mutationen das Hinzufügen eines dritten Medikaments zum 7+3-Schema oder die Benutzung alternativer Schemata. Die zusätzliche Gabe des FLT3-Inhibitors Midostaurin zur Chemotherapie (7+3) verlängert beispielsweise das Gesamtüberleben bei Patienten mit einer AML bei der sich eine *FLT3*-Mutation nachweisen lässt [44]. Ein weiteres Medikament ist Gemtuzumab-Ozogamicin, ein humanisierter monoklonaler Antikörper gegen CD33, welcher an den zytotoxischen Wirkstoff Calicheamicin konjugiert ist [43]. Studien deuten darauf hin, dass für Patienten mit günstiger genetischer Risikostratifizierung nach ELN die zusätzliche Gabe von Gemtuzumab Ozogamicin zur Chemotherapie die Prognose verbessert [45]. Gerade bei älteren Patientinnen und Patienten ist dabei jedoch auch eine erhöhte Toxizität zu beobachten, sodass die Vorteile – zumindest in dieser Patientenkohorte - kritisch zu beurteilen sind [46, 47]. Einen Vorteil gegenüber konventionellem 7+3 in Bezug auf die Ansprechrate sowie das Gesamtüberleben weist das Medikament CPX-351 bei älteren Patienten mit MDS-assoziierter oder Therapie-assoziierter AML auf [38]. Hierbei handelt es sich um eine liposomal verkapselte Formulierung von Cytarabin und Daunorubicin in einem festen molaren Verhältnis von 5:1 [39, 48].

Nach Erreichen einer Remission erhalten die Patienten eine konsolidierende Postremissionstherapie. Diese kann eine konsolidierende Chemotherapie oder auch eine allogene Stammzelltransplantation umfassen. Die Abschätzung, ob eine allogene Stammzelltransplantation zu empfehlen ist, erfolgt anhand der genetischen Risikostratifizierung (siehe 2.1.8) unter Berücksichtigung der Komorbidität. Hier können Scores wie beispielsweise der *HCT-CI-Score* helfen, das Therapie-assozierten Todesrisikos

abzuschätzen [38]. Die Postremissionschemotherapie (auch Konsolidierungstherapie) umfasst bei Patienten unter 60 Jahren mit günstiger Prognose nach ELN-Risikostratifizierung zwei bis vier Zyklen Cytarabin in mittlerer Dosierung (1000–1500 mg/m² intravenös alle zwölf Stunden für drei Tage) [38]. Für Patienten mit intermediärer oder sogar ungünstiger Prognose nach ELN-Risikostratifizierung sollte aufgrund des höheren Rezidivrisikos eine allogene Stammzelltransplantation als effektive Konsolidierung in Betracht gezogen werden [38].

Da die AML aber eher eine Erkrankung des späten Erwachsenenalters ist [9], qualifizieren sich viele Patienten aufgrund ihres *ECOG-Scores* (> 2) oder altersbedingten Komorbiditäten wie zum Beispiel schwere Herzerkrankungen oder Lungenfunktionsstörungen nicht für eine intensive Chemotherapie [38]. Bis vor zwei Jahren war die Standardtherapie für diese Patienten eine niedrigdosierte Chemotherapie mit Cytarabin oder hypomethylierenden Substanzen wie Azacitidin (AZA) und Decitabin [38, 39]. Als Kombinationspartner für diese letztgenannten Substanzen wurde im Mai 2021 das Medikament Venetoclax von der *European Medicines Agency (EMA)* zugelassen. Dabei handelt es sich um einen niedermolekularen BCL2-Inhibitor, der die Prognose dramatisch verbessern kann [49]. Unter der Therapie mit AZA in Kombination mit Venetoclax lassen sich CR-Raten von 36,7% im Vergleich zu 17,9% unter alleiniger AZA-Therapie erreichen [49]. Wenn man die CR mit unvollständiger hämatologischer Erholung dazu zählt, werden sogar CR-Raten von 66,4% versus 28,3% erreicht [49]. Außerdem ließ sich das mediane Überleben mit der Kombinationstherapie von 9,6 Monate auf 14,7 Monate verlängern [49]. Diese Daten zeigen, weshalb sich die Kombinationstherapie mit AZA und Venetoclax für diese Patienten als neuer Goldstandard etabliert hat [38]. Trotz der beschriebenen Verbesserungen wird auch deutlich, dass ein großer Bedarf an effizienteren, Mechanismus-basierten und weniger toxischen Therapieansätzen besteht. Neben diesen Therapieoptionen bleibt ansonsten die Teilnahme an klinischen Studien oder die bestmögliche unterstützende Behandlung („*best supportive care*“) [38, 39].

2.2 Neue Therapieansätze

Neu entwickelte Substanzen versuchen dem aktuellen Bedarf an neuen Behandlungsmöglichkeiten mit zielgerichteten Therapien nachzukommen. Momentan gibt es viele verschiedene neue Ansätze und zahlreiche vielversprechende Substanzen, die sich in frühen Phasen der klinischen Prüfung befinden [50].

Zu diesen neuen Substanzen zählen zum Beispiel die bereits oben erwähnten FLT3-Inhibitoren (Gilteritinib) oder Apoptose-induzierende Substanzen wie BCL2-Inhibitoren (Venetoclax) [38, 51]. Andere Ansätze wie die Immuntherapie mit Checkpoint-Inhibitoren oder *chimeric antigen receptor* (CAR)-T-Zellen haben bei der AML – im Gegensatz zu vielen anderen Neoplasien – noch rein experimentellen Charakter [38].

Sehr vielversprechende Ansätze stellen auch epigenetische Modulatoren wie beispielsweise MMi (Ziftomenib), IDH1/IDH2-Inhibitoren (Ivosidenib/Enasidenib), HDAC-Inhibitoren (Pracinostat) oder DOT1L-Inhibitoren (Pinometostat) dar und stehen deshalb im Fokus der neuen Behandlungen [38, 39, 52, 53]. Die Entwicklung dieser Medikamente spiegelt die oben genannten Erkenntnisse der Grundlagenforschung wider, dass epigenetische Regulatoren bei mehr als 50% der diagnostizierten AML-Fälle mutiert sind [54].

2.2.1 Der Menin-MLL-Komplex und dessen Inhibition in AML

Epigenetische Veränderungen bei der AML können reversibel sein und stellen somit vielversprechende Zielstrukturen für eine mögliche Therapie dar [55]. Bei der Untersuchung von Translokationsbruchstellen in humanen Leukämien wurde in den frühen 90er-Jahren auf dem Chromosom 11q23 das Gen *MLL* entdeckt [56],[57]. Dieses entspricht den *Trithorax Group*-Genen der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* [57].

Diese Gruppe von Genen reguliert in der *Drosophila* die *Homeobox (HOX)*-Gene und wirkt der repressiven Wirkung von *Polycomb group*-Genen entgegen [57, 58]. Die *HOX*-Gene (Cluster A-D) des Menschen codieren für DNS-bindende Transkriptionsfaktoren und haben einen hohen Grad an entwicklungsgeschichtlicher Konservierung [59]. Man findet die höchste Expression der Cluster A, B und C in hämatopoetischen Stammzellen (HSC) oder unreifen Progenitorzellen und ihre Genexpression wird während der Differenzierung und Reifung herunterreguliert [59]. *HOX*-Gene spielen eine wichtige Rolle für die Selbsterneuerung von HSCs und die Überexpression einiger bestimmter *HOX*-Gene bewirkt in murinen HSCs deren leukämogene Transformation [59]. Die Mehrheit der Leukämie-Patienten weisen eine aberrante *HOX*-Expression auf [60].

Die MLL (auch KMT2)- Proteinfamilie ist evolutionär hoch konserviert [61]. MLL (auch KMT2A) ist eingebettet in einen großen Chromatin-assoziierten Multiproteinkomplex, welcher

über Histonmethyltransferase- sowie Deacetylaseaktivität verfügt und in der Lage ist, Chromatin zu modifizieren [55, 62, 63]. MLL selbst besitzt Histon-Methyltransferaseaktivität, die über eine am C-Terminus liegende SET-Domäne vermittelt wird [64]. Im speziellen wird Histon 3 am Lysin 4 mono-, di- oder trimethyliert (H3K4me1/me2/me3)[64]. MLL gehört somit zur Familie der SET/MLL H3K4-Methyltransferasen, die neben MLL noch weitere Proteine wie MLL2 (KMT2B), MLL3 (KMT2C), MLL4 (KMT2D) sowie SET1A (KMT2F) und SET1B (KMT2G) umfasst [64-66]. Alle Familienmitglieder verfügen über eine SET-Domäne und bilden Komplexe mit anderen Proteinen wie beispielsweise WDR5, RbBP5 und Ash2L [64-66]. Während sich Monomethylierungen (H3K4me1) eher an *Enhancer*-Regionen finden, lassen sich Dimethylierungen (H3K4me2) eher bei aktiven Genen und Trimethylierungen (H3K4me3) an aktiven Promotorregionen und innerhalb des *Gene-body* finden [66-68]. Der MLL-Multiproteinkomplex trimethyliert bevorzugt H3K4 [66], eine Markierung, die mit transkriptioneller Aktivierung assoziiert ist [69].

In Mäusen wurde gezeigt, dass *Mll* zwar nicht für die Initiation dieser *Hox*-Genexpression aber sehr wohl für deren Erhaltung während der Embryonalentwicklung notwendig ist [57, 70]. *Knock-out* Studien zeigen, dass eine Deletion von *Mll* in der Keimbahn während der Embryonalentwicklung letal ist [71, 72].

Am N-terminalen Ende interagiert MLL mit dem onkogenen Kofaktor Menin [69, 73]. Dieser vermittelt als Adapterprotein die Bindung von MLL an den Chromatin-assoziierten Linseneithel-assoziierten Wachstumsfaktor (LEDGF), was für die Rekrutierung des Wildtyp-MLLs an das Chromatin wichtig sein soll (siehe Abbildung 5) [69, 73]. Eine genetische Elimination von sowohl Menin als auch LEDGF führt zu einer deutlich verminderten Bindung von MLL an spezifische Zielgen-Regionen wie beispielweise die *HOX*-Gene [73-75].

In HSCs koordiniert der Menin-MLL-Komplex die Selbsterneuerung, Proliferation sowie linienspezifische Genexpression und ist notwendig für die normale Hämatopoese [55].

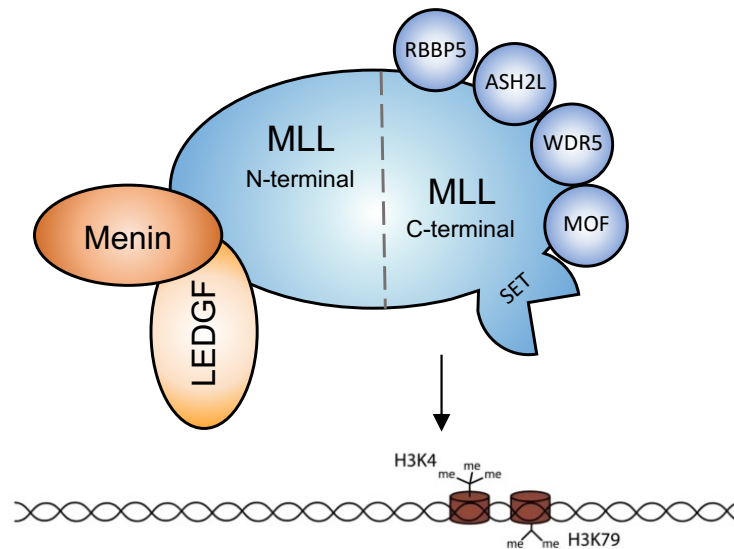


Abbildung 5: Modell des Menin-MLL-Komplexes in der normalen Hämatopoese, modifiziert nach Dafflon et al., *Oncotarget*, 2017 [76]. Das N-terminale Ende des Wildtyp-MLLs interagiert über Menin mit LEDGF. Am C-terminalen Ende findet sich die Histon-methylierende SET-Domäne sowie weitere Partner des Komplexes. Es werden nur ausgewählte Partner gezeigt.

Bei etwa 4% der erwachsenen Patienten mit AML lassen sich Translokationen finden, die das *MLL*-Gen auf Chromosom 11q23 umfassen (*MLL-Rearrangement (MLL-r)*) [72, 77, 78]. Die Translokation des *MLL*-Gens resultiert in der Formation eines onkogenen Fusionsproteins mit einem von mehr als 80 weiteren Fusionspartnern [79, 80]. Der bei der AML am häufigsten vorkommende *MLL*-Fusionspartner stellt AF9 dar, seltener vorkommende Fusionspartner sind ENL, ELL, AF10, AF6 und viele andere [78]. Einige Fusionspartner spielen eine Rolle in der transkriptionellen Kontrolle und Elongation [78, 81]. So ist ELN zum Beispiel ein Elongationsfaktor, der mit der RNA-Polymerase II assoziiert ist [78, 81].

Leukämien mit *MLL-Rearrangement (MLL-r)* zeigen ein für diesen Subtyp charakteristisches Genexpressionsprogramm mit hochregulierter Expression von unter anderem *HOXA*-Genen, *MEIS1*, *PBX3* und *MEF2C* [82-87]. *HOX* und *MEIS1* sind beispielsweise Transkriptionsfaktoren, die mit Selbsterneuerung assoziiert sind [88, 89]. Dieses Genexpressionsmuster spielt eine entscheidende Rolle in der malignen Transformation und leukämischen Progression von hämatopoetischen Stammzellen oder Progenitorzellen [86]. Es wird angenommen, dass *MLL*-Fusionsproteine an der Aktivierung eben dieses Musters entscheidend beteiligt sind [72, 78, 85]. Die bei der *MLL-r* AML am häufigsten vorkommende Translokation t(9;11), die zur Formation eines *MLL*-AF9 Fusionsproteins führt, ist mit einer intermediären, alle andere *MLL-r* mit einer ungünstigen Prognose verbunden [38].

Die Bindung an das Chromatin erfolgt sowohl beim Wildtyp- als auch beim onkogenen Menin-MLL-Komplex weiterhin wie bereits beschrieben über die Bindung des Adaptermoleküls Menin an LEDGF [73].

Ein weiteres Beispiel eines AML-Subtyps mit aberranter Expression von *HOX*- oder *MEIS1*-Genen stellt die AML mit Mutation im Nucleophosmin-1-Gen (*NPM1^{mut}*) dar [12]. Die *NPM1^{mut}* AML repräsentiert mit ungefähr 30% den häufigsten Subtyp einer AML im Erwachsenenalter [90]. Obwohl bei *NPM1^{mut}* AML in aller Regel keine zusätzlichen *MLL-r* vorliegen, konnte kürzlich demonstriert werden, dass die leukämogene Genexpression bei der *NPM1^{mut}* AML unter anderem von der Interaktion zwischen Menin und dem Wildtyp-*MLL*-Gen abhängig ist [12]. *NPM1* codiert für das multifunktionelle Protein NPM1, welches vielfältige Aufgaben in der Zelle übernimmt [90]. Neben seiner Aktivität als Histon-Chaperon, ist es zusätzlich während der Ribosomen-Biogenese, des Umbaus des Chromatins, der Mitose (Verdopplung der Zentrosomen), des mRNA-Transports, der DNS-Reparatur, der Replikation sowie Transkription aktiv [91-94]. Darüber hinaus spielt es eine Rolle bei der Apoptose und der Stabilisierung des Genoms [94]. Normalerweise ist NPM1 vor allem im Nukleolus lokalisiert und bewegt sich zwischenzeitlich zwischen Nukleus und Zytoplasma hin und her [90]. In der *NPM1^{mut}* AML kommt es pathogenetisch durch die Entstehung eines neuen C-terminalen *nuclear export signal (NES)* zu einer aberranten Lokalisation von NPM1 ins Zytoplasma. NPM1-Mutationen sind nahezu immer heterozygot, was darauf hindeuten könnte, dass eine gewisse Menge an Wildtyp-NPM1 essenziell für das Überleben der leukämischen Zellen ist [95, 96].

Die Menin-*MLL*-Interaktion kann durch niedermolekulare Inhibitoren (Beispiele sind MI-2-2 [97], MI-503 [98], MI-538 [99], VTP-50469 [100] oder Ziftomenib (KO-539) [101]) gehemmt werden und führt zur Herabregulierung der für die Subtypen der *MLL-r* und *NPM1^{mut}* AML charakteristischen Gensignatur (vor allem *MEIS1*, *PBX3*, *MEF2C* sowie *FLT3*) und Differenzierung leukämischer Blasten (siehe Abbildung 6 **A** und **B**) [100, 102]. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnte unser Labor und andere Gruppen vielversprechende anti-leukämische Aktivität in aggressiven Leukämiemodellen und primären Patientenproben nachweisen [12, 100, 102, 103]. Basierend auf diesen aussichtsreichen präklinischen Daten laufen aktuell erste klinische Phase-I-Studien zum Einsatz von MMi in AML-Patienten (NCT04067336, NCT04065399, NCT04752163, NCT04811560, NCT05153330, NCT04988555).

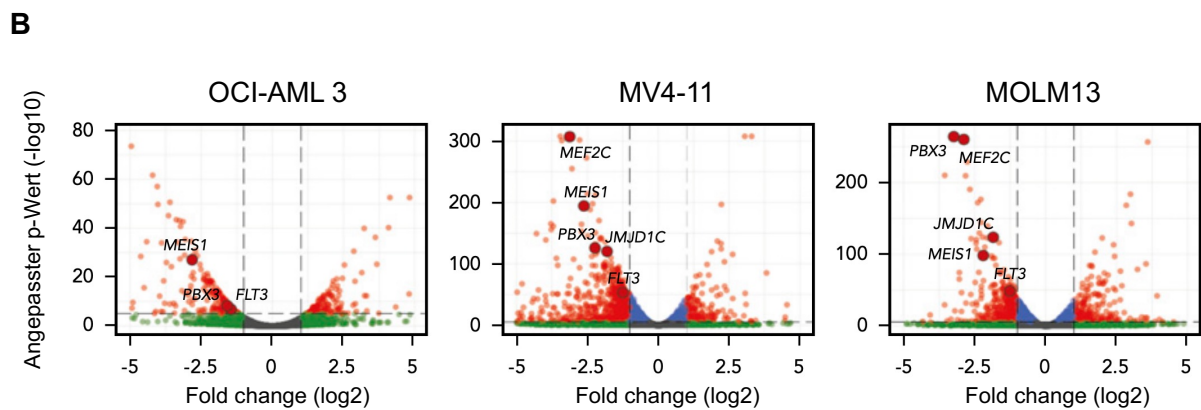
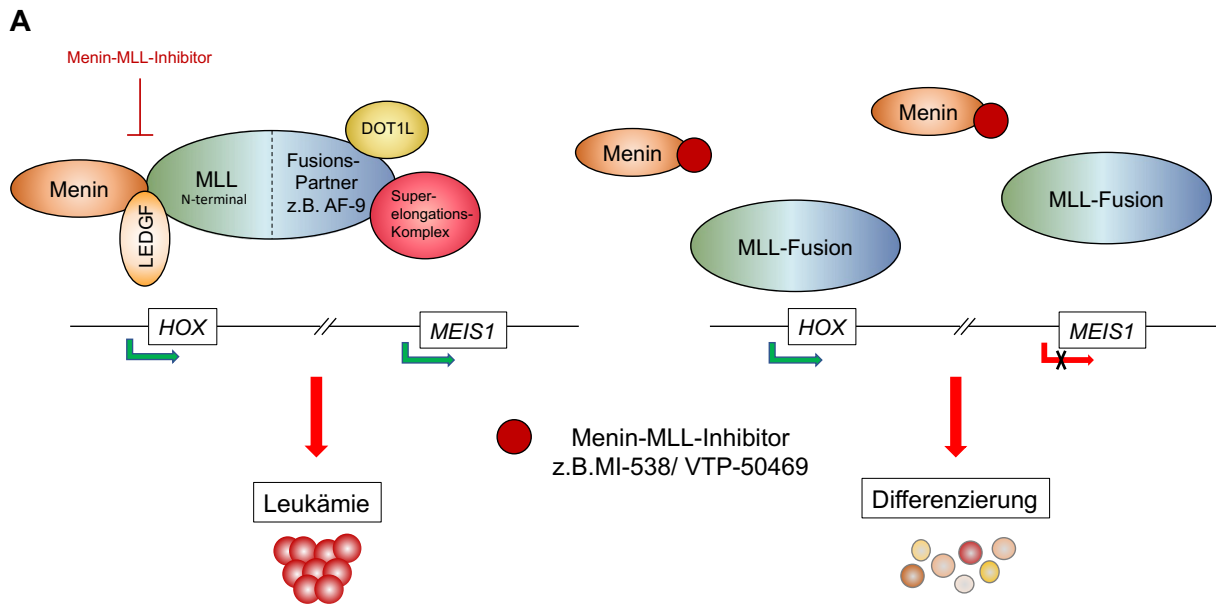


Abbildung 6: A Modell des Menin-MLL-Komplexes in der *MLL-r* AML ohne (links) und nach Menin-MLL-Inhibition (rechts), modifiziert nach Krivtsov et al., *Cancer Cell*, 2019 [100] und Dafflon et al., *Oncotarget*, 2017 [76]. **B** *Volcano-Plots* von RNA-seq-Daten der Zellen OCI-AML 3 (*NPM1^{mut}*), MV4-11 (*MLL-r*) und MOLM13-Zellen (*MLL-r*) nach Menin-MLL-Inhibition mit MI-503 (2,5 mM), modifiziert nach Dzama et al., *Blood*, 2020 [102].

2.2.2 Exportin-1 (XPO1) und dessen pharmakologische Inhibition in der AML

Für das Überleben einer Zelle ist es unabdingbar, dass bestimmte Proteine und RNAs aus dem Zellkern transportiert werden [104, 105]. Dies dient neben der Aufrechterhaltung des Zellzyklus auch der Proliferationsfähigkeit der Zellen [104, 105]. Das Protein XPO1 ist der wichtigste Mediator für diesen nukleär-zytoplasmatischen Export [104, 105]. Es gehört zur Karyopherin-Superfamilie der Subfamilie Importin- β und kann mindestens 221 Proteine mit nukleärem Exportsignal (NES) sowie einige RNAs aus dem Nukleus ins Zytoplasma transportieren [105, 106]. Proteine, die den XPO-1-vermittelten Export nutzen sind beispielsweise Tumorsuppressoren wie p53 [107, 108]. Weitere Beispiele sind in Tabelle 3 aufgeführt [109].

Tabelle 3: Effekt einer XPO1-Inhibition auf molekulare Zielstrukturen der AML (modifiziert nach Wang et al., Stem Cell Investig, 2019 [109]).

Zielstruktur (nukleäre Akkumulation)	Effekt der XPO-1-Inhibition
MDM2	Nukleäre p53-Retention und -Aktivierung
NPM1	Wiedergewinnung des nukleären NPM1
CEBPA	Nukleäre Retention und Aktivierung induziert Blasten-Differenzierung
FLT3, KIT	Reduktion
AKT	Herunterregulation der Zellproliferation
p53	Wiederherstellung des nukleären p53 und der p53-vermittelten Reaktion auf Stress; Aktivierung von p21 und p73
FOXO-Proteine	Förderung von Zellzyklus-Arrest, Apoptose und Herunterregulierung von AKT, PTEN, Wnt/ β -Catenin-Signalen
Topo II α	Nukleäre Retention und Sensibilisierung gegenüber Topoisomerase-II-Inhibitoren

XPO1-vermittelter Export erfolgt über die Interaktion mit Nukleoporinen (NUP214 und NUP88) mittels NES aus dem Nukleus [104, 107, 110]. Es konnte gezeigt werden, dass Krebszellen diesen Mechanismus nutzen, um Tumorstadium zu stimulieren und dabei Apoptose-Mechanismen zu entgehen [104]. XPO1 ist also nicht nur für den Export notwendig, sondern kann darüber hinaus auch zu Zellproliferation oder Apoptose beitragen [104]. Das erfolgt durch den nukleozytoplasmatischen Transport von NES-haltigen Tumorsuppressor- und onkogenen Proteinen, die Kontrolle des mitotischen Apparats und der Chromosomensegregation sowie die Aufrechterhaltung von nukleären und chromosomalen Strukturen [104].

Da XPO1 auch den Export von NPM1 vermittelt, könnten sogenannte XPO1-Inhibitoren ein potenzielles therapeutisches Target für die Therapie der *NPM1^{mut}* AML darstellen [108]. Wie weiter oben bereits erläutert (vgl. Kapitel 2.2.1), ist die *NPM1^{mut}* AML abhängig vom Export des mutierten NPM1 aus dem Nukleus und der daraufhin folgenden Lokalisation und Ansammlung im Zytoplasma [108]. Eine pharmakologische Inhibition des XPO1-Proteins in präklinischen Modellen führt zu einer Relokalisation des mutierten NPM1 und damit verbunden zu Differenzierung und Proliferationshemmung [108]. Darüber hinaus werden für die *NPM1^{mut}* AML typische Genexpressionsmuster wie *HOX/MEIS1* wieder herunterreguliert (siehe Abbildung 7) [108]. Zwei Vertreter dieser Gruppe sind die Substanzen Selinexor [111-113] und Eltanexor [114, 115]. Beide Substanzen sind selektive Inhibitoren des nukleären Exports (SINE), auch XPO1-Inhibitoren genannt. Selinexor als eine der ersten Substanzen dieser Klasse gehört zur ersten Generation, während das weiter entwickelte Eltanexor zur zweiten Generation gehört [114]. Beide Substanzen ähneln sich in ihren pharmakologischen Eigenschaften, Eltanexor weist jedoch eine deutlich geringere Penetration der Blut-Hirn-Schranke auf als Selinexor (>30-fach weniger) und ist deswegen für die Patienten besser verträglich [114]. Für SINE-Inhibitoren wurde präklinisch gezeigt, dass sie sich vor allem gegen bösartige Zellen richten, während die gesunden Zellen nur minimaler Toxizität ausgesetzt waren [112]. Aufgrund der vielversprechenden präklinischen Ergebnisse befinden sich aktuell sowohl Selinexor als auch Eltanexor in klinischen Studien zur Behandlung der AML (NCT02403310, NCT02649790).

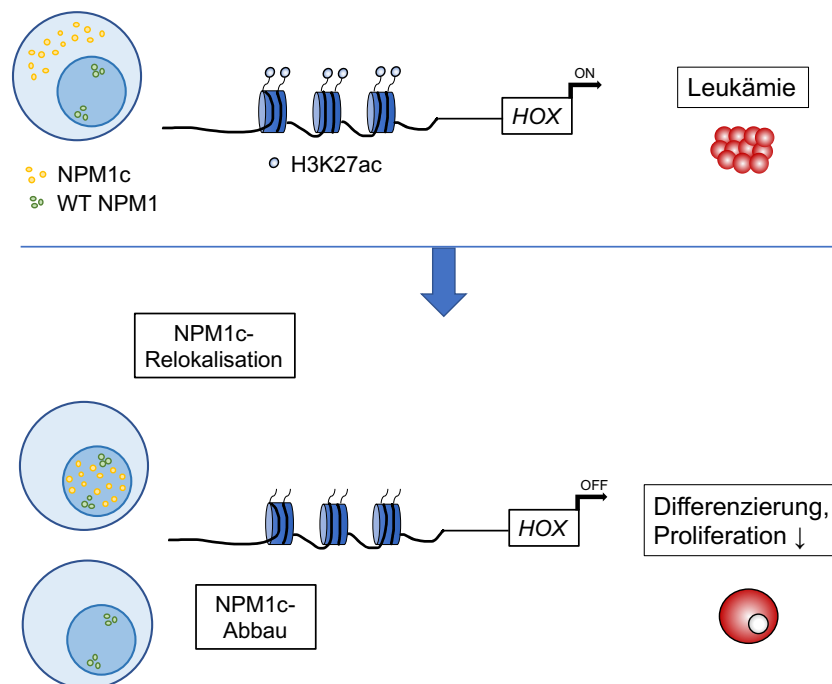


Abbildung 7: Modell der NPM1-Lokalisation in der *NPM1^{mut}*-AML ohne (oben) und nach XPO1-Inhibition (unten), modifiziert nach Brunetti et al., Cancer Cell, 2018 [108]. WT NPM1: Wildtyp NPM1, NPM1c: mutiertes NPM1 mit NES und Lokalisation im Zytoplasma, H3K27ac: Acetylierung des Lysinrests an der N-terminalen Position 27 des Histon-H3-Proteins.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zellen

Tabelle 4: AML-Zellen

Name	Beschreibung	Sequenzvariationen
HL-60	Humane AML-Zelllinie	<i>NRAS</i> mutiert, <i>TP53</i> -Deletion
IMS-M2	Humane AML-Zelllinie	<i>NPM1</i> mutiert <i>ETV6-NTRK3</i> -Fusionsgen
MOLM-13	Humane AML-Zelllinie	<i>FLT3</i> -ITD, <i>MLL-AF9</i> -Fusionsgen
MV4-11	Humane AML-Zelllinie	<i>FLT3</i> -ITD, <i>MLL-AF4</i> -Fusionsgen
OCI-AML3	Humane AML-Zelllinie	<i>NPM1</i> mutiert <i>DNMT3A</i> mutiert
<i>Npm1</i> ^{CA/+} <i>Flt3</i> ^{ITD/+} [116]	AML-Zellen aus einem murinen konditionalen <i>knock-in</i> Modell	<i>Npm1</i> mutiert <i>Flt3</i> -ITD

3.1.2 Primäre Zellen

Die primären Zellen aus Knochenmarkaspiraten wurden freundlicherweise von , III. Medizinische Klinik und Poliklinik der Universitätsmedizin Mainz, zur Verfügung gestellt oder direkt von Patienten der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Universitätsmedizin Mainz. Für alle verwendeten Proben wurde vor Probengewinnung eine schriftliche Einverständniserklärung nach ausführlicher Aufklärung im Einklang mit der Deklaration von Helsinki eingeholt. Ein positives Ethikvotum lag vor (Ethikvotum: 837.270.05(4928)).

