

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin II
(Schwerpunkt: Hämatologie, Onkologie, Klinische Immunologie,
Rheumatologie)

Die Wirkung des Tyrosinkinase-Inhibitors Crenolanib auf
autoaktive Isoformen der Rezeptortyrosinkinase KIT.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Frey, Julia

2019

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Schittenhelm

2. Berichterstatter: Professor Dr. P. Lang

Tag der Disputation: 28.11.2019

für Papa

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Rezeptortyrosinkinasen.....	1
1.2 Klasse-III-Rezeptortyrosinkinase KIT.....	1
1.3 Systemische Mastozytose.....	6
1.3.1 Pathogenese der Systemischen Mastozytose.....	7
1.3.2 Diagnose der Systemischen Mastozytose.....	7
1.4 Akute Myeloische Leukämie – Core binding factor Leukämie.....	10
1.4.1 Epidemiologie und Klinik der AML.....	10
1.4.2 Diagnose der AML.....	10
1.4.3 Pathogenese der AML.....	12
1.4.4 Therapie der AML.....	13
1.5 Crenolanib.....	13
1.6 Cladribin.....	16
1.7 Ziel der Arbeit.....	16
2 Material.....	18
2.1 Zelllinien.....	18
2.2 Geräte.....	19
2.3 Allgemeine Verbrauchsmaterialien, Glas –und Plastikmaterial.....	20
2.4 Chemikalien.....	21
2.5 Material für die Isolierung mononukleärer Zellen.....	22
2.6 Material für die Durchflusszytometrie.....	22
2.7 Material für die Proliferationsanalysen.....	23
2.8 Material für Western Blots.....	23
2.8.1 Geräte.....	23
2.8.2 Reagenzien und Laborartikel.....	24
2.8.3 Antikörper.....	25
2.9 Substanzen.....	26
3 Methoden.....	27
3.1 Zellkultur.....	27
3.1.1 Passagieren der Zellen.....	27
3.1.2 Zellzählung.....	27

3.1.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen für die Zellkultur:.....	28
3.2	Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut oder Knochenmark.....	28
3.3	Apoptoseinduktion von Zelllinien und nativen Zellen.....	29
3.3.1	Crenolanib-Verdünnungsreihen	29
3.3.2	Kombinationsbehandlung mit Crenolanib und Cladribin.....	30
3.3.3	Plasmahinhibitionstest mit Crenolanib.....	30
3.4	Durchflusszytometrie:.....	31
3.4.1	Apoptosenachweis am Durchflusszytometer mittels Annexin V/PI-Färbung	32
3.4.2	Direkte Immunfluoreszenzfärbung von nativen Zellen.....	33
3.5	Proliferationsanalysen (XTT-Proliferationsassay)	34
3.6	Western Blots.....	35
3.6.1	Vorbereitung der Zelllinien	35
3.6.2	Lysieren der Zellen.....	35
3.6.3	Proteinbestimmung (Bradford-Assay)	36
3.6.4	Vorbereitung der Proben für die SDS-Page (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese):.....	36
3.6.5	SDS-Page:	37
3.6.6	Detektion der Proteine:.....	37
3.6.7	Strippen der Membran.....	38
3.7	Statistische Auswertung.....	39
4	Ergebnisse	40
4.1	Dosisabhängige Proliferationsinhibition durch Crenolanib in KIT-mutierten Mastozytose-Zelllinien	40
4.2	Dosisabhängige Apoptoseinduktion durch Crenolanib in Leukämie – und Mastozytose-Zelllinien mit aktivierter Klasse-III-RTK.....	42
4.3	Vergleich der Crenolanib-Sensitivität gegenüber verschiedenen Zelllinien mit <i>FLT3</i> - oder <i>KIT</i> -Mutation in einem isogenen zellulären Hintergrund.....	49
4.4	Untersuchung der Crenolanib-Wirkung auf den Phosphorylierungsstatus der RTK KIT und weiterer nachgeschalteter Signalwege mittels Western Blot	53
4.5	Plasmahinhibitionstest –Crenolanib-Konzentrationen zur gezielten Inhibition von KIT D816 Isoformen sind auch <i>in vivo</i> erreichbar	58
4.6	Vergleich von Crenolanib und Dasatinib in Ba/F3 <i>KIT</i> D816V Zellen..	59

4.7	Crenolanib reduziert native, vitale Mastozytose-Zellen (<i>ex vivo</i>).....	62
4.8	Crenolanib reduziert native, vitale CBF-Leukämiezellen (<i>ex vivo</i>)	64
4.9	(Super)additiver Effekt der Kombination aus Crenolanib und Cladribin in Mastozytose-Zelllinien	68
4.10	(Super)Additiver Effekt der Kombination aus Crenolanib und Cladribin in <i>ex vivo</i> behandelten Systemischen Mastozytosen	70
5	Diskussion.....	73
6	Zusammenfassung:	81
7	Abkürzungsverzeichnis	82
8	Literaturverzeichnis	84
9	Erklärung zum Eigenanteil	93

1 Einleitung

1.1 Rezeptortyrosinkinasen

Rezeptortyrosinkinasen (RTK) gehören zur Multigenfamilie der Proteintyrosinkinasen. Im menschlichen Genom wurden über 90 Gene für Tyrosinkinasen identifiziert, davon codieren 58 für Rezeptortyrosinkinasen, die wiederum je nach Struktur ihrer Kinasedomäne und extrazellulären Region in 20 Unterfamilien eingeteilt werden [3]. RTK spielen eine Schlüsselrolle in der Regulation und Koordination komplexer physiologischer Prozesse einer Zelle wie Wachstum, Zellteilung, Differenzierung, Migration und Apoptose. Es zeigte sich, dass Veränderungen der RTK auch entscheidend an der Entstehung und Progression von Erkrankungen beteiligt sein können [4]. RTK der Klasse III, zu der PDGFR α und β , KIT, FLT3 und CSF-1R gehören, sind vor allem für die Hämatopoese von großer Bedeutung und mit verschiedenen hämatologischen Neoplasien wie Systemischen Mastozytosen (KIT), Myeloproliferativen Erkrankungen (PDGFR) oder Akuten Leukämien (FLT3, KIT) assoziiert [2, 5]. Die extrazelluläre Region der Klasse-III-RTK besteht aus fünf Immunglobulin-ähnlichen Domänen [6]. Des Weiteren haben sie charakteristischerweise eine Transmembran-Domäne (TM). Die zytoplasmatische Region enthält die juxtamembranäre Domäne, zwei durch eine Kinaseinsertionsdomäne unterteilte intrazelluläre Kinase-Domänen (TK1 und TK2), sowie die regulatorische C-terminale Domäne [1, 2]. Extrazelluläre Signalmoleküle wie Wachstumsfaktoren, Zytokine und Hormone binden mit hoher Affinität an die extrazelluläre Domäne der Klasse-III-RTK und lösen damit eine Signalkaskade aus, die unterschiedliche Zellfunktionen wie Proliferation, Differenzierung oder Apoptose regulieren [1, 2].

1.2 Klasse-III-Rezeptortyrosinkinase KIT

Die humane Klasse-III-Rezeptortyrosinkinase KIT, die auch als c-KIT, CD 117 oder SCFR (Mast/stem cell growth factor receptor) bezeichnet wird, ist ein transmembranäres Glykoprotein mit einer Molekülmasse von 145kDa [7] und wird vom *KIT*-Gen auf Chromosom 4 codiert [8]. *Abbildung 1.1* zeigt eine schematische Darstellung des KIT-Monomers. KIT wurde 1987 als menschliches

Homolog des viralen Onkogens v-KIT identifiziert und charakterisiert [7]. SCF (Stem cell factor, auch MCF = Mast cell factor) ist der Ligand der RTK KIT [9]. Bindet ein SCF-Dimer an die ligand binding pocket (Ig - Domänen 2 und 3) von KIT, vernetzt es zum einen zwei KIT-Moleküle miteinander und führt durch diese Aktivierung zum anderen dazu, dass die Ig - Domänen 4 und 5 miteinander interagieren (*siehe Abbildung 1.2 A*) [1, 10]. Durch die Dimerisierung des Rezeptors wird dessen Proteinkinaseaktivität aktiviert und es kommt zur Autophosphorylierung von Tyrosinresten des Rezeptors. Die inaktive KIT-Konfiguration wird durch die autoinhibitorische Interaktion der juxtamembranären Region mit aktiven TK-Elementen wie der Aktivierungsschleife stabilisiert. Die Störung dieser autoinhibitorischen Interaktionen durch Autophosphorylierung von bestimmten Tyrosinresten der Juxtamembran-Regionen, sowie die Autophosphorylierung der Aktivierungsschleife, ermöglichen den Übergang der RTK in eine aktive Konformation (*siehe Abbildung 1.2 B*) [1]. Die durch die Autophosphorylierung entstandenen Phosphotyrosinreste des Rezeptors dienen als hochaffine Bindungsstellen für Signalmoleküle mit SH2 (*Src-homology 2*) – oder PRB (phosphotyrosine-binding) – Domänen, die weitere nachgeschaltete Signalwege aktivieren. Neben der Tyrosin-Autophosphorylierung katalysiert KIT auch die Phosphorylierung von Substraten. Die durch SCF-Bindung aktivierte RTK KIT ist an der Aktivierung verschiedenster nachfolgender Signalwege wie beispielsweise des Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathways, des Ras/Erk pathways, der Src-Kinasen oder des JAK/STAT pathways beteiligt, die für wichtige Zellantworten wie Differenzierung, Proliferation und Apoptose verantwortlich sind (*siehe Abbildung 1.3*) [11-14].

Abbildung 1.1

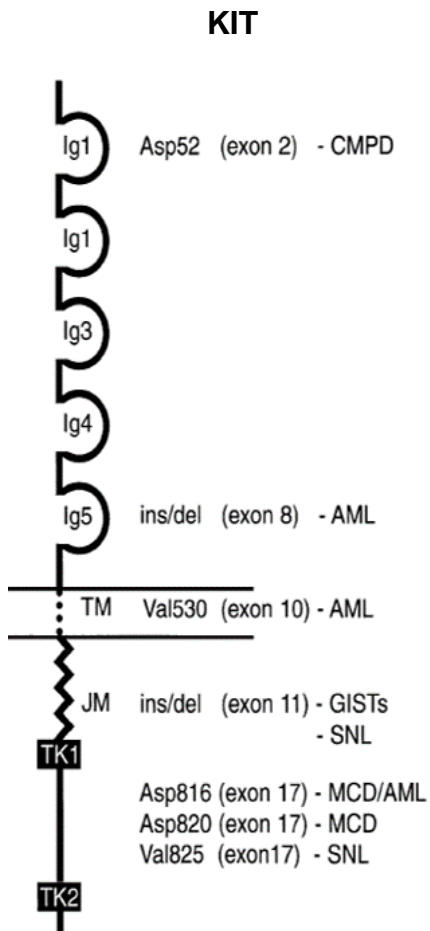


Abbildung 1.1 Schematische Darstellung einer Klasse-III-RTK am Beispiel KIT

rechts: *KIT*-Mutationen und assoziierte Erkrankungen

Ig = Immunglobulin-Domäne,

TM = Transmembran-Domäne,

JM = Juxtamembran-Domäne,

TK = Tyrosinkinase

Quelle: Reilly, J.T., *Class III receptor tyrosine kinases: role in leukaemogenesis*. Br J Haematol, 2002 [2]

Abbildung 1.2

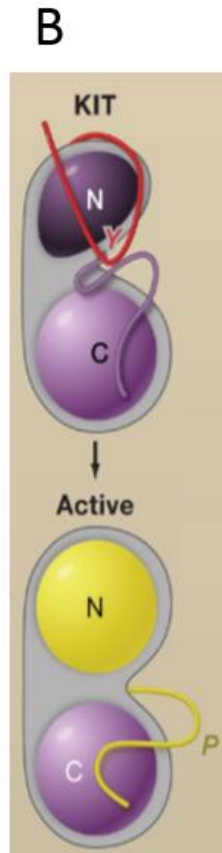
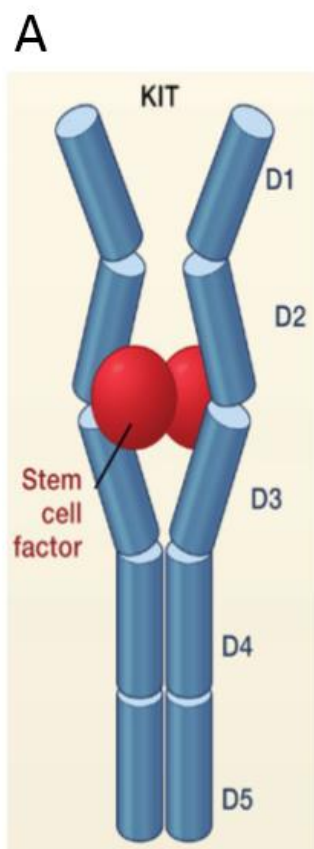


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung des KIT-Rezeptors

A: Extrazelluläre Ligandenbindung des SCF an KIT

D1-D5: Immunglobulin-Domänen

B: Intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne der RTK KIT

Oben: inaktive Konformation (lila): autoinhibitorische Interaktion zwischen JM-Region (rot) und aktiven TK-Elementen (Juxtamembran-Autoinhibition)

Unten: aktive Konformation (gelb), die durch Autophosphorylierung von Tyrosinresten der JM-Region eingenommen werden kann[1].

N = N-terminales Ende der RTK

C = C-terminales Ende der RTK

Aktivierungsschleife: lila/gelb (inaktive/aktive Konformation)

Quelle: Lemmon, M.A. and J. Schlessinger, *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. Cell, 2010 [1]

Abbildung 1.3

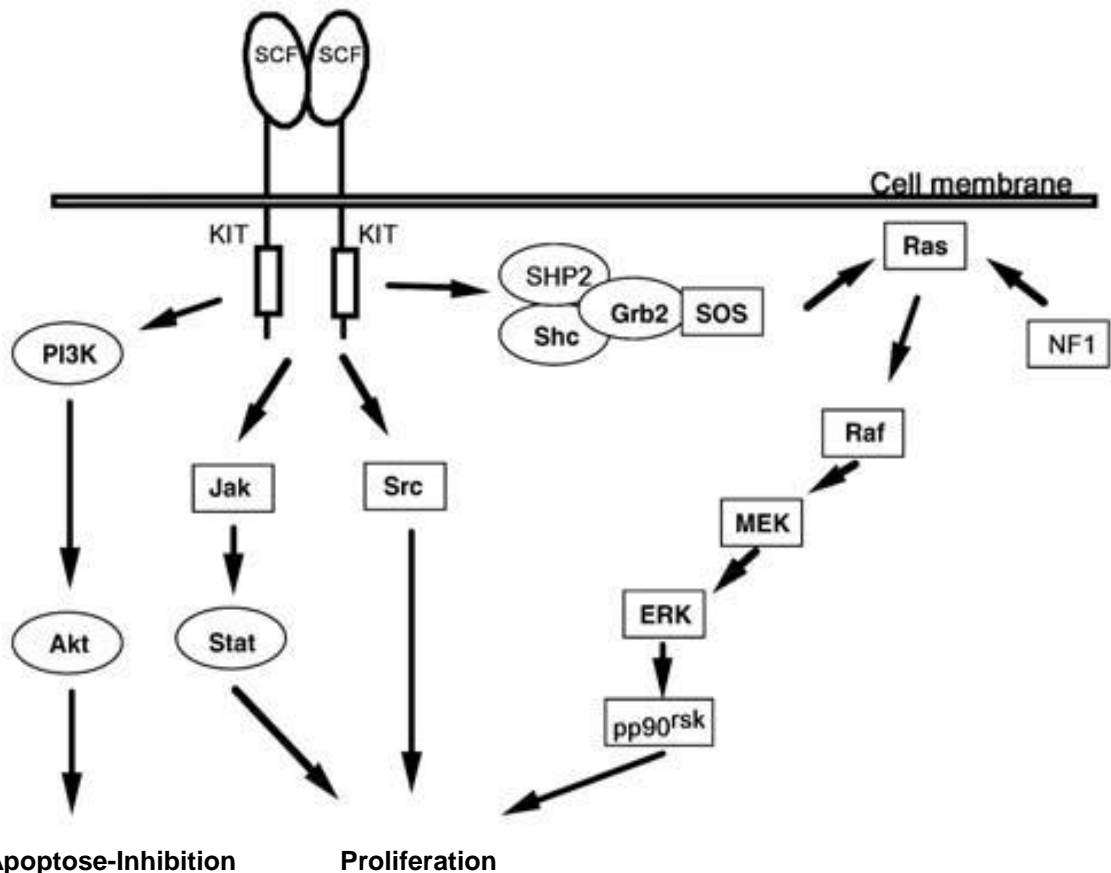


Abbildung 1.3 Schematische Darstellung der SCF/KIT-Signaltransduktion.