Tabelle 5: Primäre Zellen

Probenbezeichnung	Geschlecht	Blastenanteil im Knochenmark	Sequenzvariationen
0027/13	weiblich	75%	<i>NPM1</i> mutiert, <i>FLT3</i> -ITD

3.1.3 Medien der Zellkultur und Zusätze

Tabelle 6: Medien

Verwendung	Zusammensetzung
Humane Zelllinien (OCI-AML 3, IMS-M2, MOLM13, MV4-11, HL-60)	RPMI 1640 10% Fetales Kälberserum (FKS) 1% Penicillin/Streptomycin 1% L-Glutamin
Murine Zellen (<i>Npm1^{CA/+}Flt3^{TD/+}</i>)	DMEM 15% FKS 1% Penicillin/Streptomycin 100 ng/ml SCF 20 ng/ml IL-3 20 ng/ml IL-6
Serum-freies Medium (Primäre AML-Proben)	StemSpan 1% Penicillin/Streptomycin StemRegenin 1 1µM 2-Mercaptoethanol 0,1mM 100 ng/ml SCF 20 ng/ml IL-3 20 ng/ml G-CSF 50 ng/ml FLT3L
Auftau-Medium (Primäre AML-Proben)	IMEM 10% FKS 1% Pen/Strep DNase (1µg/ml)
Einfrier-Medium	90% FKS 10% DMSO

3.1.4 Niedermolekulare Inhibitoren

Tabelle 7: Niedermolekulare Inhibitoren

Substanzname	Substanzklasse	Hersteller
Alisertib	Aurora-A-Kinase-Inhibitor	MedChemExpress, USA
AMG-232	p53-MDM2-Inhibitor	AdooQ BioScience, USA
APR-246 (PRIMA-1Met)	p53 ^{mut} -Reaktivator	MedChemExpress, USA
APTO-253	c-MYC-Inhibitor	
AZD4573	CDK9-Inhibitor	
AZD5991	MCL-1-Inhibitor	AdooQ BioScience, USA
Barasertib	Aurora-B-Kinase-Inhibitor	MedChemExpress, USA
Birabresib	BRD2/3/4-Inhibitor	
Cobimetinib	MEK1-Inhibitor	
Dasatinib	BCR-ABL-, SRC-, c-KIT-Inhibitor	

Eltanexor	Exportin-1-Inhibitor	Selleck Chemicals, USA	
Entinostat	HDAC-Inhibitor	MedChemExpress, USA	
Entospletinib (GS-9973)	SYK-Inhibitor		
GSK2879552	LSD1-Inhibitor		
Idasanutlin	MDM2-Antagonist		
JQ1	BET-Inhibitor		
Mebendazole	Hedgehog-Inhibitor		
MI-503	Menin-MLL-Inhibitor		Selleck Chemicals, USA
MI-538	Menin-MLL-Inhibitor	MedChemExpress, USA	
Nilotinib	BCR-ABL-Inhibitor		
Olaparib	PARP-Inhibitor		
ORY-1001	KDM1A/LSD-1-Inhibitor		
Pacritinib	JAK2-Inhibitor		
Palbociclib	CDK4/ CDK6-Inhibitor		
Pevonedistat	NEDD8-Aktivatorenzym-Inhibitor		
Pracinostat	HDAC-Inhibitor		
Rapamycin	mTOR-Inhibitor		
Ribociclib	CDK4/ CDK6-Inhibitor		
Rigosertib	PI3K/PLK1-Inhibitor		
Ruxolitinib	JAK1/2-Inhibitor		
S63845	MCL1-Inhibitor		
Selinexor	Exportin-1-Inhibitor		Selleck Chemicals, USA
TAK-659	SYK/FLT3-Inhibitor		MedChemExpress, USA
Talazoparib	PARP1/2-Inhibitor		
THZ1	CDK7-Inhibitor		
Tosedostat	Aminopeptidase-Inhibitor	AdooQ BioScience, USA	
Vemurafenib	B-RAF-Inhibitor	MedChemExpress, USA	
Volasertib	PLK-1-Inhibitor		

3.1.5 Chemikalien, Reagenzien und Zusätze

Tabelle 8: Medikamente, Chemikalien, Reagenzien und Zusätze

Bezeichnung	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, USA
4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Roth, DE
A/G Agarose Beads	Merck, DE
All-trans-Retinsäure (ATRA, RAR-Agonist)	Abcam, UK
Bovines Serumalbumin (BSA)	Pan- Biotech, DE
DEPC-behandeltes Wasser	Thermo Fisher Scientific, USA
Desoxcholsäure	Sigma Aldrich, USA

Dimethylsuloxid (DMSO)	Sigma Aldrich, USA
DMEM	Gibco, USA
dNTP Mix (je 10 mM)	Biozym, DE
Dulbecco's Phosphate buffered Saline (PBS)	Sigma Aldrich, USA
EDTA (0,5 M), ph 8,0	Thermo Fisher Scientific, USA
Ethanol (99,8%)	Sigma Aldrich, USA
FACS Flow	BD Biosciences, USA
FKS	Thermo Fisher Scientific, USA
Formaldehyd	Sigma Aldrich, USA
Glycerol (87%)	Roth, DE
Humanes FLT3-L	PeptoTech, USA
Humanes G-CSF	PeptoTech, USA
Humanes GM-CSF	PeptoTech, USA
Humanes IL-3	PeptoTech, USA
Humanes SCF	PeptoTech, USA
IMDM	Gibco, USA
L-Glutamin (200mM)	Sigma Aldrich, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, DE
Natriumazid	Roth, DE
Penicillin/Streptomycin	Sigma Aldrich, USA
PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix	Thermo Fisher Scientific, USA
ProteaseArrest	G-Biosciences, USA
RPMI 1640	Gibco, USA
StemRegenin 1	StemCell, Canada
StemSpan™ SFEM	StemCell, Canada
Tris-Base	Roth, DE
Trypanblau 0,4%	Thermo Fisher Scientific, USA

3.1.6 Puffer

Tabelle 9: Puffer

Bezeichnung	Zusätze
Puffer (ChIP)	1% SDS 10 mM EDTA 50 mM TRIS-HCl pH 8 Protease-Inhibitor (1:100)
Verdünnungs-Puffer (ChIP)	0,01% SDS 1,1% Triton-X100 1,2 mM EDTA 16,7 mM TRIS-HCl pH 8

	167 mM NaCl
Salzärmer Puffer (ChIP)	0,1% SDS 1% Triton-X100 2 mM EDTA 20 mM TRIS-HCl pH 8 150 mM NaCl
Salzreicher Puffer (ChIP)	0,1% SDS 1% Triton-X100 2 mM EDTA 20 mM TRIS-HCl pH 8 500 mM NaCl
LiCl- Wasch-Puffer (ChIP)	0,25 M LiCl 1% Desoxycholsäure 1 mM EDTA 1% IGEPAL-CH 630 10 mM TRIS-HCl pH 8
TE-Puffer (ChIP)	1 mM EDTA 10 mM TRIS-HCl pH 8
A/G-Agarose-Beads	50% A/G-Sepharose 0,05% Natriumazid 0,05% BSA TE-Puffer bis zu 50 ml
Elutions-Puffer	0,21 g Natriumbikarbonat 2,5 ml 10% SDS dH ₂ O bis 25 mL

3.1.7 Primer

3.1.7.1 qRT-PCR-Primer

Tabelle 10: qRT-PCR-Primer

Primer	Vorwärts	Rückwärts
<i>β2M</i>	CCAGCAGAGAATGGAAAGTC	GATGCTGCTTACATGTCTCG
<i>FLT3</i>	TCACACTGCAAGTGCTGGTC	CCAGCTTGGGTTTCTGTCAT
<i>HOXA9</i>	CACCAGACGAACAGTGAGGA	TGGTCAGTAGGCCTTGAGGT
<i>HOXA10</i>	CCTACACACGAAGCACCAGACA	GATCCGGTTTTCTCGATTCA
<i>HOXB3</i>	CCTGGCCTGAGAGGTTGCT	TCCCGGGCGTGGAATT
<i>MEIS1</i>	TCGCGCAGAAAAACCTCTAT	CCAAGAGGGCTGGTCAGTTA

3.1.7.2 ChIP-Primer

Tabelle 11: ChIP-Primer

Primer	Vorwärts	Rückwärts
<i>MEIS1</i>	CCGCACACAGCTCATACCAA	AAGAGGGAAGCGTTGAGTCT
<i>SOX2</i>	CAGGAGTTGTCAAGGCAGAGA	CCGCCGCCGATGATTGTTA
<i>HOXA9</i>	CCCAGTAAGTGTCTCCTCCCT	CCCTATCTGAGGCGTCCCAA

3.1.8 Antikörper

Tabelle 12: Antikörper

Antigen	Klon	Verdünnung	Hersteller
Annexin V Apoptose APC-konjugiert	-	1:25	eBioscience, USA
Humanes CD11b APC-konjugiert	M1/70	1:25	BioLegend, USA
IgG (Kaninchen)	12-370	1:100	EMD Millipore, DE
Menin	A300-105A	1:100	Bethyl, USA
MLL	A300-086A	1:100	Bethyl, USA

3.1.9 Kits

Tabelle 13: Kits

Bezeichnung	Hersteller
Annexin V Apoptose-Detektionskit APC	eBioscience, USA
DNA-Purifikationskit	Qiagen, DE
RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific, USA
RNeasy Mini Kit + QIASHredder	Qiagen, DE

3.1.10 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 14: Verbrauchsmaterialien

Kategorie	Bezeichnung	Hersteller
Mikrotiterplatten	6-Kavitätenplatte	Greiner Bio-One, AT/DE
	12-Kavitätenplatte	
	24-Kavitätenplatte	

	96-Kavitätenplatte	
	384-Kavitätenplatte	Thermo Fischer Scientific, USA
Handschuhe	Einweghandschuhe	Abena, DK
Gefäße	Eppendorf Safe-Lock Gefäße 1,5/ 2 ml	Greiner Bio-One, AT/DE
	Zentrifugenröhrchen 15/ 50 ml	Greiner Bio-One, AT/DE
Pipettenspitzen	Ohne Filter: 10µl, 200µl, 1000µl	Greiner Bio-One, AT/DE
	Mit Filter: 10µl, 100µl, 300µl, 1000µl	Starlab, DE
Pipetten	5/10/25/50 ml	Greiner Bio-One, AT/DE
PCR	MicroAmp <i>Fast 96-well reaction</i>	Life Technologies, USA
	MicroAmp Optical Adhesive Film	Life Technologies, USA
Zellkultur	Zählkammer	VWR, USA
	Zellkulturflaschen 40 ml/ 100 ml	Greiner Bio-One, AT/DE

3.1.11 Laborgeräte

Tabelle 15: Laborgeräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Durchflusszytometer	BD FACSCanto™ II	BD Biosciences, USA
Einfrierbehälter	NALGENE Cryo 1° Freezing Container	Nalgene, USA
Feinwaage	440-33	Kern, DE
Heizblock	N2400-4002	Starlab, DE
Inkubator	HERA Cell 240i	Thermo Fischer Scientific, USA
Kühlschrank	Kombinierter +4°C/-20°C Kühlschrank Premium	Liebherr, DE
	-80°C U570 Premium <i>Ultra low temperature freezer</i>	New Brunswick Scientific, USA
Mehrkanalpipetten	Research plus	Eppendorf, DE
Mikroskop	CKX-41	VWR, USA
Nanodrop	Nanodrop One	Thermo Fisher Scientific, USA
PCR-System	QuantStudio3	Thermo Fisher Scientific, USA
	C1000 Thermozykler	BIO-RAD, USA
Pipetten	Transferpette	Brand, DE
	Research Plus ES10, ES20, ES200, ES1000	Eppendorf, DE

	PipetBoy	Integra Biosciences, CH
Sauger	Vacusaft	Integra Biosciences, CH
Sonicator	Bioruptor Plus	Diagenode, BE
Sterilbank	Herasafe	Thermo Fischer Scientific, USA
Stickstofftank	-120°C NO ₂ -Kühleinheit	Cryopal, FR
	NO ₂ -Tank XL 180	Taylor-Whartor, USA
Timer	WB388	Roth, DE
Vortexer	TXU	Velp Scientifica, IT
Wasserbad	Certomat WR	B. Braun, DE
Zentrifuge	Centrifuge 5810R, 5415R	Eppendorf, DE

3.1.12 Software

Tabelle 16: Software

Name	Entwickler
CalcuSyn	ComboSyn, Inc.
FlowJo 10	FlowJo, LLC
Graphpad Prism 9	Graphpad Software Inc.
Microsoft Excel, Power-Point, Word	Microsoft Corporation

3.2 Methoden

3.2.1 Methoden der Zellkultur

3.2.1.1 Auftauen der humanen Zelllinien und murinen Zellen

Die Zellen wurden bei -196°C in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Zur Aufnahme in Kultur wurden die entsprechenden Zellen zunächst in einem 37°C -warmen Wasserbad für eine Minute nahezu gänzlich aufgetaut und anschließend im jeweiligen Kulturmedium (siehe Kapitel 3.1.3) in einem Verhältnis von 1:10 in einem 15 ml- Zentrifugenröhrchen suspendiert. Nach zehn Minuten bei Raumtemperatur wurde die Suspension zentrifugiert (1500 Umdrehungen pro Minute für fünf Minuten), der Überstand abgesaugt und die Zellen erneut in frischem Kulturmedium (siehe 3.1.3.) in einer Zellkulturfläche suspendiert.

3.2.1.2 Auftauen der primären Zellproben

Die primären Zellproben wurden wie die Zelllinien bei -196°C in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Zur Aufnahme in die Zellkultur wurden die einzelnen Proben in einem 37°C -warmen Wasserbad nahezu gänzlich aufgetaut und dann in einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen mit 10 ml IMDM-Medium, welches zuvor mit 10% fetalem Kälberserum, 1% Penicillin/Streptomycin und $1\mu\text{g/ml}$ DNase angereichert wurde, suspendiert. Nach zehn Minuten wurde die Suspension zentrifugiert (800 Umdrehungen pro Minute, acht Minuten), der Überstand abgesaugt und die Zellen in frischem Kulturmedium (siehe 3.1.3) suspendiert. Anschließend wurden die Zellen auf einer 6-Kavitätenplatte verteilt und nach ein bis zwei Tagen in eine Zellkulturflasche überführt.

3.2.1.3 Kultivierung der Zellen

Wie unter 3.1.3 aufgeführt wurden die humanen Zelllinien OCI-AML3, IMS-M2, HL-60, MV4-11 und MOLM-13 in RPMI-1640-Medium kultiviert, welches mit 10% FKS, 1% Pen/Strep und 1 % L-Glutamin angereichert wurde. Die murinen Zellen *Npm1^{CA/+}Flt3^{ITD/+}* wurde in DMEM-Medium, angereichert mit 15% FKS, 1% Pen/Strep und Zytokinen (100 ng/mL SCF, 20 ng/mL, IL-3 sowie IL-6), kultiviert. Die primären Zellproben wurden in Serum-freiem Medium (StemSpan), angereichert mit $1\mu\text{M}$ StemRegenin, $0,1\text{ mM}$ 2-Mercaptoethanol, 100 ng/mL SCF, 20 ng/mL IL-3, G-SCF und 50 ng/mL FLT3-L kultiviert. Die Inkubation erfolgte im Inkubator unter standardisierten Bedingungen (37°C , $>90\%$ Luftfeuchtigkeit sowie $5\% \text{ vol CO}_2$) in je 10 ml des jeweiligen Mediums. Alle Zellen wurden höchstens bis zu zwei Monate in Kultur gehalten und je nach Dichte der Zellen in zwei- bis dreitägigen Abständen verdünnt.

3.2.1.4 Bestimmung der Anzahl lebender Zellen

Die Bestimmung der Anzahl lebender Zellen erfolgte nach Trypanblau 0,4%-Färbung sowie mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer mit einer Kammertiefe von 0,1 mm (Kammerfaktor 10^4). Gezählt wurden nur die Trypanblau-exkludierenden, weißen Zellen. Hierzu wurde folgende Formel verwendet: Zellen/ml= gezählte Zellen pro Quadrant x Verdünnungsfaktor x 10^4 .

3.2.2 Zellproliferationsverhalten der humanen und murinen Zellen

Um die Zellproliferation unter Behandlung mit verschiedenen Medikamenten zu bestimmen wurden 20 000 lebende, Trypanblau-exkludierende Zellen pro Kavität in 100 μ L Medium in Triplikaten in 96-Kavitätenplatten ausgesät. Zur Bestimmung des IC_{50} -Werts der einzelnen Medikamente wurden die Zellen mit je 50 μ L der MMI, der XPO1-Inhibitoren oder der beiden Inhibitoren in Kombination behandelt. Durch jeweilige Verdünnung der Kavitäten im Verhältnis 1:2 angefangen mit der höchsten Konzentration wurden insgesamt neun unterschiedliche Konzentrationen erreicht. Als Kontrolle wurden zudem Zellen mit dem Lösungsmittel DMSO (2,5 μ M) behandelt. Die höchste Konzentration von MI-503/ MI-538 betrug 2,5 μ M. Die Zellviabilität wurde mittels Durchflusszytometrie und mit Hilfe einer DAPI (1 μ g/mL)- Färbung an Tag 4, 7 und 11 der Behandlung bestimmt. Das Volumen von 20 000 lebenden Zellen in der DMSO- Kontrolle an Tag 4 und 7 wurde berechnet und jeweils aus allen Kavitäten auf eine neue 96-Kavitätenplatte in je 100 μ L PBS überführt. Die Zellen wurden anschließend zentrifugiert und der Überschuss entfernt. Abschließend erfolgte eine Suspension in neuem Medium sowie eine erneute Behandlung mit den entsprechenden Medikamenten. Die Experimente zur Charakterisierung der Kombination aus MI-538 und Eltanexor (300 nM) erfolgten wie oben beschrieben. Die Behandlungsdauer mit den Einzelsubstanzen betrug viereinhalb Tage für MI-538 und zwei Tage für Eltanexor. Für die Kombinationstherapie erfolgte die Therapie mit MI-538 ebenfalls für viereinhalb Tage (MI-538) wovon Eltanexor in den letzten zwei Tagen für die Kombinationstherapie hinzugegeben wurde. Synergismus-Effekte wurden durch Berechnung von Kombinations-Indizes (KI) mit Hilfe der CompuSyn-Software berechnet. Grundlage ist hier die Chou-Talalay-Methode und die Berechnung erfolgt nach folgender Formel : $KI = \sum_{j=1}^n \frac{(D)^j}{(Dx)^j}$ mit KI als Kombinationsindex, j als Laufvariante, n als Endwert sowie D als Dosis und Dx als die Dosis jedes einzelnen Medikaments, das eine Hemmung von x% bewirkt [117]. Allgemein deuten KI-Werte von < 1 auf Synergismus hin, während KI-Werte von = 1 auf additive Effekte und KI-Werte von > 1 auf Antagonismus zwischen den getesteten Substanzen hinweist [117]. Die Autoren unterteilen weiter in: sehr starker Synergismus (KI<0,1), starker Synergismus (KI=0,1-0,3), Synergismus (KI=0,3-0,7), moderater Synergismus (KI=0,7-0,85), leichter Synergismus

(KI=0,85-0,9), additiv (KI=0,9-1,1), leichter Antagonismus (KI=1,1-1,2), moderater Antagonismus (KI=1,2-1,45), Antagonismus (KI=1,45-3,3), starker Antagonismus (KI=3,3-10) sowie sehr starker Antagonismus (KI>10).

3.2.3 Zellproliferationsverhalten in primären Zellen

Die primären Patientenproben wurden ebenfalls wie unter 3.2.2 beschrieben ausgesät und mit verschiedenen Konzentrationsstufen (1:4- Verdünnung) der Einzelbehandlung (Höchstkonzentration: 100 nM VTP-50469 oder 200 nM Eltanexor), der Kombination (100 nM VTP-50469 und 200 nM Eltanexor) oder der Kontrolle (DMSO) für viereinhalb Tagen/zwei Tage behandelt. Die Anzahl der lebenden Zellen (DAPI-negativ) wurde mittels Durchflusszytometrie erhoben (siehe 3.2.4.).

3.2.4 Durchflusszytometrie

Die Analyse der Zellen (siehe 3.2.2.) erfolgte im Durchflusszytometer. Die Zellen werden dazu fluoreszenzmarkiert, beispielsweise mit einem Fluoreszenzfarbstoff oder einem fluoreszenzmarkierten Antikörper und durch das Fluidsystem transportiert [118, 119]. Im Gerät erfolgten eine hydrodynamische Fokussierung und Vereinzelung der Zellen [119]. Diese fließen dann mit laminarer Strömung durch einen Laserstrahl [119]. Durch verschiedene Detektoren können die Zellen dann analysiert werden [118, 119]. Die Vorwärtsstreuung (Forward Scatter, FSC) ist ein Maß für die Größe des sogenannten Events (zum Beispiel einer Zelle), die Seitwärtsstreuung (Side Scatter, SSC) ist ein Maß für die Granularität [118]. Bei der Messung mit Färbung der Zellen werden die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffs durch den Laser angeregt, bei Abgabe dieser Energie wird dann Licht in spezifischen Wellenlängen emittiert, welches durch spezifische Fluoreszenz-Detektoren genau quantifiziert und gleichzeitig detektiert werden kann [119, 120]. Zur Auswertung wird in der Regel ein Dot- Plot erstellt werden, indem FSC gegen SSC aufgetragen wird, um so bestimmte Merkmale (wie zum Beispiel verschiedene Zelltypen) genauer zu analysieren [118].

3.2.4.1 Bestimmung der Zellviabilität

Die zu messenden Proben wurden mit DAPI (1µg/ml), gelöst in PBS und 2,2 µM EDTA, gemischt. Dafür wurden pro Kavität einer neuen 96-Kavitätenplatte zu 180 µl DAPI/PBS-Gemisch 20 µl der behandelten und durchmischten Zellen hinzugefügt. Die Messung erfolgte im FACSCanto II- Durchflusszytometer, wo die Anzahl lebender Zellen in 25 µl der 1:10

verdünnten Probe bestimmt wurde. Die Datenauswertung erfolgte mittels der FlowJo 10-Software.

3.2.4.2 Färbung für den Monozyten-Differenzierungsmarker CD11b

CD11b wurde als Maß für den monozytoiden Differenzierungsgrad der Zellen ausgewählt. OCI-AML 3-Zellen wurden mit MI-538 (2,5µM) für vier Tage, Eltanexor (300 nM) für zwei Tage sowie der Kombination (MI-538 und Eltanexor) für vier Tage/zwei Tage behandelt. Anschließend wurden die Zellen in 150 µl kaltem PBS zwei Mal gewaschen und anschließend in 30 µl PBS resuspendiert. Die Färbung erfolgte mittels Zugabe von 1,5 µl des APC-konjugierten CD11b-Antikörper für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln. Anschließend folgte ein erneuter Waschschrift in kaltem PBS sowie zur Viabilitätsbestimmung eine Färbung mit DAPI (1 µg/ml) in PBS/EDTA. Die Messung erfolgte wie unter 3.2.3.1 beschrieben.

3.2.4.3 Apoptose-Analysen/ Annexin-V-Färbung

Die Analyse und Bestimmung der apoptotischen Zellen erfolgte ebenfalls im Durchflusszytometer mittels des Annexin-V-Apoptose-Detektionskit APC. Annexin-V ist ein Protein, welches bei apoptotischen Zellen an Phosphatidylserin bindet und als Marker für Apoptose fungiert, wenn es sich auf der äußeren Oberfläche befindet [121]. Die Anzahl apoptotischer Zellen entspricht der Summe aus Annexin-V-positiven/ DAPI-negativen Zellen und Annexin-V-positiven/ DAPI-positiven Zellen. DAPI diffundiert durch die perforierte Zellmembran von toten Zellen und färbt diese [122]. 200 µl der behandelten Zellen wurden in eine 96-Kavitätenplatte ausgesät, zentrifugiert (1500 Umdrehungen pro Minute, fünf Minuten) und in 150 µl PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Entfernung des Überstands wurden 30 µl des Bindungspuffers des Kits sowie 1,5 µl des Annexin-V-Konjugats (1:20) hinzugegeben. Das Gemisch wurde dann bei 4° C im Dunkeln für 30 Minuten inkubiert und danach 170 µl Bindungspuffer mit DAPI (1 µg/mL) in einer Verdünnung von 1:600 hinzugefügt. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Analyse.

3.2.5 Genexpressionsanalysen

Genexpressionsanalysen werden eingesetzt, um herauszufinden, wie genetische Information umgesetzt und übersetzt wird. Man kann die Expression multipler und spezifisch ausgewählter Gene von zwei oder mehreren Proben miteinander vergleichen. Dadurch lassen sich sowohl Aussagen über die Qualität als auch Quantität der Expression von Genen treffen. Dies erlaubt einen Einblick in die Rolle unterschiedlicher Genexpression und kann zum Beispiel dazu genutzt werden, die Effekte von Behandlungen auf die Zellen genauer zu verstehen und dadurch vielleicht Ansatzpunkte für neue Therapiestrategien zu finden.

3.2.5.1 Behandlung der Zellen

Mithilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde das Volumen von 750 000 OCI-AML3-Zellen je Ansatz ermittelt, anschließend in ein 15 ml- Rörchen transferiert und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 5 ml frischem Medium resuspendiert. Anschließend erfolgt die Behandlung mit MI-538 (2,5 µM), DMSO (2,5 µM), Eltanexor (300 nM) und der Kombinationstherapie aus MI-538 und Eltanexor.

3.2.5.2 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde zunächst das Volumen für 10^6 lebende, Trypanblau-exkludierende Zellen bestimmt. Alle weiteren Schritte erfolgten entsprechend den Angaben des Herstellers.

3.2.5.3 Komplementäre DNA-Synthese (cDNA)

Zur Synthese der komplementären DNA (cDNA) wurde das RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit von Thermo Fisher Scientific verwendet. In ein steriles, Nuklease-freies Eppendorfgefäß wurden 1,5 µg der oben gewonnenen RNA und 1 µl der Oligo-dT-Primer gegeben. Die Probe wurde dann bis auf 12 µl mit Nuklease-freiem Wasser aufgefüllt, gemischt, leicht zentrifugiert und bei 65°C für fünf Minuten inkubiert. Danach wurde die Probe auf Eis abgekühlt, leicht zentrifugiert und zurück auf Eis gestellt. Im nächsten Schritt wurden 4 µl des 5X Reaktionspuffers, 1 µl des RiboLock RNase Inhibitors (20 U/µl), 2 µl des 10 mM dNTP Mix, 1 µl des RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase (200 U/µl) hinzugefügt, sodass ein Endvolumen von 20 µl entstand. Die Probe wurde nun erneut gemischt und zentrifugiert. Es folgte ein weiterer Inkubationsschritt für 60 Minuten bei 42°C. Um die Reaktion zu beenden, wurde die Probe für fünf Minuten auf 70° C erhitzt.

3.2.5.4 Quantitative *Real-Time*-Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Für die qPCR wurde pro Primer-Paar ein Mastermix mit einem Endvolumen von 18 µl/Kavität angesetzt. Jeder Mastermix pro Kavität bestand aus 6 µl Wasser, 1 µl Vorwärtsprimer (10 µM), 1 µl Rückwärtsprimer (10 µM) und 10 µl SYBR Green 1 Mastermix. Die Proben wurden in Triplikaten gemessen. Die gewonnene cDNA wurde in einer 1:2-Verdünnung mit Wasser verdünnt. Danach wurden 2 µl der cDNA in jede entsprechende Kavität auf der Messplatte pipettiert und der passende Mastermix hinzugefügt. Neben den Proben wurden drei Kavitäten als Kontrolle mit dem Mastermix und nur Wasser gefüllt. Nachdem alle Ansätze vollständig vorbereitet wurden, wurde eine Folie auf die Messplatte geklebt und diese kurz und vorsichtig zentrifugiert. Die Messung erfolgte dann im QuanStudio3-Gerät von Thermo Fisher Scientific. Die relative Genexpression der zu untersuchenden Gene wurde schließlich mit der $\Delta/\Delta C_t$ -Wert-Methode [123] bestimmt und auf das Haushaltsgen β -2-Mikroglobulin (β 2M) normalisiert. Dies ist ein Gen, welches für β 2-Mikroglobulin codiert, was sich als Teil des MHC-I-Moleküls [124] nach Behandlung nicht ändern sollte.

3.2.6 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Zuerst wurden 8 ml der entsprechenden Zellen mit einer Dichte von je $0,5 \times 10^6$ ml in Zellkulturflaschen ausgesät. Die Behandlung erfolgte anschließend mit MI-538 (2,5 μ M/ viereinhalb Tage), Eltanexor (300 nM/ zwei Tage), der Kombination oder mit der DMSO-Kontrolle. $2,5 \times 10^6$ Zellen wurden in je 1 ml frischem Medium resuspendiert und mit Formalin (finale Konzentration 1%) für zehn Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Zum Beenden dieser Reaktion wurde Glycin (finale Konzentration 125 mM, pH=8,0) hinzugefügt und für fünf Minuten erneut unter Rotation inkubiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (fünf Minuten, 2500 Umdrehungen/Minute, 4 °C), zwei Mal mit eiskaltem PBS gewaschen und danach der Überstand vollständig abgenommen. Für die anschließende Lyse und Sonifizierung wurde dem ChIP-Lyse-Puffer Protease-Inhibitor hinzugefügt und die Zellen dann in 100 μ l Lyse-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde dann in geeignete Eppendorfgefäße überführt und für 15 Zyklen bei höchster Intensität sonifiziert (30 Sekunden Sonifizierung, 30 Sekunden keine Sonifizierung), was genomische Fragmente einer Größe von 100- 400 Basenpaaren lieferte. Die Lysate wurden dann in ChIP-Verdünnungs-Puffer mit Protease-Inhibitor verdünnt, bis ein Volumen von 1 ml erreicht wurde. Zur Vorreinigung der Proben wurden je 20 μ l geblockten A/G-Agarose-Beads auf die Lysate gegeben und für eine Stunde bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Danach wurden die Proben zentrifugiert und der Überstand in neue Eppendorfgefäße überführt. Als Input-Kontrolle wurden nun 5% des eingesetzten Lysats abgenommen, in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert und eingefroren. Pro Immunpräzipitation wurden je 300 μ l des Lysats verwendet, 4 μ g der entsprechenden Antikörper (Menin und Hasen-IgG als Negativkontrolle) zu den Proben gegeben und bei 4°C unter Rotation über Nacht inkubiert. Zur Gewinnung der entstandenen Immunkomplexe wurden am nächsten Tag je 20 μ l der geblockten A/G-Agarose-Beads jeder Probe hinzugefügt und für 1 bis 2 Stunden bei 4°C unter Rotation inkubiert. Anschließend folgten verschiedene aufeinanderfolgende Waschschriffe nach jeweils kurzer Inkubation unter Rotation (Fünf Minuten, 4°C) mit je 1 ml des salzarmen, dann des salzreichen, dann des LiCl- sowie abschließend des TE-Puffers. Dies wurde bis auf dem LiCl-Puffer pro Puffer zweimal wiederholt. Durch die Zugabe von je 200 μ l Elutionspuffer pro Probe und 15-minütige Rotation bei Raumtemperatur wurden die Immunkomplexe von den Beads gelöst. Danach erfolgte eine kurze Zentrifugation und der Überstand wurde in neue Eppendorfgefäße überführt. Nun wurde der zuvor eingefrorene Input aufgetaut. Zum Herauslösen der DNA-Fragmente durch De-Crosslinking wurden den Proben und dem Input NaCl (finale Konzentration 0,2 M) hinzugegeben. Die Proben wurden dann über Nacht bei 65 °C inkubiert. Zur Aufreinigung der DNS wurde am folgenden Tag das PCR-Reinigungskit von Qiagen verwendet. Die DNS wurde in 35 μ l Wasser eluiert, für die anschließende qPCR

(siehe 3.2.4.4) wurden 2µl pro Reaktion eingesetzt. Die Auswertung der qPCR erfolgte über Standardkurven und die Berechnung des %Inputs.

3.2.7 Synergismus-Screen

3.2.7.1 Auswahl der Medikamente

Die Auswahl der Medikamente, die in Kombination mit dem MMi getestet wurden, erfolgte anhand verschiedener Kriterien. Hierbei wurden ausschließlich molekular zielgerichtete Substanzen ausgewählt, die in präklinischen und ersten klinischen Studien bereits Aktivität gegen die AML gezeigt haben. Aus dieser Auswahl wurden dann anhand des EC₅₀-Werts die neusten und effektivsten Substanzen ausgewählt. Pro Zielstruktur wurden meist zwei Substanzen ausgewählt, um mögliche Klasseneffekte zu identifizieren. Die getroffene Auswahl ist unter 3.1.4 zu finden.

3.2.7.2 Ansatz und Einteilung der Substanzen

Alle Medikamente wurden entsprechend den Angaben des Herstellers in DMSO oder doppelt-destilliertem Wasser angesetzt, dann aliquotiert und gemäß den Herstellerangaben bei -20°C gelagert. Die Einteilung erfolgte nach der Effektivität in fünf verschiedene Gruppen und durch entsprechende Verdünnung jeweils in einem Verhältnis von 1:4 wurden insgesamt je vier Konzentrationen pro Substanz erreicht. Einige Substanzen mussten nach der Durchführung eines ersten Test-Screens in ihrer Gruppenzugehörigkeit angepasst werden, sodass eine optimale Abstufung ihrer Wirkung gewährleistet werden konnte.

Tabelle 17: Einteilung der Substanzen nach Konzentrationsstufen (KS) (vgl. Tabelle 18)

Nr.	Substanz	Substanzklasse	EC50	Zeit	Quelle	Klinische Studien	KS
1	Alisertib	Aurora-A-Kinase-Inhibitor	60 nM	72 h	[125]	Phase II NCT02560025 [126]	1
2	AMG-232	p53-MDM2-Inhibitor	500 nM	72 h	[127]	Phase I NCT03041688	2
3	APR-246 (PRIMA-1Met)	p53 ^{mut} -Reaktivator	10 µM	96 h	[128]	Phase Ib/2 NCT03072043 [129]	4
4	APTO-253	c-MYC-Inhibitor	400 nM	72 h	[130]	Phase I NCT02267863	2
5	ATRA	RAR-Agonist	1 µM	48 h	[131]	Phase III NCT00151255 [132]	2
6	AZD4573	CDK9-Inhibitor	50 nM	72 h	[133]	Phase I NCT03263637	0
7	AZD5991	MCL-1-Inhibitor	<10 nM	72 h	[134]	Phase I/II NCT03218683	1
8	Barasertib	Aurora-B-Kinase-Inhibitor	<5 nM	48 h	[135]	Phase I/II NCT03217838	1
9	Birabresib	BRD2/3/4-Inhibitor	60 nM	72 h	[136]	Phase I NCT01713582 [137]	1
10	Cobimetinib	MEK1-Inhibitor	100 nM	72 h	[138]	Phase I	0

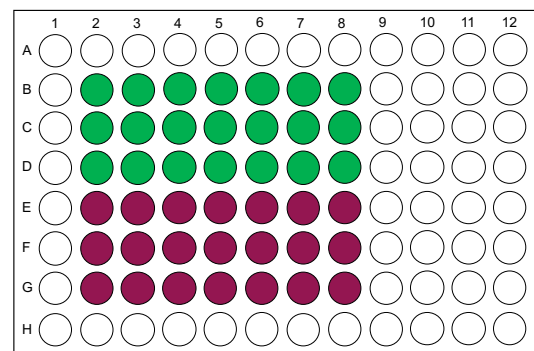
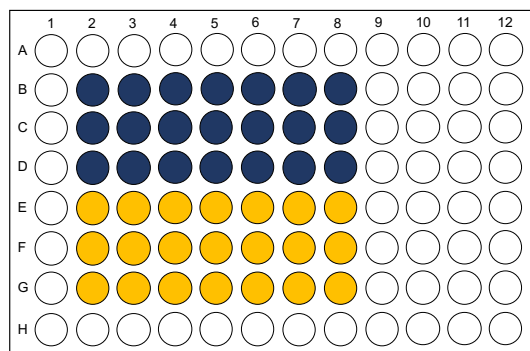
						NCT02670044	
11	Dasatinib	BCR-ABL-, SRC-, c-KIT-Inhibitor	5 µM	72 h	[139]	Phase III NCT02013648	3
12	Eltanexor	Exportin-1-Inhibitor	150 nM	48 h	[114]	Phase I/II NCT02649790	1
13	Entinostat	HDAC-Inhibitor	1 µM	48 h	[140]	Phase 2 NCT00313586 [141]	2
14	Entospletinib (GS-9973)	SYK-Inhibitor	1 µM	72 h	[142]	Phase I/II NCT02343939	2
15	GSK2879552	LSD1-Inhibitor	500 nM	72 h	[143]	Phase I NCT02177812	2
16	Idasanutlin	MDM2-Antagonist	50 nM	72 h	[144]	Phase 3 NCT02545283	1
17	JQ-1	BET-Inhibitor	250 nM	72 h	[145]	-	1
18	Mebendazole	Hedgehog-Inhibitor	500 nM	48 h	[146]	Phase III NCT02201381	2
19	Nilotinib	BCR-ABL-Inhibitor	10 µM	24 h	[147]	Phase II NCT01806571	3
20	Olaparib	PARP-Inhibitor	10 µM	48 h	[148]	Phase II NCT03953898	3
21	ORY-1001	KDM1A/LSD-1-Inhibitor	200 nM	96 h	[149]	Phase II 2018-000482-36	3
22	Pacritinib	JAK2-Inhibitor	100 nM	72 h	[150]	Phase II NCT02532010	2
23	Palbociclib	CDK4/ CDK6-Inhibitor	200 nM	72 h	[151]	Phase I/II NCT03844997	2
24	Pevonedistat	NEDD8-Aktivator-enzym-Inhibitor	300 nM	24 h	[152]	Phase III NCT03268954	2
25	Pracinostat	HDAC-Inhibitor	300 nM	48 h	[153]	Phase II NCT01912274 [154]	2
26	Rapamycin	mTOR-Inhibitor	10 nM	24 h	[155]	Phase II NCT00235560	1
27	Ribociclib	CDK4/ CDK6-Inhibitor	350 nM	72 h	[151]	Phase III NCT03701334	2
28	Rigosertib	PI3K/PLK1-Inhibitor	100 nM	48 h	[156]	Phase II NCT01926587	1
29	Ruxolitinib	JAK1/2-Inhibitor	300 nM	48 h	[157]	Phase II NCT03286530	2
30	S63845	MCL1-Inhibitor	<10 nM	72 h	[134]	-	1
31	Selinexor	Exportin-1-Inhibitor	160 nM	48 h	[158]	Phase II NCT02088541	1
32	TAK-659	SYK/FLT3-Inhibitor	50 nM	72 h	[159]	Phase I/II NCT02323113	3
33	Talazoparib	PARP1/2-Inhibitor	1 µM	48 h	[160]	Phase I/II NCT02878785	2
34	THZ1	CDK7-Inhibitor	300 nM	72 h	[145]	-	0
35	Tosedostat	Aminopeptidase-Inhibitor	500 nM	96 h	[161]	Phase II NCT00780598	2
36	Vemurafenib	B-RAF-Inhibitor	5 µM	24 h	[162]	Phase II NCT01711632	3
37	Volasertib	PLK-1-Inhibitor	20 nM	72 h	[163]	Phase III NCT01721876	1

Tabelle 18: Konzentrations-Stufen (KS)

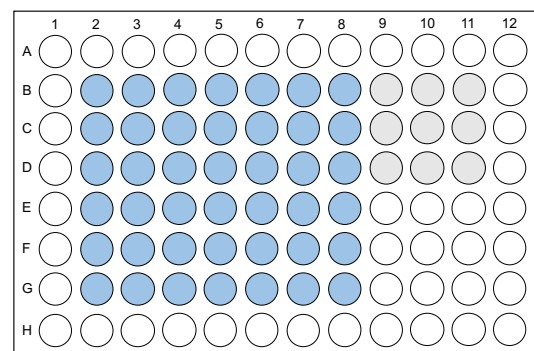
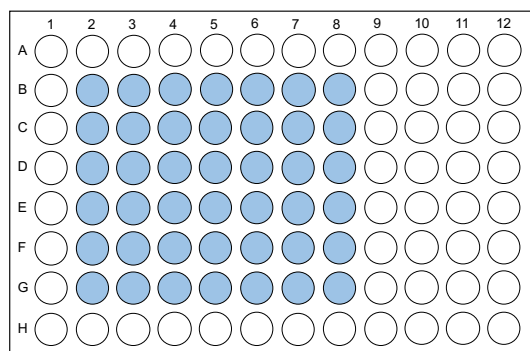
KS	C1	C2	C3	C4
0	5 nM	1,25 nM	0,312 nM	0,078 nM
1	200 nM	50 nM	12,5 nM	3,125 nM
2	2,5 µM	0,612 µM	0,156 µM	0,039 µM
3	20 µM	5 µM	1,25 µM	0,312 µM
4	100 µM	25 µM	6,25 µM	1,56 µM

3.2.7.3 Durchführung des Screens

Pro Kavität wurden 20 000 vitale, Trypanblau-exkludierende Zellen in je 100 µl Medium auf vier 96-Kavitätenplatten ausgesät. Anschließend wurden die Zellen der ersten und zweiten Platte mit je 50 µl des MMi MI-538 pro Kavität (siehe Abbildung 8) behandelt. Der dritten und vierten Platte wurden je 50 µl des entsprechenden Mediums pro Kavität hinzugegeben. Die zusätzlichen neun Kavitäten auf der dritten Platte wurden mit je 50 µl DMSO (0,1%) als Kontrolle behandelt (siehe Abb. 8).



MI-538 (2,5 µM), MI-538 (0,156 µM), MI-538 (0,625 µM), MI-538 (0,039 µM)



Unbehandelt (nur Medium), DMSO

Abbildung 8: Versuchsaufbau der Vorbehandlung der Zellen für den anschließenden Synergismus-Screen

Nach zweieinhalb Tagen wurden je 66 µl aus jeder Kavität der 96-Kavitätenplatte entnommen und auf die entsprechende Kavität der 384-Kavitätenplatte transferiert. Anschließend wurden dann je 33 µl des MMi MI-538, der zu testenden Substanz oder ihre Kombination entsprechend der Abbildung 9 hinzugefügt. Als Kontrolle wurden je 33 µl des Lösungsmittels DMSO zu den Kontrollkavitäten auf der 384-Kavitätenplatte gegeben. Die äußeren Kavitäten wurden ausgespart. zwei Tage nach weiterer Behandlung wurde die Zellviabilität mittels Durchflusszytometrie nach DAPI (1 µg/ml)-Färbung bestimmt.

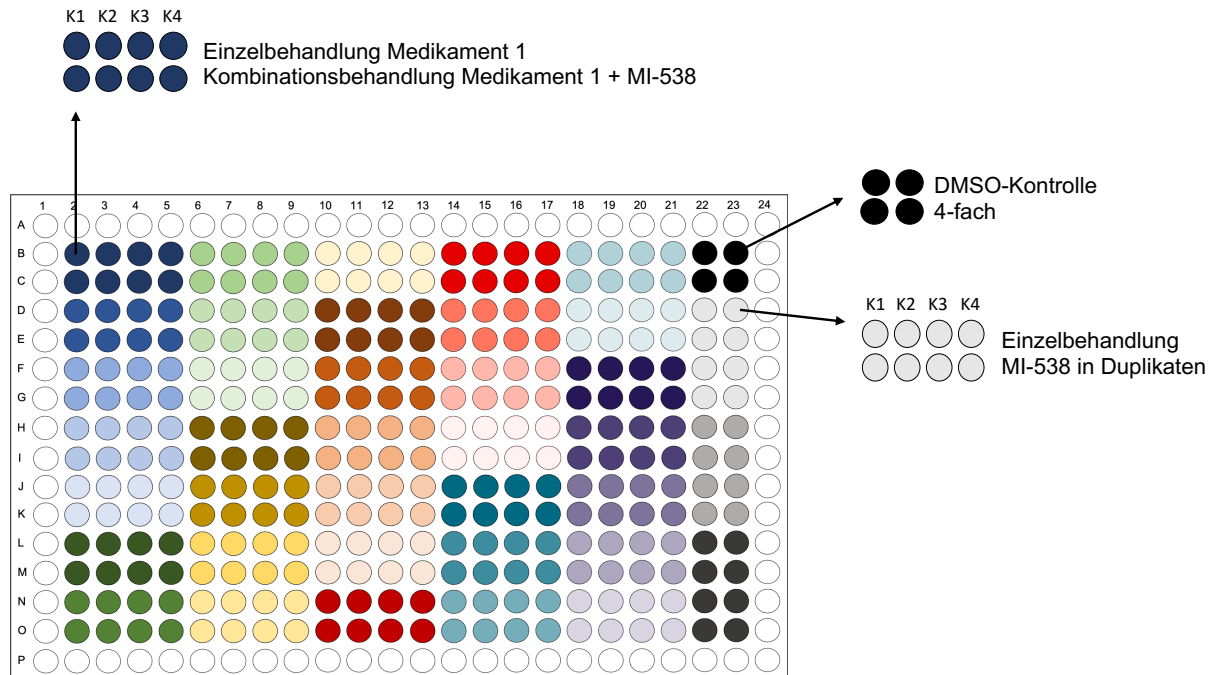


Abbildung 9: Aufbau der 384-Kavitätenplatte.

Der Effekt des MMi MI-538 wurde in vier Konzentrationen (K1-K4) in Duplikaten erhoben. Jede der 37 Kombinationspartner wurde ebenfalls in vier abstuften Konzentrationen (K1-K4) getestet, sowohl in Einzel- als auch Kombinationsbehandlung mit MI-538. Die Kontrolle des Lösungsmittels DMSO wurde auf der gleichen Platte in vier technischen Replikaten gemessen. Die Daten aus der Durchflusszytometrie wurden anschließend in die CompuSyn-Software übertragen, um den Synergismus der Kombinationen nach der Chou-Talalay-Methode [117] zu berechnen.

3.2.8 Datenanalyse und Statistik

Die Daten, die durch Durchflusszytometrie gewonnen wurden, wurden durch die FACS Diva-Software von BD erfasst. Die Weiterverarbeitung der Rohdaten erfolgte mit der FlowJo 10-Software und Microsoft Excel. Die statistische Auswertung und graphische Darstellung erfolgte durch GraphPad Prism 9. Die Messpunkte der Proliferationsexperimente wurden dort in einer Dosis-Wirkungskurve aufgetragen und das *Curve-Fitting* erfolgte mittels des EC50 *shift*-Algorithmus in Graphpad Prism. Die EC50 wird definiert als Konzentration, bei der der halbmaximaler Effekt eines Inhibitors erreicht wird. Dies bedeutet für die Experiment dieser Arbeit die Konzentration bei der 50% der Zellen umgebracht wurden. *In-vitro*-Experimente wurden (bis auf die Differenzierungs- und ChIP-Experimente) in mindestens zwei unabhängigen Experimenten durchgeführt, jeder Assay in drei technischen Replikaten. Die Daten zu den Differenzierungs- und ChIP-Experimenten wurden in einem Experiment erhoben. Der Synergismus- Screen wurde in drei unabhängigen Experimenten pro getesteter Zelllinie durchgeführt. p-Werte < 0,05 wurden als signifikant identifiziert mit ns: > 0,05; *:p < 0,05; **:p < 0,01; ***:p < 0,001; ****:p < 0,0001.

4 Ergebnisse

4.1 Menin-MLL-Inhibition hemmt selektiv die Proliferation *NPM1*^{mut} AML-Zellen

Zur Bestätigung der selektiven, inhibitorischen Effekte und der Bestimmung der mittleren effektiven Wirkkonzentration (EC_{50}) wurde das Proliferationsverhalten verschiedener humaner AML-Zellen unter Menin-MLL-Inhibition mit dem Erstgenerationsinhibitor MI-503 untersucht.

Hierfür wurden die Zellen der humanen AML-Zelllinien OCI-AML3 (*NPM1*^{mut}), MV4-11 (*MLL-r*) sowie HL-60 (Negativkontrolle ohne entsprechende Mutationen) verwendet. Die Zellen wurden mit MI-503 in einer abstuften Verdünnungsreihe von insgesamt neun Konzentrationen (1:2) mit einer Höchstkonzentration von 2,5 μ M behandelt. Außerdem erfolgte eine ausschließliche Behandlung der Zellen mit dem Lösungsmittel des Inhibitors DMSO (2,5 μ M) zum Vergleich. Wie ebenfalls in vorherigen Publikationen [12],[98],[102] demonstriert, wurde die Anzahl der viablen Zellen für jede Konzentrationsstufe mittels DAPI (1 μ g/ml)-Färbung (im Durchflusszytometer) nach vier, sieben und elf Tagen Behandlung gemessen und Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt (Abbildung 10 **A-C**).

In Übereinstimmung mit den publizierten Daten [12, 102] zeigten die *NPM1*^{mut} OCI-AML3-Zellen und *MLL-r* MV4-11 AML-Zellen eine dosisabhängige Sensitivität gegenüber MI-503 (EC_{50} -Werten von OCI-AML: 253,5 nM und MV4-11: 482,5 nM an Tag 11). Die HL-60 AML-Zellen (*NPM1*- und *MLL*-Wildtyp) zeigten sich nicht sensibel gegenüber der Behandlung (EC_{50} -Wert: 2023 nM; Abbildung 10 **D**). Sie zeigten hingegen selbst bei hohen Dosen des Inhibitors und an Tag 11 nur eine sehr geringe Reduktion der Anzahl lebender Zellen. Somit konnte die Selektivität und die Wirksamkeit der Behandlung auf Zellen mit *NPM1*-Mutation beziehungsweise *MLL-r* [12],[102] bestätigt werden. Die HL-60-Zellen dienten in den folgenden Experimenten als Negativkontrolle der Menin-MLL-Inhibition.

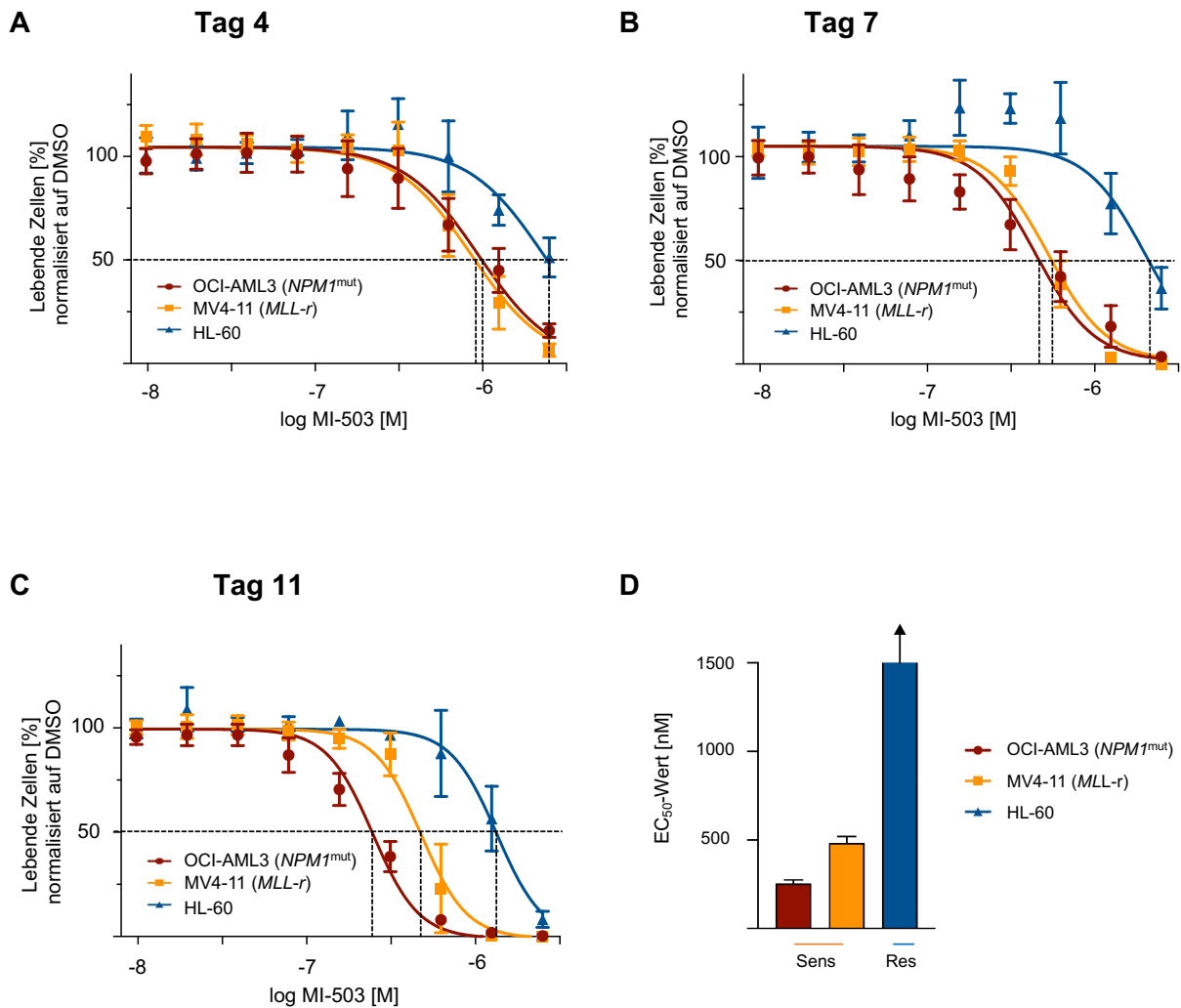


Abbildung 10: Dosis-Wirkungs-Kurven verschiedener AML-Zelllinien nach vier (A), sieben (B) und elf Tagen (C) Menin-MLL-Inhibition mit MI-503 in neun abstufigen Konzentrationen, normalisiert auf DMSO-behandelte Zellen. Die Daten wurden in drei unabhängigen Experimenten mit jeweils technischen Triplikaten erhoben. Die Anzahl lebender Zellen (DAPI-negativ) wurde mittels Durchflusszytometrie erhoben. D EC₅₀-Werte verschiedener AML-Zelllinien nach elf Tagen Menin-MLL-Inhibition mit dem MMi MI-503. Die Werte wurden mittels der Graphpad Prism-Software berechnet.

4.2 Menin-MLL-Inhibition mit Zweitgenerations-Inhibitor MI-538

4.2.1 MMi MI-538 zeigt potente Inhibition der Proliferation in *NPM1*^{mut} AML

Zur Auswahl des zum Zeitpunkt der Studieninitiierung potentesten und spezifischsten MMi für den Synergismus-Screen, wurde das Proliferationsverhalten von -insgesamt vier humanen AML- Zelllinien (davon eine mit *MLL-r* und zwei mit *NPM1*^{mut}) nach Menin-MLL-Inhibition gemessen. Neben MI-503 von zwei Herstellern (Selleck Chemicals und MedChemExpress) wurde auch die Substanz MI-538 getestet, welche auf der gleichen Grundstruktur basiert [99]. MI-538, ein präklinischer Zweitgenerationsinhibitor wurde dabei entwickelt, um die pharmakokinetischen Eigenschaften früherer MMi zu verbessern. Er zeigte außerdem eine erhöhte Aktivität und Selektivität in *MLL-r* AML-Zelllinien im Vergleich zu anderen Substanzen dieser Klasse [99]. Das nächste Experiment wurde durchgeführt, um festzustellen, ob sich diese Effekte auch in *NPM1*^{mut} AML-Zellen bestätigen lassen sowie um die Substanzen zu vergleichen und wachstumshemmenden Effekte auf die Proliferation zu bestimmen. Dazu wurden erneut *NPM1*^{mut} OCI-AML3-, *NPM1*^{mut} IMS-M2-, *MLL-r* MV4-11- sowie HL-60-Zellen (Wildtyp für *NPM1* und *MLL*; Negativkontrolle) mit je einem Inhibitor (2,5 µM) behandelt. Anschließend wurde die Anzahl der lebenden Zellen wie oben beschrieben ermittelt. Nach vier Tagen Behandlung erwies sich MI-538 sowohl in den *NPM1*^{mut} OCI-AML3-Zellen als auch in den *MLL-r* MV4-11-Zellen gegenüber den anderen Inhibitoren als leicht potenter. Dieser Effekt war nach sieben und nach elf Tagen Behandlung deutlich stärker ausgeprägt (Tag 11: EC₅₀: 56,2 nM vs. 562,3 nM in OCI-AML3 und 125,9 nM vs. 446,7 nM in MV4-11). Für den Synergismus-Screen wurde deshalb MI-538 ausgewählt. Die *NPM1*^{mut} IMS-M2-Zellen zeigten erst bei deutlich höheren Konzentrationen ein Ansprechen auf die Inhibitoren ohne relevanten Unterschied zwischen den verschiedenen Substanzen. Die als Negativkontrolle verwendeten HL-60-Zellen zeigten keine Sensitivität (siehe Abbildung 14).

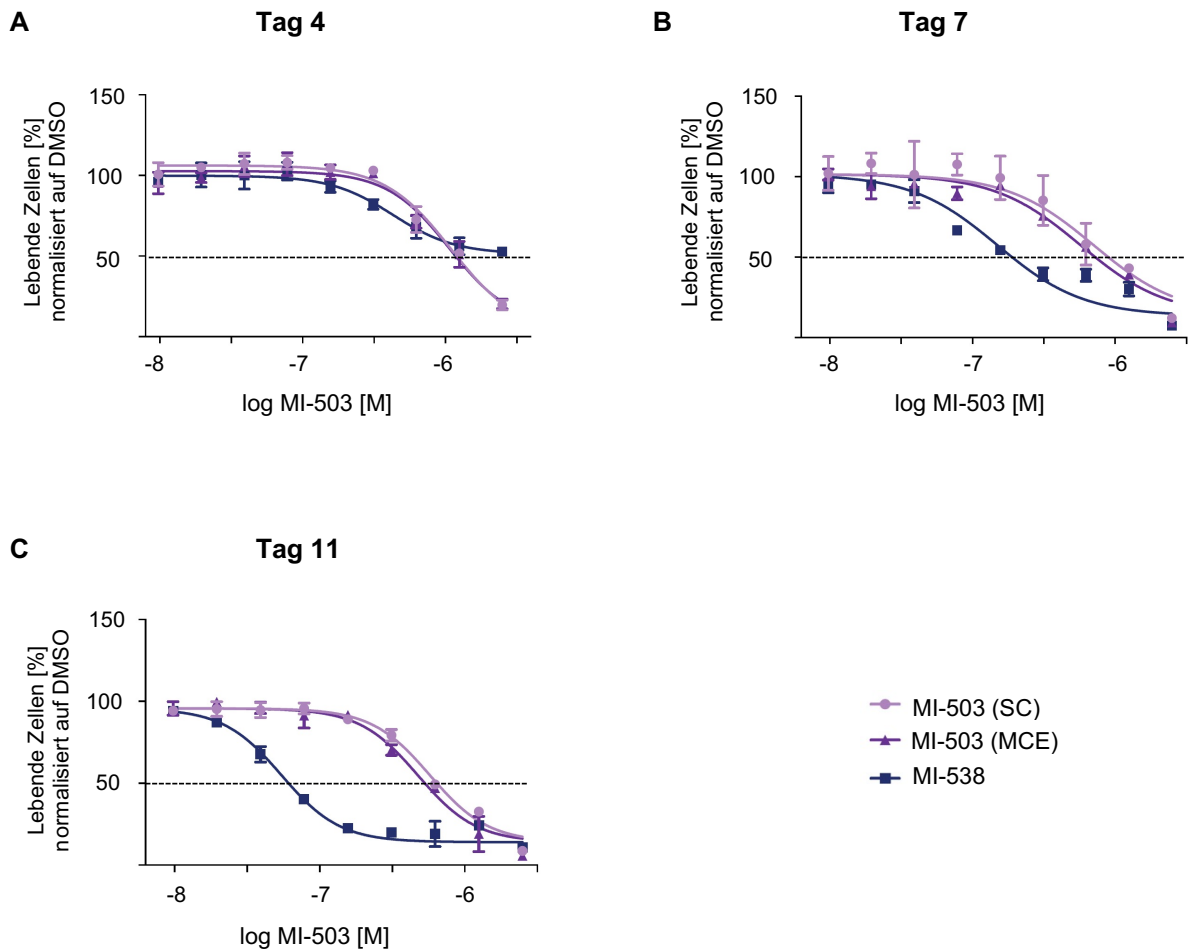


Abbildung 11: Dosis-Wirkungs-Kurven der humanen *NPM1^{mut}* OCI-AML3-Zellen nach vier (**A**), sieben (**B**) und elf (**C**) Tagen Menin-MLL-Inhibition mit MI-503 oder MI-538, normalisiert auf DMSO-behandelte Zellen. Die Daten wurden in drei unabhängigen Experimenten mit jeweils technischen Triplikaten erhoben. Die Anzahl der lebenden Zellen (DAPI-negativ) wurde mittels Durchflusszytometrie erhoben.