Quelle: Kitamura, Y. and S. Hirota, *Kit as a human oncogenic tyrosine kinase*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2004 [13]

KIT wird physiologischerweise von hämatopoetischen Stammzellen, Mastzellen, Melanozyten, Keimzellen der Gonaden und den interstitiellen Schrittmacherzellen von Cajal exprimiert [15]. „Gain-of-function“-Mutationen im Protoonkogen *KIT* führen zur Wachstumsfaktor-unabhängigen, dauerhaften Aktivierung der RTK und somit zu dauerhafter Apoptosehemmung und überschießender Proliferation und können eine maligne Transformation oder eine andere hyper-proliferative Erkrankung des betroffenen Gewebes auslösen [4, 13]. *KIT*-Mutationen kommen unter anderem bei Keimzelltumoren und Gastrointestinalen Stromatumoren (GIST), sowie bei Akuten Leukämien und bei der großen Mehrheit der Systemischen Mastozytosen vor, die im Folgenden noch genauer beschrieben werden [12].

1.3 Systemische Mastozytose

Mastzellen sind körpereigene Zellen der Immunabwehr, die je nach umliegendem Gewebe verschiedene Mediatoren entweder in Sekretgranula speichern und bei Aktivierung entleeren (z.B. Histamin, Heparin, Serinproteasen) oder direkt de-novo synthetisieren und freisetzen (z.B. Zytokine, Leukotriene, Prostaglandine, PAF). Sie finden sich in fast allen Geweben des Körpers in großer Anzahl Mastzellen stammen von hämatopoetischen Stammzellen ab und exprimieren die Rezeptortyrosinkinase KIT, die durch SCF-Bindung aktiviert wird und sowohl Differenzierung, Proliferation und Apoptose der Mastzellen maßgeblich steuert, als auch für die Mastzellaktivierung und -degranulation von entscheidender Bedeutung ist [16-18]. Die pathologische klonale Vermehrung morphologisch und immunphänotypisch veränderter Mastzellen bezeichnet man als Mastozytose, die mit einer geschätzten Inzidenz von 0,00001% pro Jahr eine seltene Erkrankung ist [19]. Die überwiegende Mehrzahl der Mastozytose -Patienten weist eine aktivierende Mutation der RTK KIT auf. Mastozytosen werden je nach klinischer Präsentation in benigne oder maligne Formen unterteilt. Bei den häufiger auftretenden benignen, teilweise selbstlimitierenden Kutanen Mastozytosen, die meist Kinder betreffen, beschränkt sich die Mastzellakkumulation auf die Haut. Die aggressiveren Systemischen Mastozytosen (SM) treten gewöhnlich bei Erwachsenen auf, zeigen einen persistenten oder progressiven Verlauf [20] und zeichnen sich durch das Vorkommen von multifokalen, entarteten Mastzellherden in einem oder mehreren extrakutanen Organsystemen aus. Man unterscheidet vier Formen der SM: Die Indolente SM (ISM), SM, die im Rahmen einer assoziierten hämatologischen, nichtmastozytären Erkrankung meist der myeloischen Reihe auftreten (SM-AHNMD), die Aggressive SM (ASM) und Mastzelleukämien (MCL) [21, 22]. Zwei weitere seltene Formen der Mastozytose, die weder der Systemischen noch der Kutanen Mastozytose zugeordnet werden, sind das Mastzellsarkom (MCS) und das Extrakutane Mastozytom, die jeweils sowohl benigne als auch maligne sein können. Alle Formen der Mastozytose können in seltenen Fällen in eine MCL übergehen [23].

1.3.1 Pathogenese der Systemischen Mastozytose

Die genaue Entstehung der Systemischen Mastozytose ist noch nicht bekannt, jedoch wird bei der überwiegenden Mehrzahl der Patienten mit SM eine aktivierende „gain-of-function“-Mutation im *KIT*-Gen, das für die RTK KIT codiert, gefunden. In den meisten Fällen (>90%) [24] liegt eine Punktmutation der Tyrosinkinasedomäne im Kodon 816 (Exon 17) des *KIT*-Gens vor (*KIT* D816V – Mutation), bei der die Aminosäure Aspartat an dieser Stelle durch Valin ersetzt wird. Durch die Mutation kommt es zu einer Wachstumsfaktor (SCF) – unabhängigen Aktivierung der RTK KIT und somit zu gesteigerter Proliferation, Überlebensdauer und Mediatorfreisetzung der Mastzellen. Bei der häufigen *KIT* D816V assoziierten SM ist oftmals ein schwerer Verlauf zu beobachten [20]. Weniger häufige somatische Mutationen im *KIT*-Gen (< 5%) sind beispielsweise die V560G – Mutation oder die D816Y – Mutation [15, 21, 25, 26]. Mastozytosen, die mit einer Eosinophilie assoziiert sind, können das *FIP1L1-PDGFR*A Fusionsgen aufweisen, das zu einer Autoaktivierung von PDGFRA führt [27].

1.3.2 Diagnose der Systemischen Mastozytose

Die Diagnose einer Mastozytose wird an Hand der WHO-Kriterien für Kutane und Systemische Mastozytosen gestellt. Zur Diagnose einer Systemischen Mastozytose müssen das Hauptkriterium und mindestens ein Nebenkriterium oder drei Nebenkriterien erfüllt sein (siehe Tabelle 1.1: Diagnosekriterien der Systemischen Mastozytose) [28].

Hauptkriterium:
Multifokale, dichte Mastzellinfiltrate (bestehend aus ≥ 15 Mastzellen) im Knochenmark und/oder anderen extrakutanen Organen.
Nebenkriterien:
1. Vorliegen von $> 25\%$ morphologisch atypischen, spindelförmigen oder unreifen Mastzellen im Knochenmarkausstrich oder einem Gewebebiopsat
2. Nachweis einer aktivierenden <i>KIT</i> D816V Punktmutation (im Blut, KM oder anderen Gewebebiopsat)
3. Vorliegen von Mastzellen in einem Biopsat oder KM-Aspirat, die zusätzlich zu den normalen Mastzellmarkern auch CD2 und/oder CD25 exprimieren
4. dauerhaft erhöhter Tryptase – Spiegel $> 20\text{ng/ml}$ im Serum

Tabelle 1.1 Diagnosekriterien der Systemischen Mastozytose

1.3.3 Klinik der Systemischen Mastozytose

Viele Symptome, die im Rahmen einer Mastozytose auftreten, werden durch die chronische oder akute Freisetzung der Mastzellmediatoren verursacht (Mastzellmediator-Freisetzungssyndrom). Die Mediatorfreisetzung kann durch bestimmte Stimuli wie unter anderem Medikamente (z.B. Aspirin, Narkotika, iodhaltige Kontrastmittel, NSAIDs, Antibiotika), Insektenstiche, Sonne, Müdigkeit, Alkohol, Infektionen, Gerüche, mechanische Reizung, plötzliche Temperaturveränderungen, emotionalen Stress und Sport getriggert werden, wobei nicht alle potentiellen Triggerfaktoren bei allen Mastozytose-Patienten eine Degranulation der Mastzellen auslösen [29].

Mastozytosen weisen ein sehr breites Spektrum an klinischen Erscheinungsbildern auf. Die Mastzelldegranulation kann, je nachdem in welchem Organsystem sie stattfindet, neben Juckreiz und Flush auch gastrointestinale Symptome (Übelkeit, Erbrechen, chronische Bauchschmerzen, Diarrhö), durch episodische Vasodilatation bedingte kardiovaskuläre Symptome (Hypotension, Tachykardie, Synkopen), muskuloskeletale Symptome (Knochen- und Muskelschmerzen, erhöhte Osteoporoseneigung, pathologische Frakturen), neuropsychiatrische Symptome ("mixed organic brain syndrome") oder systemische Symptome (Fatigue, Kachexie, Anaphylaxie) auslösen [30-34]. Die

durch Freisetzung der Mastzellmediatoren verursachten Symptome treten häufiger bei indolenteren als bei aggressiven Varianten der SM auf [21].

Darüber hinaus können Mastzellablagerungen in Organen, die mit steigender Aggressivität der Krankheit zunehmen, zu erheblichen Organfunktionsstörungen bis hin zum Multiorganversagen und deutlich verkürzter Lebenserwartung führen [35]. Das Knochenmark ist bei fast ausnahmslos allen SM mitbetroffen [22].

1.3.4 Therapie der Systemischen Mastozytose

Für die Systemische Mastozytose ist bis dato keine kurative Therapie bekannt. Alle Therapieansätze dienen der Symptomreduktion und Verbesserung der Lebensqualität der Patienten. Eingesetzt werden hierzu unter anderem Antihistaminika, Methoxypsoralen in Kombination mit einer UVA-Phototherapie, Cromoglycinsäure und Leukotrienantagonisten [36]. Ist diese Antimediator-Therapie nicht ausreichend, kommen low-dose Glukokortikoide und zytoreduktive Therapien wie Interferon alpha, Hydroxycarbamid und Cladribin oder neuerdings die gezielte Therapie mit einem Tyrosinkinase-Inhibitor zum Einsatz [37]. Da die SM in den meisten Fällen mit einer aktivierenden Mutation der RTK KIT einhergeht, verspricht die gezielte Inhibition von KIT durch Tyrosinkinase-Inhibitoren zytoreduktive Effekte bei schweren Formen der SM [38]. Der TKI Imatinib konnte in der Therapie der GIST (Gastrointestinalen Stromatumoren), die zu 80-85% ebenfalls eine aktivierende Mutation der RTK KIT in Exon 9,11,13 oder 17 aufweisen, gute Erfolge erzielen [15]. Versuche, die SM ebenfalls mit Imatinib zu behandeln, zeigten gute Aktivität gegenüber *KIT*WT oder auch der *KIT* V560G Mutation, jedoch konnte kein nennenswerter zytotoxischer Effekt gegenüber den häufigen *KIT* D816V (Exon 17) positiven SM erzielt werden. Imatinib stellt somit nur bei den deutlich selteneren SM ohne *KIT* D816V Mutation eine Therapieoption dar, die auf Imatinib ein deutliches Ansprechen mit Reduktion der Mastzelllast und der klinischen Symptome zeigten [24, 39-43]. Der TKI Midostaurin erzielte in einer Phase-II-Studie auch in der Therapie *KIT* D816V positiver Systemischer Mastozytosen zytoreduktive Effekte und erhielt aktuell die Zulassung zur Therapie aggressiver Formen der Systemischen Mastozytose [44, 45]. Andere Tyrosinkinase-Inhibitoren wie

Masitinib, Nilotinib oder Dasatinib konnten trotz vielversprechender *in vitro* Ergebnisse nur enttäuschende oder vorübergehende Wirksamkeit *in vivo* erzielen [46-48].

1.4 Akute Myeloische Leukämie – Core binding factor Leukämie

1.4.1 Epidemiologie und Klinik der AML

Die Lebenswahrscheinlichkeit an einer Leukämie zu erkranken beträgt ca. 1:70. Somit sind die Leukämien eine eher seltene maligne Erkrankung und stehen an 10. (Frauen) bzw. 11. Stelle (Männer) im Ranking der häufigsten malignen Erkrankungen in Deutschland [49]. In etwa 30% der Fälle handelt es sich um akute Leukämieformen [50]. Die Akute Myeloische Leukämie macht dabei etwa 80% aller akuten Leukämien im Erwachsenenalter aus [51]. Dabei zeigt die Inzidenz einen deutlichen Anstieg mit fortschreitendem Lebensalter [52].

Akute Myeloische Leukämien zeichnen sich durch die klonale Proliferation myeloischer, unreifer Vorläuferzellen aus, die die Fähigkeit zur Differenzierung weitgehend verloren haben. Durch die Akkumulation der teilungsfähigen, aber funktionell unreifen leukämischen Blasten im Knochenmark wird die Bildung reifer Blutzellen verdrängt, so dass in vielen Fällen eine Anämie, Granulozytopenie und Thrombopenie auftritt. Die klinischen Symptome der AML sind häufig sehr unspezifisch, resultieren aber meistens aus der durch die hämatopoetische Insuffizienz bedingten Panzytopenie. Typischerweise treten zum Beispiel Müdigkeit, verminderte Leistungsfähigkeit, Blutungsneigung und Infektionen auf. Durch Blasteninfiltration von verschiedenen Organen können weitere Symptome entstehen [52].

1.4.2 Diagnose der AML

Eine AML ist von der WHO durch einen Blastenanteil i.A.>20% im Knochenmark oder peripheren Blut, oder durch den Nachweis einer speziellen zytogenetischen Veränderung definiert. AML werden nach dem WHO-Klassifikationsschema unter Berücksichtigung morphologischer, zytochemischer und molekular- und

zytogenetischer Eigenschaften eingeteilt und diagnostiziert (siehe Tabelle 1.2: WHO-Klassifikationsschema der Akuten Leukämien (2016)) [53, 54].

AML mit rekurrenter genetischer Anomalie	<ul style="list-style-type: none"> - AML mit t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1 - AML mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11 - Akute Promyelozytenleukämie (APL) mit PML-RARA - AML mit t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A - AML mit t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214 - AML mit inv(3)(q21.3;q26.2) oder t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2-MECOM - AML (megakaryoblastisch) mit t(1;22)(p13.3;q13.3); RBM15-MKL1 - Provisorische Entität: AML mit BCR-ABL1 - AML mit mutiertem NPM1 - AML mit biallelischer Mutation von CEBPA - Provisorische Entität: AML mit mutiertem RUNX1
AML mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen	
Therapie-assoziierte myeloische Neoplasie	
AML, nicht anderweitig klassifiziert (NOS)	<ul style="list-style-type: none"> - AML mit minimaler Differenzierung (analog FAB M0) - AML ohne Ausreifung (analog FAB M1) - AML mit Ausreifung (analog FAB M2) - Akute myelomonozytäre Leukämie (analog FAB M4) - Akute monoblastäre/monozytäre Leukämie (analog FAB M5a-b) - Reine Erythroleukämie (analog FAB M6) - Akute Megakaryoblastäre Leukämie (analog FAB M7) - Akute Basophilen-Leukämie - Akute Panmyelose mit Myelofibrose
Myeloisches Sarkom	
Myeloische Down-Syndrom-assoziierte Proliferation	<ul style="list-style-type: none"> - Transient abnorme Myelopoese (TAM) - Myeloische Leukämie mit Down Syndrom

Akute Leukämien unklarer Linienzugehörigkeit	<ul style="list-style-type: none"> - Akute undifferenzierte Leukämie - Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp (MPAL) mit t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1 - MPAL mit t(v;11q23.3); KMT2A-rearrangiert - MPAL, B/myeloisch, nicht weiter klassifiziert (NOS) - MPAL, T/myeloisch, nicht weiter klassifiziert (NOS)
B-lymphoblastische Leukämien / B-lymphoblastische Lymphome	<ul style="list-style-type: none"> - B-lymphoblastische Leukämie/Lymphom, nicht weiter klassifiziert (NOS) - B-lymphoblastische Leukämie/Lymphom mit rekurrenter genetischer Anomalie
T-lymphoblastische Leukämien / T-lymphoblastische Lymphome	<ul style="list-style-type: none"> - Provisorische Entität: frühe T-Zell-Vorläufer lymphoblastische Leukämie - Provisorische Entität: NK-Zell lymphoblastische Leukämie

Tabelle 1.2 WHO-Klassifikationsschema der Akuten Leukämie (2016)

1.4.3 Pathogenese der AML

Bei über 30% der *de-novo* AML liegt eine *FLT3*-Mutation vor, wobei *FLT3*-ITD und *FLT3* D835 am häufigsten vorkommen. Aktivierende *KIT* - Mutationen betreffen etwa 6 % der *de-novo* AML, die häufigste Mutation betrifft das Codon *KIT* D816 [14, 55]. Bezogen auf die Gesamtheit aller AML kommen *KIT*-Mutationen somit eher selten vor. Jedoch liegt bei etwa 30% der Core binding factor AML eine *KIT*-Mutation vor, vorrangig *KIT* D816V im Exon 17, welches für die Aktivierungsschleife kodiert, oder im Exon 8, welches für eine extrazelluläre Rezeptorregion kodiert [56]. Der Core binding factor (CBF) ist ein Transkriptionsfaktor, der in der Regulation der normalen Hämatopoese eine entscheidende Rolle spielt. Eine CBF AML wird als „AML mit wiederkehrenden zytogenetischen Anomalien“ charakterisiert und ist definiert durch das Vorliegen einer t(8;21) (q22;q22) oder einer inv(16)(p13;q22), deren Nachweis für eine AML-Diagnose, unabhängig vom Blastenanteil im Knochenmark, ausreicht. Als Produkt der genetischen Veränderung entstehen Fusionsproteine wie AML1-ETO (t(8;21)) und CBFβ-SMMHC (inv(16)), die als aberrante

Transkriptionsfaktoren die Regulation und Aufrechterhaltung der normalen Hämatopoese empfindlich stören [57].