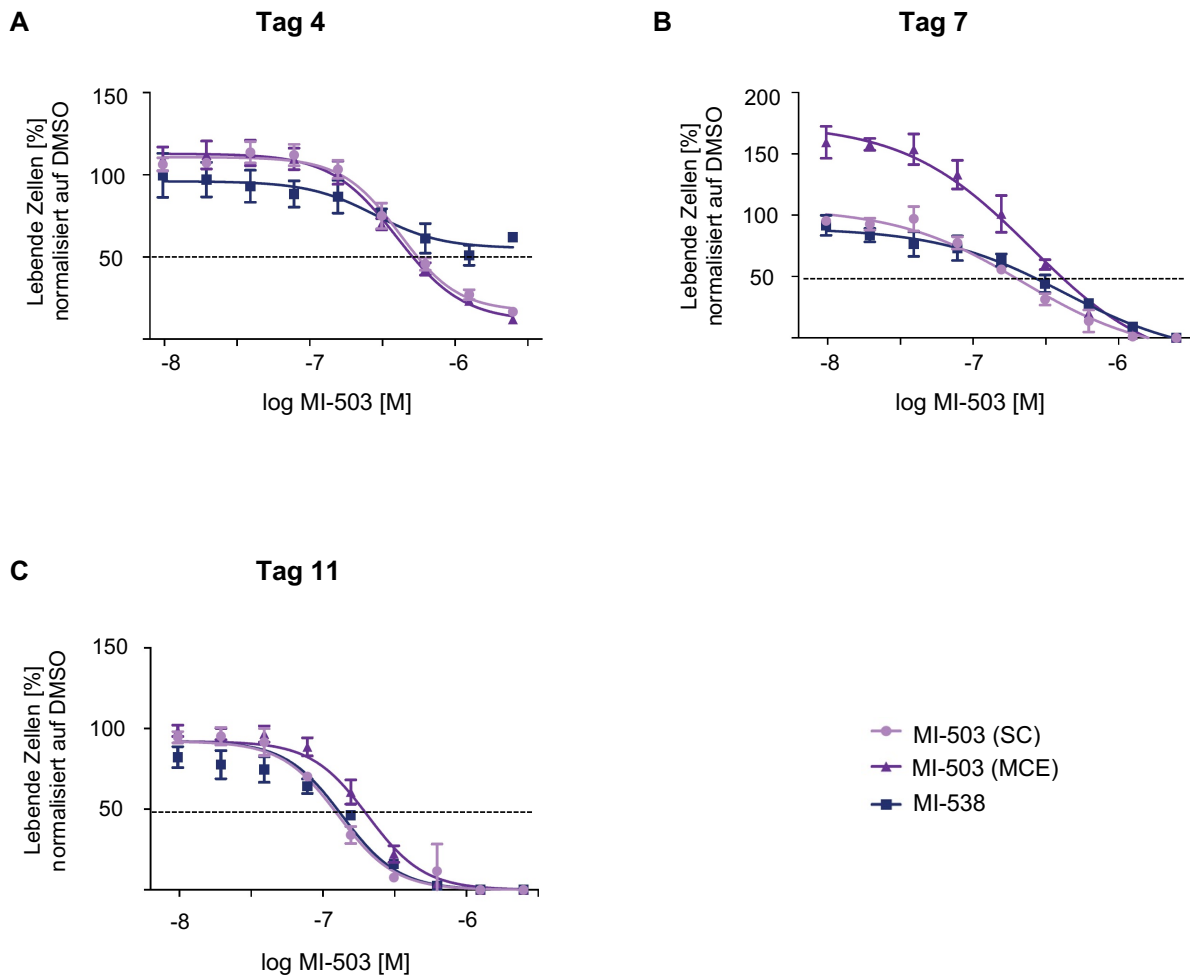


Abbildung 12: Dosis-Wirkungs-Kurven der humanen *NPM1^{mut}* IMS-M2-Zellen nach vier (**A**), sieben (**B**) und elf (**C**) Tagen Menin-MLL-Inhibition mit MI-503 oder MI-538, normalisiert auf DMSO-behandelte Zellen. Die Daten wurden in drei unabhängigen Experimenten mit jeweils technischen Triplikaten erhoben. Anzahl der lebenden Zellen (DAPI-negativ) wurde mittels Durchflusszytometrie erhoben.

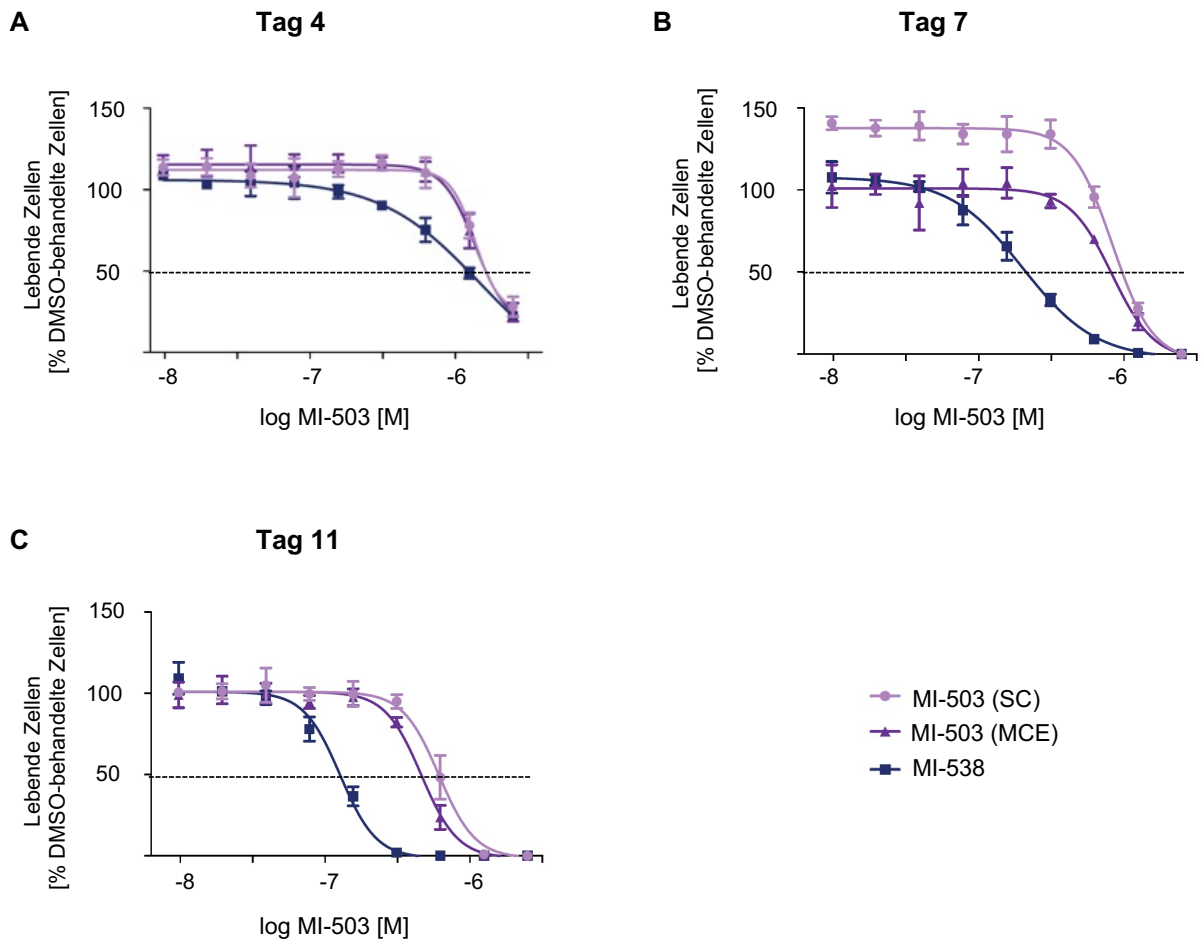


Abbildung 13: Dosis-Wirkungs-Kurven der humanen *MLL-r* MV4-11-Zellen nach vier (A), sieben (B) und elf (C) Tagen Menin-MLL-Inhibition mit MI-503 oder MI-538, normalisiert auf DMSO-behandelte Zellen. Die Daten wurden in drei unabhängigen Experimenten mit jeweils technischen Triplikaten erhoben. Die Anzahl der lebenden Zellen (DAPI-negativ) wurde mittels Durchflusszytometrie erhoben.

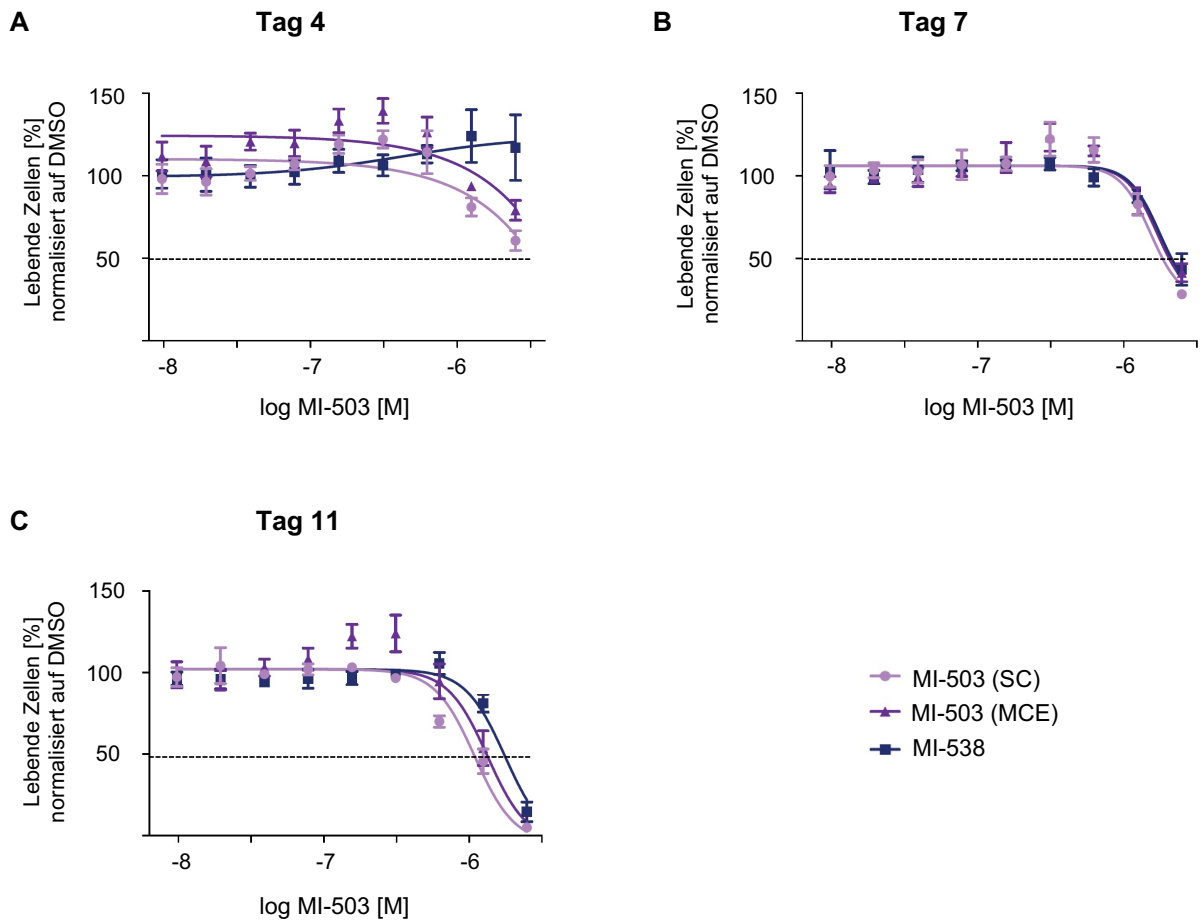


Abbildung 14: Dosis-Wirkungs-Kurven der humanen HL60-Zellen (Wildtyp für *NPM1* und *MLL*) nach vier (**A**), sieben (**B**) und elf (**C**) Tagen Menin-MLL-Inhibition mit MI-503 oder MI-538, normalisiert auf DMSO-behandelte Zellen. Die Daten wurden in drei unabhängigen Experimenten mit jeweils technischen Triplikaten erhoben. Die Anzahl der lebenden Zellen (DAPI-negativ) wurde mittels Durchflusszytometrie erhoben.

4.2.2 Pharmakologische Menin-MLL-Inhibition führt zur Herabregulierung eines leukämogenen Genexpressionsprogramm in *NPM1^{mut}* AML

Um die Wirkung der Menin-MLL-Inhibition auf die Genexpression in *NPM1^{mut}* AML zu untersuchen, wurde die *NPM1^{mut}* OCI-AML3-Zellen zunächst vier Tage mit MI-503 (Erstgeneration), MI-538 (Zweitgeneration) oder DMSO behandelt. Anschließend wurde mittels qPCR die Expression der Transkriptionsfaktor-Gene *MEIS1*, *HOXA9* und *HOXA10* sowie des für die Tyrosinkinase FLT3 kodierenden Gens gemessen [12, 88, 89, 164].

Mit beiden Inhibitoren zeigte sich eine deutliche Suppression der Expression von *MEIS1* sowie *FLT3* im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Abbildung 15 **A-B**). Während sich die Expression nach Behandlung zwischen den beiden Inhibitoren von *FLT3* nicht signifikant unterschied, konnte bei *MEIS1* eine geringfügig stärker ausgeprägte Suppression (16% versus 7%, $p < 0,01$) nach der Inhibition mit MI-538 im Vergleich zu MI-503 beobachtet werden. *MEIS1* wurde außerdem von allen untersuchten Genen am stärksten herunterreguliert. In Bezug auf *HOXA9* und *HOXA10* konnte eine signifikante, aber nur leichte Herunterregulation (100% versus 81%, $p < 0,05$) nach MI-538-Behandlung beobachtet werden, während die Inhibition mit MI-503 (100% versus 85%, $p > 0,05$) keine deutlichen Unterschiede ergab (Abbildung 15 **C-D**). Diese Ergebnisse bestätigen frühere Beobachtungen, dass die *MEIS1*-Expression *NPM1^{mut}* AML-Zellen durch Menin-MLL-Inhibition sehr stark supprimiert wird [12].

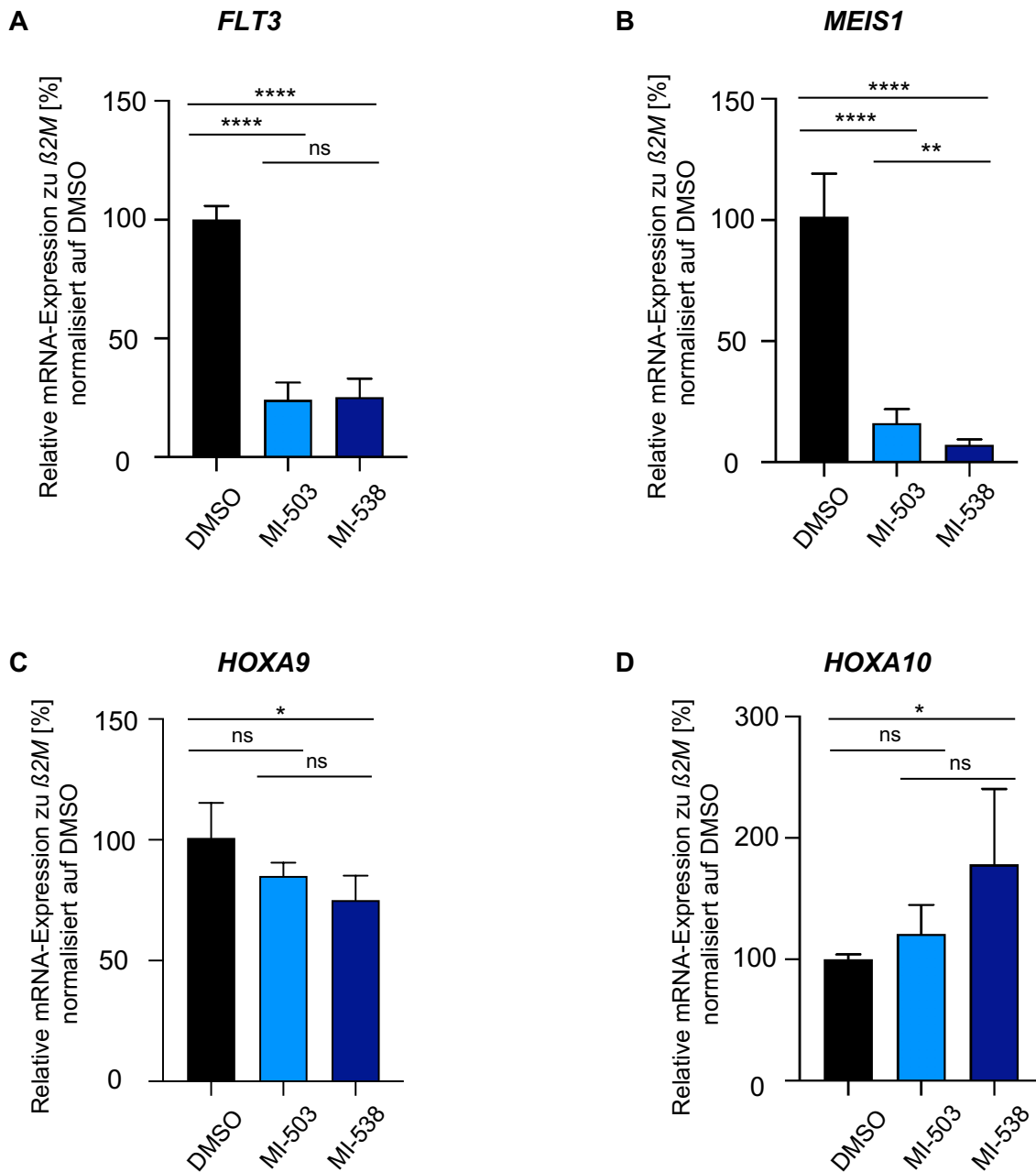


Abbildung 15: Genexpressionsanalyse durch qPCR nach vier Tagen Behandlung mit MI-503, MI-538 oder DMSO (je 2,5 μ M) in humanen *NPM1*^{mut} OCI-AML3-Zellen, normalisiert auf DMSO-behandelte Zellen. Die Daten wurden in zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils technischen Triplikaten erhoben. ns: $p > 0,05$; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$.

4.3 Synergismus-Screen in *NPM1*^{mut} AML

Da, wie oben bereits beschrieben, nicht zu erwarten ist, dass Einzelsubstanzen Langzeitremissionen bei AML induzieren, ist die Entwicklung synergistischer Substanzkombinationen von hoher Relevanz [14]. Zur Identifikation von synergistischen Kombinationspartnern, die mit dem MMi MI-538 eine effektive Kombination für die Behandlung der *NPM1*^{mut} Leukämie bilden, wurde der in Kapitel 3.2.6 beschriebene Screen entworfen, mit dessen Hilfe insgesamt 37 mögliche Kombinationen getestet wurden.

4.3.1 384-Kavitätenplatten stellen ein geeignetes Format zum Screening von Medikamentenkombinationen dar

Zunächst wurde der Synergismus-Screen etabliert. Dazu wurden 384-Kavitätenplatten verwendet, um eine größere Anzahl an Medikamentenkombinationen zu testen und gleichzeitig mögliche *Batch*-Effekte zu reduzieren. Im ersten Schritt wurde überprüft, ob sich im 384- Hochdurchsatzformat gegenüber dem 96-Format trotz der dadurch veränderten Zelldichte vergleichbare Ergebnisse erzielen lassen.

Da in diesem Screen eine synergistische Kombination für die Behandlung der *NPM1*^{mut} AML identifiziert werden sollte, wurden *NPM1*^{mut} OCI-AML3-, *NPM1*^{mut} IMS-M2- sowie HL-60-Zellen als Negativkontrolle für die Setup-Experimente verwendet. Es wurden zunächst Zellen der o.g. AML-Zelllinien sowohl in der 96- (20 000 Zellen/150 µl) als auch in der 384-Kavitätenplatte (14 000 Zellen/100 µl) ausgesät, um die Vergleichbarkeit der Medikamententestungen zwischen diesen Plattenformaten zu überprüfen. Die Vergleichbarkeitstestung war notwendig, da die Kavitäten der 384- Kavitätenplatten über einen flachen Boden verfügen, wohingegen die Kavitäten der 96- Kavitätenplatten U-förmig sind. Dadurch könnte es in den 96 vs. 384- Kavitätenplatten lokal zu einer unterschiedlichen Zellzahl/Fläche kommen. Die Anzahl der lebenden Zellen und daraus abgeleitet das Proliferationsverhalten wurde – wie oben beschrieben - nach zwei Tagen mittels DAPI (1µg/ml) - Färbung und Durchflussszytometrie bestimmt.

In den explorativen Etablierungsanalysen ergaben sich bezüglich des Proliferationsverhaltens der drei AML-Zelllinien lediglich geringfügige Unterschiede zwischen den 96- oder 384-Kavitätenplatten (Abbildung 16 A). Die Verdopplungszeiten auf der 96- sowie 384-Kavitätenplatte lagen für alle drei Zelllinien in einem vergleichbaren Bereich und unterschieden sich nur um wenige Stunden. Für die HL-60- (34,8 auf der 96- versus 35,5 Stunden auf der 384-Kavitätenplatten) und IMS-M2-Zellen (20,6 versus 20,7 Stunden) waren diese Unterschiede ($p > 0,05$) nicht signifikant, für die OCI-AML3-Zellen ergab sich ein geringfügiger, aber signifikanter Unterschied (~24,6 versus ~28,8 Stunden) (Abbildung 16 B).

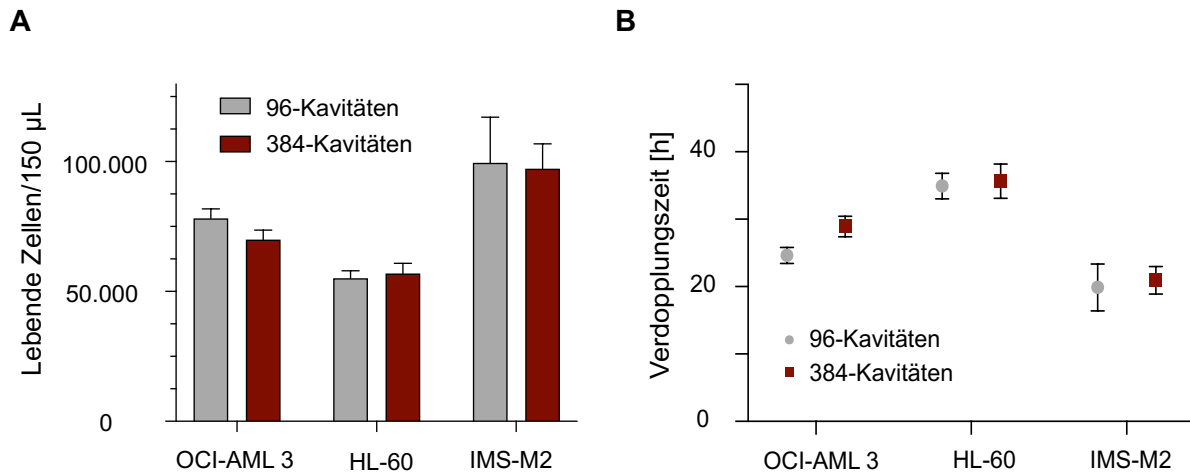


Abbildung 16: A Lebendzellanzahl sowie **B** Verdopplungszeit der Zelllinien OCI-AML3, IMS-M2 sowie HL-60 nach zwei Tagen Wachstum in einer 96-Kavitäten (grau)- beziehungsweise einer 384-Kavitätenplatte (rot).

Im nächsten Schritt wurde die Behandlung mit einem MMi auf der 384- gegenüber der 96-Kavitätenplatte überprüft. Hierzu wurden OCI-AML3-Zellen für drei Tage mit dem MMi MI-503 behandelt. Die Zellzahlen und - damit verbunden - das Proliferationsverhalten wurde mittels Durchflusszytometrie nach DAPI-Färbung (1 µg/ml) gemessen. Dabei zeigte sich, dass sich der bekannte anti-proliferative Effekt der Menin-MLL-Inhibition in der 96-Kavitätenplatte auch in der 384-Kavitätenplatte nachvollziehen lässt (Abbildung 17). Es zeigt sich der vorbekannte typische Verlauf (vgl. 4.1) einer Dosis-Wirkungskurve nach Behandlung mit einem MMi, in diesem Fall MI-503.

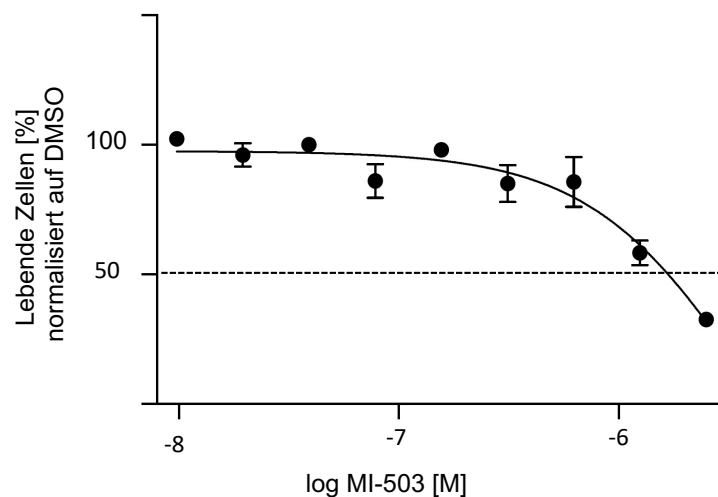


Abbildung 17: A Dosis-Wirkungs-Kurve der humanen *NPM1^{mut}* OCI-AML3-Zellen nach drei Tagen Menin-MLL-Inhibition mit MI-503 in einer 384-Kavitätenplatte, normalisiert auf DMSO-behandelte Zellen. Die Daten wurde in technischen Triplikaten erhoben und die Anzahl der lebenden Zellen (DAPI-negativ) mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Der Proliferations-Assay auf der 96-Kavitätenplatte beinhaltet die Replattierung einer reduzierten Zellzahl sowie die Erneuerung von Medium und Medikamenten Tag 4 und 7. Dies erfolgt durch Zentrifugation der Zellen in Platten und durch Auswerfen des alten Mediums Richtung Boden mit anschließendem Waschschrift (PBS) und Resuspension in neuem Medium und Medikament.

Um zu überprüfen, ob sich dieses Verfahren auch bei der 384-Kavitätenplatte etablieren lässt, wurden 17 500 lebende (Trypanblau-exkludierende) *NPM1^{mut}* OCI-AML3-Zellen pro Kavität ausgesät, zentrifugiert und danach der Überstand durch Auswerfen entfernt. Die Etablierungsversuche deuten darauf hin, dass es durch das Auswerfen der 384-Kavitätenplatte zu einem stärkeren Zellverlust kommt. Gleichzeitig war der Zellverlust nicht systematisch und reproduzierbaren Ergebnisse daher nicht mehr möglich (Abbildung 18 **A**). Das könnte beispielsweise durch unterschiedliche Adhäsionskräfte im anderen Plattenformat bedingt sein. Die Standardabweichung dieser Technik ist in Abbildung 18 **B** zu sehen.

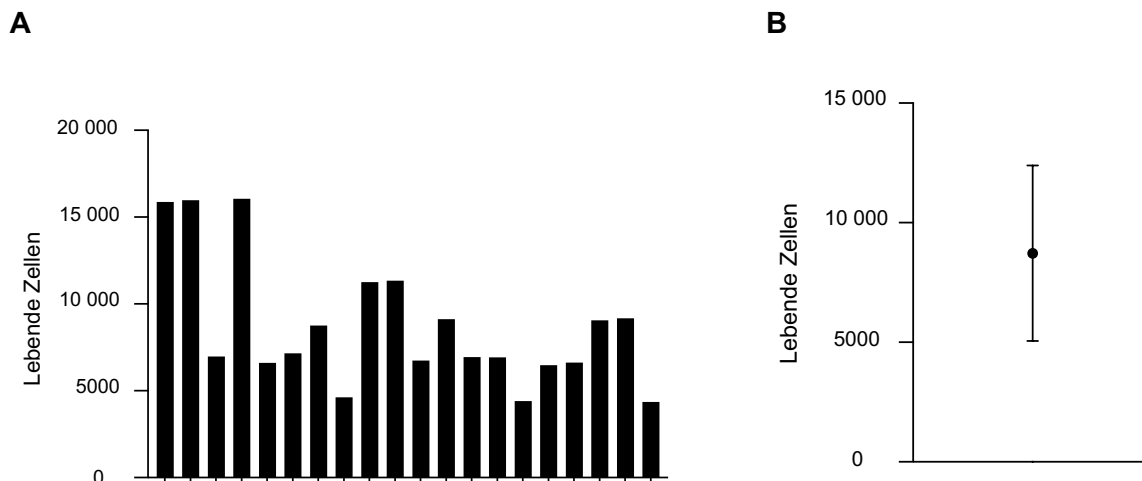


Abbildung 18: **A** Zellzahlen nach Zentrifugation und Auswurf des Mediums von ursprünglich 17 500 ausgesäten lebenden, Trypanblau-exkludierenden *NPM1^{mut}* OCI-AML3-Zellen. **B** Standardabweichung der Zellzahlen aus A. Die Anzahl der lebenden Zellen (DAPI-negativ) wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Um den beschriebenen Zellverlust beim Mediumwechsel zu vermeiden, wurde der Synergismus-Assay so entwickelt, dass zunächst eine Vorbehandlung mit dem MMi in 96-Kavitätenplatten erfolgte. Aufgrund des epigenetischen Wirkmechanismus tritt der antiproliferative Effekt mit Latenz ein. Anschließend wurden die Zellen auf die 384-Kavitätenplatte transferiert und mit den Kombinationspartnern behandelt (siehe 3.2.7.3).

4.3.2 Identifizierung synergistischer pharmakologischer Kombinationspartner von Menin-MLL-Inhibitoren zur Behandlung der *NPM1*^{mut} AML

Im Screen wurden neben den humanen *NPM1*^{mut} OCI-AML3- und *NPM1*^{mut} IMS-M2-Zellen auch Zellen eines murinen *Npm1*^{CA/+}*Flt3*^{ITD/+} knock-in AML-Modells [116] hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens unter Behandlung untersucht. Der Screen erfolgte pro Zelllinie in drei unabhängigen Experimenten. Die zu testenden Medikamente wurden im Vorfeld basierend auf ihren EC₅₀-Werten in fünf Gruppen eingeteilt (siehe Kapitel 3.2.7.2, Tabelle 17). Die Zellzahlen wurden wie weiter oben beschrieben erhoben und die Kombinationsindices (KI) mittels der CompuSyn-Software nach der Chou-Talalay- Methode [117] errechnet.

Nach Behandlung von *NPM1*^{mut} OCI-AML3-Zellen sowie *Npm1*^{CA/+}*Flt3*^{ITD/+}-Zellen ließen sich 18 der 37 getesteten Substanzen als synergistische Kombinationen (KI <0,9) identifizieren (Abbildung 19). Es fanden sich acht Kandidaten mit einem KI <0,7 sowie zehn Kandidaten mit einem KI <0,9. Die acht Kandidaten mit einem KI <0,7 waren namentlich die Substanzen GSK2879552 (LSD1-Inhibitor), Ribociclib (CDK4/CDK6-Inhibitor), Tosedostat (Aminopeptidase-Inhibitor), Rapamycin (mTOR-Inhibitor), S63845 (MCL1-Inhibitor), Selinexor (XPO1-Inhibitor), ATRA (RAR-Agonist), Eltanexor (XPO1-Inhibitor). Beide Inhibitoren des XPO1-Proteins, Selinexor und Eltanexor, ließen sich unter diesen Kandidaten finden. Diese im Screen als stark synergistisch identifizierte Kombination von XPO1- und Menin-MLL-Inhibition wurde in weiteren Experimenten charakterisiert (vgl. Kapitel 4.4). Da die *NPM1*^{mut} OCI-AML3-Zellen eine starke Übereinstimmung mit den *NPM1*^{mut} *Npm1*^{CA/+}*Flt3*^{ITD/+}-Zellen aufwiesen, wurden die Ergebnisse dieser Screens auch in einer Konsensus-Tabelle zusammengefasst (Abbildung 19).

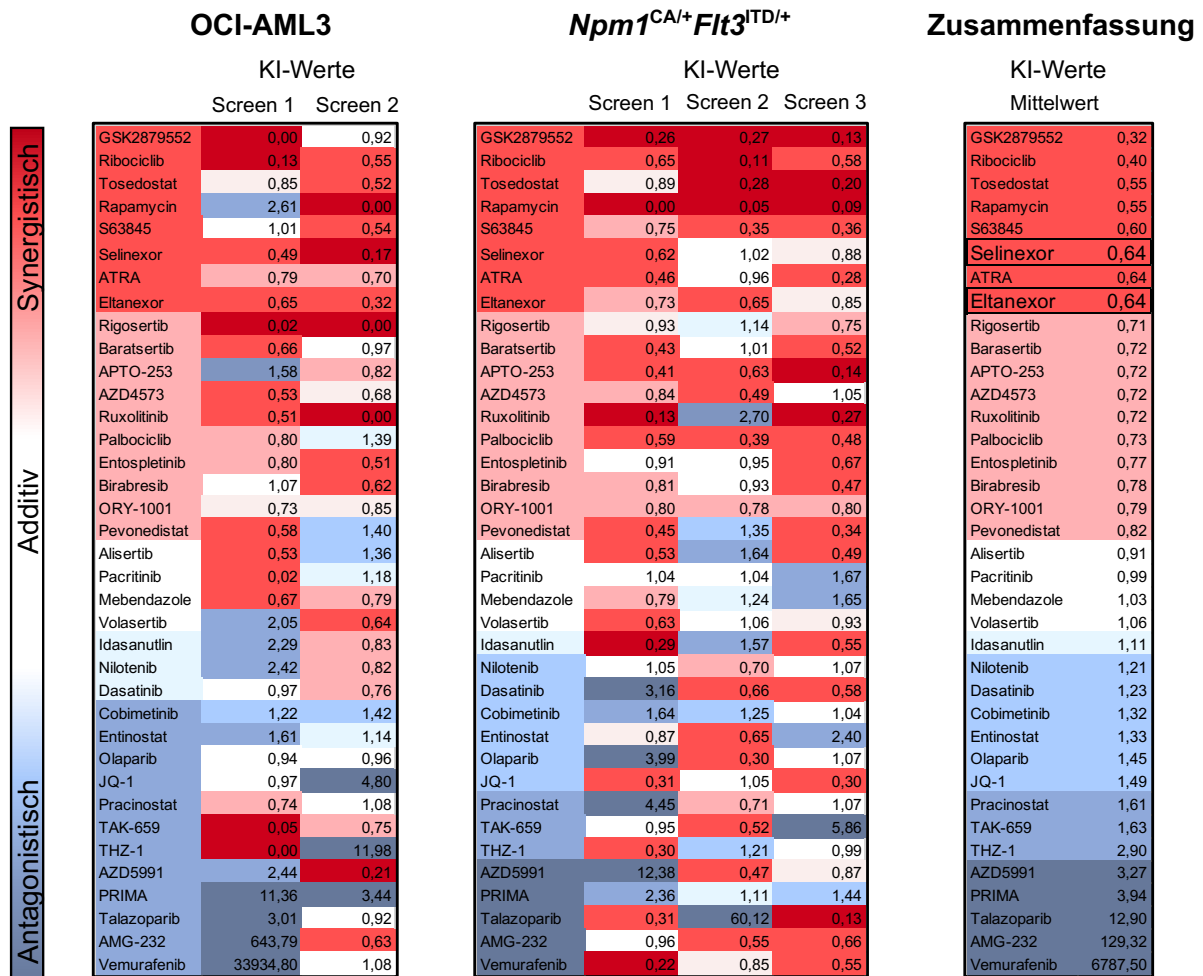


Abbildung 19: Synergismus-Screen in den humanen *NPM1*^{mut} OCI-AML3-Zellen sowie in den murinen *Npm1*^{CA/+}*Fit3*^{TD/+} AML-Zellen mit anschließender kombinierter Auswertung. Die Zellzahlen wurden mittels Durchflusszytometrie nach DAPI-Färbung (1 µg/ml) bestimmt und die Kombinationsindices mittels der CompuSyn-Software nach der Chou-Talalay-Methode [117] errechnet. Einteilung nach KI-Werten: sehr starker Synergismus (KI<0,1, dunkelrot), starker Synergismus (KI=0,1-0,3, dunkelrot), Synergismus (KI=0,3-0,7, rot), moderater Synergismus (KI=0,7-0,85, lachsfarben), leichter Synergismus (KI=0,85-0,9, rosa), additiv (KI=0,9-1,1, weiß), leichter Antagonismus (KI=1,1-1,2, hellblau), moderater Antagonismus (KI=1,2-1,45, blau), Antagonismus (KI=1,45-3,3, mittelblau), starker Antagonismus (KI=3,3-10, dunkelblau) sowie sehr starker Antagonismus (KI>10, dunkelblau) [117].

Die humanen *NPM1*^{mut} IMS-M2-Zellen unterschieden sich hingegen deutlich von den anderen beiden Zelllinien, weshalb diese Zellen einzeln betrachtet und nicht mit den *NPM1*^{mut} OCI-AML3-Zellen sowie *Npm1*^{CA/+}*Fit3*^{TD/+}-Zellen zusammengefasst wurden (Abbildung 20). *NPM1*^{mut} IMS-M2-Zellen stammen ursprünglich von einer Patientin mit komplexen Karyotyp [165].

Auch für diese Zellen ließen sich in Kombination mit dem MMi MI-538 neun von 37 getesteten Medikamenten als synergistisch wirkende Substanzen (KI<0,9) identifizieren. Die synergistischsten Kandidaten (KI <0,7) waren Talazoparib (PARP1/2-Inhibitor), Ruxolitinib (JAK1/2-Inhibitor), Ribociclib (CDK4/ CDK6-Inhibitor), APTO-253 (c-Myc-Inhibitor), Nilotinib (Bcr-Abl-Inhibitor) und Palbociclib (CDK4/ CDK6-Inhibitor).

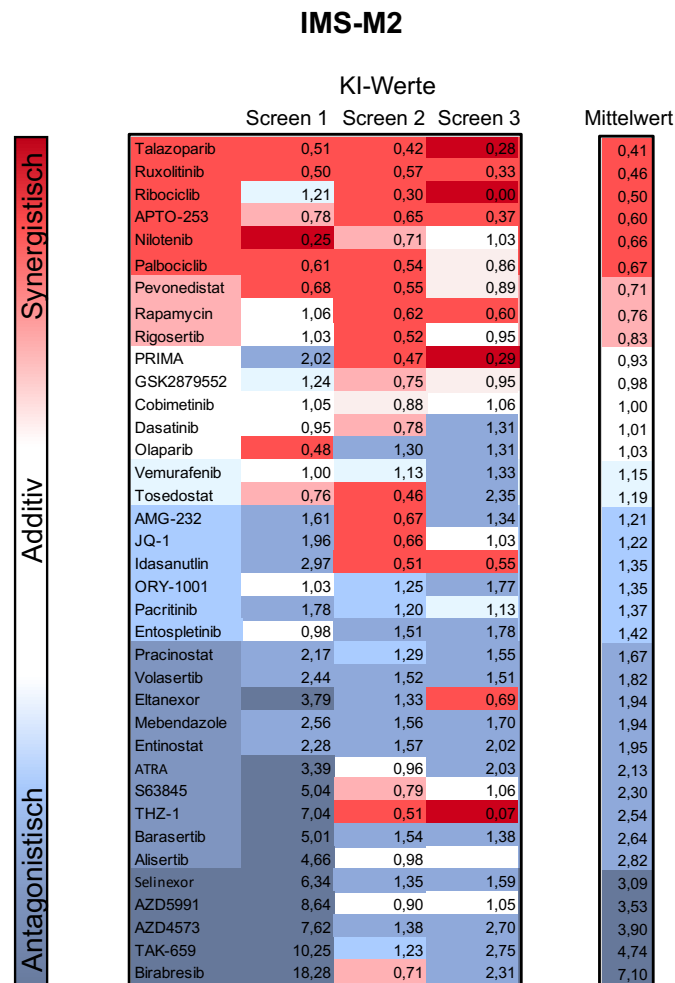


Abbildung 20: Synergismus-Screen der *NPM1^{mut}* IMS-M2 AML-Zellen. Die Zahlen viabler Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie nach DAPI-Färbung (1 µg/ml) gemessen und die Kombinationsindices nach Chou-Talalay- Methode [117] errechnet. Einteilung nach KI-Werten: sehr starker Synergismus (KI<0,1, dunkelrot), starker Synergismus (KI=0,1-0,3, dunkelrot), Synergismus (KI=0,3-0,7, rot), moderater Synergismus (KI=0,7-0,85, lachsfarben), leichter Synergismus (KI=0,85-0,9, rosa), additiv (KI=0,9-1,1, weiß), leichter Antagonismus (KI=1,1-1,2, hellblau), moderater Antagonismus (KI=1,2-1,45, blau), Antagonismus (KI=1,45-3,3, mittelblau), starker Antagonismus (KI=3,3-10, dunkelblau) sowie sehr starker Antagonismus (KI>10, dunkelblau) [117].

4.4 Kombinierte XPO1- und Menin-MLL-Inhibition in *NPM1*^{mut} AML

Nun sollte die identifizierte Kombination aus XPO1- und Menin-MLL-Inhibition durch weitere Experimente näher charakterisiert werden. Eltanexor wurde im Hinblick auf etwaige klinische Testung aufgrund eines vorteilhafteren pharmakodynamischen Profils für die weitergehende Untersuchung ausgewählt, da es die Blut-Hirnschranke weniger penetriert als zum Beispiel der vergleichbare Vertreter dieser Substanzklasse Selinexor, was für die Patienten verträglicher ist [114].

4.4.1 Validierung der Kombinationstherapie in *NPM1*^{mut} AML

Zunächst wurden die Ergebnisse des Screens hinsichtlich des Proliferationsverhaltens der *NPM1*^{mut} OCI-AML3- und IMS-M2-Zellen mit zusätzlichen Konzentrationsstufen (neun anstelle der vier Konzentrationsstufen des Screens) validiert. Außerdem wurden die zugehörigen Kombinationsindices berechnet, um Synergismus darzustellen. Als Negativkontrolle wurden HL-60-Zellen verwendet.

Die Kombination aus XPO1- und Menin-MLL-Inhibition hat sowohl in den *NPM1*^{mut} OCI-AML3-Zellen als auch in den *NPM1*^{mut} IMS-M2-Zellen einen deutlich stärkeren antiproliferativen Effekt als die Einzelbehandlungen (Abbildung 21 **A** und **C**).

In den *NPM1*^{mut} OCI-AML3-Zellen verschoben sich die EC₅₀-Werte nach der Kombinationsbehandlung für MI-538 von mikro- zu nanomolaren Konzentrationen. Für Eltanexor reduzierte sich die Konzentration um mehr als das Achtfache (MI-538: > 2,5 µM, Eltanexor: 2,37 µM, Kombination: 316 nM). Alle kombinierten Konzentrationsstufen der beiden Inhibitoren waren dabei synergistisch (Abbildung 21 **B**).

In den *NPM1*^{mut} IMS-M2-Zellen ließ sich ebenfalls ein synergistischer Effekt für die Substanzkombination nachweisen, dieser war jedoch weniger ausgeprägt als in den oben genannten *NPM1*^{mut} OCI-AML3-Zellen (Eltanexor: 251 nM, MI-538: 355 nM, Kombination: 75 nM) (Abbildung 21 **D**).

Die als Negativkontrolle für die Menin-MLL-Inhibition verwendeten HL-60-Zellen, zeigten bei der Kombinationsbehandlung keine Linksverschiebung des EC₅₀-Werts, sondern lediglich einen ähnlichen Kurvenverlauf wie bei der Eltanexor-Einzelbehandlung (Abbildung 21 **E**).

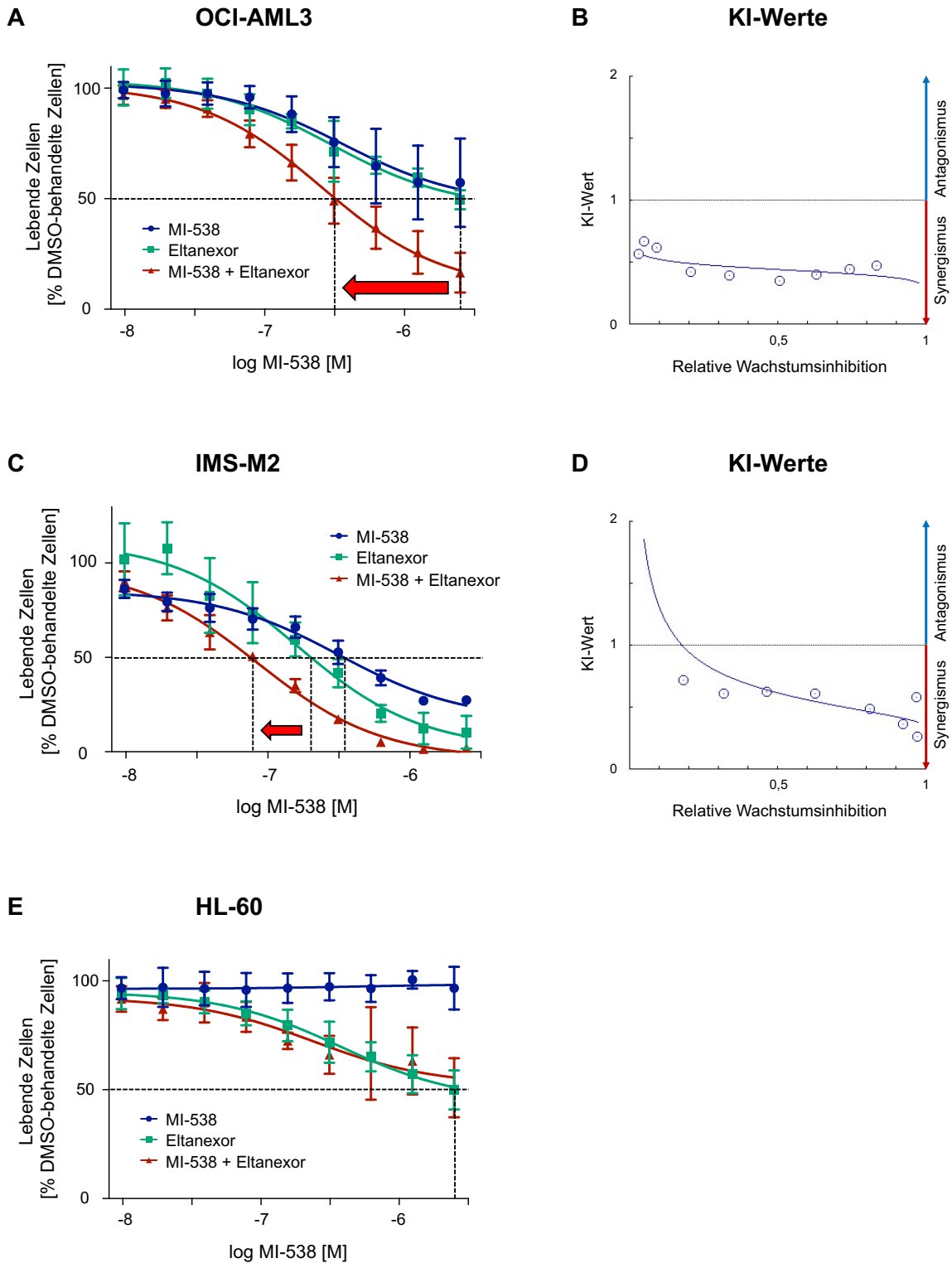


Abbildung 21: Dosis-Wirkungs-Kurven der *NPM1*^{mut} OCI-AML3-Zellen (A), *NPM1*^{mut} IMS-M2-Zellen (B) und HL-60-Zellen (C) nach Behandlung mit dem MMi MI-538 (2,5 μ m, viereinhalb Tage, blau) oder Eltanexor (300 nM, zwei Tage, grün) oder der Kombination aus beiden viereinhalb Tage mit MI-538 davon zwei Tage mit Eltanexor (rot). Die gestrichelte Linie zeigt jeweils den EC₅₀-Wert an. Die Daten wurden in drei unabhängigen Experimenten mit jeweils technischen Triplikaten erhoben. Die Anzahl der lebenden Zellen (DAPI-negativ) wurde mittels Durchflusszytometrie erhoben.

4.4.2 Kombinierte XPO1- und Menin-MLL-Inhibition supprimiert leukämogene Genexpression in *NPM1*^{mut} AML

Als nächstes sollte die Genexpression nach Kombinationsbehandlung aus XPO1- und Menin-MLL-Inhibition im Vergleich zur jeweiligen Einzelbehandlung sowie der Kontrolle mit DMSO untersucht werden. Hierfür wurde die Expression der Gene *HOXA9*, *HOXA10*, *HOXB3* sowie *FLT3* und *MEIS1* untersucht. Es wurden zunächst *NPM1*^{mut} OCI-AML3-Zellen entweder mit dem MMi MI-538 (2,5 µM, viereinhalb Tage), mit dem XPO1-Inhibitor Eltanexor (300 nM, zwei Tage), mit der Kombination aus beiden oder DMSO (0,1%) behandelt. Anschließend erfolgte eine qPCR.

Nach viereinhalbtägiger Behandlung mit MI-538 sowie zweitägiger Behandlung mit Eltanexor zeigten sich die Level der *MEIS1*- sowie *FLT3*- Expression bereits herabreguliert. Nach Behandlung mit der Kombination zeigte sich darüber hinaus eine signifikant deutlichere Herabregulation der Expression dieser Gene im Vergleich sowohl zur DMSO-Kontrolle (*FLT3*: 12% nach Kombinationsbehandlung versus 100% nach DMSO-Behandlung, $p < 0,0001$; *MEIS1*: 1% nach Kombinationsbehandlung versus 100% nach DMSO-Behandlung, $p < 0,0001$) als auch zu den Einzelbehandlungen (*FLT3*: 12% nach Kombinationsbehandlung versus 33% nach MI-538-Behandlung bzw. 30% nach Eltanexor-Behandlung, $p < 0,0001$, *MEIS1*: 1% nach Kombinationsbehandlung versus 5% nach MI-538-Behandlung bzw. 4% nach Eltanexor-Behandlung, $p < 0,0001$).

Die Expression der Gene *HOXA9*, *HOXA10* und *HOXB3* wurde nach der Einzelbehandlung mit Eltanexor ebenfalls herabreguliert, allerdings zeigte sich erneut eine signifikant stärkere Herabregulation dieser Gene nach Kombinationsbehandlung (*HOXA9*: 7% nach Kombinationsbehandlung versus 87% nach MI-538-Behandlung bzw. 14% nach Eltanexor-Behandlung, $p < 0,0001$, *HOXA10*: 3% nach Kombinationsbehandlung versus 113% nach MI-538-Behandlung bzw. 9% nach Eltanexor-Behandlung, $p < 0,0001$, *HOXB3*: 7% nach Kombinationsbehandlung versus 68% nach MI-538-Behandlung bzw. 13% nach Eltanexor-Behandlung, $p < 0,0001$).

Zusammenfassend ließ sich eine signifikant stärkere Suppression der hier untersuchten Genexpression nach der kombinierten XPO1- und Menin-MLL-Inhibition im Vergleich zur Einzelbehandlung beobachten (siehe Abbildung 22).

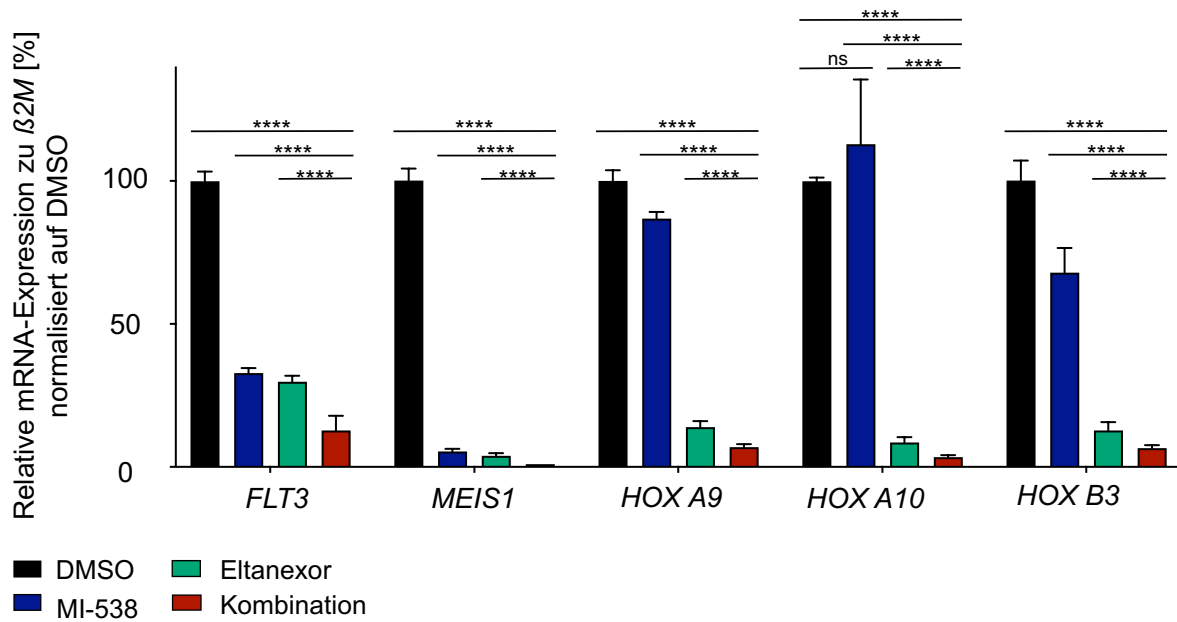


Abbildung 22: Genexpressionsanalyse durch qPCR nach Behandlung mit MI-538 (2,5 μ M, viereinhalb Tage), Eltanexor (300 nM, zwei Tage), Kombination aus MI-538 und Eltanexor (2,5 μ M, viereinhalb Tage/300 nM, zwei Tage) oder DMSO (0,1%) als Kontrolle in humanen *NPM1*^{mut} OCI-AML3-Zellen. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression gegenüber β 2M, normalisiert auf DMSO-behandelte Zellen. Die Daten wurden in drei unabhängigen Experimenten mit jeweils technischen Triplikaten erhoben. ns: > 0,05; *:p < 0,05; **:p < 0,01; ***:p < 0,001; ****:p < 0,0001.

4.4.3 Kombinierte XPO1- und Menin-MLL-Inhibition vermittelt Reduktion der Bindung des Menin-MLL-Komplexes an das Chromatin über MI-538

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass pharmakologische Menin-MLL-Inhibition zu einer vollständigen Depletion von Menin vom Chromatin in *MLL-r* AML-Zellen führt [100]. Aus diesem Grund sollte ermittelt werden, welche Effekte die Kombinationsbehandlung aus XPO1- und Menin-MLL-Inhibition im Vergleich zu den Einzelbehandlungen auf die Menin-Bindung in *NPM1^{mut}* AML ausübt.

Dazu wurden *NPM1^{mut}* OCI-AML3-Zellen entweder mit dem MMi MI-538 (viereinhalb Tage), mit dem XPO1-Inhibitor Eltanexor (zwei Tage), der Kombination aus beiden oder dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Anschließend wurde eine Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) mit darauffolgender quantitativer Real-Time-PCR durchgeführt (ChIP-PCR). Die Detektion spezifischer Sequenzen des *MEIS1*- und *HOXA9*- *Gene-body* sowie von *SOX2* als Negativkontrolle erfolgte mittels dafür hergestellten Primern (vgl. Tabelle 11).

Es konnte beobachtet werden, dass Menin von *MEIS1*- und *HOXA9*-Gen-Loci depletiert wird (vgl. Abbildung 23). Der XPO1-Inhibitor hingegen bewirkte keine Veränderung der Menin-Bindung an die oben genannten Ziel-Loci. Weiterhin zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Einzelbehandlung MI-538 und der Kombinationsbehandlung. Die Menin-Depletion nach Kombinationstherapie entspricht also der nach Einzelbehandlung mit dem MMi MI-538 (Abbildung 23). Am Locus des nicht exprimierten Gens *SOX2*, das als Negativkontrolle diente, zeigt sich keine Menin-Bindung.

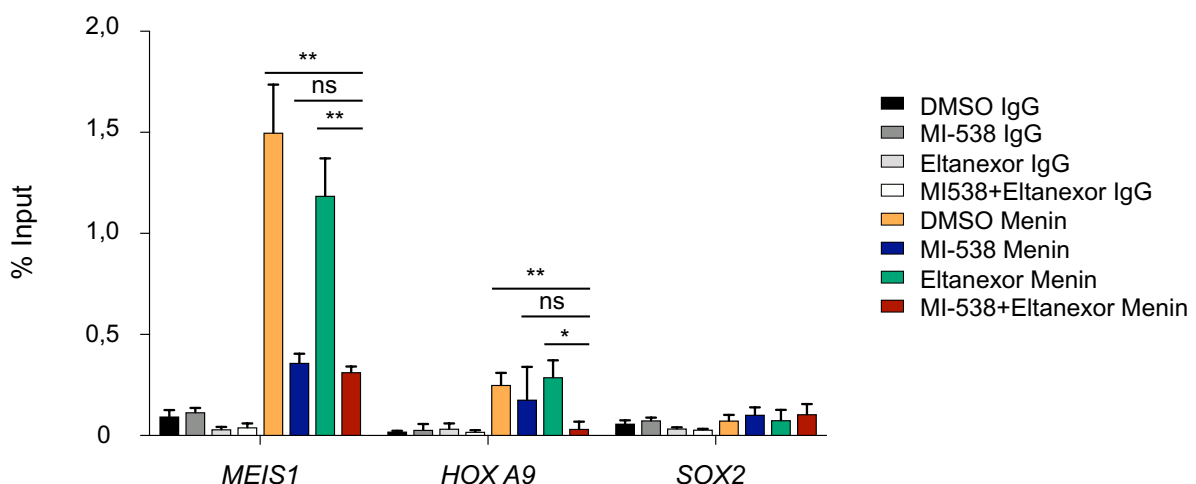


Abbildung 23: Chromatin-Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen Menin und IgG sowie anschließender qPCR nach Behandlung mit MI-538 (2,5 μ M, viereinhalb Tage), Eltanexor (300 nM, zwei Tage), Kombination aus MI-538 und Eltanexor (2,5 μ M, viereinhalb Tage/300 nM, zwei Tage) oder DMSO (2,5 μ M, Kontrolle) in humanen *NPM1^{mut}* OCI-AML3-Zellen.

4.4.4 Kombinierte XPO1- und Menin-MLL-Inhibition induziert die Expression des monozytären Differenzierungsmarker CD11b in *NPM1*^{mut} AML

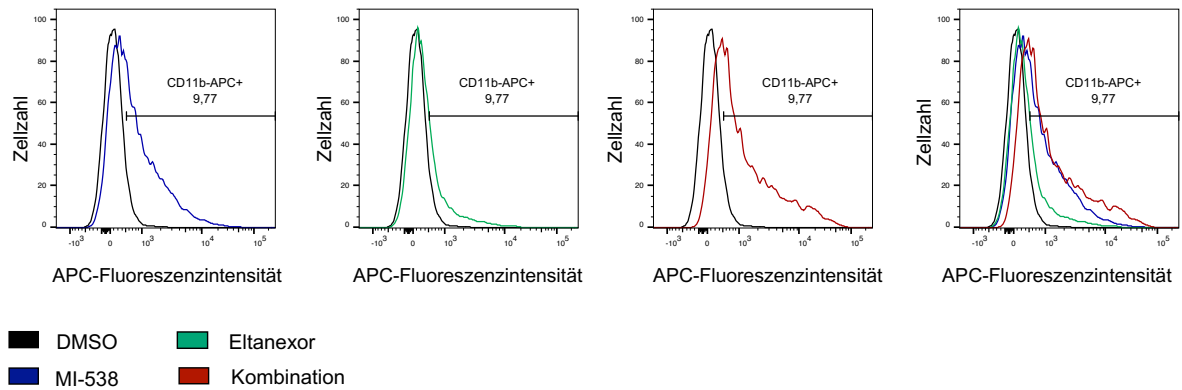
Es sollte nun untersucht werden, welchen Effekt die Behandlungen auf die Differenzierung der AML-Zellen haben, da im vorherigen Experiment Gene der Selbsterneuerung herabreguliert wurden. Dafür wurden *NPM1*^{mut} OCI-AML3-Zellen entweder mit MI-538 (viereinhalb Tage), Eltanexor (zwei Tage), der Kombination aus beiden (viereinhalb Tage davon zwei Tage) oder DMSO (viereinhalb Tage) als Kontrolle behandelt. Als Marker wurde CD11b verwendet, ein Differenzierungsmarker für Zellen der myeloisch-monozytären Linie [166]. Dieser wurde mit entsprechendem Antikörper detektiert und die Expression anschließend durch Durchflusszytometrie erhoben. Als Negativkontrolle wurden mit DMSO behandelte Zellen verwendet und die entsprechenden Gates wurden an ungefärbten *NPM1*^{mut} OCI-AML3-Zellen gesetzt und in Histogrammen dargestellt (Abbildung 24). Die schwarze Kurve stellt die DMSO-Kontrolle dar.

Es ließ sich eine deutliche Steigerung der CD11b-Expression nach Kombinationsbehandlung im Vergleich zur DMSO-Kontrolle beobachten ($p < 0,0001$). Die CD11b-Expression nach Kombination zeigte sich verglichen mit der Eltanexor-Behandlung ebenfalls signifikant erhöht ($p < 0,01$), unterschied sich allerdings nicht substantiell ($p > 0,05$) von der Behandlung mit MI-538 (Kombination: 66%, MI-538: 59%, Eltanexor: 30%, DMSO: 12%) (Abbildung 25 **A**). Dies lässt darauf schließen, dass die Differenzierungseffekte zu diesem Zeitpunkt auf die Behandlung mit dem MMi zurückzuführen sind.