FLT3- und *KIT*-Mutationen haben neben ihrer Bedeutung für die Pathogenese der AML auch einen hohen prognostischen Stellenwert für AML-Patienten, da einige *FLT3*- und *KIT*- Mutationen mit einer deutlich schlechteren Überlebensrate und erhöhter Therapieresistenz einhergehen [14, 55, 58-61]. *KIT* - Mutationen sind außerdem mit einem erhöhten Rezidiv-Risiko der CBF AML assoziiert. Ob dieser negative prognostische Effekt nur für *KIT* positive CBF AML mit t(8;21) [55] oder auch für diejenigen mit inv(16) gilt [62], ist nicht endgültig geklärt.

1.4.4 Therapie der AML

Das Therapieregime einer AML wird individuell, in Abhängigkeit von Alter und Komorbiditäten eines Patienten, sowie nach diagnostiziertem AML-Subtyp und dem Vorliegen einer therapierefraktären oder einer rezidierten AML festgelegt. Neben bei AML standardmäßig verwendeten Zytostatika wie bspw. Cytarabin oder Anthrazyklinen [63-65], stellt die gezielte Inhibition mutierter RTK durch Tyrosinkinase-Inhibitoren eine Therapieoption, auch in Kombination mit einer Standard AML-Chemotherapie, dar. Zahlreiche TKI wie bspw. Sorafenib, Semaxanib, Sunitinib, Lestaurtinib, Dasatinib und Quizartinib mit unterschiedlichem Aktivitätsspektrum gegenüber mutierten Klasse-III-RTK wie *FLT3* und *KIT* wurden bereits für die AML-Therapie entwickelt, zeigten jedoch *in vivo* je nach vorliegender Mutation nur unzureichende oder vorübergehende Wirksamkeit. Bisher wurde eine Zulassung nur für Midostaurin für die Induktions-, Konsolidierungs- und Erhaltungstherapie bei *FLT3*- mutierter AML erteilt [24, 66-74].

1.5 Crenolanib

Crenolanib (CP-868,596-26, 4-piperidinamine, 1-[2-[5-[(3-Methyl-3-oxetanyl)methoxy]-1H-benzimidazol-1-yl]-8-quinoliny]-, monobenzenesulfonate) ist ein neuer, von der Firma AROG Pharmaceuticals entwickelter, oraler Klasse-III Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor der zweiten Generation. Crenolanib besitzt Typ-I-TKI - Eigenschaften und bindet somit an die aktive, phosphorylierte Form einer

RTK, während Typ-II-TKI wie Imatinib, Sorafenib und Quizartinib an die inaktive RTK-Konformation binden [75-77].

Crenolanib befindet sich für *FLT3*-ITD und *FLT3*-Wildtyp-AML, sowie für *PDGFR*-assoziierte solide Tumoren (GIST, Gliome, NSCLC) bereits in mehreren Phase-II- und Phase-III-Studien in klinischer Erprobung [78] und konnte zuvor in Phase-I-Studien bezüglich Verträglichkeit und Sicherheit gute Ergebnisse erzielen. Darüber hinaus zeigte sich im Vergleich zu anderen Substanzen ein exzellentes pharmakokinetisches Profil [79, 80].

Crenolanib wurde als Inhibitor der Klasse-III-RTK *PDGFR* α und β entwickelt und erwies sich ebenfalls als ein selektiver Typ-I pan-*FLT3*-Inhibitor mit vielversprechenden Ergebnissen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gegenüber *FLT3* mit aktivierenden ITD- und/oder D835 - oder F691 - Mutationen, die mit einem hohen Rezidivrisiko und Therapieresistenz bei AML-Patienten assoziiert sind. RTK-Inhibitoren, wie Quizartinib und Sorafenib zeigen bei *FLT3* positiven AML-Patienten initial sehr gute Ansprechraten, jedoch entwickelten viele Patienten innerhalb kurzer Zeit eine sekundäre Therapieresistenz gegenüber diesen Substanzen. Es wird vermutet, dass sekundäre *FLT3*-Punktmutationen wie bspw. die D835-oder die F691-Mutation zu einer Destabilisierung der inaktiven *FLT3*-Konformation führen, so dass die Typ-II-TK-Inhibitoren nicht mehr binden können.

Demgegenüber scheint Crenolanib, welches als TKI Typ-I auch an die aktive Konformation bindet, positive Effekte auf *FLT3* positive AML erzielen zu können [75, 76, 81]. Für bereits in der Klinik eingesetzte *FLT3*-Inhibitoren wie Quizartinib konnte zudem eine Aktivität gegenüber anderen Klasse-III-RTK-Mutationen wie *PDGFR* – oder *KIT*-Mutationen [82] gezeigt werden. Auch für Crenolanib wird eine gezielte Inhibierung von *PDGFR*–oder *KIT*–Isoformen postuliert [83, 84]. Dabei zeigen Kinase Assays allerdings eine 100-fach höhere Selektivität von Crenolanib gegenüber WT-*FLT3* als WT-*KIT* [76]. Dennoch scheint eine gezielte *KIT*-Inhibition durch Crenolanib mittels klinisch erreichbarer Dosen möglich und bedarf einer genaueren Untersuchung.

Abbildung 1.4

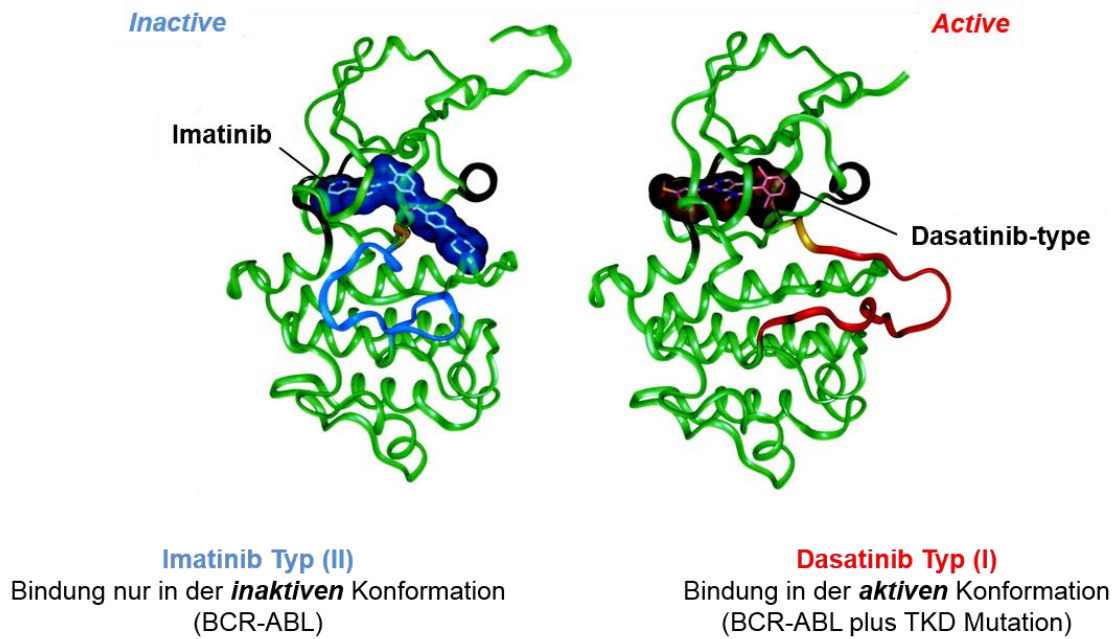


Abbildung 1.4 Schematische Darstellung der Wirkungsweise von Typ-I -und Typ-II-Tyrosinkinase-Inhibitoren am Beispiel der ABL-Kinase.

Quelle: Nagar, B., et al., *Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571)*. Cancer Res, 2002 [85]

1.6 Cladribin

Das Zytostatikum Cladribin (2-Chloro-2'-deoxyadenosine, 2-CdA) ist ein Nukleosidanalogen, dessen aktivierte Form durch DNA-Interkalation die DNA-Synthese und –Reparatur hemmt. Cladribin ist zur Therapie der akuten Haarzelleukämie zugelassen [86], wird aber in Kombination mit Standardpräparaten wie Ara-C auch zur Therapie refraktärer oder rezidivierender Akuter Myeloischer Leukämien verwendet [87, 88]. Cladribin senkt außerdem die Mastzell-Last bei Patienten mit Systemischer Mastozytose und wird deshalb auch hier als first-line Therapie oder in Kombination mit anderen Präparaten eingesetzt [37, 89-93].

1.7 Ziel der Arbeit

Systemische Mastozytosen und CBF AML sind zu einem großen Anteil mit *KIT*-Mutationen assoziiert, die bei AML meist mit schweren Krankheitsverläufen einhergehen. Die Therapieoptionen sind bislang nicht zufriedenstellend, so dass die *KIT*-Inhibition hier einen neuen therapeutischen Ansatzpunkt auf molekularer Ebene liefert.

Ziel dieser Arbeit ist es, die gezielte Wirkung des potenten *FLT3*-Inhibitors Crenolanib gegenüber mutierten *KIT*-Isoformen an verschiedenen Mastzell- und Leukämiezelllinien mit autoaktivierenden *KIT*-Mutationen, sowie an nativen *ex vivo* Blasten von Patienten mit Systemischer Mastozytose oder *KIT* positiver AML zu untersuchen. Hierzu wurden Apoptosemessungen und Proliferationsanalysen durchgeführt. Mittels Western Blot wurde außerdem der spezifische Effekt von Crenolanib hinsichtlich *KIT*-Inhibierung auf Proteinebene untersucht.

Darüber hinaus wurde die proapoptotische und die antiproliferative Wirksamkeit einer Kombinationstherapie aus Crenolanib und dem bereits standardmäßig für die Therapie Systemischer Mastozytosen eingesetzten Cladribin getestet. Es wurden hierfür sowohl die Mastzelllinien als auch native Mastozytose-Zellen mit Kombinationen dieser beiden Substanzen behandelt.

Crenolanib wird momentan in mehreren klinischen Studien als targeted therapy gegen andere mutierte Klasse-III-RTK (*FLT3*, *PDGFR*) eingesetzt und erwies

sich als sichere und gut verträgliche Substanz [79, 80]. Die Überprüfung der Wirksamkeit von Crenolanib gegenüber KIT-Isoformen *in vitro* und *ex vivo* in der hier vorliegenden Arbeit bildet die präklinische Grundlage zur klinischen Erprobung dieses TKI in oben genannten Entitäten.

2 Material

2.1 Zelllinien

Zelllinie	Bezug
p815, EOL-1, Ba/F3	American Type Culture Collection (Manassas, VA)
HMC1.2	Dr. Akin (Laboratory of Allergic Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH, Bethesda, MD)
K562	Prof. Dr. CD Lopez, MD, PhD, Oregon Health and Science University, Portland
MOLM14	Fujisaki Cell Center (Okayama, Japan)
HL60	German Collection of Microorganisms & Cell Cultures (DSMZ)
Jurkats	CLS (Cell lines service)

Tabelle 2.1 Zelllinien

p815: Die p815 Zelllinie wurden aus dem Mastzelltumor einer DBA/2-Maus gewonnen [94]. Sie exprimiert eine *Kit* D814Y Mutation, die der humanen *KIT* D816Y Mutation entspricht [95].

HMC1.2: Die humane Mastzelllinie HMC1.2 ist ein spontan aufgetretener Subklon der Schwesternzelllinie HMC1.1. Die HMC1.2-Zellen exprimieren zusätzlich zur *KIT* V560G Mutation eine weitere Mutation in der Aktivierungsschleife, die *KIT* D816V Mutation [96].

EOL-1: Die humane *FIP1L1-PDGFR*A positive Zelllinie EOL-1 wurde 1984 aus dem peripheren Blut eines Patienten mit Akuter Myeloischer Eosinophilenleukämie gewonnen [97, 98].

MOLM14: Die humane Zelllinie MOLM14 wurde aus dem peripheren Blut eines Patienten mit aus einem MDS entstandener sekundärer Akuter Myeloischer Leukämie (FAB-Subtyp M5a) gewonnen [99]. Die Zelllinie MOLM14 exprimiert eine heterozygote *FLT3* ITD Mutation [100].

Ba/F3: Die IL-3 abhängige pro B-Zelllinie Ba/F3 stammt von einer C3H-Maus [101] und wurde zur Erstellung des isogenen Ba/F3-Modells verwendet.

HL60, Jurkat, K562:

Die Zelllinie **HL60** wurde von einer Patientin mit Akuter Myeloischer Leukämie (FAB-Subtyp M2) gewonnen [102].

Die Zelllinie **Jurkat** stammt von einem 14-jährigen Patienten mit ALL [103].

Die **K562**-Zelllinie wurde aus dem Pleuraerguss einer Patientin mit CML in der Blastenkrise gewonnen [104]. Die Zellen tragen das *BCR/ABL-1* Fusionsgen [105].

Die Zelllinien HL60, Jurkat und K562 besitzen keine aktivierte Klasse-III-RTK [82].

2.2 Geräte

Gerät	Hersteller
Sterile Werkbank Hera Safe	Heraeus Instruments
Brutschrank HERAcell	Heraeus Instruments
Zentrifugen - Varifuge 3.0 ORS - Centrifuge 5415R	Heraeus Instruments Eppendorf
Kühlschrank 4°C	Liebherr
Gefrierschrank - 20°C - 86°C	- Liebherr - Sanyo
Eismaschine	Scotsman
Beheizbares Wasserbad	Köttermann
Vortexer - Reax top - Vortex Genie 2	- Heidolph - Scientific industries
Pipettboy acu	IBS Integra Biosciences

Pipetten - Research Plus Einkanalpipette 10 µl, 200µl, 1000 µl - 8-Kanalpipette 300 µl - Multipipette 1µl-10ml	Eppendorf
Schüttler	GFL
Mikroskop Wilovert S	Will
Neubauer Zählkammer	Assistent Germany
Deckglas 22 x 22 mm	Menzel
Absaugsystem Vacusafe	Integra

Tabelle 2.2 Geräte

2.3 Allgemeine Verbrauchsmaterialien, Glas –und Plastikmaterial

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Sterile Pipettenspitzen (10µl, 20 µl, 200µl, 1000µl)	Eppendorf
Combitips Advanced (0,5 ml, 2,5 ml, 5 ml)	Eppendorf
Glaspipettenspitzen steril (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Falcon – Corning
Pasteurpipette für Absaugsystem	WU Mainz
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Falcon – Corning
Zellkulturflaschen belüftet (250ml)	Falcon – Corning
Safe Lock Tubes (0,5 ml, 1,5 ml)	Eppendorf
Einfrier Röhrchen CryoTube Vials, steril, 1,8 ml	Thermo scientific
Handschuhe nitril	Kimberly-Clark
Einfrierbox Cool Cell	biocision
Multiwellplatten (6 Well, 96 Well)	Falcon-Corning
FACS-Röhrchen Rundboden 5 ml	Falcon-Corning

Tabelle 2.3 Allgemeine Verbrauchsmaterialien, Glas –und Plastikmaterial

2.4 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
<u>Kulturmedium für Zelllinien</u> 90% RPMI 1640 Glutamax + 10% Fetales bovines Serum (FBS) + 1% Natriumpyruvat 100mM + 1% Penicillin (10.000U/ml) / Streptomycin (10.000µg/ml) + 1% MEM NEAA	Gibco - Gibco - Gibco - Biochrom - Gibco
<u>Kulturmedium für Patientenmaterial</u> 80% DMEM + 20% Fetales bovines Serum (FBS) + 1% Natriumpyruvat 100mM + 1% Penicillin (10.000U/ml) / Streptomycin (10.000µg/ml) + 1% MEM NEAA	Biochrom
Dulbecco's Phosphate buffered saline (DPBS) - 1x - 10x	- Sigma - Biochrom
<u>Freezing Medium</u> 50% RPMI 1640 Glutamax (für Zelllinien) oder 50% DMEM (für Patientenmaterial) + 40% FBS + 10% DMSO	- Sigma
Trypsin-EDTA (0,05%/0,02%)	Biochrom

Tabelle 2.4 Chemikalien

2.5 Material für die Isolierung mononukleärer Zellen

Materialien	Hersteller
Peripheres Vollblut oder Knochenmark	Patientenmaterial
Biocoll Separating Solution	Biochrom
Dulbeccos' Phosphate buffered saline (DPBS) 1x	Sigma

Tabelle 2.5 Material für die Isolierung mononukleärer Zellen

2.6 Material für die Durchflusszytometrie

Materialien	Hersteller
FACS Calibur <ul style="list-style-type: none"> - angeschlossene Hardware - Auswertungsprogramm Cell QuestPro 	Becton Dickinson <ul style="list-style-type: none"> - Apple - BD
10x Annexin V Binding Buffer	BD Biosciences
PI (propidium iodide)	Life Technologies
FITC Annexin V	BD Biosciences
FIX-A (Fix and Perm)	dianova
Monoklonale Antikörper <ul style="list-style-type: none"> - Anti-Human Control γ1FITC/γ1PE (X40, X40) - FITC Mouse Anti-Human CD25 (Clone 2A3) - FITC Mouse Anti-Human CD45 (CloneHI30) 	<ul style="list-style-type: none"> - BD #349526 - BD #555431 - BD #555482
Ethanol (70%-ig)	Merck
FACS-Flow	BD Biosciences

Tabelle 2.6: Material für die Durchflusszytometrie/Zellzyklusanalyse

2.7 Material für die Proliferationsanalysen

Materialien	Hersteller
XTT Sodium Salt	AppliChem
Phenazine methosulfate (ECR)	Sigma
Neubauer Zählkammer	Assistant Germany
Lichtmikroskop Wilovert S	Will
Deckglas 22mm x 22mm	Menzel
Microplate Reader MR 7000	DyanTech
Software XTT	BioLinx (Dinatech Laboratories)

Tabelle 2.7: Material für die Proliferationsanalysen

2.8 Material für Western Blots

2.8.1 Geräte

Geräte	Hersteller
Fluorescence Absorbance Microplate Reader	BioTek Instruments
PowerPac Basic	BioRad
Criterion Western-Kammer	BioRad
Criterion Blotter (Blotting-Kammer)	BioRad
Magnetrührer mit Heizung	Phoenix instruments
Licor Odyssey	Li-Cor

Tabelle 2.8: Geräte für den Westen Blot

2.8.2 Reagenzien und Laborartikel

<u>Lysepuffer (für 10 Lysate)</u>		
- Ripa Buffer	943μl	Sigma
- PP1	10μl	Sigma
- Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	10μl	Sigma
- NaF (0,5M)	10μl	Uni-Apotheke
- NaVo (0,2M)	5μl	Sigma
- Pefabloc SC	1μl	Roche
- Pepstatin	1μl	Roche
- Leupeptin	1μl	Roche
- Aprotinin	1μl	Roche
- Protease Inhibitor Cocktail for use	10μl	Sigma
- Glycerophosphat	50μl	Uni-Apotheke
Bio-Rad Protein Assay		BioRad
XT Sample Buffer 4x		BioRad
XT Reducing Agent		BioRad
XT MOPS (Running Buffer)		BioRad
<u>Transferpuffer (für 1 Liter)</u>		
- Glycin	14,4g	BioFroxx
- Trizma base 99,9%	3g	Sigma
- Methanol	200ml	VWR Chemicals
- Aqua dest	800ml	
Criterion XT Precast 10%-Tris-Acetate-Gel		BioRad
Criterion Filterpapier		BioRad
Nitrozellulose Blotting-Membran 0,2 μ m		GE Healthcare
Albumin Fraktion V		Roth
Akt Control Cell Extracts		Cell Signaling # 9273

Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
Stripping Buffer	Thermo Scientific

Tabelle 2.9 Reagenzien und Laborartikel für den Western Blot

2.8.3 Antikörper

<p>Primärantikörper</p> <ul style="list-style-type: none"> - Phospho-c-KIT (Tyr 719) Antibody - c-KIT (D13A2) Antibody - Phospho - p44/42-MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) Antibody - p44/42 MAPK (Erk1/2) Antibody - Phospho-Akt (Ser473) Antibody - Akt Antibody - Phospho-Stat5 (Tyr694) Antibody - Stat5 Antibody - Tubulin 	<p>Cell signaling</p> <p># 3391</p> <p># 3074</p> <p># 9101</p> <p># 9102</p> <p># 9271</p> <p># 9272</p> <p># 9351</p> <p># 9352</p> <p># 3873</p>
<p>Sekundärantikörper</p> <ul style="list-style-type: none"> - Goat anti-rabbit 800 - Goat anti-mouse 680 	<p>LiCor</p> <p>LiCor</p>

Tabelle 2.10 Antikörper für den Western Blot

2.9 Substanzen

Substanz	Firma
Crenolanib - 10mM/l Stocklösung (gelöst in DMSO)	AROG Pharmaceuticals
Cladribin - 10mM/l Stocklösung (gelöst in DMSO)	Klinikapotheke
Dasatinib - 10mM/l Stocklösung (gelöst in DMSO)	Bristol-Myers Squibb

Tabelle 2.11: Substanzen

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Alle Zelllinien wurden in 10 – 15ml RPMI Medium (Stammlösung A) in Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator kultiviert und jeweils nach 48h unter sterilen Bedingungen passagiert. Das Medium der parentalen IL-3 abhängigen Ba/F3 Zellen (Ausgangszellen des isogenen Ba/F3 Zellmodells) wurde zusätzlich mit 1µl/ml IL3 substituiert. Bei den Ba/F3 FLT3 wt Zellen wurde das Medium mit 1µl/10ml FLT3-Ligand und bei den Ba/F3 KIT wt mit 1µl/10ml SCF supplementiert.

3.1.1 Passagieren der Zellen

Nicht-adhärenente Zellen wie die EOL-1, MOLM14, Jurkat, K562 und HL60 wurden in Suspensionskultur gehalten und abhängig von der jeweiligen Teilungsrate/ Zelldichte ca. alle 48h gesplittet, mit frischem Kulturmedium versorgt und in eine neue Kulturflasche überführt.

Zum Passagieren der semi-adhärenenten Zellen wie der p815, HMC1.1, HMC1.2 und der Zellen des isogenen Ba/F3 Modells wurden zusätzlich die am Kulturflaschenboden adhärenenten Zellen mit 2ml Trypsin-EDTA gelöst und zusammen mit dem Überstand weiter versorgt.

3.1.2 Zellzählung

Die Zellzahl pro ml Zellsuspension wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dabei wurden je 10µl der Zellsuspension auf die Zählkammer gegeben. Die Zellzahl pro ml ergibt sich aus dem Durchschnittswert von vier repräsentativen Auszählfelder auf der Kammer multipliziert mit dem Volumenfaktor 10⁴.

$$n = \frac{x}{4} \times 10^4$$

n = Zellen pro ml, x = Zellzahl in 4 repräsentativen Auszählfeldern

3.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen für die Zellkultur:

Zum Einfrieren wurden die Zellen in Einfriermedium (freezing-RMPI für Zelllinien, freezing-DMEM für Patientenmaterial) resuspendiert und in verschließbaren Kryoröhrchen bei -80°C eingefroren. Für ein schrittweises Abkühlen der Zellen wurden die Kryos zunächst für 24h in einer Cool Cell Einfrierbox aufbewahrt.

Die Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und zunächst einmal mit Kulturmedium gewaschen, um das im flüssigen Zustand zytotoxische DMSO aus dem Einfriermedium auszuwaschen. Im Anschluss wurden die Zellen in 10ml frischem Kulturmedium resuspendiert und in eine Kulturflasche überführt.

3.2 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut oder Knochenmark

Die Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut oder Knochenmark mittels Dichtegradientenzentrifugation und der Biocoll-Separationslösung beruht auf der unterschiedlichen Dichte der verschiedenen Blut- bzw. Knochenmarkzellen. Während Erythrozyten und Granulozyten eine höhere Dichte haben als die Biocoll-Separationslösung mit einer Dichte von 1,077g/ml, sind Thrombozyten, Lymphozyten und Monozyten deutlich weniger dicht als die Separationslösung. Auf Grund dessen setzen sich bei der Zentrifugation die Granulozyten und Erythrozyten am Boden des Röhrchens ab. Oberhalb von diesem Zellpellet folgt die Biocoll-Schicht. Die mononukleären Zellen reichern sich in der Interphase zwischen der Biocoll-Schicht und der obersten Schicht aus Plasma, welche auch die Thrombozyten enthält, an [106] [107].

Zur Isolierung der mononukleären Zellen wurde das heparinisierte Vollblut oder Knochenmark zu gleichen Teilen mit Dulbecco's Phosphate buffered saline (DPBS 1x) verdünnt. Im nächsten Schritt wurden 15ml der Biocoll-Separationslösung vorsichtig mit der Zellsuspension überschichtet und für 20 Minuten bei 750rpm (2000g) ohne Bremse zentrifugiert. Der entstandene Überstand aus Plasma und Thrombozyten wurde bis zur Interphase von oben vorsichtig abgesaugt und verworfen. Die mononukleären Zellen in der Interphase zwischen der Biocoll-Separationslösung unten und dem restlichen Plasma oben

wurden vollständig mit einer Pipette aufgenommen und in ein 50ml-Röhrchen überführt. Nachfolgend wurden die mononukleären Zellen abhängig vom Grad der Verunreinigung durch Erythrozytenreste zwei - bis dreimal mit 50ml PBS gewaschen und für je 8 Minuten bei 1200rpm zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend entweder in DMEM-Kulturmedium resuspendiert und direkt in Kulturplatten weiter behandelt oder bei -80°C eingefroren. Die Isolierung erfolgte unter sterilen Bedingungen.

3.3 Apoptoseinduktion von Zelllinien und nativen Zellen

3.3.1 Crenolanib-Verdünnungsreihen

Um die proapoptotische Wirksamkeit von Crenolanib zu bestimmen, wurde für Mastozytose-Zelllinien und Leukämie-Zelllinien mit autoaktiverter KIT oder FLT3 Mutation, sowie für native Zellen von Patienten mit Systemischer Mastozytose oder *KIT* positiver Leukämie eine Crenolanib-Verdünnungsreihe von 0-1000nM erstellt. Als Kontrolle dienten die Crenolanib-Verdünnungsreihen, die für die Zelllinien ohne autoaktivierte KIT oder FLT3 Mutation ebenfalls erstellt wurden.

Die 10µM Crenolanib-Arbeitslösung wurde direkt vor Versuchsbeginn durch Verdünnung der Stocklösung im Verhältnis 1:1000 mit Kulturmedium (RPMI für Zellkulturen, DMEM für Patientenmaterial) hergestellt.

Die Behandlung der Zellen erfolgte in 6-Well-Platten, wobei in jedes Well 2000µl Volumen, bestehend aus Zellsuspension, Kulturmedium und Arbeitslösung, gegeben wurden.

Um die bestmögliche Vitalität der Zellen während der Inkubationszeit zu gewährleisten, erwiesen sich je nach Teilungsrate 3×10^4 - 5×10^4 Zellen pro Well für Zelllinien und 10^5 Zellen pro Well für Patientenzellen als optimal. Die Zellen wurden dann zusammen mit der entsprechenden Konzentration der Substanz in einem finalen Volumen von 2000µl Medium in den Kulturplatten angesetzt und bei 37°C und 5%CO₂ im Brutschrank für 48h inkubiert. Für jede Verdünnungsreihe wurde darüber hinaus eine unbehandelte Probe als Referenz mitgeführt. Ebenso wurde eine Lösungsmittelkontrolle mit reinem DMSO durchgeführt.

3.3.2 Kombinationsbehandlung mit Crenolanib und Cladribin

Die Cladribin-Arbeitslösung wurde aus einer 10mM – Stocklösung und Kulturmedium hergestellt (Verhältnis 1:1000).

Wie unter Punkt 3.3.1 beschrieben wurden die ausgezählten Zellen in 6-Well-Platten überführt und zu definierten Zeitpunkten (*siehe Tabelle 3.1*) mit Crenolanib und/oder Cladribin behandelt. Es wurden drei Versuchsansätze durchgeführt, die sowohl die gleichzeitige als auch zeitversetzte Behandlung der Zellen mit beiden Substanzen beinhalteten (Daten der gleichzeitigen Behandlung nicht gezeigt, da die zeitversetzten Versuche aussagekräftiger waren). Für die zeitversetzten Versuche wurde zunächst jeweils einer der beiden Wirkstoffe für 24h inkubiert, bevor der zweite Wirkstoff für weitere 24h hinzugegeben wurde.

Versuchsansatz	0-24h	24-48h
(a)	Cb	Cb + 2-CdA
(b)	2-CdA	Cb + 2-CdA
(c)	Cb + 2-CdA	Cb + 2-CdA

Tabelle 3.1 Inkubationsprotokoll für die Kombinationsbehandlung mit Crenolanib und Cladribin

3.3.3 Plasmainhibitionstest mit Crenolanib

Um zu testen, ob die *in vitro* erzielten Crenolanib-Dosen auch *in vivo* ausreichend sind, um *KIT* D816V Zellen in Apoptose zu bringen, wurde ein wie von Lewis et al [108] beschriebener modifizierter Plasmainhibitionstest durchgeführt. Die als Referenzzelllinien verwendeten Ba/F3 *KIT* D816V und HMC1.2 wurden dabei im Serum eines gesunden Spenders kultiviert und in 6-Well-Platten bei 37°C und 5% CO₂ für 48h mit Crenolanib (0nM, 100nM, 250nM, 500nM, 1000nM) behandelt (*siehe Punkt 3.3.1*). Die erreichten Apoptoseraten wurden durchflusszytometrisch mittels Annexin V/PI – Färbung detektiert (*siehe Punkt 3.4*).

3.4 Durchflusszytometrie:

Die wie unter Punkt 3.3 beschrieben behandelten Zellen wurden nach Ablauf der Inkubationszeit am FACS-Calibur Durchflusszytometer gemessen.

Um Zellen durchflusszytometrisch analysieren zu können, müssen diese in einer Einzelzellsuspension vorliegen. Die Zellsuspension wird beim Messvorgang zunächst beschleunigt. Durch einen Hüllstrom wird der Probenstrahl hydrodynamisch fokussiert, so dass die Zellen einzeln nacheinander den Messpunkt passieren, auf welchen ein Argonlaserstrahl mit einer Wellenlänge von 488nm gerichtet ist. Je nach physikalischen Eigenschaften (Größe und Granularität) der passierenden Zelle und je nach spezifischer Fluoreszenz eines zuvor an Oberflächenmarker oder intrazelluläre Bestandteile der Zelle gebundenen Antikörpers, wird das Licht charakteristisch gestreut. Das in einem engen Winkel zum Laserlicht abgelenkte Vorwärtsstreulicht (FSC) spiegelt unscharf die Zellgröße wider. Das durch die Zelle im 90°-Winkel zum Laserstrahl seitwärts gestreute Licht (SSC) ist annähernd proportional zur Granularität der Zelle. Hierdurch können beispielsweise große, wenig granulierte lebende Zellen von toten Zellen mit physikalisch gegensätzlichen Eigenschaften (klein, stark granuliert) unterschieden werden. Fluoreszenzen, die von mit fluoreszierenden Antikörpern beladenen Zellen ausgehen, werden ebenfalls im 90°-Winkel abgelenkt und je nach Wellenlänge vom Photodetektor FL1-FL3 erfasst. Dabei erkennt FL1 grünes (Wellenlänge: 520nm), FL2 oranges (Wellenlänge: 580nm) und FL3 rotes Licht (Wellenlänge: 670nm). Die Fluorochrome absorbieren zunächst kurzzeitig die Energie des Argonlaserslichts (Wellenlänge 488nm) am Messpunkt, werden dadurch angeregt und emittieren das Licht dann mit einer höheren Wellenlänge. Die Fluoreszenzfarben können mit Hilfe eines Filtersystems unterschieden werden. Die detektierten Lichtsignale werden dann in elektrische Signale umgewandelt, durch den Computer quantitativ ausgewertet und mit Hilfe der Software Cell Quest Pro in Dot-Plots und Histogrammen dargestellt. Hierbei werden FSC und SSC linear und FL1-FL3 logarithmisch erfasst [109] [110].