Um Ausmaß und zeitlichen Verlauf möglicher Differenzierungseffekte nach Behandlung mit dem XPO1-Inhibitor zu untersuchen, wurde die Behandlungszeit von Eltanexor von zwei auf viereinhalb Tage verlängert und anschließend die CD11b-Expression bestimmt. Die Behandlungsdauer des MMi blieb weiterhin bei viereinhalb Tagen. Nun ließ sich eine deutliche Steigerung der CD11b-Expression der Zellen sowohl nach den Einzelbehandlungen als auch nach der Kombinationsbehandlung beobachten (MI-538: 59%, Eltanexor: 93%, Kombination: 99%) (Abbildung 25 **B**).

Obwohl nach der Behandlung mit Eltanexor allein bei 93% der Zellen die Expression von CD11b induziert wurde, zeigt sich nach Kombinationsbehandlung ein nochmals signifikant stärkerer Anstieg auf 99% ($p < 0,01$). Außerdem zeigte sich, dass eine viereinhalbtägige Behandlung mit Eltanexor die CD11b-Expression der Zellen stärker induziert als eine zweitägige Behandlung (93% versus 30%, $p < 0,0001$).

A



B

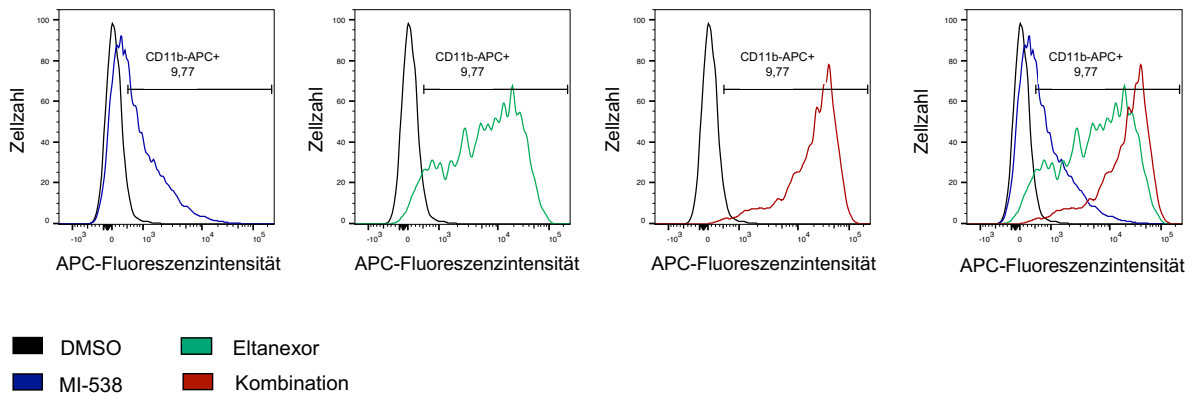
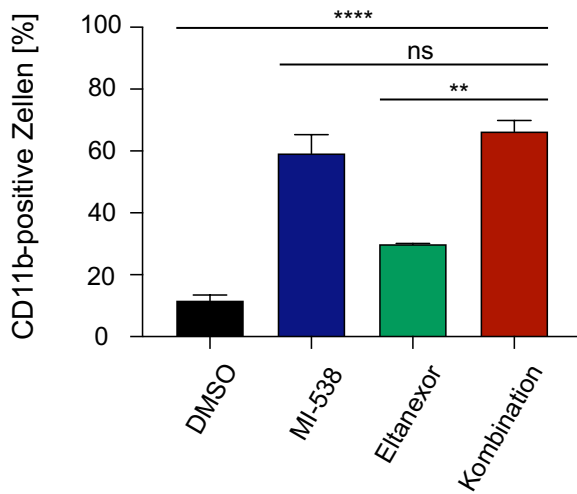


Abbildung 24: A Differenzierung nach Behandlung mit MI-538 (2,5 μ M, viereinhalb Tage, blau), Eltanexor (300 nM, zwei Tagen, grün), Kombination aus MI-538 und Eltanexor (2,5 μ M, viereinhalb /300 nM, zwei Tagen, rot) oder DMSO (0,1%, Kontrolle, schwarz) bestimmt über die CD11b-Expression. **B** Differenzierung nach viereinhalb Tagen XPO1-Inhibition ansonsten wie A. Die Daten wurden in technischen Duplikaten erhoben. Die Anzahl der lebenden (DAPI-negativ) und CD11b-positiven Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

A MI-538 4,5 Tage / Eltanexor 2 Tage



B MI-538 4,5 Tage / Eltanexor 4,5 Tage

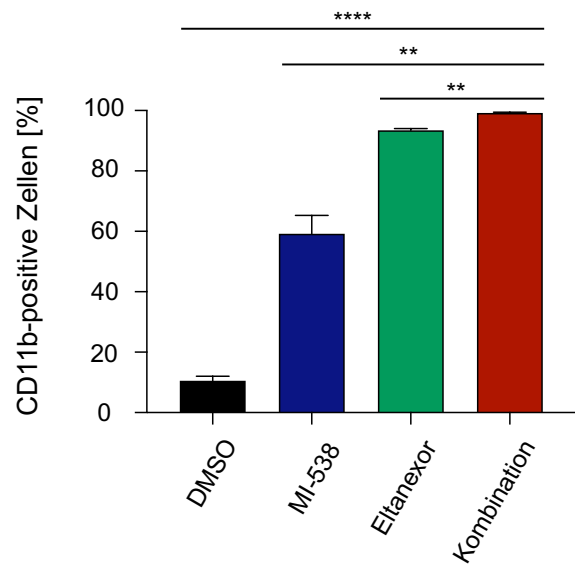


Abbildung 25: A und **B** Zusammenfassende Darstellung mittels Gating bestimmter Prozente, dargestellt als Balkendiagramm. Die Daten wurden in technischen Duplikaten erhoben. Die Anzahl der lebenden (DAPI-negativ) und CD11b-positiven Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. ns: > 0,05; *:p < 0,05; **:p < 0,01; ***:p < 0,001; ****:p < 0,0001.

4.4.5 Kombinierte XPO1- und Menin-MLL-Inhibition induziert Apoptose in *NPM1*^{mut} AML

Um den Effekt der kombinierten Behandlung auf die *NPM1*^{mut} AML weiter zu charakterisieren, wurden Apoptose-Assays durchgeführt. Dafür wurden erneut *NPM1*^{mut} OCI-AML3-Zellen entweder mit MI-538 (viereinhalb Tage), Eltanexor (zwei Tage), der Kombination aus beiden (viereinhalb Tage/ zwei Tage) oder DMSO (viereinhalb Tage) als Kontrolle behandelt. Anschließend folgte eine Annexin-V- und DAPI (1 µg/ml) - Färbung sowie die Erhebung der Daten mittels Durchflusszytometrie nach Detektion. Die Anzahl apoptotischer Zellen entspricht der Summe aus Annexin-V-positiven / DAPI-negativen Zellen (frühe Apoptose) und Annexin-V-positiven / DAPI- positiven Zellen (späte Apoptose). Als tote Zellen werden hier ausschließlich DAPI-positiv / Annexin-V-negativ Zellen bezeichnet.

Die durch die Behandlung mit den Einzelsubstanzen ausgelöste Apoptose ließ sich durch kombinierte Behandlung signifikant steigern (MI-538: 23%, Eltanexor: 25%, DMSO: 13%, Kombination: 40% mit $p < 0,0001$ zu den Einzelbehandlungen) (vgl. Abbildung 26). Besonders die Anzahl früh-apoptotischer Zellen zeigte sich im Vergleich zu den Einzelbehandlungen erhöht. Die Induktion von Apoptose der AML-Zellen könnte also einen möglichen Wirkmechanismus der Kombinationstherapie darstellen.

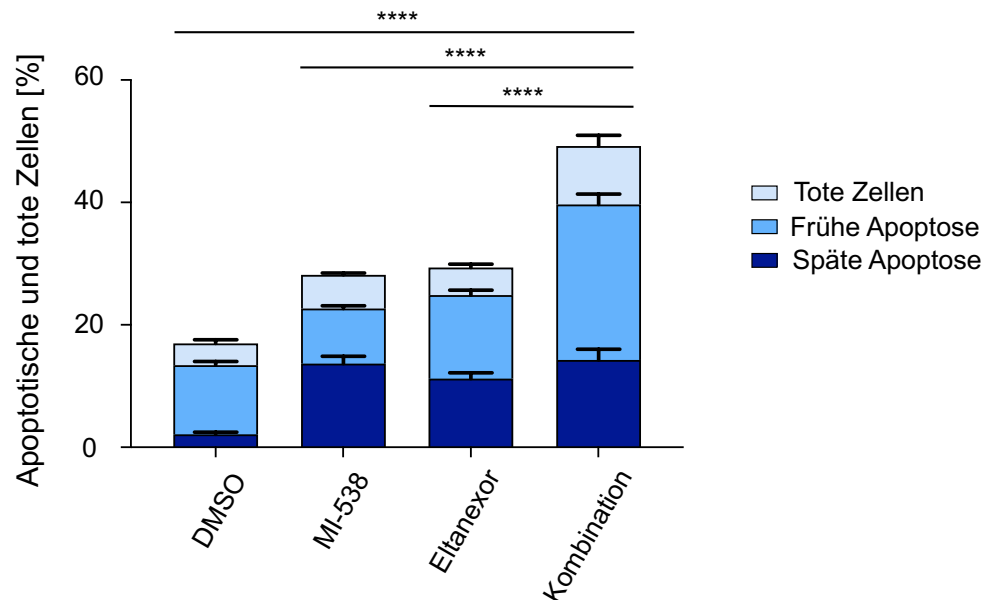


Abbildung 26: A Apoptose in *NPM1*^{mut} OCI-AML3-Zellen nach Behandlung mit MI-538 (2,5 µM, viereinhalb Tage), Eltanexor (300 nM, zwei Tage), Kombination aus MI-538 und Eltanexor (2,5 µM, viereinhalb Tage/300 nM, zwei Tage) oder DMSO (0,1%) als Kontrolle nach Annexin-V- und DAPI (1 µg/ml) - Färbung. Die Daten wurden in drei unabhängigen Experimenten mit jeweils technischen Triplikaten erhoben. Die Anzahl der lebenden (DAPI-negativ) und Annexin-V-positiven Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. ns: $> 0,05$; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$.

4.4.6 Kombinierte XPO1- und Menin-MLL-Inhibition wirkt synergistisch in primären Zellproben

Abschließend sollten die bisher beobachteten Ergebnisse an primären Patientenproben validiert werden. Während der Arbeiten an diesem Projekt wurde der neue MMi der 3. Generation VTP-50469 mit besseren pharmakokinetischen Eigenschaften, höherer Selektivität und Bindungsaffinität entwickelt, dessen enges Analogon SNDX-5613 sich aktuell in klinischer Testung befindet (NCT04065399). Da dieses Medikament in einer klinischen Studie bereits vielversprechende Ergebnisse zeigt [167], wurden die folgenden Experimente mit VTP-50469 durchgeführt. Die Zellen der primären Patientenprobe wurden erneut entweder mit VTP-50469 (viereinhalb Tage), Eltanexor (zwei Tage), der Kombination aus beiden (viereinhalb Tage/ zwei Tage) oder DMSO (viereinhalb Tage) als Kontrolle behandelt. Die Anzahl der lebenden Zellen wurde wie oben beschrieben erhoben. Aufgrund der geringen Zellzahl war es nur möglich, wie im Screen, vier abstufende Konzentrationen auszuwählen.

Es lässt sich beobachten, dass die Behandlung mit der Kombination eine deutliche Linksverschiebung der EC_{50} -Werte zu geringeren Konzentrationen verglichen mit der Einzelbehandlung bewirkt (Eltanexor 447 nM, VTP 100 nM, Kombination: 20 nM, Abbildung 27 **A**). Anschließend wurden zur Synergismus-Bestimmung die Kombinationsindices gegen die relative Wachstumsinhibition aufgetragen (siehe Abbildung 27 **B**). Alle getesteten Konzentrationskombinationen zeigen Synergismus ($KI < 0,7$) an. Die Kombination aus MMi VTP-50469 und XPO1-Inhibitor Eltanexor inhibiert also auch synergistisch die Proliferation der primären Zellen.

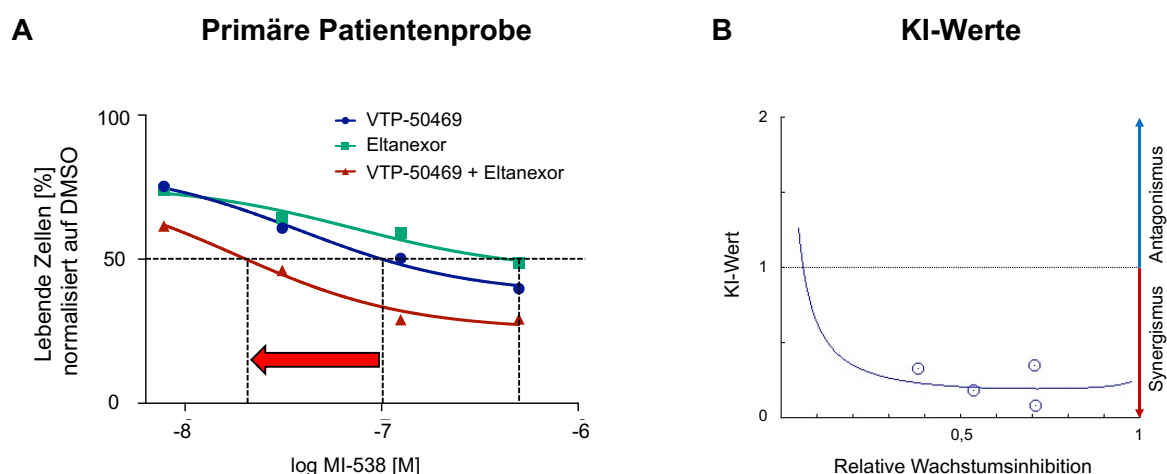


Abbildung 27: **A** Dosis-Wirkungs-Kurven einer primären Patientenprobe nach viereinhalb Tagen Behandlung mit dem MMi VTP-50469 (100 nM, blau), zwei Tage Eltanexor (200 nM) oder der Kombination aus beiden (rot). **B** Bestimmung des Synergismus mittels Kombinationsindices der Behandlung aus gemeinsamer XPO1- und Menin-MLL-Inhibitoren. Die Anzahl der lebenden Zellen (DAPI-negativ) wurde mittels Durchflusszytometrie erhoben.

5 Diskussion

5.1 Präklinische Entwicklung von synergistischen Kombinationsregimen

In dieser Arbeit wurde ein Screen zur Identifizierung von zielgerichteten, synergistischen Kombinationspartnern für eine Behandlung in Kombination mit einem MMi entwickelt und durchgeführt. Vor dem Hintergrund der hohen Remissionsraten von MMi in zwischenzeitlich publizierten Behandlungsdaten [13] stellt sich die Frage nach der Rationale der Entwicklung von Kombinationsregimen. Die Gruppe der AML ist geprägt von einer sowohl genetischen als auch epigenetischen Komplexität mit durchschnittlich mehr als drei Treibermutationen [32]. Aufgrund dieser Heterogenität ist nicht davon auszugehen, dass sich mit Monosubstanz-basierten Therapien bei dieser Erkrankung Langzeitremissionen erzielen lassen [14]. Die European Hematology Association (EHA) hat aus diesem Grund bereits 2016 die Entwicklung von rationalen Kombinationstherapien als eines der vorrangigen Ziele der Erforschung dieser Erkrankung definiert [14]. Um gerade der großen Gruppe älterer Patienten, die keine intensive Chemotherapie erhalten können, eine kurative Therapieoption zu ermöglichen, stellen zielgerichtete Kombinationstherapien einen vielversprechenden Ansatz dar. Es besteht also ein dringender Bedarf an neuen, Mechanismus-basierten Therapien, die weniger toxisch und somit auch für ältere Patienten zugänglich sind. Trotz kürzlichen Zulassungen von Vertretern dieser Therapien hat sich bisher kein neues Medikament als Einzelbehandlung bewährt.

Bereits vor mehr als zwei Jahrzehnten schlugen Gilliland und Griffin die Two-Hit-Hypothese für die Entstehung der AML vor [164]. Diese besagte, dass zwei verschiedene Arten von Mutationen für die Entwicklung einer AML notwendig sind, zum einen Mutationen, die den leukämischen Zellen einen Wachstumsvorteil geben und zum anderen Mutationen, die zu einer Blockade der Differenzierung führen [33]. Wenn also mindestens zwei Mutationen (im Median durchschnittlich mehr als drei Treibermutationen [32]) notwendig zur Entstehung der AML sind, somit sind eventuell auch zwei oder vielleicht sogar mehr Ansatzpunkte zu einer erfolgreichen Therapie notwendig [14], da die Zellen von mehreren onkogenen Treibern abhängig sind [33].

Die oben bereits beschriebene Heterogenität erschwert jedoch nicht nur die Therapie durch die Notwendigkeit mehrerer Ansatzpunkte, sondern führt auch zu einem erhöhten Risiko einer möglichen Resistenzentwicklung [168]. Eine Resistenz gegen die Behandlung ist entweder primär bereits vorhanden oder sekundär im Laufe der Therapie erworben [168]. Die primäre Resistenz kann zum Beispiel auf genetische oder metabolische Besonderheiten wie bestimmte Punktmutationen in Rezeptoren oder Enzymen der Patienten zurückgeführt

werden [169, 170], während bei der sekundär erworbenen Resistenz häufig neu erworbene Mutationen verantwortlich sind. Dadurch erlangen die Zellen einen Überlebensvorteil und können erneut krankhaft proliferieren, was zum Rezidiv führen kann [168, 169]. Auch wenn es möglich ist, dass diese Patienten durch Therapie eine erneute CR erreichen, ist das krankheitsfreie Intervall anschließend deutlich schlechter prognostiziert als bei Patienten, die kein Rezidiv entwickelt haben [168].

Darüber hinaus besteht bei jeder Einzelsubstanz theoretisch die Gefahr, dass die leukämischen AML-Zellen sekundäre Resistenzen aufgrund des medikamentösen Selektionsdrucks bilden und die Behandlung trotz ursprünglichen Ansprechens nicht mehr greift wie aktuell beispielsweise bei den *FLT3*-Inhibitoren zu beobachten war [171]. Kombinationstherapien könnten einen möglichen Ansatz darstellen, um diesem Phänomen entgegenzutreten. In weiterführenden Experimenten könnte zudem untersucht werden, ob mehrere Eingriffe in den gleichen Signalweg aber an unterschiedlichen Stellen oder aber mehrere Eingriffe in komplett unterschiedliche Signalwege insbesondere bei unabhängigen Mutationen am zielführendsten sind. Dies ist wahrscheinlich individuell abhängig vom Patienten, sodass aktuell auch individuell zugeschnittene Kombinationsbehandlungen diskutiert werden [172].

Andererseits sollte bei der Entwicklung von medikamentösen Kombinationstherapien eine mögliche Zunahme der unerwünschten Arzneimittelwirkungen (UAW) als auch die Möglichkeit der Zunahme von möglichen Medikamenteninteraktionen berücksichtigt werden. Bei der Gabe mehrerer Medikamente kann sowohl die Metabolisierung verändert als auch eine Verstärkung der UAW verursacht werden. Bei einer Therapie mit dem BCL2-Inhibitor Venetoclax muss zum Beispiel in Kombination mit CYP3A4-Inhibitoren wie Azolen eine Dosisanpassung erfolgen, da das Medikament ebenfalls über CYP3A4 metabolisiert wird [173]. Gerade bei älteren, komorbiden Patienten muss man beachten, dass die Kombination gut verträglich ist, um eventuelle schädliche Effekte so gering wie möglich zu halten. Hoffnung auf ein niedriges Niveau an zusätzlichen UAW bei zielgerichteten Kombinationstherapien geben aktuelle Studiendaten [174]. Beispielsweise zeigte sich die Therapie aus BCL2-Inhibitor Venetoclax mit IDH-Inhibitor Ivosidenib sowohl ohne als auch mit dem Chemotherapeutikum Azacitidin als gut verträglich [174]. Die meisten aufgetretenen UAW (91%) waren lediglich mild oder moderat [174].

Ein weiterer Vorteil von synergistisch wirkenden Kombinationsregimen könnte sein, dass durch einen synergistischen statt rein additiven Effekt mit deutlich niedrigere Konzentrationen eine höhere Effektivität und dadurch weniger Toxizität als mit der Einzelbehandlung erreicht werden können. Da auch unter oben genannten Beispielen primär refraktäre Verläufe und Rezidive auftreten [49], wird noch viel Forschung nötig sein, um die

geeignetsten Kombinationen, ggf. auch von mehr als zwei Medikamenten, für Patienten individuell zu ermitteln.

Wie zuvor von unserer Gruppe demonstriert und in dieser Arbeit validiert, zeigen die MMi nicht nur in *MLL-r* (bereits von [100] gezeigt) sondern auch in *NPM1*^{mut} AML vielversprechende Ergebnisse bezüglich der Effekte auf die Proliferation, Genexpression, Differenzierung und Apoptose. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnte dramatische klinische Aktivität in aggressiven Leukämie-Modellen und primären Patientenproben nachgewiesen werden [12]. Seit Beginn der Experimente an dieser Arbeit, ist die Entwicklung von neuen MMi vorangeschritten. Die neu entwickelten Inhibitoren werden spezifischer, potenter und verfügen über ein verbessertes pharmakokinetisches Profil, was zu einem verbesserten Nebenwirkungsprofil und somit Verträglichkeit auch in älteren AML-Patienten führen könnte [100]. Aktuell befinden sich wie oben erwähnt sechs MMi in klinischer Phase-I-Testung. Namentlich sind das die Substanzen Ziftomenib (NCT04067336), Revumenib (NCT04065399), DS-1594b (NCT04752163), JNJ-75276617 (NCT04811560), BMF-219 (NCT05153330) und DSP-5336 (NCT04988555). Kürzlich publizierte Daten der Phase-I-Studie (NCT04065399) mit dem MMi Revumenib (SNDX-5613) zeigten eine Rate an CR oder CR mit partieller hämatologischer Erholung (CRh) von 30% sowie eine Gesamt-Ansprechrates von 53% bei Patienten mit refraktärer oder rezidivierender akuter Leukämie mit *MLL*-Rearrangement oder *NPM1*-Mutation [13]. Da sich die neu entwickelten Substanzen häufig zumindest partiell von früheren MMi ableiten, ist es sehr wahrscheinlich, dass sich der in dieser Arbeit entwickelte Screen auch auf künftig entwickelte Substanzen übertragen lässt. Dies konnte unsere Arbeitsgruppe bereits am MMi Ziftomenib demonstrieren [175].

5.2 Methodische Aspekte der Synergismus-Testung von Menin-MLL-Inhibitoren

Da die Wirkung von MMi (wie fast alle epigenetisch wirksamen Medikamenten) im Zellkulturmodell mit einer Latenz von einigen Tagen eintritt, ist nicht davon auszugehen, dass diese Substanzen in konventionelle Screens, die nach 24-48 Stunden ausgelesen werden als mögliche Kombinationspartner erkannt werden [176]. Hier wurde deshalb eine Vorbehandlungsphase durchgeführt, damit die häufig sehr schnell einsetzenden Effekte der Kombinationspartner einen möglichen Synergismus nicht maskieren. Grundsätzlich lässt sich das Testprinzip beliebig auf andere Medikamente mit oder ohne Vorbehandlungszeit anpassen.

Von den in dieser Arbeit identifizierten Compounds wurden die vielversprechendste Kombination an primären Patientenproben getestet und validiert (vgl. Kapitel 4.4.6). Somit könnte sich der Screen potenziell auch zur prospektiven Testung von Patientenmaterial als funktionelle Grundlage vor einer Therapieentscheidung eignen. Im Hinblick auf eine solche prospektive Testung ergeben sich jedoch auch mögliche Hindernisse.

Bei vielen Patienten mit hochzelliger AML besteht bei Diagnosestellung dringender therapeutischer Handlungsbedarf [6], sodass im Einzelfall nicht auf zeitaufwendige Laborresultate gewartet werden könnte. Das hier beschriebene Vorgehen könnte in so einer Situation aufgrund der erheblichen Vorarbeit und der aufwendigen Durchführung zu zeitaufwändig sein. Pro Screen erfolgt die gesamte Einzel- und Kombinationsbehandlung in nur einem einzigen Ansatz, wodurch sich eine Anfälligkeit für Fehler ergeben könnte und die Resultate schneller verfälscht werden könnten. Eine Testung in mehreren Replikaten ist aufgrund des gewählten Designs auf einer einzelnen 384-Kavitätenplatte nicht möglich und die Testung in mehreren Ansätzen manuell zu pipettieren ist zu zeitaufwändig. Gleichzeitig ist die Durchführung des Screens in Replikaten für die Validität der Messung entscheidend. Das bedeutet, dass im Falle einer Übersetzung dieser Methodik in eine präklinische Testung vor Therapiebeginn eine Prozessautomatisierung beispielsweise mittels Pipettierroboter sinnvoll wäre. Dadurch könnte nicht nur erheblich Zeit eingespart, sondern auch menschliche Fehlerquellen, verursacht durch das testende Personal, reduziert werden.

Auch die Quantität und Qualität bzw. der Blastengehalt des Probenmaterials kann stark variieren und somit potenziell die Aussagekraft der Testergebnisse beeinflussen. Beschrieben ist, dass die Punktionstechnik ein wichtiger Faktor für die Materialgüte ist [177]. Dies kann sich auf die Anzahl lebender Zellen pro Probe auswirken, die man für das Screening einsetzen könnte. Auch die Anzahl an möglichen Replikaten, die man an primären Proben durchführen kann, ist von der Materialmenge abhängig.

Wie weiter oben bereits beschrieben (vgl. Kapitel 3.2.7.2) erfolgte die Einteilung der niedermolekularen Inhibitoren nach ihrer Wirkpotenz und aufgrund der Menge der zu testenden Substanzen in verschiedene Konzentrationsstufen. Dadurch kann eventuell nicht für alle Medikamente in der getesteten Verdünnung das ideale Wirkungsfenster getroffen werden, welches die vollständige dynamische Breite abbildet. Dies kann die Auswertung durch Berechnung des Synergismus stören bzw. sogar unmöglich machen. Darüber hinaus spielt auch die Behandlungszeit eine wichtige Rolle. Für MI-538 erfolgte zwar eine Vorbehandlung, die anschließende Behandlungszeit der Kombinationspartnern war allerdings für alle Substanzen gleich lang (48 Stunden). Dadurch wird eventuell nicht der effektivste Behandlungszeitraum für jedes Medikament gewählt. Trotz dieser unterschiedlichen, methodischen Effekte zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit und der darauf aufbauenden Publikation [175] hinsichtlich der dynamischen Breite sowie Ansprechrate und Effektivität, dass reproduzierbare Ergebnisse mit methodisch ausreichend auswertbaren Daten entstehen.

Über die näher charakterisierte Kombination aus XPO1-Inhibitoren und MMi hinaus wurden für die verschiedenen Zelllinie zwischen neun bis 16 weitere synergistische Kombinationen identifiziert, die in zukünftigen Analysen nähergehend evaluiert werden könnten (vgl. Kapitel 4.3.2). Eine weitere vielversprechende Kombination neben den XPO1-Inhibitoren könnte also beispielsweise die Kombination der MMi mit LSD1-Inhibitoren wie GSK2879552 (NCT02177812)[178] oder ORY-1001 (EudraCT No.: 2018-000482-36)[179] sein, die bereits in klinische Studien untersucht werden. Da sich diese Substanzen bisher nicht als Einzelsubstanzen etabliert haben, könnte ein Kombinationsansatz eine gute Behandlungsoption darstellen.

Zusammenfassend bietet der Screen die Chance die aktuell wirksamsten erhältlichen Substanzen genauer zu charakterisieren, um so um so eine präklinische Grundlage für *in vivo*-Versuche und anschließende schnelle Translation in darauf aufbauenden klinischen Studien und spätere mögliche Therapien zu ermöglichen. Die Voraussetzung für diesen Ansatz ist die direkte Translation in die klinische Praxis. Bei Bestätigung der präklinisch beobachteten Ergebnisse und ähnlicher Aktivität im klinischen Setting an Patienten könnte der Synergismus-Screen die bisherige Therapieplanung ergänzen.

5.3 Wirkungsmechanismen von kombinierter XPO1- und Menin-MLL-Inhibition bei der Behandlung von *NPM1*^{mut}-AML

Die verschiedenen MMi wirken bei *MLL-r* Leukämien, indem sie die für die Chromatinbindung erforderliche Interaktion von Menin und MLL inhibieren und so die Assoziation des MLL-Fusionsprotein an Chromatin an ausgewählte MLL-Zielregionen verringert wird [100]. Diese Zielgene werden transkriptionell herabreguliert und es resultiert eine veränderte Genexpression, die Induktion von Differenzierung sowie Apoptose [100]. Sowohl in *MLL-r* AML-Zellen als auch in *NPM1*^{mut} AML-Zellen zeigte sich nach Menin-MLL-Inhibition eine Herunterregulierung der Expression von MLL-Zielgenen [99], [102], [103]. Interessanterweise werden jedoch nicht alle MLL-Bindungszielgene gleichermaßen herunterreguliert [100], [102]. Während die Zielgene wie beispielsweise *MEIS1*, *PBX3* oder *MEF2C* in *MLL-r* und *NPM1*^{mut} AML-Zellen nach Menin-MLL-Inhibition signifikant weniger exprimiert werden, wurde eine Herunterregulierung von *HOXA*-Genclustern in bisherigen Studien nur in *MLL-r* AML beobachtet [99],[100],[102]. Krivtsov et al. konnten jedoch kürzlich zeigen, dass auch in *MLL-r* AML die Expression der *HOXA*-Gencluster weniger auf eine Behandlung anspricht als die Expression der anderen oben genannten Genloci [100]. Aktuell ist noch nicht ausreichend geklärt, weshalb in AML-Subtypen mit *NPM1*-Mutation *HOXA*-Gencluster nach Menin-MLL-Inhibition nicht oder nur in geringem Umfang herunterreguliert werden. Dies bedarf weiterer Forschung.

Die Menin-MLL-Inhibition konnte in bisherigen präklinischen Arbeiten gerade für die Behandlung mit einer Einzelsubstanz vielversprechende Erfolge erzielen. Das Überleben von Mäusen mit *MLL-r* und *NPM1*^{mut} AML konnte enorm verbessert und in vielen Fällen konnten entweder vollständige Leukämiefreiheit erreicht oder die Progression der Krankheit gestoppt werden [100],[180]. In dieser Arbeit konnten die XPO1-Inhibitoren Eltanexor und Selinexor als geeignete Kombinationspartner identifiziert werden. XPO1-Inhibitoren wirken in *NPM1*^{mut} AML vermutlich über die Relokalisation von delokalisiertem *NPM1c* aus Zytoplasma zurück in den Nukleolus [108]. Dies führt wiederum zu einer Herunterregulation von *HOX*-Genen sowie deren Kofaktoren wie *MEIS1* und einer Induktion von Differenzierung [108]. Wie genau das funktioniert, ist ebenfalls noch nicht vollständig verstanden und erfordert weiterführende Untersuchungen.