Abbildung 3.1

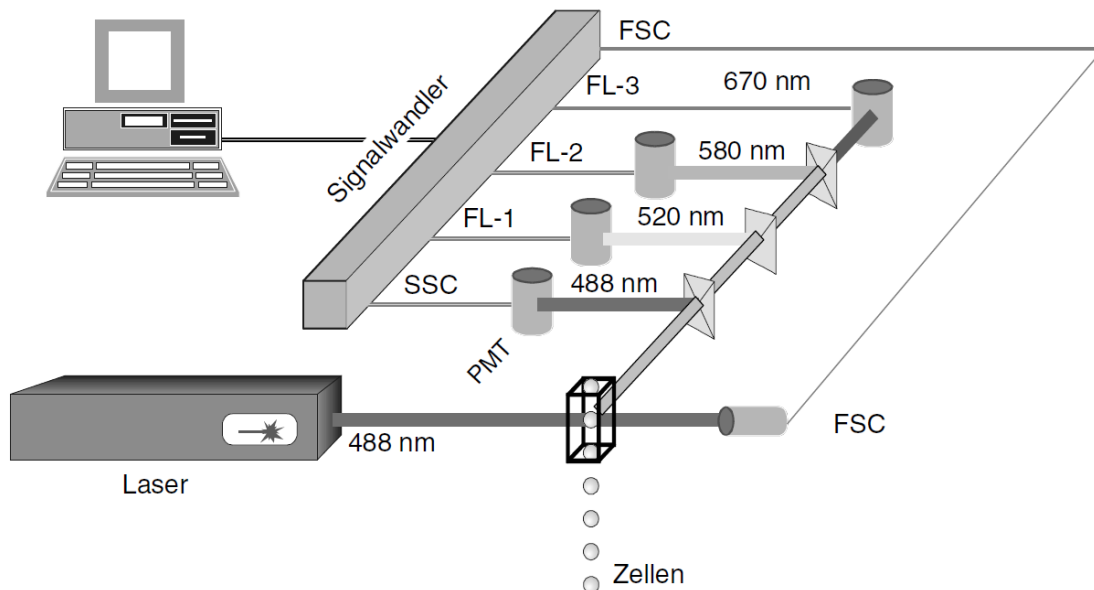


Abbildung 3.1 Genereller Aufbau eines Durchflusszytometers [109].

3.4.1 Apoptosenachweis am Durchflusszytometer mittels Annexin V/PI-Färbung

Um die Apoptoseraten von Zelllinien unter Behandlung mit zytotoxischen Substanzen zu detektieren, wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkiertem (FITC) Annexin-V und Propidiumiodid (PI) angefärbt und später per Durchflusszytometrie am FACS-Calibur quantifiziert.

Phosphatidylserin (PS) ist ein Phospholipid, das sich in der inneren Lipidschicht der Plasmamembran befindet. In der frühen Phase der Apoptose transloziert PS von der Membraninnenseite zur Membranaußenseite, so dass es an der Zelloberfläche exprimiert wird und der FITC gelabelte Farbstoff Annexin V, ein Phospholipid-Bindungsprotein mit hoher Affinität gegenüber PS, Ca^{2+} -abhängig daran binden kann [111].

Propidiumiodid (PI) ist ein DNA-Farbstoff, der die DNA einer Zelle nur dann anfärben kann, wenn er die Zellmembran passieren kann. Da die Zellmembran vitaler Zellen jedoch undurchlässig ist und erst in der späten Phase der Apoptose für PI durchlässig wird, dient die PI-Färbung der Detektion spätapoptotischer Zellen.

Mit der Annexin V/PI-Färbemethode können somit vitale Zellen (FITC-/PI-), frühapoptotische Zellen (FITC+/PI-) und spätapoptotische Zellen (FITC+/PI+) detektiert werden [112].

Die wie unter Punkt 3.3 beschrieben behandelten Zellen wurden nach Ablauf der Inkubationszeit mit der Annexin-V/PI-Lösung (100µl 1xBinding Buffer (10x Binding Buffer, 1:10 verdünnt mit aqua dest), 5µl PI und 2µl Annexin-V pro Probe) angefärbt und für 30min unter Lichtabschluss auf Eis inkubiert. Nach Zugabe des hergestellten 1xBinding Buffers (300µl pro Probe) wurden die erzielten Apoptoseraten anschließend mit Hilfe des Durchflusszytometers FACSCalibur (Becton Dickinson) und der Analysesoftware CellQuest Pro (BD Biosciences) erfasst [113].

Die Feineinstellungen der Templates für eine Versuchsreihe erfolgten über die Regulation der Kanalverstärker FSC (x-Achse) und SSC (y-Achse), sowie der Kanäle FL1 und FL3. Im Fluoreszenz-Dot-Plot erfasst die x-Achse die Fluoreszenz des FITC-markierten Annexins im FL1-Kanal, die y-Achse erfasst die Fluoreszenz von PI im FL3-Kanal. Die Einstellungen wurden so gewählt, dass alle zu messenden Zellen im FSC/SSC-Plot erfasst wurden. Die Verstärkerspannungen für die Kanäle FL1 und FL3 wurden so gewählt, dass die Zellen der unbehandelten Kontrollprobe in beiden Kanälen bei 10^1 auf der Fluoreszenzskala im Histogramm dargestellt wurden. Die Einstellung erfolgte immer für die unbehandelte Probe einer Versuchsreihe und wurde im Verlauf der Messungen nicht mehr verändert. Es wurden pro Probe 30 000 Zellen mit einer Messrate von 100-500 Events pro Sekunde (abhängig von der Dichte der Zellsuspension) gemessen.

3.4.2 Direkte Immunfluoreszenzfärbung von nativen Zellen

Mononukleäre Zellen von Patienten mit einer *KIT*-assoziierten Core binding factor AML oder einer Systemischen Mastozytose wurden wie unter Punkt 3.2 und 3.3 beschrieben isoliert und behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen fixiert (100µl FIX A-Reagenz pro Probe) und je nach Versuchsaufbau mit einem Primärantikörper gefärbt. Die Inkubationszeit betrug

1,5h unter Lichtabschluss bei 4°C im Kühlschrank. Alle AML-Proben wurden mit dem gelabelten Panleukozytenmarker CD45 (PE) gefärbt, alle Mastozytose-Proben mit dem gelabelten CD25 (FITC) Primärantikörper. Für jede Versuchsreihe wurde neben einer CD45- bzw. CD25- gefärbten unbehandelten Probe eine unbehandelte IgG-Kontrolle mitgeführt. Nach Ablauf der Inkubationszeit konnten die Proben am FACSCalibur mit der Software CellQuest Pro (BD Biosciences) gemessen werden.

Im Fluoreszenz-Dot-Plot erfasst die x-Achse die Fluoreszenz der von FL1 detektierten FITC-markierten Antikörper CD25 oder CD45. Die Verstärkerspannung für den Kanal FL1 wurde so gewählt, dass die Zellen der unbehandelten IgG-Kontrollprobe bei 10^1 auf der Fluoreszenzskala im Histogramm dargestellt wurden. Die Einstellung erfolgte immer für die unbehandelte IgG-Probe einer Versuchsreihe und wurde im Verlauf der Messungen nicht mehr verändert. Durch einen Rechtsshift im Fluoreszenz-Histogramm der mit dem FITC- Antikörper gefärbten Zellen (CD25 oder CD45) im Kanal FL1 gegenüber der IgG-gefärbten Kontrollprobe, konnte die korrekte Färbung der behandelten Zellen nachgewiesen werden.

3.5 Proliferationsanalysen (XTT-Proliferationsassay)

2,3 – bis (2 – methoxy – 4 – nitro – 5 – sulfophenyl) – 5 - [(phenylamino)carbonyl] - 2H - tetrazolium hydroxide (XTT) wird vom Metabolismus vitaler Zellen zu einem wasserlöslichen Formazan-Produkt reduziert. Die Zugabe von PMS (Phenazine methosulfate) steigert die Reduktion des XTT-Reagenz durch vitale Zellen. Während der Redox-Indikator im oxidierten Zustand (Tetrazolium) farblos vorliegt, ist er im reduzierten Zustand (Formazan) rot [114] [115]. Gibt man also die XTT-Lösung zu einer Zellsuspension, ist nach Ablauf der Reduktionsreaktion eine direkte Messung der Absorption möglich, die auf die Vitalität und somit auf die Proliferationsrate und Substanzsensitivität der Zellen rückschließen lässt.

Pro Probe wurden 50 000 Zellen in 2ml Kulturmedium (abzüglich des Volumens der Zellsuspension und der Arbeitslösung) unter sterilen Bedingungen mit Crenolanib behandelt. Anschließend wurden aus jeder Probe in eine 96-Well-

Platte 600µl in 6 Wells à 100µl gegeben. Als Referenz wurde zudem für jede Platte eine Reihe (6-Wells à 100µl) Kulturmedium pipettiert. Die Zellen wurden für 48h bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der XTT-Lösung, bestehend aus 50µl XTT-Sodium Salt und 1µl ECR (Phenazine methosulfate), zu jeder Probe. Nach Ablauf der 5-stündigen Inkubationszeit im Brutschrank wurde im nächsten Schritt die Absorption der Proben an einem Spektrophotometer (Microplate Reader MR 7000) mit der Software Biolinx mit einer Wellenlängen von 490nm gemessen. Zum Ausschluss unspezifischer Absorption wurden die Proben mit einer weiteren Wellenlänge (630nm) gemessen. Der von Biolinx berechnete Wert entspricht der Absorption bei 490nm abzüglich der Absorption bei 630nm. Die Messwerte wurden zudem in Bezug zu den Leerproben (Kulturmedium) gesetzt.

3.6 Western Blots

3.6.1 Vorbereitung der Zelllinien

Zunächst wurden die Zelllinien beim Splitten von einer Kulturflasche auf sechs Kulturflaschen expandiert und 48h im Inkubator weiter kultiviert, so dass die Zellen bei Versuchsbeginn eine optimale Vitalität und ein exponentielles Wachstum aufwiesen. Im nächsten Schritt wurde in jede Kulturflasche (10ml) die entsprechende Konzentration Crenolanib oder Dasatinib zugegeben. Die Inkubation bei 37°C im Brutschrank dauerte 90min. Außerdem wurde für jede Zelllinie eine unbehandelte Probe zum späteren Vergleich gegenüber den behandelten Proben mitgeführt.

3.6.2 Lysieren der Zellen

Nach Ablauf der 90-minütigen Inkubationszeit wurden die Zellen zentrifugiert, die Zellpellets anschließend je nach Größe in 70-100µl Lysepuffer (Herstellung siehe Tabelle 2.3: Chemikalien) resuspendiert und für 15min auf Eis lysiert. Zur Gewinnung der Proteinextrakte wurden die lysierten Zellen für 15min mit 13200rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand (Lysat) wurde für das weitere Vorgehen verwendet.

3.6.3 Proteinbestimmung (Bradford-Assay)

Zur photometrischen, quantitativen Proteinbestimmung mittels Bradford-Assay wurde in eine 96-Well-Platte zunächst 1µl eines Lysats zu 50µl aqua dest und 150µl Bradford-Reagenz pro Well (hergestellt aus aqua dest + Bio-Rad-Assay im Verhältnis 3:1) gegeben. Für jede Probe wurde ein Triplet pipettiert, um später einen Mittelwert der Proteinkonzentration zu erhalten. Außerdem wurde eine BSA-Standardverdünnungsreihe (Standardlösung: aqua dest + BSA im Verhältnis 9:1) als Referenz auf dieselbe Platte pipettiert.

Das Absorptionsmaximum des im Bradford-Reagenz enthaltenen Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 verschiebt sich von 465nm zu 595nm, wenn der Farbstoff an Proteine bindet. Da sich die Absorption linear zur Proteinkonzentration verändert, kann der Proteingehalt eines Lysats mit dem Bradford-Reagenz quantifiziert werden [116].

Die Platte wurde bei Raumtemperatur 10-20min inkubiert. Im nächsten Schritt wurde mit einem Spektralphotometer (Fluorescence Absorbance Microplate Reader) die Absorption der Proben bei 595nm bestimmt und die Proteinkonzentration einer Probe in µg/µl durch die Software KC4 anhand der gemessenen Werte und der BSA-Eichgeraden berechnet.

3.6.4 Vorbereitung der Proben für die SDS-Page (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese):

Um die Expression bestimmter Targetproteine später differentiell analysieren zu können, muss die bei der SDS-Page beladene Gesamtproteinmenge in allen Ausgangsproben gleich sein (Zielkonzentration: 100µg). Da jede Geltasche mit 35µl Volumen befüllt werden soll, wurde das für die Gesamtproteinmenge benötigte Volumen eines Proteinlysats berechnet, mit 10µl der Reagenzlösung aus XT-Reducing Agent und XT-Sample-Buffer 4x im Verhältnis 1:5 vermischt und mit aqua dest auf 35µl Volumen aufgefüllt.

Der XT-Sample-Buffer enthält SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), das zur Denaturierung der Proteine und deren Untereinheiten führt [117]. Durch die

stöchiometrische Anlagerung des anionischen Detergens SDS an die Aminosäuren der Polypeptidketten erhält man zusätzlich eine negative Gesamtladung des Proteins, die proportional zu dessen molekularer Masse ist [118]. XT-Reducing-Agent enthält das zur Reduktion von inter- und intramolekularen Disulfidbrücken benötigte TCEP.

Im nächsten Schritt wurden die Proben im Heizblock bei 95°C für 5min vollständig denaturiert.

3.6.5 SDS-Page:

Zur Vorbereitung der Gelelektrophorese wurde das vorgefertigte 10%-Tris-Acetate-Gel in das Elektrophoresegerät eingeführt, welches zuvor mit Running-Buffer (hergestellt aus aqua dest und MOPS-Buffer im Verhältnis 19:1) befüllt wurde. Neben 10µl eines Proteingrößenmarkers, welcher aus 9 Proteinen von bekannter Größe zwischen 10 und 250kDa [119] besteht und somit als Referenz diente, sowie je 10µl einer Positiv- und Negativkontrolle für AKT, wurden je 35µl eines denaturierten Proteinlysats in die Geltaschen pipettiert. Im nächsten Schritt wurde an die Gelelektrophoresekammern über ein Netzgerät für 40-60 Minuten eine elektrische Spannung von 200V angelegt und die negativ geladenen, denaturierten Proteine wanderten im Gel in Richtung Anode. Durch das Siebprinzip des Polyacrylamid-Gels wurden die Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt. Kleine, weniger negativ geladene Proteine wurden weniger im Gel zurückgehalten als große, stärker negativ geladene Proteine.

3.6.6 Detektion der Proteine:

Um die aufgetrennten Proteine von dem Elektrophoresegel auf die Nitrocellulose-Blottingmembran zu transferieren, wurde das Gel zunächst gemeinsam mit der Blottingmembran in einer mit Transferpuffer befüllten Transferkassette für 30min bei 100V auf einem Magnetrührer geblottet. Nach dem während dem Blotten erfolgten Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran, wurde die Membran im nächsten Schritt für eine Stunde in BSA-Blockpuffer auf einer Wippe inkubiert, um freie Bindungsstellen auf der Membran zu besetzen, an die der Primärantikörper später unspezifisch binden könnte. Der Blockpuffer wurde

durch einmaliges Waschen der Membran mit Tween-Waschpuffer (aqua dest + 10x PBS im Verhältnis 9:1 mit einem Zusatz von 2,5 ml Tween pro Liter) entfernt und die Membran über Nacht bei 4°C im Dunkeln auf einem Wipptisch mit dem Primärantikörper (1:500 verdünnt mit 10%iger BSA-Waschpufferlösung) inkubiert. Als Primärantikörper wurden anti-KIT, anti-p-KIT, anti-pp-ERK1/2, anti-p-ERK1/2, anti-p-AKTSerin, anti-AKT, anti-p-STAT5 und anti-STAT5 verwendet. Am nächsten Tag wurde der Primärantikörper durch mehrere Waschvorgänge (Tween-Waschpuffer) von der Membran entfernt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit der Tubulin-Ladekontrolle (1:1000 mit Waschpuffer verdünnt), sowie nach wiederholten Waschvorgängen die einstündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper (1:10 000 in Waschpuffer verdünnt) im Dunkeln bei Raumtemperatur. Für den Primärantikörper wurde ein grün-leuchtender (Wellenlänge 800nm) anti-rabbit-Sekundärantikörper, für die Tubulin-Ladekontrolle ein rot leuchtender (Wellenlänge 680nm) anti-mouse-Sekundärantikörper verwendet. Nicht gebundener Sekundärantikörper wurde durch weitere Waschprozesse von der Membran entfernt. Durch Einscannen der Membran mit der jeweiligen Wellenlänge der verwendeten Sekundärantikörper am LiCor Odyssey wurden die Proteinbanden sichtbar gemacht.

3.6.7 Strippen der Membran

Um weitere Proteine nachweisen zu können, wurde zunächst der aktuell gebundene Antikörper von der Membran entfernt. Hierzu wurde die Membran für 15min in Stripping Buffer inkubiert. Der Stripping Buffer wurde verworfen und die Membran nach mehrmaligem Waschen eine Stunde in BSA-Puffer geblockt. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe des neuen Primärantikörpers, der über Nacht inkubiert. Die Zugabe des Sekundärantikörpers am nächsten Tag und das Einscannen der Membran erfolgte wie bereits unter Punkt 3.7.6 beschrieben.

3.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte zunächst mit One-way ANOVA. Für alle statistisch signifikanten One-way ANOVA-Ergebnisse wurde der Tukey's HSD (honest significant difference) test durchgeführt. Die Testergebnisse, die einen p-Wert kleiner 0,05 ergaben, wurden als statistisch signifikant angenommen. Diese Analyse wurde mit der Statistiksoftware JMP® 11.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA) durchgeführt.

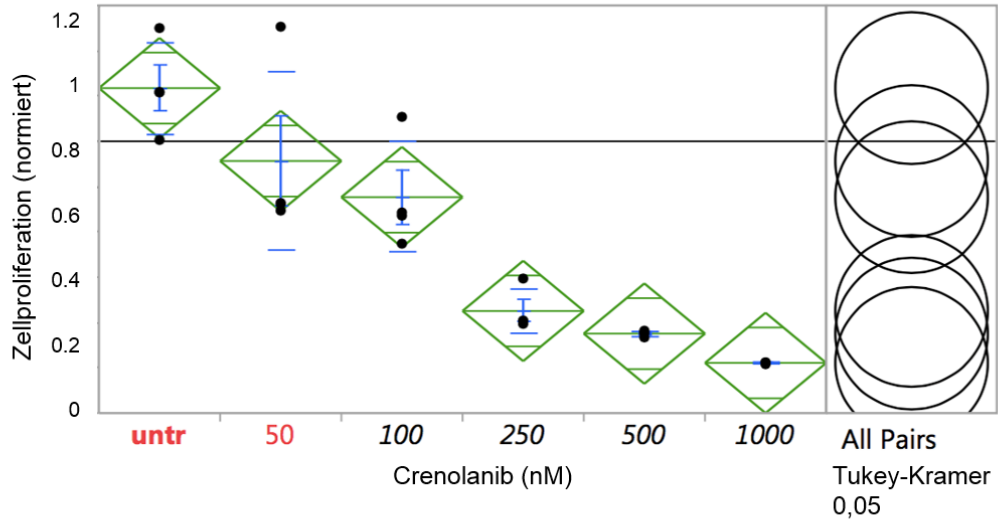
4 Ergebnisse

4.1 Dosisabhängige Proliferationsinhibition durch Crenolanib in KIT-mutierten Mastozytose-Zelllinien

Um die antiproliferative Wirkung von Crenolanib gegenüber KIT-mutierten Zellen zu untersuchen, wurden die Mastozytose-Zelllinien HMC1.2 (*KIT* V560G + D816V Mutation) und p815 (*Kit* D814Y = humane *KIT* D816Y Mutation) für 48h mit Crenolanib behandelt und der Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Zellen anschließend mittels eines XTT-basierten Assays gemessen. Die ermittelte IC₅₀ der Zelllinien p815 und HMC1.2 liegt bei ca. 200 – 250nM und sollte damit klinisch erreichbar und effektiv sein (vgl. IC₅₀ von Imatinib bei *BCR-ABL1* positiven Zelllinien wie bspw. K562 [120]).

Abbildung 4.1

A HMC1.2



B P815

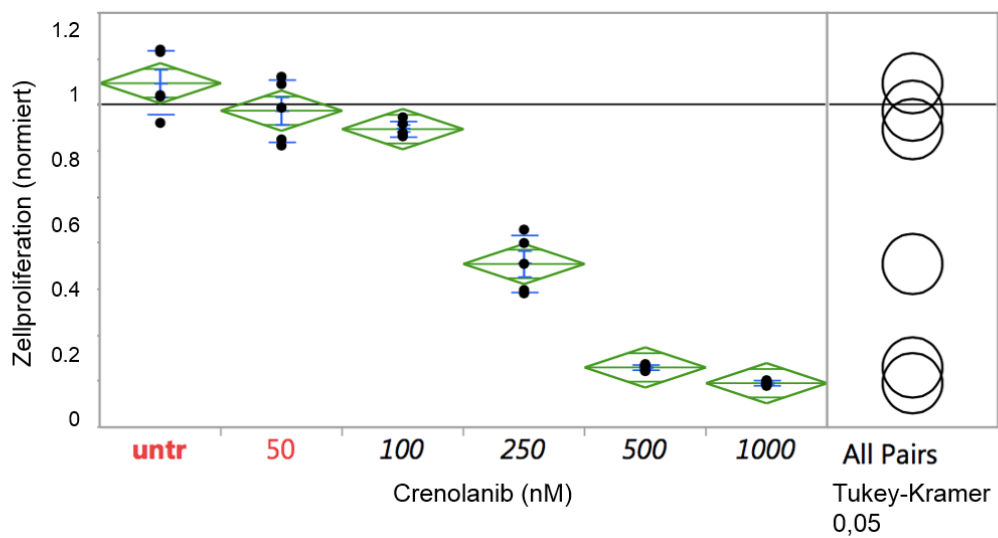


Abbildung 4.1 Crenolanib inhibiert dosisabhängig die Proliferation der Zelllinien HMC1.2 (*KIT*V560G + *KIT*D816V Mutation) (A) und p815 (*KIT* D816Y) (B). Die Crenolanib-Behandlung erfolgte für 48h, die Messdaten wurden mit einem XTT-basierten Assay erhoben. Die Extinktion der unbehandelten Kontrollprobe wurde auf 1 normiert und die Extinktionen der behandelten Proben anteilig im Vergleich zur Kontrollprobe angegeben.

4.2 Dosisabhängige Apoptoseinduktion durch Crenolanib in Leukämie – und Mastozytose-Zelllinien mit aktivierter Klasse-III-RTK

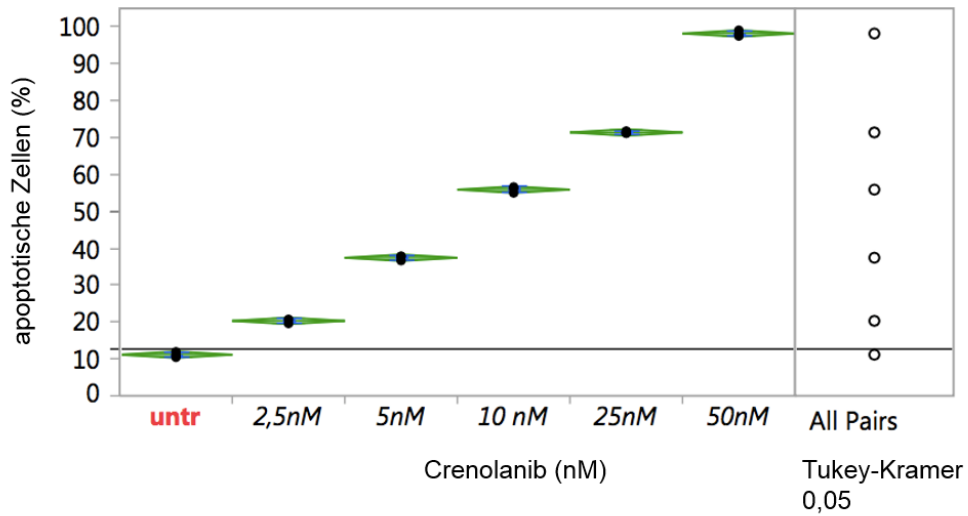
Die Leukämie- oder Mastozytose-Zelllinien MOLM14, EOL-1, p815 und HMC1.2, die unterschiedliche Klasse-III-RTK-Isoformen exprimieren, wurden für 48h mit verschiedenen Konzentrationen Crenolanib behandelt. Der proapoptotische Effekt von Crenolanib wurde anschließend durchflusszytometrisch mit Hilfe einer Annexin/PI-Färbung der Zellen ermittelt.

Crenolanib ist bekanntermaßen ein potenter FLT3 – und PDGFR-Inhibitor. Um dies zu bestätigen, wurde für die humane Eosinophilenleukämie-Zelllinie EOL-1, die das *FIP1L1-PDGFR*A Fusionsgen aufweist, sowie für die *FLT3* ITD positive humane AML-Zelllinie MOLM14 eine Verdünnungsreihe mit Crenolanib erstellt.

Wie zu erwarten, zeigten sich diese beiden Zelllinien sehr sensitiv gegenüber der Behandlung mit Crenolanib. Schon Konzentrationen im niedrig nanomolaren Bereich führten zur effektiven Apoptoseinduktion.

Abbildung 4.2

A MOLM 14



B EOL-1

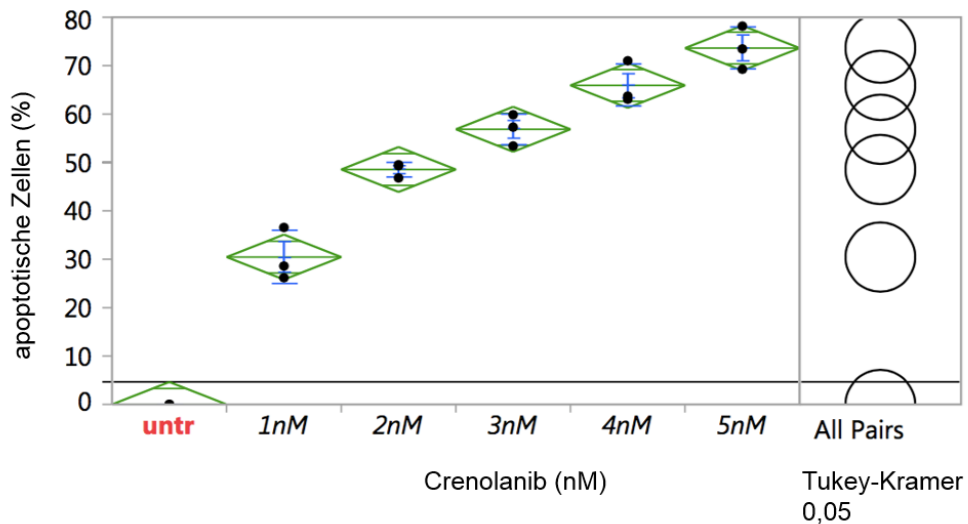


Abbildung 4.2 Crenolanib induziert Apoptose in FLT3- oder PDGFR – mutierten Leukämiezellen. Die Diagramme zeigen die dosisabhängigen Apoptoseraten der Zelllinien MOLM14 (*FLT3* ITD) (A) und EOL-1 (*FIP1L1-PDGFR*A) (B) unter Crenolanib. Die Crenolanib-Behandlung erfolgte für 48h, die Messungen erfolgten mittels eines Annexin-V/PI-basierten Assays. Die statistische Auswertung wurde mit One-way ANOVA und dem Tukey's honestly significant difference (HSD) Test durchgeführt.

Um die proapoptische Kapazität von Crenolanib gegenüber mutierten KIT-Isoformen zu detektieren, wurde die humane Mastozytose-Zelllinie HMC1.2 (*KIT* Exon 17 V560G D816 V) und die murine Mastozytose-Zelllinie p815 (*Kit* D814Y,

entspricht der humanen *KIT* D816Y Mutation) für 48h mit Crenolanib-Konzentrationen zwischen 0-300nM (p815) bzw. 0-2000nM (HMC1.2) behandelt.

Die *Kit* D814Y positive (entspricht der humanen *KIT* D816Y Mutation) Mauszelllinie p815 zeigte sich gegenüber Crenolanib sehr sensitiv und es konnte eine IC50 im Bereich von wenigen hundert Nanomolar erreicht werden (IC50=225nM). Bemerkenswerterweise weist auch die ansonsten auf KIT-Inhibition resistente Zelllinie HMC1.2 [121] eine gute proapoptotische Sensitivität gegenüber Crenolanib auf.

Abbildung 4.3

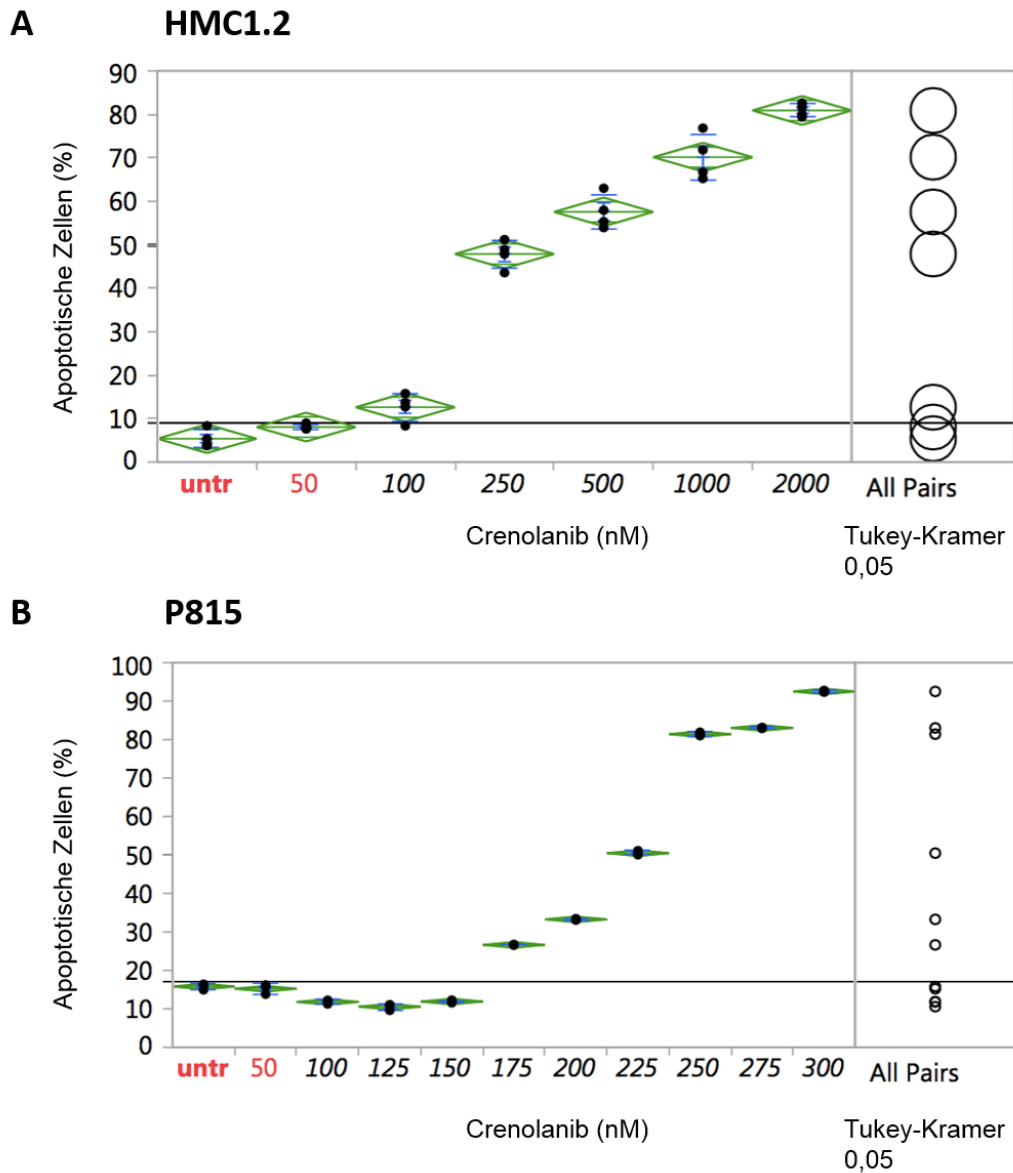


Abbildung 4.3 Crenolanib induziert Apoptose in KIT-mutierten Mastozytose-Zellen. Die Abbildung zeigt die dosisabhängigen Apoptoseraten der Zelllinie HMC1.2 (*KIT* V560G+*KIT* D816V) p815 (**A**) unter Crenolanib, sowie die dosisabhängigen Apoptoseraten der Zelllinie p815 (*KIT* D816Y) (**B**). Die Crenolanib-Behandlung erfolgte für 48h, die Messungen erfolgten mittels eines Annexin-V/PI-basierten Assays. Die statistische Auswertung wurde mit One-way ANOVA und dem Tukey's honestly significant difference (HSD) Test durchgeführt.