Bezüglich der Genexpressions-Muster war auffällig, dass *MEIS1* das am stärksten herunterregulierte Gen nach Kombinationsbehandlung war (vgl. Kapitel 4.4.2). Da beide Einzelbehandlungen die Expression des Gens *MEIS1* herunterregulieren, könnte die synergistische Wirkung der Kombination eventuell auf eben diese gemeinsame Herunterregulation zurückzuführen sein. *MEIS1* spielt eine wichtige Rolle in hämatopoetischen Stammzellen und deren Fähigkeit zur Selbsterneuerung [181]. Außerdem

ist es an der Regulation der Transkription des häufig in der AML mutierten *FLT3*-Gens beteiligt [89]. Dessen Genexpression zeigte sich nach Kombinationsbehandlung ebenfalls signifikant reduziert. Ferner zeigte sich die *HOX*-Genexpression nach Kombinationstherapie im Gegensatz zur Einzelbehandlung mit MI-538 deutlich supprimiert, genauso wie im Vergleich zur Einzelbehandlung mit Eltanexor. Zusammenfassend sprechen diese Ergebnisse dafür, dass die Kombinationstherapie neben der *MEIS1*-Genexpression auch die Expression dessen *upstream* regulierenden *HOX*-Genen sowie von Downstreamzielregionen wie *FLT3* reduziert und somit mehrfach in diesen aberranten Signalweg eingreift. Um den genauen Wirkmechanismus der Kombinationstherapie weiter zu untersuchen, wäre es in weiterführenden Untersuchungen interessant die Genexpression darüber hinaus durch globale Transkriptom-Analysen zu untersuchen.

Für die Menin-MLL-Inhibition wurde in vorherigen Arbeiten gezeigt, dass Menin in *MLL-r* und *NPM1^{mut}* AML-Zellen nach der Behandlung vollständig und global vom Chromatin depletiert wird [12],[100]. MLL hingegen wurde nach Menin-MLL-Inhibition nicht global aus dem Chromatin verdrängt [100]. An dieser Stelle stellt sich die Frage, ob die XPO1-Inhibition ebenfalls die Bindung des MLL-Chromatinkomplexes an das Chromatin in typischen *MLL*-Zielregionen verändert. Für XPO1 konnte gezeigt werden, dass es eine Interaktion mit dem Kernporenkomplex-Protein NUP98 eingeht, welches in die Transkriptionsaktivierung involviert ist und häufig Fusionen mit Proteinen bildet, die das Chromatin umstrukturieren können [108]. Außerdem wurde gezeigt, dass XPO1 an *HOX*-Loci angereichert ist und NUP98-Fusionsproteine zu diesen Loci bringt [108]. Die Experimente dieser Arbeit konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Menin-Bindung nach Kombinationsbehandlung im Vergleich zur MI-538-Einzelbehandlung zeigen. Eltanexor übt keine nennenswerten Effekte auf die Menin-Bindung aus. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass der Effekt der Kombination auf die Menin-Bindung am Chromatin allein durch die Menin-MLL-Inhibition erreicht wird, wie es für die Einzelbehandlung bereits beschrieben ist [12]. Der XPO1-Inhibitor hingegen wird wahrscheinlicher über einen anderen Mechanismus wirken. Ob XPO1 (mit oder ohne NUP98) an den *MEIS1*-Locus bindet zudem müsste zukünftig noch untersucht werden.

Da sowohl für die Einzelbehandlung mit MMi als auch für die Einzelbehandlung mit XPO1-Inhibitoren eine deutliche Induktion von Differenzierung nach Behandlung beschrieben ist [12],[108], wurden diese Effekte auch nach der Kombinationsbehandlung untersucht. Die Differenzierung wurde in dieser Arbeit durch die Messung der Expression des Surrogatparameters CD11b bestimmt. CD11b ist ein Differenzierungsmarker für Zellen der myeloisch-monozytären Abstammungslinie [166]. Das Level der Expression von CD11b zeigte sich deutlich abhängig von der Behandlungsdauer und war nach längerer Behandlungszeit stärker ausgeprägt. Die Kombinationstherapie konnte signifikant mehr

Differenzierung induzieren, obwohl eine Einzelbehandlung mit Eltanexor bereits den Großteil der Zellen differenzierte. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass durch die Kombinationsbehandlung mehr Differenzierungseffekte erreicht werden können als durch die Einzelbehandlungen. Dies könnte im klinischen Alltag einen Vorteil zur schnelleren Kontrolle der AML bedeuten, wenn sich diese Resultate so in die Klinik übersetzen ließen. Gleichzeitig bestünde möglicherweise allerdings auch ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Differenzierungssyndroms. Die Kombinationstherapie konnte neben den Differenzierungseffekten ein deutlich höheres Level an apoptotischen sowie zu dem Messzeitpunkt bereits toten Zellen generieren als die jeweiligen Einzelbehandlungen. Das deutet darauf hin, dass die Kombinationsbehandlung die AML-Zellen schneller und effektiver in die Apoptose treibt, was übersetzt auf die klinisch eine schnellere Kontrolle der Leukämie last bedeuten könnte.

Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente und daraus gewonnenen Erkenntnisse könnte der Mechanismus hinter der synergistischen Kombinationstherapie aus MMi sowie XPO1-Inhibitor wie in Abbildung 28 dargestellt aussehen. Der MMi sowie der XPO1-Inhibitor führen zu einer Herunterregulierung der *MEIS1*-Expression. Darüber hinaus reguliert der XPO1-Inhibitor die Expression von upstream regulierenden *HOX*-Genen und der MMi die Expression von Zielgenen wie *FLT3* herunter. Dies führt synergistisch zu einer Wachstumshemmung der AML-Zellen, der Suppression leukämischer Genexpressionsmuster, sowie der Induktion von Differenzierung und Apoptose. Zusammenfassend stellt dieser Therapieansatz also eine vielversprechende neue Option zur Behandlung der *NPM1^{mut}* AML dar.

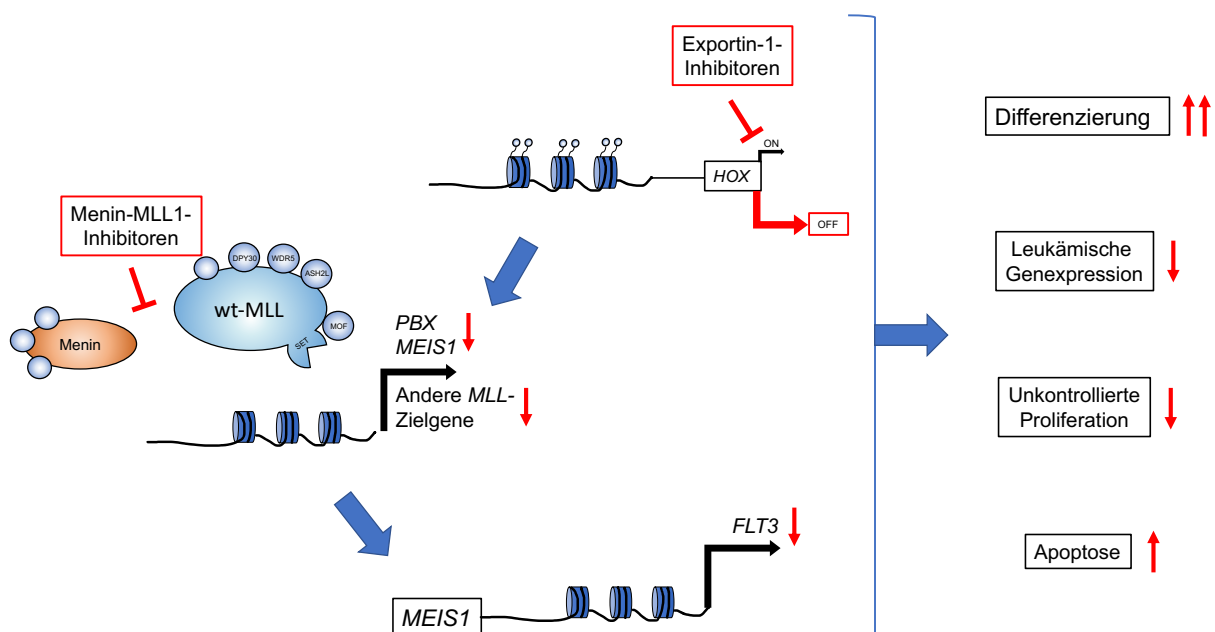


Abbildung 28: Mögliches Modell des synergistischen Mechanismus hinter einer kombinierten XPO1- und Menin-MLL-Inhibition in *NPM1^{mut}* AML.

5.4 Limitationen und Chancen einer kombinierten XPO1- und Menin-MLL- Inhibition in *NPM1*^{mut}- AML

Die getesteten Medikamente befinden sich einzeln bereits in klinischen Studien. Eltanexor konnte als Monotherapie eine gute Verträglichkeit sowie überschaubare Nebenwirkungen an Patienten mit metastasiertem kolorektalem Karzinom zeigen (NCT02649790). Die Effizienz und Nebenwirkungen der MMi werden aktuell noch in verschiedenen Phase-I/II-Studien, wie oben bereits erwähnt, erhoben. Die Limitationen der Kombinationsbehandlung sind nur schwer vorauszusehen und es sind sowohl *in vivo*-Experimente als auch sich anschließende klinische Studien erforderlich, um sie genauer einschätzen zu können.

Wie oben (vgl. 5.3) bereits angedeutet könnte eine mögliche Komplikation das Auftreten eines Differenzierungssyndroms sein, welches bei Medikamenten beschrieben ist, die Differenzierung induzieren. Bekannt ist dieses Syndrom bei der Therapie der akute Promyelozytenleukämie (APL) mit all-trans-Retinsäure (ATRA) [182]. Zuletzt wurde es auch in einer klinischen Studie (NCT02074839) mit IDH1-Inhibitoren zur Behandlung der AML beobachtet [183]. Das potenziell reversible Differenzierungssyndrom ist gekennzeichnet durch Fieber oder Dyspnoe ohne Anwesenheit einer Infektion, periphere Ödeme, Gewichtszunahme, Hypotensionen, renale Insuffizienz, Hyperbilirubinämie und kann zu einem Leukostase-Syndrom führen [184]. Im schlimmsten Fall kann das Differenzierungssyndrom lebensgefährlich werden [184]. Da die Kombinationstherapie aus XPO1- und Menin-MLL-Inhibition ebenfalls die Differenzierung induziert, könnte dies eine potenzielle Nebenwirkung darstellen. Die Differenzierungseffekte traten bei der Kombinationsbehandlung erst nach einem gewissen Behandlungszeitraum ein, während die Induktion von Apoptose sowie die Reduzierung der Proliferation bereits früher eintrat. Dies könnte dazu führen, dass der Patient für einen determinierten Zeitraum ohne funktionierendes Immunsystem überleben muss. Dies birgt die Gefahr der Infektionen aufgrund der Neutropenie, Müdigkeit sowie Dyspnoe aufgrund der Anämie und die Gefahr von Blutungen und weiteren hämorrhagischen Ereignissen aufgrund der Thrombozytopenie. Dies sind allerdings auch mögliche Symptome der AML sowie Nebenwirkungen einer Chemotherapie, sodass eine Behandlung mit der Kombinationstherapie mit dem Ziel der Komplettremission zur Behebung dieser Symptome, diese Risiken aufwiegen würde.

Ein weiterer limitierender Faktor könnte eine potenzielle toxische Wirkung auf gesunde hämatopoetische Zellen sein. *MEIS1* spielt, wie oben bereits beschrieben, eine wichtige Rolle in normalen hämatopoetischen Stammzellen und deren Fähigkeit der Selbsterneuerung [185]. Das könnte im Patienten zu einer transienten hämatopoetischen Insuffizienz führen. Solche Nebenwirkungen wurden in bisherigen Studien zu den MMi, die auch allein bereits einen starken Effekt auf *MEIS1* haben, jedoch noch nicht beobachtet

[100]. Zudem zeigen bisher nicht publizierte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe, dass Zellen mit einer Resistenz gegen die MMi auch ohne eine Expression von *MEIS1* auskommen können.

Trotz der genannten Limitationen bietet die Kombinationstherapie unter der Voraussetzung, dass sich die Ergebnisse in den klinischen Alltag übertragen lassen, vielfältige Chancen für die zukünftige Behandlung der AML.

Die wohl wichtigste Chance dieser Kombinationstherapie ergibt sich wie bereits weiter oben diskutiert für ältere, komorbide Patienten, denen ein effektiver Zugang zu einer potenziell kurativen Therapiealternative ermöglicht werden könnte. Darüber hinaus könnte aufgrund des attraktiven Nebenwirkungsprofils der gezielten Therapieansätze außerdem darüber diskutiert werden, ob man bei nicht ausreichender Effektivität der Kombinationstherapie, für fitte Patienten eine Chemotherapie hinzufügen könnte. Dies bedarf jedoch noch weiterer Forschung.

Interessant für zukünftige Untersuchungen wäre es festzustellen, ob die Kombinationstherapie neben dem AML-Blasten auch die Leukämie-initiiierende Zellen oder leukämische Stammzellen (LSC), angreifen und ggf. gezielt zerstören könnte, da sich der hier beschriebene Ansatz primär gegen Selbsterneuerungs-assoziierte Gene richtet. Da LSCs nach momentanem Stand der Wissenschaft als Treiber einer Leukämie gesehen werden [29],[30], wäre ein Therapieansatz, der an der AML-Initiierung ansetzt, von großer Bedeutung. Für MMi konnte im *MLL-r* Mausmodell gezeigt werden, dass eine Komplettremission oder eine Regression der Erkrankung erreicht werden konnte [180]. Das könnte dafürsprechen, dass auch LSCs getroffen werden können [180]. Dies gilt es in weiterführenden Experimenten für die Kombinationstherapie zu validieren, besonders auch in *NPM1^{mut}* Zellen zu untersuchen und anschließend in klinischen Studien auch im Patienten zu erreichen.

Aufgrund aktuell noch begrenzter klinischer Daten und laufender Forschungsbemühungen ist es wichtig anzumerken, dass die Bewertung von Limitationen und Chancen einer kombinierten Therapie aus XPO1- und Menin-MLL-Inhibition noch fortlaufend ist. Weiterführende Experimente sowie klinische Studien sind erforderlich, um das volle Potenzial, den genauen Wirkmechanismus sowie die beschriebenen und bisher noch nicht entdeckten Herausforderungen dieser Behandlungsstrategie besser zu verstehen.

5.5 Perspektiven für die Zukunft

Sowohl der in dieser Arbeit entwickelte Screen als auch die identifizierte synergistische Kombination aus XPO1- und Menin-MLL-Inhibition könnten das Potenzial haben, die Therapie der *NPM1*^{mut} AML voranzutreiben.

Falls sich die präklinischen Ergebnisse des in dieser Arbeit entwickelten Screens in die Klinik übersetzen ließen, würde sich mit dieser Methodik die Möglichkeit bieten, jeden Patienten zukünftig vor Therapiebeginn zu untersuchen, um ein individuell auf den Patienten abgestimmtes Kombinationsregime zu entwickeln. Der Screen könnte ermöglichen, primäre Proben von Patienten direkt zu testen und so spezifische, wirksame Medikamente für die individuellen AML-Zellen zu identifizieren. Mehrere potenziell wirksame Behandlungsoptionen könnten so identifiziert werden, sodass im Falle von Therapieversagen aufgrund möglicher Resistenzen zeitnah eine Zweitlinientherapie zur Verfügung stehen könnte. Dies könnte die Chance eröffnen, die Behandlung auf die individuellen Bedürfnisse und Reaktionen jedes Patienten anzupassen und somit die Erfolgsaussichten der Therapie zu verbessern.

Zurzeit ist die Anzahl identifizierter prognostischer Biomarker, die das Ansprechen auf bestimmte Therapien vorhersagen noch sehr limitiert beziehungsweise wenig klinisch validiert [186]. Auch in dieser Hinsicht könnte der Screen nützlich sein, da er eine effektive Behandlung anzeigen könnte, noch bevor die Biologie dahinter bekannt ist.

Damit eine gezielte Therapie entwickelt werden kann, wird die Sequenzierung und Analyse der leukämischen Zellen auch in Zukunft von großer Relevanz sein und an Bedeutung zunehmen. Nur durch eine genaue und detailreiche Analyse können mögliche Schwachpunkte analysiert und daraufhin neue Medikamente und Therapien entwickelt werden, die ebendiese Punkte anzielen können.

Eine weitere, neuere Erkenntnis betrifft eine mögliche Prävention der Erkrankung. Im Mausmodell konnten präleukämische Zellen durch eine zielgerichtete Therapie mit VTP-50469 eliminiert werden [103]. Dies könnte einen zukunftsweisenden neuen Ansatz für die Prävention anstelle der Therapie der AML darstellen [103].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die AML eine Erkrankung darstellt, die weiterhin intensiver Forschung bedarf, um eine langfristige Heilung für alle Patienten zu finden. Die Methodik des in dieser Arbeit entwickelten Screens sowie die daraus identifizierte Medikamentenkombination stimmen jedoch optimistisch, dass im Sinne einer personalisierten Medizin die Identifikation spezifisch wirksamer Medikamente für jeden Patienten möglich sein könnte. So könnte präklinisch eine optimale Grundlage geschaffen werden, die eine schnelle Translation der Medikamente in die Klinik ermöglicht.

6 Zusammenfassung

Die Behandlung der akuten myeloischen Leukämien (AML) stellt nach wie vor eine große therapeutische Herausforderung dar. Die Heterogenität der Erkrankung sowie das hohe mediane Erkrankungsalter machen eine Behandlung häufig schwierig. Rückgrat der Behandlung ist seit vier Jahrzehnten eine Polychemotherapie mit oder ohne allogene Stammzelltransplantation. Gerade für die große Anzahl älterer Patienten ist dieses Therapieregime jedoch häufig nicht tolerabel, was insgesamt zu sehr ungünstigen Prognosen gerade bei diesen Patienten führt.

In den letzten Jahren kam es auf dem Forschungsgebiet der AML in Bezug auf neue Therapiestrategien zu bedeutenden Fortschritten. Der Fokus liegt dabei vermehrt auf gezielten Mechanismus-basierten und potenziell weniger toxischen Therapien. Diese könnten auch älteren Patienten einen Zugang zu einer effizienten, kurativen Therapie ermöglichen. Das in dieser Arbeit entwickelte Screening-Verfahren konnte in der Nucleophosmin 1-mutierten (*NPM1*^{mut}) AML präklinisch mehrere synergistisch wirkende Kombinationsregime definieren, die künftig weiter evaluiert werden können. Als besonders synergistisch sind dabei die Kombinationen aus XPO1- und Menin-MLL-Inhibition aufgefallen, welche anschließend näher charakterisiert wurden.

Eine kombinierte Inhibition in humanen *NPM1*^{mut} AML-Zelllinien führte im Vergleich zur jeweiligen Einzelbehandlung zu einem ausgeprägten antiproliferativer Effekt und verringerte deutlich die benötigten Konzentrationen der jeweiligen Medikamente. Darüber hinaus veränderte eine Kombinationsbehandlung die leukämische Genexpression der Blasten und besonders die Expression des Gens *MEIS1* wurde dabei von allen untersuchten Genen am stärksten herunterreguliert. Diese Ergebnisse legen also nahe, dass die synergistische Wirkung dieser Kombination aus einer gemeinsamen Herunterregulation einer für diese AML typischen leukämogenen Genexpression resultieren könnte, zu der auch eine hohe Expression von *MEIS1* zählt. Zudem führt die Kombinationstherapie zur ausgeprägten Induktion von Differenzierung sowie der Apoptose der leukämischen Blasten. Auch an primären Patientenproben konnten die antiproliferativen Effekte sowie der starke Synergismus der Kombinationsbehandlung validiert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Screen wertvolle Daten für eine präklinische Grundlage synergistischer Kombinationen liefern kann, die eine schnelle Translation jener in klinische Studien erleichtern könnte. Die Kombination aus XPO1- und Menin-MLL-Inhibition könnte eine attraktive neue Therapiestrategie in der *NPM1*^{mut} AML darstellen, vorausgesetzt dass sich die in dieser Arbeit observierten Ergebnisse in die Klinik übertragen lassen. Um dies näher zu evaluieren, werden zukünftig sowohl *in vivo*-Versuche im Patienten-abgeleiteten Mausmodell sowie klinische Studien notwendig sein.

7 Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt (Destatis). *Anzahl der Gestorbenen nach Kapiteln der ICD-10 und nach Geschlecht für 2020, 2021*. Available from: www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/gestorbene_anzahl.html, accessed [23.08.2022].
2. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), *Krebs in Deutschland für 2017/2018*. 13. Ausgabe. Berlin, 2021.
3. Ferlay, J., et al., *Cancer statistics for the year 2020: An overview*. Int J Cancer, 2021.
4. Ferlay, J., et al. *Global Cancer Observatory: Cancer Tomorrow*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2020. Available from: <https://gco.iarc.fr/tomorrow>, accessed [31.05.2021].
5. Kantarjian, H., et al., *Acute myeloid leukemia: current progress and future directions*. Blood Cancer J, 2021. **11**(2): p. 41.
6. Short, N.J., M.E. Rytting, and J.E. Cortes, *Acute myeloid leukaemia*. Lancet, 2018. **392**(10147): p. 593-606.
7. Menzin, J., et al., *The outcomes and costs of acute myeloid leukemia among the elderly*. Arch Intern Med, 2002. **162**(14): p. 1597-603.
8. Cancer Genome Atlas Research, N., et al., *Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia*. N Engl J Med, 2013. **368**(22): p. 2059-74.
9. Juliusson, G., et al., *Acute myeloid leukemia in the real world: why population-based registries are needed*. Blood, 2012. **119**(17): p. 3890-9.
10. Dohner, K., P. Paschka, and H. Dohner, *[Acute myeloid leukemia]*. Internist (Berl), 2015. **56**(4): p. 354-63.
11. Shah, A., et al., *Survival and cure of acute myeloid leukaemia in England, 1971-2006: a population-based study*. Br J Haematol, 2013. **162**(4): p. 509-16.
12. Kuhn, M.W., et al., *Targeting Chromatin Regulators Inhibits Leukemogenic Gene Expression in NPM1 Mutant Leukemia*. Cancer Discov, 2016. **6**(10): p. 1166-1181.
13. Issa, G.C., et al., *The menin inhibitor revumenib in KMT2A-rearranged or NPM1-mutant leukaemia*. Nature, 2023. **615**(7954): p. 920-924.
14. Engert, A., et al., *The European Hematology Association Roadmap for European Hematology Research: a consensus document*. Haematologica, 2016. **101**(2): p. 115-208.
15. Hao, T., et al., *An emerging trend of rapid increase of leukemia but not all cancers in the aging population in the United States*. Scientific Reports, 2019. **9**(1): p. 12070.
16. Piller, G., *Leukaemia - a brief historical review from ancient times to 1950*. Br J Haematol, 2001. **112**(2): p. 282-92.
17. Juliusson, G. and R. Hough, *Leukemia*. Prog Tumor Res, 2016. **43**: p. 87-100.
18. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2018*. CA Cancer J Clin, 2018. **68**(1): p. 7-30.
19. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2020*. CA Cancer J Clin, 2020. **70**(1): p. 7-30.
20. Dores, G.M., et al., *Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States, 2001-2007*. Blood, 2012. **119**(1): p. 34-43.
21. Shallis, R.M., et al., *Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges*. Blood Rev, 2019. **36**: p. 70-87.
22. Sant, M., et al., *Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project*. Blood, 2010. **116**(19): p. 3724-34.
23. Smith, A., et al., *Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the Haematological Malignancy Research Network*. Br J Cancer, 2011. **105**(11): p. 1684-92.
24. Puumala, S.E., et al., *Epidemiology of childhood acute myeloid leukemia*. Pediatr Blood Cancer, 2013. **60**(5): p. 728-33.

25. Kantarjian, H., *Acute myeloid leukemia--major progress over four decades and glimpses into the future*. Am J Hematol, 2016. **91**(1): p. 131-45.
26. Arber, D.A., et al., *International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data*. Blood, 2022. **140**(11): p. 1200-1228.
27. Khwaja, A., et al., *Acute myeloid leukaemia*. Nat Rev Dis Primers, 2016. **2**: p. 16010.
28. Deschler, B. and M. Lubbert, *Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology*. Cancer, 2006. **107**(9): p. 2099-107.
29. Terstappen, L.W., et al., *Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells*. Blood, 1991. **77**(6): p. 1218-27.
30. Bonnet, D. and J.E. Dick, *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. Nat Med, 1997. **3**(7): p. 730-7.
31. Passegue, E., et al., *Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics?* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100 Suppl 1**: p. 11842-9.
32. Papaemmanuil, E., et al., *Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia*. N Engl J Med, 2016. **374**(23): p. 2209-2221.
33. Reilly, J.T., *Pathogenesis of acute myeloid leukaemia and inv(16)(p13;q22): a paradigm for understanding leukaemogenesis?* Br J Haematol, 2005. **128**(1): p. 18-34.
34. Grove, C.S. and G.S. Vassiliou, *Acute myeloid leukaemia: a paradigm for the clonal evolution of cancer?* Dis Model Mech, 2014. **7**(8): p. 941-51.
35. Barbosa, K., et al., *The role of TP53 in acute myeloid leukemia: Challenges and opportunities*. Genes Chromosomes Cancer, 2019. **58**(12): p. 875-888.
36. Fennell, K.A., C.C. Bell, and M.A. Dawson, *Epigenetic therapies in acute myeloid leukemia: where to from here?* Blood, 2019. **134**(22): p. 1891-1901.
37. Bewersdorf, J.P. and A.M. Zeidan, *Hyperleukocytosis and Leukostasis in Acute Myeloid Leukemia: Can a Better Understanding of the Underlying Molecular Pathophysiology Lead to Novel Treatments?* Cells, 2020. **9**(10).
38. Dohner, H., et al., *Diagnosis and Management of AML in Adults: 2022 ELN Recommendations from an International Expert Panel*. Blood, 2022.
39. Dohner, H., et al., *Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel*. Blood, 2017. **129**(4): p. 424-447.
40. Arber, D.A., et al., *The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia*. Blood, 2016. **127**(20): p. 2391-405.
41. Patel, J.P., et al., *Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia*. N Engl J Med, 2012. **366**(12): p. 1079-89.
42. Dohner, H., et al., *Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet*. Blood, 2010. **115**(3): p. 453-74.
43. Dohner, H., D.J. Weisdorf, and C.D. Bloomfield, *Acute Myeloid Leukemia*. N Engl J Med, 2015. **373**(12): p. 1136-52.
44. Stone, R.M., et al., *Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation*. N Engl J Med, 2017. **377**(5): p. 454-464.
45. Hills, R.K., et al., *Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials*. Lancet Oncol, 2014. **15**(9): p. 986-96.
46. Lambert, J., et al., *Gemtuzumab ozogamicin for de novo acute myeloid leukemia: final efficacy and safety updates from the open-label, phase III ALFA-0701 trial*. Haematologica, 2019. **104**(1): p. 113-119.
47. Schlenk, R.F., et al., *Gemtuzumab Ozogamicin in NPM1-Mutated Acute Myeloid Leukemia: Early Results From the Prospective Randomized AMLSG 09-09 Phase III Study*. J Clin Oncol, 2020. **38**(6): p. 623-632.

48. Lancet, J.E., et al., *Final results of a phase III randomized trial of CPX-351 versus 7+3 in older patients with newly diagnosed high risk (secondary) AML*. Journal of Clinical Oncology, 2016. **34**(15_suppl): p. 7000-7000.
49. DiNardo, C.D., et al., *Azacitidine and Venetoclax in Previously Untreated Acute Myeloid Leukemia*. N Engl J Med, 2020. **383**(7): p. 617-629.
50. Estey, E., R.L. Levine, and B. Lowenberg, *Current challenges in clinical development of "targeted therapies": the case of acute myeloid leukemia*. Blood, 2015. **125**(16): p. 2461-6.
51. Saygin, C. and H.E. Carraway, *Emerging therapies for acute myeloid leukemia*. J Hematol Oncol, 2017. **10**(1): p. 93.
52. Winer, E.S. and R.M. Stone, *Novel therapy in Acute myeloid leukemia (AML): moving toward targeted approaches*. Ther Adv Hematol, 2019. **10**: p. 2040620719860645.
53. Wouters, B.J. and R. Delwel, *Epigenetics and approaches to targeted epigenetic therapy in acute myeloid leukemia*. Blood, 2016. **127**(1): p. 42-52.
54. DiNardo, C.D. and J.E. Cortes, *Mutations in AML: prognostic and therapeutic implications*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2016. **2016**(1): p. 348-355.
55. Artinger, E.L., et al., *An MLL-dependent network sustains hematopoiesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013. **110**(29): p. 12000-12005.
56. Biondi, A., et al., *Biological and therapeutic aspects of infant leukemia*. Blood, 2000. **96**(1): p. 24-33.
57. Ernst, P., J. Wang, and S.J. Korsmeyer, *The role of MLL in hematopoiesis and leukemia*. Curr Opin Hematol, 2002. **9**(4): p. 282-7.
58. Hanson, R.D., et al., *Mammalian Trithorax and polycomb-group homologues are antagonistic regulators of homeotic development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(25): p. 14372-7.
59. Argiropoulos, B. and R.K. Humphries, *Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis*. Oncogene, 2007. **26**(47): p. 6766-76.
60. Skvarova Kramarzova, K., et al., *Homeobox gene expression in acute myeloid leukemia is linked to typical underlying molecular aberrations*. J Hematol Oncol, 2014. **7**: p. 94.
61. Rao, R.C. and Y. Dou, *Hijacked in cancer: the KMT2 (MLL) family of methyltransferases*. Nat Rev Cancer, 2015. **15**(6): p. 334-46.
62. Nakamura, T., et al., *ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation*. Mol Cell, 2002. **10**(5): p. 1119-28.
63. Yokoyama, A., et al., *Leukemia proto-oncoprotein MLL forms a SET1-like histone methyltransferase complex with menin to regulate Hox gene expression*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(13): p. 5639-49.
64. Milne, T.A., et al., *MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters*. Mol Cell, 2002. **10**(5): p. 1107-17.
65. Ruthenburg, A.J., C.D. Allis, and J. Wysocka, *Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark*. Mol Cell, 2007. **25**(1): p. 15-30.
66. Crump, N.T. and T.A. Milne, *Why are so many MLL lysine methyltransferases required for normal mammalian development?* Cellular and Molecular Life Sciences, 2019. **76**(15): p. 2885-2898.
67. Heintzman, N.D., et al., *Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome*. Nat Genet, 2007. **39**(3): p. 311-8.
68. Beacon, T.H., et al., *The dynamic broad epigenetic (H3K4me3, H3K27ac) domain as a mark of essential genes*. Clin Epigenetics, 2021. **13**(1): p. 138.
69. Yokoyama, A., et al., *The menin tumor suppressor protein is an essential oncogenic cofactor for MLL-associated leukemogenesis*. Cell, 2005. **123**(2): p. 207-18.
70. Yu, B.D., et al., *MLL, a mammalian trithorax-group gene, functions as a transcriptional maintenance factor in morphogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(18): p. 10632-6.