Abbildung 4.4

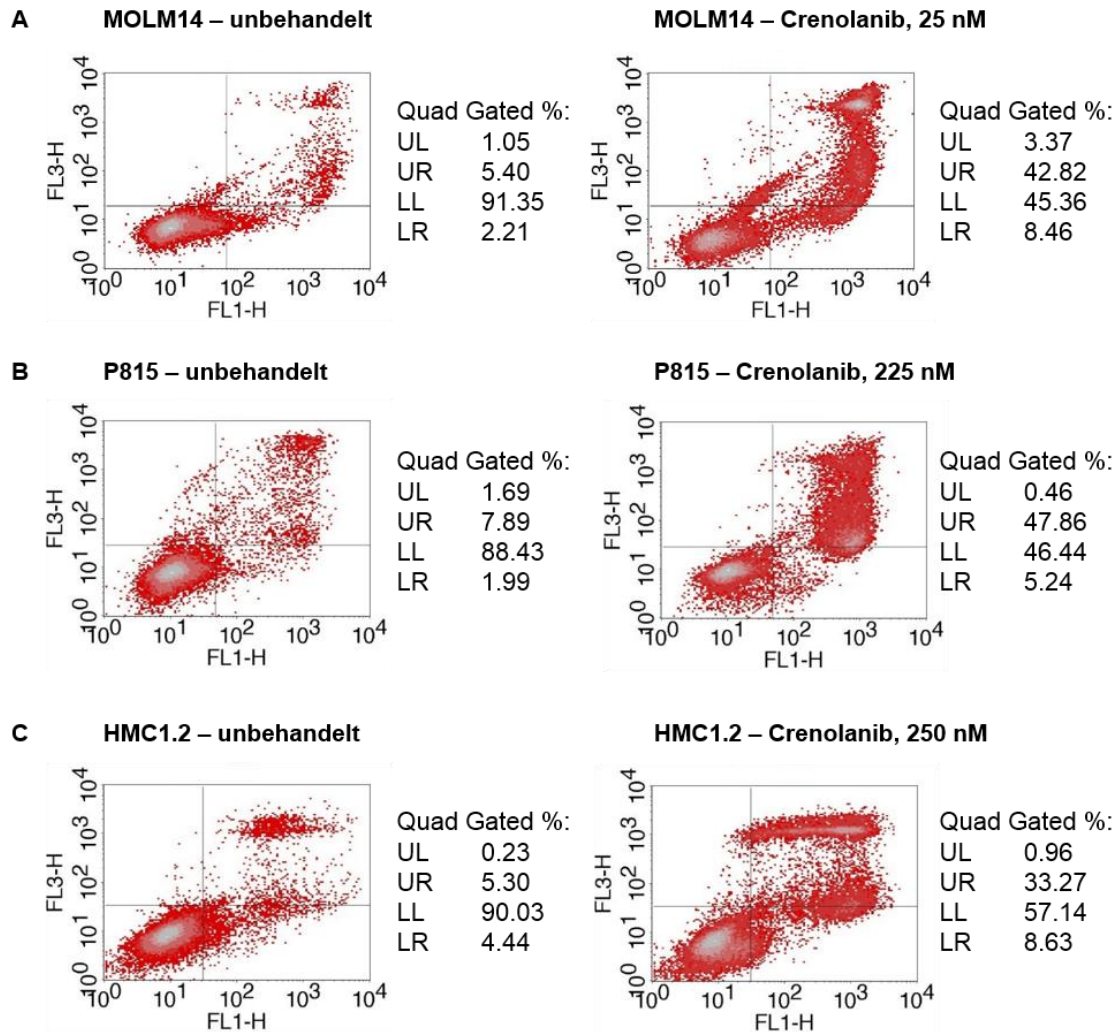
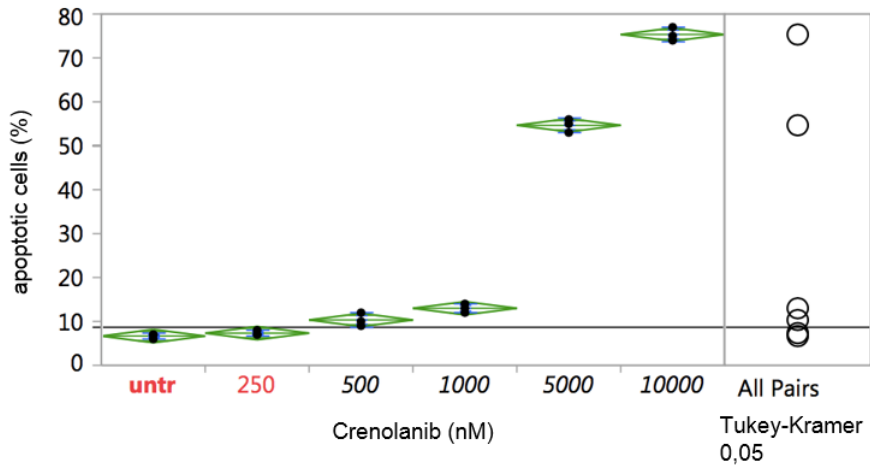


Abbildung 4.4 Apoptoseinduktion in *FLT3*-oder *KIT*-mutierten Mastozytose - und Leukämie-Zelllinien unter Crenolanib. Die Zelllinien wurden mit verschiedenen Konzentrationen der Substanz Crenolanib für 48h behandelt. Die Apoptoseraten wurden mittels eines Annexin-V/PI-basierten Assays durchflusszytometrisch gemessen. FLH-1 (x-Achse) zeigt die Annexin-V-positiven, frühapoptotischen Zellen, FL3-H (y-Achse) zeigt die Propidium-Iodid-positiven, spätapoptotischen Zellen an. Die *FLT3* ITD positive Zelllinie MOLM14 (**A**) erwies sich als am sensitivsten gegenüber Crenolanib. Die p815 – Zellen (*KIT* D 816 Y-Mutation) (**B**) zeigten ein gutes Ansprechen auf Crenolanib bei Konzentrationen im niedrigen Nanomolar-Bereich. Für die Zelllinie HMC1.2 (**C**), die sowohl die *KIT* V560G-Mutation als auch die zusätzliche *KIT* D816V Mutation trägt, konnte ebenfalls eine gute Sensitivität gegenüber Crenolanib nachgewiesen werden.

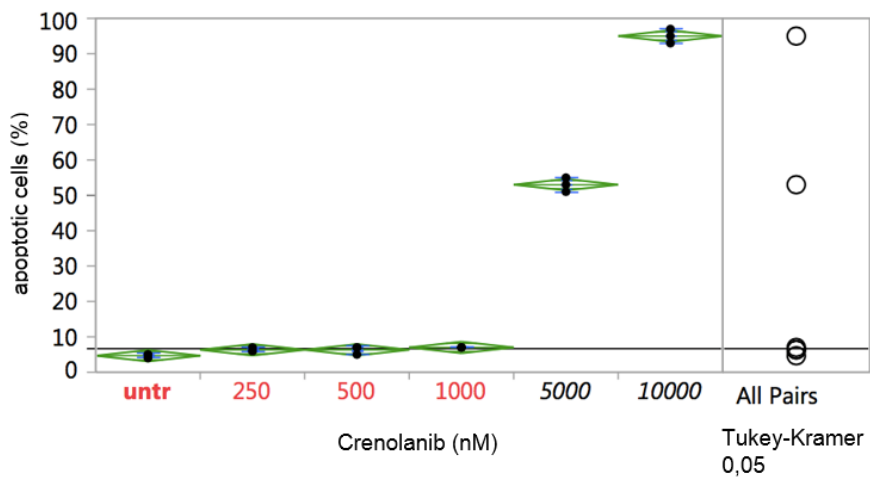
Zur Kontrolle der durchgeführten Experimente mit Zelllinien, die eine Mutation in einer Klasse-III-RTK aufweisen, wurde die Sensitivität der Zelllinien Jurkat, HL60 und K562 gegenüber Crenolanib untersucht. Die Zelllinien Jurkat und HL60 exprimieren keine aktivierte Klasse-III-RTK, die Zelllinie K562 exprimiert eine *BCR-ABL1* Translokation. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Behandlung dieser Zellen mit Crenolanib zu keiner nennenswerten gezielten Apoptoseinduktion führt (IC50 ~ 5000nM) und unterstreichen den gezielten Effekt von Crenolanib als Target gegenüber KIT-mutierten Isoformen und anderen mutierten Klasse-III-RTK.

Abbildung 4.5

A K562



B Jurkat



C HL60

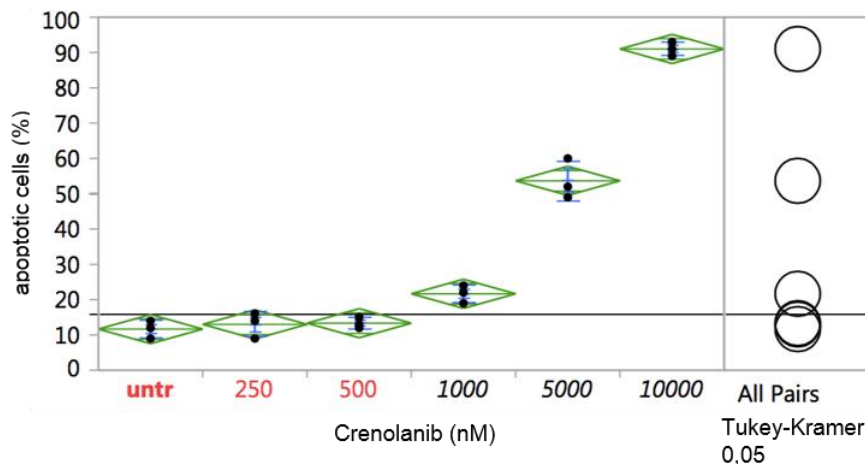


Abbildung 4.5 Apoptoseinduktion in Zelllinien ohne aktivierte Klasse-III-RTK unter Crenolanib. Crenolanib hat eine geringe Wirkung auf Zellen ohne aktivierte Klasse-III-RTK-Aktivität (K562 (A), Jurkat (B), HL60 (C)). Die Crenolanib-Behandlung erfolgte für 48h, die Messungen erfolgten mittels eines Annexin-V/PI-basierten Assays.

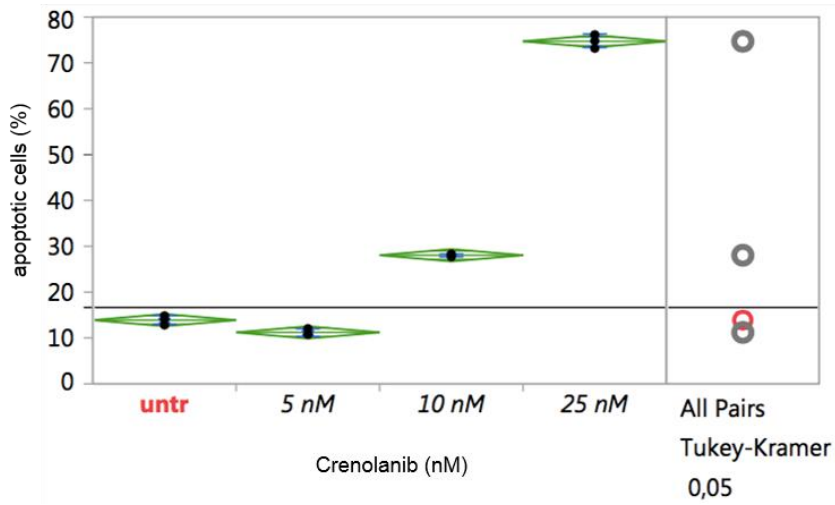
4.3 Vergleich der Crenolanib-Sensitivität gegenüber verschiedenen Zelllinien mit *FLT3*- oder *KIT*-Mutation in einem isogenen zellulären Hintergrund

Wie unter Punkt 4.1 und 4.2 erläutert, zeigt Crenolanib eine deutliche antiproliferative und proapoptotische Wirkung in Zelllinien, die eine aktivierende Mutation der RTK *FLT3*, *KIT* oder *PDGFR* aufweisen. Allerdings werden für jede Zelllinie unterschiedlich hohe Konzentrationen Crenolanib benötigt, um gleiche Effekte auf das Apoptose - und Proliferationsverhalten der jeweiligen Zellen zu erzielen. Um auszuschließen, dass Zelllinien-spezifische off-target Effekte für diese divergierende Inhibitionskapazität verantwortlich sind und nicht wie vermutet die unterschiedliche Sensitivität von Crenolanib gegenüber verschiedenen mutierter RTK, wurden alle bereits an Zelllinien untersuchten Mutationen in einem isogenen zellulären Hintergrund getestet. Hierzu wurden die verschiedenen humanen *FLT3* ITD oder *KIT* D816 Isoformen stabil mittels eines retroviralen Vektors in die murine, IL-abhängige B-Zelllinie Ba/F3 transfiziert. [121] [122].

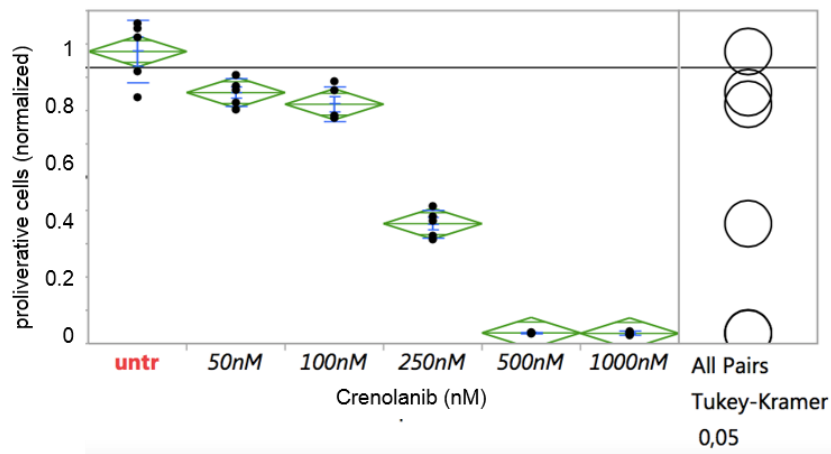
Auf diese Weise war ein direkter Vergleich der Zellen, in die eine RTK-Mutation transfiziert wurde mit den Zelllinien, die die jeweilige korrespondierende Mutation exprimieren, möglich. Es zeigte sich, dass die verwendeten Standard-Zelllinien und die genetisch veränderten Zelllinien, die jeweils die gleiche mutierte Kinase exprimieren, vergleichbar auf eine Behandlung mit Crenolanib reagierten. Der proapoptotische Effekt von Crenolanib in der *FLT3* ITD positiven Leukämie-Zelllinie MOLM14 ist ähnlich gut wie in den Ba/F3 Zellen, in die die *FLT3* ITD Mutation transfiziert wurde. Auch die in Versuchen zur Apoptoseinduktion und Proliferationsinhibition erhobenen Ergebnisse der Ba/F3 Zellen mit transfizierter *KIT* D816V Mutation oder *KIT* D816Y Mutation entsprechen den Ergebnissen der Zelllinien HMC1.2 (*KIT* D816V) bzw. p815 (*Kit* D814Y, entspricht der humanen *KIT* D816Y Mutation), die die korrespondierenden Mutationen exprimieren. Im Gegensatz dazu zeigten die parentalen Ba/F3 bis zu einer getesteten Konzentration von 750nM keine wesentliche Sensitivität gegenüber Crenolanib. Erst ab einer Konzentration von 1000nM Crenolanib konnte der am ehesten durch off-target Effekte bedingte Zelltod der Ba/F3-Zellen beobachtet werden. Es liegt nahe, dass der durch Crenolanib erzielte antiproliferative und proapoptotische Effekt direkt und Mutations-spezifisch über Inhibition der entsprechenden Rezeptortyrosinkinase vermittelt wird. *Tabelle 4.1* zeigt die IC50 der Apoptosemessungen aller untersuchten Zelllinien.