71. Thirman, M.J., *Paradoxical Effects of MLL Paralogs in MLL-Rearranged Leukemia*. Cancer Cell, 2017. **31**(6): p. 729-731.
72. Muntean, A.G. and J.L. Hess, *The pathogenesis of mixed-lineage leukemia*. Annu Rev Pathol, 2012. **7**: p. 283-301.
73. Yokoyama, A. and M.L. Cleary, *Menin critically links MLL proteins with LEDGF on cancer-associated target genes*. Cancer Cell, 2008. **14**(1): p. 36-46.
74. Milne, T.A., et al., *Menin and MLL cooperatively regulate expression of cyclin-dependent kinase inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(3): p. 749-54.
75. El Ashkar, S., et al., *LEDGF/p75 is dispensable for hematopoiesis but essential for MLL-rearranged leukemogenesis*. Blood, 2018. **131**(1): p. 95-107.
76. Dafflon, C., R. Tiedt, and J. Schwaller, *Targeting multiple nodes of MLL complexes to improve leukemia therapy*. Oncotarget, 2017. **8**(53): p. 90614-90615.
77. Grimwade, D., A. Ivey, and B.J. Huntly, *Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance*. Blood, 2016. **127**(1): p. 29-41.
78. Krivtsov, A.V. and S.A. Armstrong, *MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(11): p. 823-33.
79. Munoz, L., et al., *Acute myeloid leukemia with MLL rearrangements: clinicobiological features, prognostic impact and value of flow cytometry in the detection of residual leukemic cells*. Leukemia, 2003. **17**(1): p. 76-82.
80. Meyer, C., et al., *The MLL recombinome of acute leukemias in 2013*. Leukemia, 2013. **27**(11): p. 2165-76.
81. Shilatifard, A., et al., *An RNA polymerase II elongation factor encoded by the human ELL gene*. Science, 1996. **271**(5257): p. 1873-6.
82. Orlovsky, K., et al., *Down-regulation of homeobox genes MEIS1 and HOXA in MLL-rearranged acute leukemia impairs engraftment and reduces proliferation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(19): p. 7956-61.
83. Faber, J., et al., *HOXA9 is required for survival in human MLL-rearranged acute leukemias*. Blood, 2009. **113**(11): p. 2375-85.
84. Wong, P., et al., *Meis1 is an essential and rate-limiting regulator of MLL leukemia stem cell potential*. Genes Dev, 2007. **21**(21): p. 2762-74.
85. Armstrong, S.A., et al., *MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia*. Nat Genet, 2002. **30**(1): p. 41-7.
86. Guo, H., et al., *PBX3 is essential for leukemia stem cell maintenance in MLL-rearranged leukemia*. Int J Cancer, 2017. **141**(2): p. 324-335.
87. Brown, F.C., et al., *MEF2C Phosphorylation Is Required for Chemotherapy Resistance in Acute Myeloid Leukemia*. Cancer Discov, 2018. **8**(4): p. 478-497.
88. Alharbi, R.A., et al., *The role of HOX genes in normal hematopoiesis and acute leukemia*. Leukemia, 2013. **27**(5): p. 1000-1008.
89. Wang, G.G., M.P. Pasillas, and M.P. Kamps, *Meis1 programs transcription of FLT3 and cancer stem cell character, using a mechanism that requires interaction with Pbx and a novel function of the Meis1 C-terminus*. Blood, 2005. **106**(1): p. 254-64.
90. Falini, B., et al., *NPM1-mutated acute myeloid leukemia: from bench to bedside*. Blood, 2020. **136**(15): p. 1707-1721.
91. Lindstrom, M.S., *NPM1/B23: A Multifunctional Chaperone in Ribosome Biogenesis and Chromatin Remodeling*. Biochem Res Int, 2011. **2011**: p. 195209.
92. Falini, B., et al., *Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype*. N Engl J Med, 2005. **352**(3): p. 254-66.
93. Wang, W., et al., *Temporal and spatial control of nucleophosmin by the Ran-Crm1 complex in centrosome duplication*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(8): p. 823-30.
94. Box, J.K., et al., *Nucleophosmin: from structure and function to disease development*. BMC Molecular Biology, 2016. **17**(1): p. 19.
95. Falini, B., et al., *Altered nucleophosmin transport in acute myeloid leukaemia with mutated NPM1: molecular basis and clinical implications*. Leukemia, 2009. **23**(10): p. 1731-43.
96. Grisendi, S., et al., *Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis*. Nature, 2005. **437**(7055): p. 147-53.

97. Shi, A., et al., *Structural insights into inhibition of the bivalent menin-MLL interaction by small molecules in leukemia*. Blood, 2012. **120**(23): p. 4461-9.
98. Borkin, D., et al., *Pharmacologic inhibition of the Menin-MLL interaction blocks progression of MLL leukemia in vivo*. Cancer Cell, 2015. **27**(4): p. 589-602.
99. Borkin, D., et al., *Property Focused Structure-Based Optimization of Small Molecule Inhibitors of the Protein-Protein Interaction between Menin and Mixed Lineage Leukemia (MLL)*. J Med Chem, 2016. **59**(3): p. 892-913.
100. Krivtsov, A.V., et al., *A Menin-MLL Inhibitor Induces Specific Chromatin Changes and Eradicates Disease in Models of MLL-Rearranged Leukemia*. Cancer Cell, 2019. **36**(6): p. 660-673 e11.
101. Wang, E.S., et al., *Preliminary Data on a Phase 1/2A First in Human Study of the Menin-KMT2A (MLL) Inhibitor KO-539 in Patients with Relapsed or Refractory Acute Myeloid Leukemia*. Blood, 2020. **136**: p. 7-8.
102. Dzama, M.M., et al., *Synergistic targeting of FLT3 mutations in AML via combined menin-MLL and FLT3 inhibition*. Blood, 2020. **136**(21): p. 2442-2456.
103. Uckelmann, H.J., et al., *Therapeutic targeting of preleukemia cells in a mouse model of NPM1 mutant acute myeloid leukemia*. Science, 2020. **367**(6477): p. 586-590.
104. Gravina, G.L., et al., *Nucleo-cytoplasmic transport as a therapeutic target of cancer*. J Hematol Oncol, 2014. **7**: p. 85.
105. Azmi, A.S., M.H. Uddin, and R.M. Mohammad, *The nuclear export protein XPO1 — from biology to targeted therapy*. Nature Reviews Clinical Oncology, 2021. **18**(3): p. 152-169.
106. Kosyna, F.K. and R. Depping, *Controlling the Gatekeeper: Therapeutic Targeting of Nuclear Transport*. Cells, 2018. **7**(11).
107. Fornerod, M., et al., *CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals*. Cell, 1997. **90**(6): p. 1051-60.
108. Brunetti, L., et al., *Mutant NPM1 Maintains the Leukemic State through HOX Expression*. Cancer Cell, 2018. **34**(3): p. 499-512 e9.
109. Wang, A.Y. and H. Liu, *The past, present, and future of CRM1/XPO1 inhibitors*. Stem Cell Investig, 2019. **6**: p. 6.
110. Fung, H.Y. and Y.M. Chook, *Atomic basis of CRM1-cargo recognition, release and inhibition*. Semin Cancer Biol, 2014. **27**: p. 52-61.
111. Etchin, J., et al., *KPT-330 inhibitor of CRM1 (XPO1)-mediated nuclear export has selective anti-leukaemic activity in preclinical models of T-cell acute lymphoblastic leukaemia and acute myeloid leukaemia*. Br J Haematol, 2013. **161**(1): p. 117-27.
112. Etchin, J., et al., *Antileukemic activity of nuclear export inhibitors that spare normal hematopoietic cells*. Leukemia, 2013. **27**(1): p. 66-74.
113. Garzon, R., et al., *A phase 1 clinical trial of single-agent selinexor in acute myeloid leukemia*. Blood, 2017. **129**(24): p. 3165-3174.
114. Etchin, J., et al., *KPT-8602, a second-generation inhibitor of XPO1-mediated nuclear export, is well tolerated and highly active against AML blasts and leukemia-initiating cells*. Leukemia, 2017. **31**(1): p. 143-150.
115. Hing, Z.A., et al., *Next-generation XPO1 inhibitor shows improved efficacy and in vivo tolerability in hematological malignancies*. Leukemia, 2016. **30**(12): p. 2364-2372.
116. Mupo, A., et al., *A powerful molecular synergy between mutant Nucleophosmin and Flt3-ITD drives acute myeloid leukemia in mice*. Leukemia, 2013. **27**(9): p. 1917-20.
117. Chou, T.C., *Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies*. Pharmacol Rev, 2006. **58**(3): p. 621-81.
118. McKinnon, K.M., *Flow Cytometry: An Overview*. Curr Protoc Immunol, 2018. **120**: p. 5 1 1-5 1 11.
119. Cossarizza, A., et al., *Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition)*. Eur J Immunol, 2019. **49**(10): p. 1457-1973.
120. Adan, A., et al., *Flow cytometry: basic principles and applications*. Crit Rev Biotechnol, 2017. **37**(2): p. 163-176.

121. van Engeland, M., et al., *Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure*. Cytometry, 1998. **31**(1): p. 1-9.
122. Wallberg, F., T. Tenev, and P. Meier, *Analysis of Apoptosis and Necroptosis by Fluorescence-Activated Cell Sorting*. Cold Spring Harb Protoc, 2016. **2016**(4): p. pdb prot087387.
123. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
124. Gussow, D., et al., *The human beta 2-microglobulin gene. Primary structure and definition of the transcriptional unit*. J Immunol, 1987. **139**(9): p. 3132-8.
125. Kelly, K.R., et al., *Targeting Aurora A kinase activity with the investigational agent alisertib increases the efficacy of cytarabine through a FOXO-dependent mechanism*. Int J Cancer, 2012. **131**(11): p. 2693-703.
126. Brunner, A.M., et al., *Alisertib plus induction chemotherapy in previously untreated patients with high-risk, acute myeloid leukaemia: a single-arm, phase 2 trial*. Lancet Haematol, 2020. **7**(2): p. e122-e133.
127. Canon, J., et al., *The MDM2 Inhibitor AMG 232 Demonstrates Robust Antitumor Efficacy and Potentiates the Activity of p53-Inducing Cytotoxic Agents*. Molecular Cancer Therapeutics, 2015. **14**(3): p. 649-658.
128. Nahi, H., et al., *Mutated and non-mutated TP53 as targets in the treatment of leukaemia*. British Journal of Haematology, 2008. **141**(4): p. 445-453.
129. Sallman, D.A., et al., *Eprenetapopt (APR-246) and Azacitidine in TP53-Mutant Myelodysplastic Syndromes*. J Clin Oncol, 2021. **39**(14): p. 1584-1594.
130. Local, A., et al., *APTO-253 Stabilizes G-quadruplex DNA, Inhibits MYC Expression, and Induces DNA Damage in Acute Myeloid Leukemia Cells*. Mol Cancer Ther, 2018. **17**(6): p. 1177-1186.
131. Buteyn, N.J., et al., *Anti-leukemic effects of all-trans retinoic acid in combination with Daratumumab in acute myeloid leukemia*. Int Immunol, 2018. **30**(8): p. 375-383.
132. Tassara, M., et al., *Valproic acid in combination with all-trans retinoic acid and intensive therapy for acute myeloid leukemia in older patients*. Blood, 2014. **123**(26): p. 4027-36.
133. Cidado, J., et al., *AZD4573 Is a Highly Selective CDK9 Inhibitor That Suppresses MCL-1 and Induces Apoptosis in Hematologic Cancer Cells*. Clinical Cancer Research, 2020. **26**(4): p. 922-934.
134. Xiang, W., C.Y. Yang, and L. Bai, *MCL-1 inhibition in cancer treatment*. Onco Targets Ther, 2018. **11**: p. 7301-7314.
135. Yang, J., et al., *AZD1152, a novel and selective aurora B kinase inhibitor, induces growth arrest, apoptosis, and sensitization for tubulin depolymerizing agent or topoisomerase II inhibitor in human acute leukemia cells in vitro and in vivo*. Blood, 2007. **110**(6): p. 2034-40.
136. Coude, M.M., et al., *BET inhibitor OTX015 targets BRD2 and BRD4 and decreases c-MYC in acute leukemia cells*. Oncotarget, 2015. **6**(19): p. 17698-712.
137. Berthon, C., et al., *Bromodomain inhibitor OTX015 in patients with acute leukaemia: a dose-escalation, phase 1 study*. Lancet Haematol, 2016. **3**(4): p. e186-95.
138. Han, L., et al., *Concomitant targeting of BCL2 with venetoclax and MAPK signaling with cobimetinib in acute myeloid leukemia models*. Haematologica, 2020. **105**(3): p. 697-707.
139. Heo, S.-K., et al., *Targeting c-KIT (CD117) by dasatinib and radotinib promotes acute myeloid leukemia cell death*. Scientific Reports, 2017. **7**(1): p. 15278.
140. Nishioka, C., et al., *MS-275, a novel histone deacetylase inhibitor with selectivity against HDAC1, induces degradation of FLT3 via inhibition of chaperone function of heat shock protein 90 in AML cells*. Leukemia Research, 2008. **32**(9): p. 1382-1392.
141. Prebet, T., et al., *Azacitidine with or without Entinostat for the treatment of therapy-related myeloid neoplasm: further results of the E1905 North American Leukemia Intergroup study*. Br J Haematol, 2016. **172**(3): p. 384-91.

142. Cremer, A., et al., *Resistance Mechanisms to SYK Inhibition in Acute Myeloid Leukemia*. *Cancer Discov*, 2020. **10**(2): p. 214-231.
143. Smitheman, K.N., et al., *Lysine specific demethylase 1 inactivation enhances differentiation and promotes cytotoxic response when combined with all-trans retinoic acid in acute myeloid leukemia across subtypes*. *Haematologica*, 2019. **104**(6): p. 1156-1167.
144. Lehmann, C., et al., *Superior anti-tumor activity of the MDM2 antagonist idasanutlin and the Bcl-2 inhibitor venetoclax in p53 wild-type acute myeloid leukemia models*. *J Hematol Oncol*, 2016. **9**(1): p. 50.
145. Chen, H., H. Liu, and G. Qing, *Targeting oncogenic Myc as a strategy for cancer treatment*. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2018. **3**(1): p. 5.
146. Freisleben, F., et al., *Mebendazole Exerts Potent Anti-Leukemic Effects By Downregulating Protein Levels of Hedgehog Transcription Factors GLI1 and GLI2*. *Blood*, 2018. **132**: p. 5145.
147. Shen, N., et al., *Inactivation of Receptor Tyrosine Kinases Reverts Aberrant DNA Methylation in Acute Myeloid Leukemia*. *Clin Cancer Res*, 2017. **23**(20): p. 6254-6266.
148. Faraoni, I., et al., *Cytotoxicity and Differentiating Effect of the Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitor Olaparib in Myelodysplastic Syndromes*. *Cancers (Basel)*, 2019. **11**(9).
149. Maes, T., et al., *ORY-1001, a Potent and Selective Covalent KDM1A Inhibitor, for the Treatment of Acute Leukemia*. *Cancer Cell*, 2018. **33**(3): p. 495-511 e12.
150. Jeon, J.Y., et al., *Preclinical activity and a pilot phase I study of pacritinib, an oral JAK2/FLT3 inhibitor, and chemotherapy in FLT3-ITD-positive AML*. *Invest New Drugs*, 2020. **38**(2): p. 340-349.
151. Kim, S., et al., *The potent and selective cyclin-dependent kinases 4 and 6 inhibitor ribociclib (LEE011) is a versatile combination partner in preclinical cancer models*. *Oncotarget*, 2018. **9**(81): p. 35226-35240.
152. Cojocari, D., et al., *Pevonedistat and azacitidine upregulate NOXA (PMAIP1) to increase sensitivity to venetoclax in preclinical models of acute myeloid leukemia*. *Haematologica*, 2021.
153. Novotny-Diermayr, V., et al., *The oral HDAC inhibitor pracinostat (SB939) is efficacious and synergistic with the JAK2 inhibitor pacritinib (SB1518) in preclinical models of AML*. *Blood Cancer J*, 2012. **2**(5): p. e69.
154. Garcia-Manero, G., et al., *Pracinostat plus azacitidine in older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia: results of a phase 2 study*. *Blood Adv*, 2019. **3**(4): p. 508-518.
155. Recher, C., et al., *Antileukemic activity of rapamycin in acute myeloid leukemia*. *Blood*, 2005. **105**(6): p. 2527-34.
156. Hyoda, T., et al., *Rigosertib induces cell death of a myelodysplastic syndrome-derived cell line by DNA damage-induced G2/M arrest*. *Cancer Sci*, 2015. **106**(3): p. 287-93.
157. Karjalainen, R., et al., *JAK1/2 and BCL2 inhibitors synergize to counteract bone marrow stromal cell-induced protection of AML*. *Blood*, 2017. **130**(6): p. 789-802.
158. Ranganathan, P., et al., *XPO1 Inhibition using Selinexor Synergizes with Chemotherapy in Acute Myeloid Leukemia by Targeting DNA Repair and Restoring Topoisomerase IIalpha to the Nucleus*. *Clin Cancer Res*, 2016. **22**(24): p. 6142-6152.
159. Stage, E., et al., *The Combination of the Novel Syk Inhibitor TAK659 with Decitabine Exerts Synergistic Cytotoxic Effects Against FLT3/ITD Mutated Acute Myeloid Leukemia Cells*. *Blood*, 2015. **126**(23): p. 4928-4928.
160. Kiehlmeier, S., et al., *Identification of therapeutic targets of the hijacked super-enhancer complex in EVI1-rearranged leukemia*. *Leukemia*, 2021.
161. Jenkins, C., et al., *Aminopeptidase inhibition by the novel agent CHR-2797 (tosedostat) for the therapy of acute myeloid leukemia*. *Leuk Res*, 2011. **35**(5): p. 677-81.

162. Peh, J., et al., *The Combination of Vemurafenib and Procaspace-3 Activation Is Synergistic in Mutant BRAF Melanomas*. Mol Cancer Ther, 2016. **15**(8): p. 1859-69.
163. Rudolph, D., et al., *Efficacy and mechanism of action of volasertib, a potent and selective inhibitor of Polo-like kinases, in preclinical models of acute myeloid leukemia*. J Pharmacol Exp Ther, 2015. **352**(3): p. 579-89.
164. Gilliland, D.G. and J.D. Griffin, *The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia*. Blood, 2002. **100**(5): p. 1532-42.
165. Chi, H.T., et al., *Detection of exon 12 type A mutation of NPM1 gene in IMS-M2 cell line*. Leukemia Research, 2010. **34**(2): p. 261-262.
166. Fang, J., et al., *Upregulation of CD11b and CD86 through LSD1 inhibition promotes myeloid differentiation and suppresses cell proliferation in human monocytic leukemia cells*. Oncotarget, 2017. **8**(49): p. 85085-85101.
167. Sasca, D., B. Guezguez, and M.W.M. Kuhn, *Next generation epigenetic modulators to target myeloid neoplasms*. Curr Opin Hematol, 2021. **28**(5): p. 356-363.
168. Zhang, J., Y. Gu, and B. Chen, *Mechanisms of drug resistance in acute myeloid leukemia*. Onco Targets Ther, 2019. **12**: p. 1937-1945.
169. Zhou, J. and W.J. Chng, *Resistance to FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia: Molecular mechanisms and resensitizing strategies*. World J Clin Oncol, 2018. **9**(5): p. 90-97.
170. Chu, S.H. and D. Small, *Mechanisms of resistance to FLT3 inhibitors*. Drug Resist Updat, 2009. **12**(1-2): p. 8-16.
171. Daver, N., et al., *Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence*. Leukemia, 2019. **33**(2): p. 299-312.
172. Siendones, E., et al., *Inhibition of Flt3-activating mutations does not prevent constitutive activation of ERK/Akt/STAT pathways in some AML cells: a possible cause for the limited effectiveness of monotherapy with small-molecule inhibitors*. Hematol Oncol, 2007. **25**(1): p. 30-7.
173. DiNardo, C.D., et al., *10-day decitabine with venetoclax for newly diagnosed intensive chemotherapy ineligible, and relapsed or refractory acute myeloid leukaemia: a single-centre, phase 2 trial*. Lancet Haematol, 2020. **7**(10): p. e724-e736.
174. Lachowicz, C.A., et al., *A Phase Ib/II Study of Ivosidenib with Venetoclax +/- Azacitidine in IDH1-Mutated Myeloid Malignancies*. Blood Cancer Discov, 2023. **4**(4): p. 276-293.
175. Rausch, J., et al., *Menin inhibitor ziftomenib (KO-539) synergizes with drugs targeting chromatin regulation or apoptosis and sensitizes acute myeloid leukemia with MLL rearrangement or NPM1 mutation to venetoclax*. Haematologica, 2023.
176. Lappin, K.M., et al., *A compound combination screening approach with potential to identify new treatment options for paediatric acute myeloid leukaemia*. Scientific Reports, 2020. **10**(1): p. 18514.
177. Marinelli, L.M., et al., *Bone Marrow Biopsy Operator Experience and Impact on Aspirate, Biopsy, and Ancillary Testing Quality*. Mayo Clin Proc Innov Qual Outcomes, 2018. **2**(3): p. 241-247.
178. Morera, L., M. Lübbert, and M. Jung, *Targeting histone methyltransferases and demethylases in clinical trials for cancer therapy*. Clinical Epigenetics, 2016. **8**(1): p. 57.
179. Buesa, C., et al., *Iadademstat Shows Efficacy in Elderly AML Patients in Combination with Azacitidine*. Alice Trial. Blood, 2019. **134**(Supplement_1): p. 3839-3839.
180. Klossowski, S., et al., *Menin inhibitor MI-3454 induces remission in MLL1-rearranged and NPM1-mutated models of leukemia*. J Clin Invest, 2020. **130**(2): p. 981-997.
181. Blasi, F. and C. Bruckmann, *MEIS1 in Hematopoiesis and Cancer. How MEIS1-PBX Interaction Can Be Used in Therapy*. J Dev Biol, 2021. **9**(4).
182. Reyhanoglu, G., et al., *Differentiation Syndrome, a Side Effect From the Therapy of Acute Promyelocytic Leukemia*. Cureus, 2020. **12**(12): p. e12042.
183. Birendra, K.C. and C.D. DiNardo, *Evidence for Clinical Differentiation and Differentiation Syndrome in Patients With Acute Myeloid Leukemia and IDH1*

- Mutations Treated With the Targeted Mutant IDH1 Inhibitor, AG-120.* Clin Lymphoma Myeloma Leuk, 2016. **16**(8): p. 460-5.
184. Gasparovic, L., et al., *Incidence of Differentiation Syndrome Associated with Treatment Regimens in Acute Myeloid Leukemia: A Systematic Review of the Literature.* J Clin Med, 2020. **9**(10).
185. Liu, J., et al., *Meis1 is critical to the maintenance of human acute myeloid leukemia cells independent of MLL rearrangements.* Ann Hematol, 2017. **96**(4): p. 567-574.
186. Prada-Arismendy, J., J.C. Arroyave, and S. Röthlisberger, *Molecular biomarkers in acute myeloid leukemia.* Blood Reviews, 2017. **31**(1): p. 63-76.

8 Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne die Unterstützung einiger spezieller Personen nicht möglich gewesen, denen ich auf diesem Weg ganz recht herzlich danken möchte.

Als erstes möchte ich mich bei _____ bedanken für die Möglichkeit an diesem spannenden Projekt zu arbeiten. Vielen Dank, dass ich Teil deiner Arbeitsgruppe werden durfte und du mich zu jeder Zeit immens gefördert hast. Du hast mich über die Jahre als Wissenschaftlerin, Ärztin, aber auch als Mensch geformt, dein umfassendes Wissen und deine Begeisterung für dein Fach mit mir geteilt, mir Herausforderungen gestellt, in denen ich über mich hinauswachsen konnte und auch in schweren Zeiten hast du mich jederzeit unterstützt. Ohne dich und deine hervorragende Betreuung wäre diese Arbeit niemals möglich gewesen und ich jetzt vermutlich nicht da, wo ich heute bin. Unsere Lab-Outs mit dem ganzen Labor habe ich immer sehr genossen und ich finde, zum Abschluss dieser Arbeit besteht auf jeden Fall Wiederholungsbedarf.

Mein weiterer Dank gilt außerdem _____ für ihre herausragende Betreuung und Unterstützung. Du bist die begabteste Wissenschaftlerin, die ich jemals getroffen habe und ich bin mir sicher, dass du alles erreichen kannst, was du dir vornimmst. Vielen Dank, dass du mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden hast und stets ein offenes Ohr für mich und meine Fragen hattest. Auch ohne dich wäre dieses Projekt so nicht möglich gewesen und ich hätte mir niemand besseren als Kollegin vorstellen können.

Mein besonderer Dank gilt außerdem der José-Carreras-Stiftung sowie der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie für die finanzielle Unterstützung dieses Projekts und die Möglichkeit an Kongressen teilzunehmen sowie interessante Kontakte zu knüpfen.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei meiner Kollegin _____. Du hast sofort dafür gesorgt, dass ich mich sofort als Teil unserer Arbeitsgruppe gefühlt habe. Deine sympathische und liebevolle Art ist einzigartig und dein Engagement für alle Projekte unserer Arbeitsgruppe ist bemerkenswert. Unser Labor wäre nicht dasselbe ohne dich gewesen und ich bin sehr dankbar, dass ich dich durch dieses Projekt kennenlernen durfte. Außerdem möchte ich meinen Kollegen _____ für die gemeinsame Zusammenarbeit danken.

Ebenso möchte ich mich bei Professor _____ für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Auch meiner Familie möchte ich an dieser Stelle danken. Mein größter Dank gilt meinen Eltern, denen diese Arbeit gewidmet ist. Vielen Dank, dass ich immer auf eure bedingungslose Unterstützung zählen konnte und ihr mir alles ermöglicht habt. Ohne euch wäre ich nicht die Person, die ich heute bin und ich kann euch gar nicht genug für eure

Liebe, Hingabe und eurem Einsatz danken. Außerdem möchte ich meinen Schwestern danken. Vielen Dank für eure wissenschaftliche Expertise, eure Gabe mich abzulenken, wenn es dringend nötig war, sowie eure Empathie, Zeit und Geduld. Vielen Dank, dass ich immer auf euch zählen und alles mit euch teilen kann, ich könnte mir keine besseren Schwestern wünschen. Mein weiterer Dank gilt _____, die sich immer alle meine Sorgen angehört hat, mich mit gemeinsamen Kochabenden, Gesprächen jeglicher Art und Hundespaziergängen schnell wieder aufgebaut und mir neue Motivation gegeben hat.

Mein weiterer Dank gilt meinen Freunden _____, die mich während der gesamten Zeit des Projekts unterstützt und motiviert haben, mir mit Rat zur Seite standen, jederzeit bereit waren zu helfen und für Ablenkung gesorgt haben, wenn ich einmal nicht weiterkam. Außerdem möchte ich meiner Bib-Gang danken, die mich während des Schreibprozesses immens unterstützt haben und ohne die ich jetzt wahrscheinlich immer noch am Schreiben wäre.

Vielen herzlichen Dank!

9 Publikation

aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikation:

Rausch J, Dzama MM, Dolgikh N, **Stiller HL**, Bohl SR, Lahrmann C, Kunz K, Kessler L, Echchannaoui H, Chen CW, Kindler T, Döhner K, Burrows F, Theobald M, Sasca D, Kühn MWM, *Menin inhibitor ziftomenib (KO-539) synergizes with drugs targeting chromatin regulation or apoptosis and sensitizes acute myeloid leukemia with MLL rearrangement or NPM1 mutation to venetoclax*. Haematologica, 2023.

10 Tabellarischer Lebenslauf

Persönliches

Name	Hanna Luca Stiller
Geburtsdaten	31.01.1998 in Wiesbaden-Dotzheim

Ausbildung

Seit 2023	Studium der Zahnmedizin, <i>Johannes-Gutenberg Universität, Mainz</i>
2016 – 2023	Studium der Humanmedizin, Gesamtnote: „Sehr gut“ <i>Johannes-Gutenberg Universität, Mainz</i>
2023	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: „Sehr gut“
2022	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: „Gut“
2018	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: „Sehr gut“
2016	Abitur (Note:1,1), <i>Pestalozzischule, Idstein</i>

Klinische Erfahrung

Seit 08/2023	Assistenzärztin in Weiterbildung zur Mund-Kiefer-Gesichtschirurgin <i>Universitätsmedizin Mainz, Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie</i>
05/2022 – 04/2023	Praktisches Jahr <ol style="list-style-type: none"> 1. Innere Medizin (<i>Universitätsspital Basel, Basel</i>) 2. Chirurgie (<i>Diakonie Krankenhaus, Bad Kreuznach / Groote Schuur Hospital, Cape Town</i>) 3. Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie (<i>Universitätsmedizin Mainz</i>)
2019 – 2020	Famulaturen <ol style="list-style-type: none"> 1. Diagnostische und Interventionelle Radiologie, <i>Klinikum Hanau, Hanau</i> 2. Hämatologie und Onkologie, <i>Universitätsmedizin Mainz</i> 3. Allgemeinmedizin, <i>Praxis Dres. med. Daltrop & Geist, Wiesbaden</i> 4. Kardiologie, <i>Praxis Dr. med. Bunte, Homburg</i>

Zusatz Tätigkeiten im Rahmen des Studiums

2019 – 2022	Ultraschall-Tutorin für das studentische Projekt „Sono-for-Klinik“ sowie Leitung der AG Kommunikation, <i>Universitätsmedizin Mainz</i>
2020 – 2021	Auslandsaufenthalt im Rahmen des ERASMUS-Programms <i>Universität Valencia, Spanien</i>
2018 – 2019	Wissenschaftliche Hilfskraft, <i>Johannes-Gutenberg Universität, Mainz, Institut für Mikroskopische Anatomie und Neurobiologie (IMAN)</i>
2016 – 2022	Studentische Vertreterin, <i>Fachschaft Medizin der Johannes-Gutenberg Universität, Mainz</i>

Stipendien

2019 – 2020	José-Carreras-DGHO-Promotionsstipendium, <i>José-Carreras-Stiftung und Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie</i>
2018 – 2019	Deutschlandstipendium, <i>TRON Translationale Onkologie, Mainz</i>