Abbildung 4.6

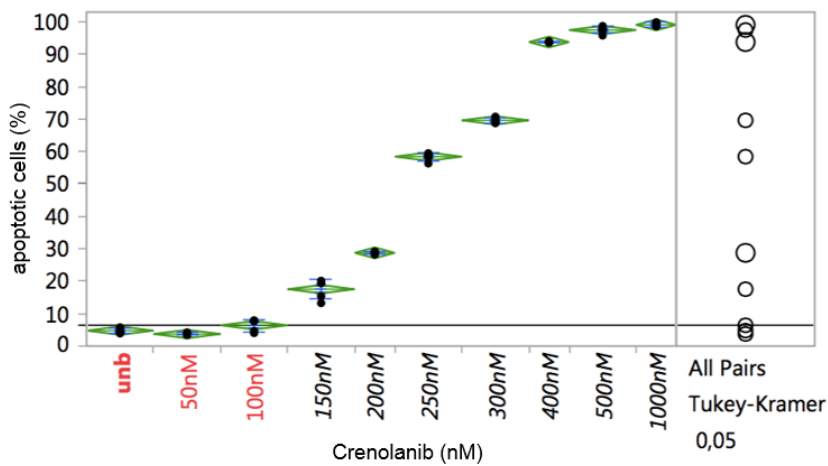
A Ba/F3 FLT3 ITD



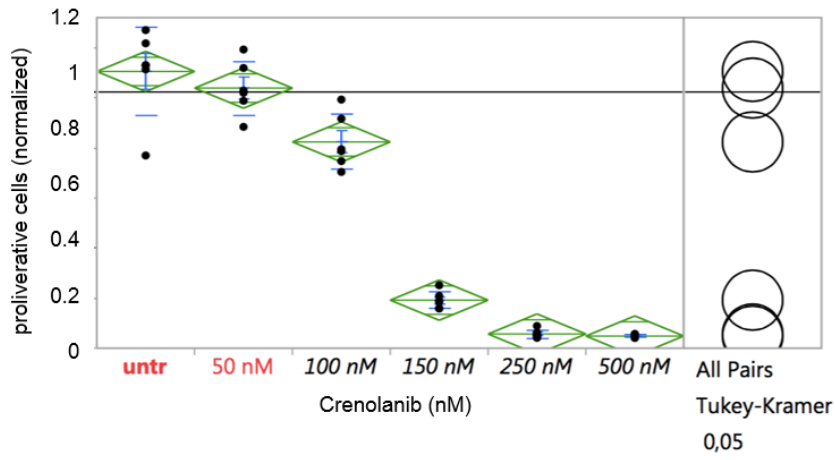
B1 Ba/F3 KIT D816V



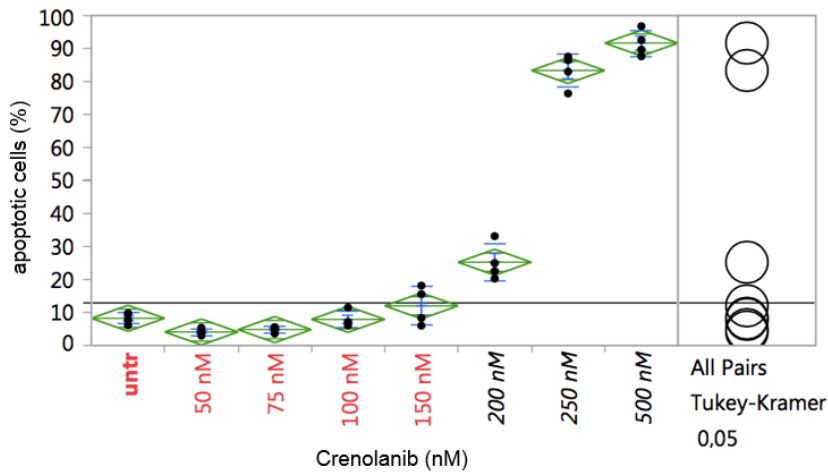
B2 Ba/F3 KIT D816V



C1 Ba/F3 KIT D816Y



C2 Ba/F3 KIT D816Y



D Ba/F3 parental

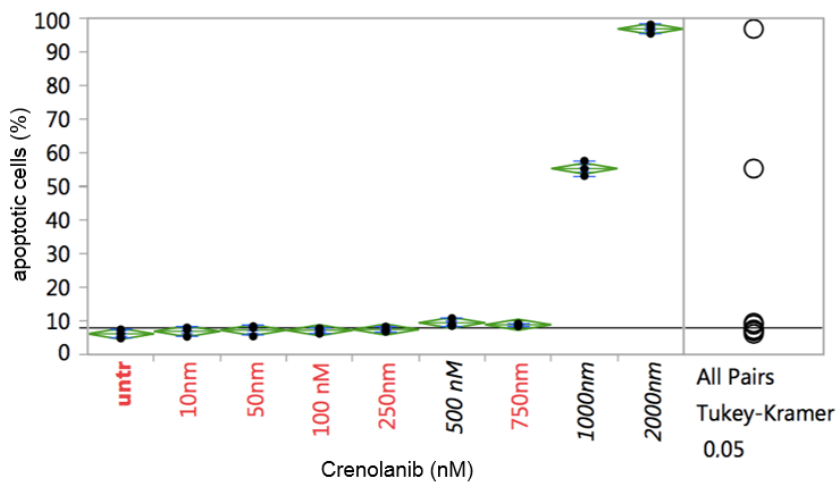


Abbildung 4.6 Crenolanib-Wirkung in Zelllinien mit *FLT3*-oder *KIT*-Mutation des isogenen Ba/F3-Modells. Die im Annexin-V/PI-basierten Assay erhobenen dosisabhängigen Apoptoseraten der Zelllinie Ba/F3 *FLT3* ITD (**A**) entsprechen den Apoptoseraten der korrespondierenden Zelllinie MOLM14 (siehe *Abbildung 4.2 A*). Die im XTT-basierten Assay erhobenen Proliferationsdaten, sowie die Apoptoseraten der Zelllinien Ba/F3 *KIT* D816V (**B1, B2**) und Ba/F3 *KIT* D816Y (**C1, C2**) des isogenen Zellmodells zeigen ebenfalls einen ähnlichen dosisabhängigen Verlauf wie die korrespondierenden Zelllinien HMC1.2 (*KIT* D816V) (siehe *Abbildung 4.1 A und 4.3 A*) und p815 (*KIT* D816Y) (siehe *Abbildung 4.1 B und 4.3 B*). Die Zelllinie Ba/F3 parental (**D**) zeigt keine Apoptoseinduktion bis zu einer off-target bedingten Toxizität ab 1000nM Crenolanib.

Zelllinie	Mutation	geschätzte IC 50 (nM) <i>Apoptoseinduktion</i>
HMC1.2	<i>KIT</i> V560G/D816V	250-500
Ba/F3 <i>KIT</i> D816V	<i>KIT</i> V560G/D816V	250
P815	<i>KIT</i> D814Y (murin)	225
Ba/F3 <i>KIT</i> D816Y	<i>KIT</i> D816VY	200-250
EOL-1	<i>FIP1L1-PDGFR</i>	2
MOLM14	<i>FLT3</i> ITD	25
Ba/F3 <i>FLT3</i> ITD	<i>FLT3</i> ITD	10-25
Ba/F3 parental	-	Off target 1000

Tabelle 4.1 IC50 aller Zelllinien mit mutierter Klasse-III-RTK unter Crenolanib. In Annexin-V/PI-basierten Assays erhobene IC50-Werte für alle untersuchten Zelllinien mit mutierter Klasse-III-RTK nach 48-stündiger Behandlung mit Crenolanib.

4.4 Untersuchung der Crenolanib-Wirkung auf den Phosphorylierungsstatus der RTK KIT und weiterer nachgeschalteter Signalwege mittels Western Blot

Um die „Target-Spezifität“ von Crenolanib hinsichtlich KIT-Inhibierung, auf welche die durchgeführten zellbiologischen Experimente hindeuten, auf Proteinebene zu untersuchen, wurden Western Blots für sowohl die Zelllinien HMC1.2 und p815 als auch für die korrespondierenden transfizierten Zelllinien Ba/F3 *KIT* D816V und Ba/F3 *KIT* 816Y unter Behandlung mit Crenolanib erstellt. Wie unter *Punkt 1.1* erläutert, werden RTK durch Liganden-abhängig ausgelöste

Phosphorylierung aktiviert. Gain-of-function Mutationen im *KIT*-Gen führen zu einer Autophosphorylierung der RTK KIT, die sich dadurch in einem aktiven Zustand befindet.

Die Western Blots der Zelllinien HMC1.2, Ba/F3 *KIT* D816V, p815 und Ba/F3 *KIT* D816Y zeigen, dass die RTK KIT, sowie deren nachgeschaltete Signalwege wie unter anderem AKT, MAP-Kinasen und STAT5 im unbehandelten Zustand in phosphorylierter, also aktivierter Form vorliegen. Durch die 90-minütige Behandlung der Zellen mit Crenolanib zeigte sich ein mit steigender Substanzkonzentration abnehmender Phosphorylierungsstatus der untersuchten Proteine. Beide getesteten KIT-Isoformen (Zelllinie HMC1.2 mit *KIT* D816V Mutation, sowie Zelllinie p815 mit *KIT* D816Y) zeigten bereits bei ~100nM Crenolanib eine deutlich schwächere Phosphorylierung des KIT-Proteins. Die Sensitivität der Zelllinien Ba/F3 *KIT* D816V und Ba/F3 *KIT* D816Y des isogenen Ba/F3-Zellmodells gegenüber Crenolanib entspricht der Sensitivität der jeweils korrespondierenden Standard-Mastozytose-Zelllinie HMC1.2 bzw. p815. Analog dazu wiesen die Zielproteine MAP-Kinasen, AKT (an Serin 473) und STAT5 ebenfalls eine verminderte Aktivierung bei ~100nM auf. Zu diskutieren ist an dieser Stelle das Inhibitionsmuster von ERK1/2 und STAT5 im Western Blot der Zelllinie HMC1.2. Während das Zielprotein STAT5 bereits bei einer Crenolanib-Konzentration von 50nM eine fast vollständige Dephosphorylierung aufweist, wurden für das Zielprotein ERK1/2 deutlich höhere Crenolanib-Konzentrationen benötigt, um eine abnehmende Phosphorylierung zu erzielen. Es fällt auf, dass das Inhibitionsmuster von ERK1/2 dem der glykosylierten Form von KIT (obere KIT-Bande) entspricht, während das Inhibitionsmuster von STAT5 dem der nicht-glykosylierten Form von KIT ähnelt (untere KIT-Bande). Diese Beobachtung führt zu der Überlegung, dass die glykosylierte und die nicht-glykosylierte Form der RTK KIT möglicherweise unterschiedliche nachgeschaltete Signalwege in HMC1.2 – Zellen inhibieren. Die Zelllinie HMC1.2 exprimiert im Unterschied zu den anderen in diesem Experiment untersuchten Zelllinien p815, Ba/F3 *KIT* D816V und Ba/F3 *KIT* D816Y neben der *KIT* D816V eine zweite Mutation im *KIT*-Gen, die *KIT* V560G Mutation. Möglicherweise stellt diese Doppelmutation der Zelllinie HMC1.2 und ein damit verbundenes verändertes Inhibitionsmuster in der

Signaltransduktion eine Erklärung für dieses gegenüber den anderen untersuchten Zelllinien abweichende Ergebnis dar. Darüber hinaus sind auch methodisch bedingte Ursachen für unterschiedliche Inhibitionsmuster der Zielproteine in den Western Blots der Zelllinie HMC1.2 nicht auszuschließen. Vor allem die Ergebnisse der Zelllinien des isogenen Zellmodells Ba/F3 *KIT* D816V und Ba/F3 *KIT* D816Y zeigen jedoch, dass Crenolanib gezielt die Kinase-Aktivität von KIT inhibiert. Die in nativen Zelllinien wie bspw. der Zelllinie HMC1.2 möglicherweise auftretenden off-target Effekte, sowie die Hypothese, dass die glykosylierte und die nicht-glykosylierte Form der RTK KIT unterschiedliche Signalwege inhibieren, müssen in weiterführenden Experimenten genauer untersucht werden.

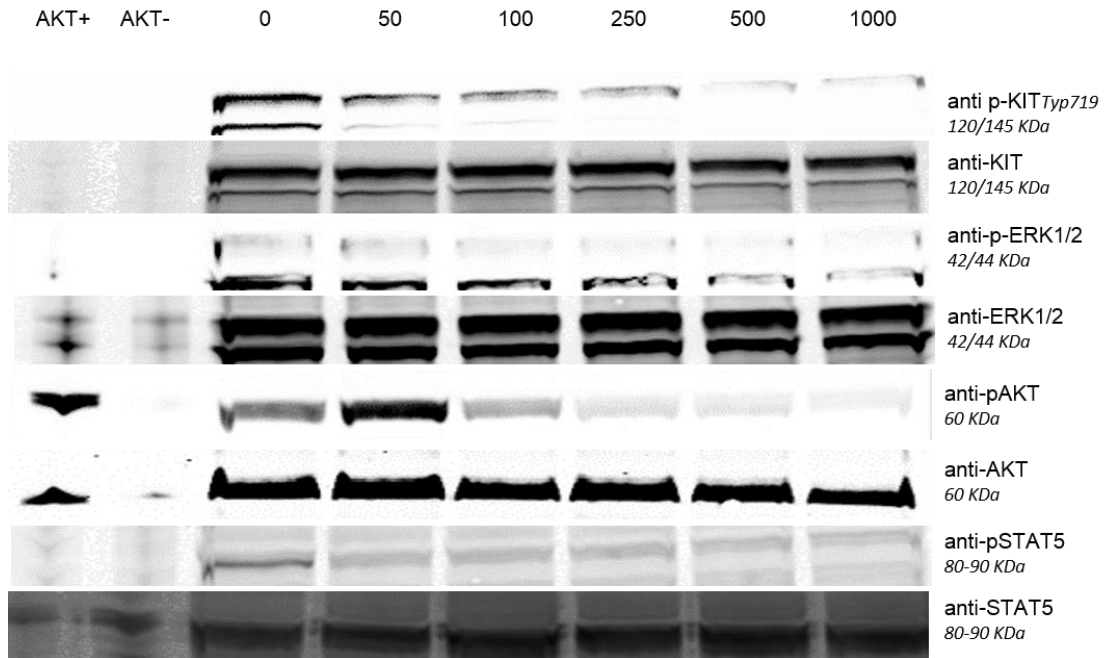
Die Ergebnisse der Western-Blots gehen mit den in den Experimenten zur Zellviabilität erhobenen Daten einher und sprechen zusammenfassend für eine gezielte, RTK-vermittelte Wirkung von Crenolanib und gegen durch unspezifische off-target Effekte erzielte proapoptotische und antiproliferative Effekte. Die Ergebnisse der Untersuchungen auf Proteinebene bestätigen KIT somit als direktes Target von Crenolanib.

Abbildung 4.7

A

HMC1.2

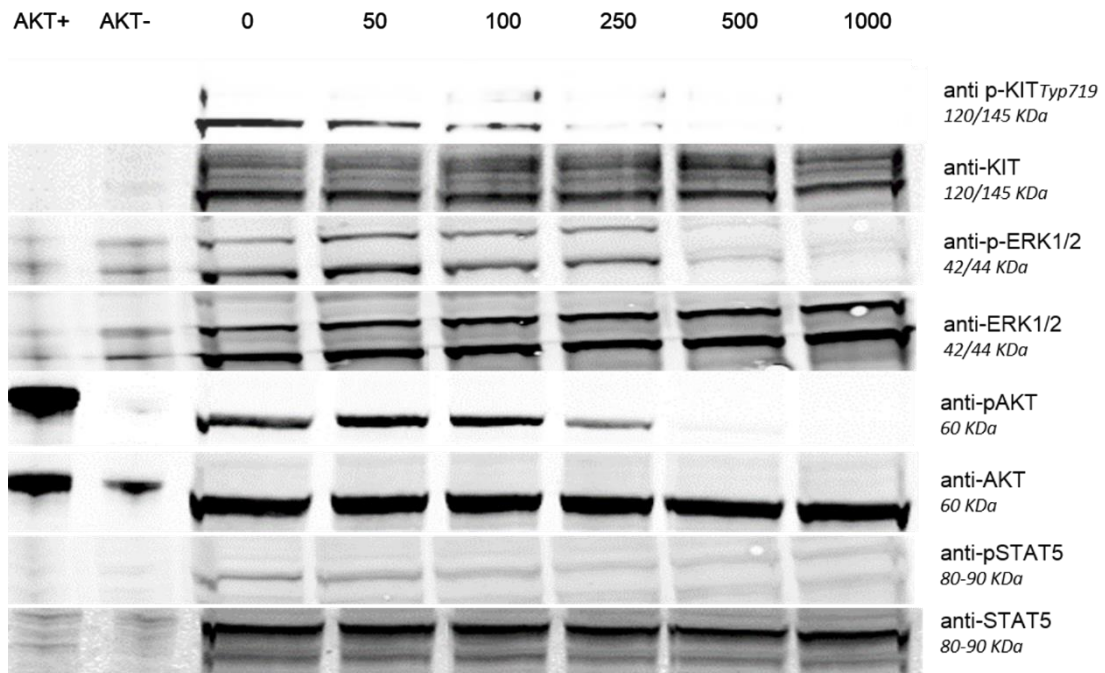
Crenolanib (nM), cultured in 10%FBS



B

Ba/F3 KIT D816V

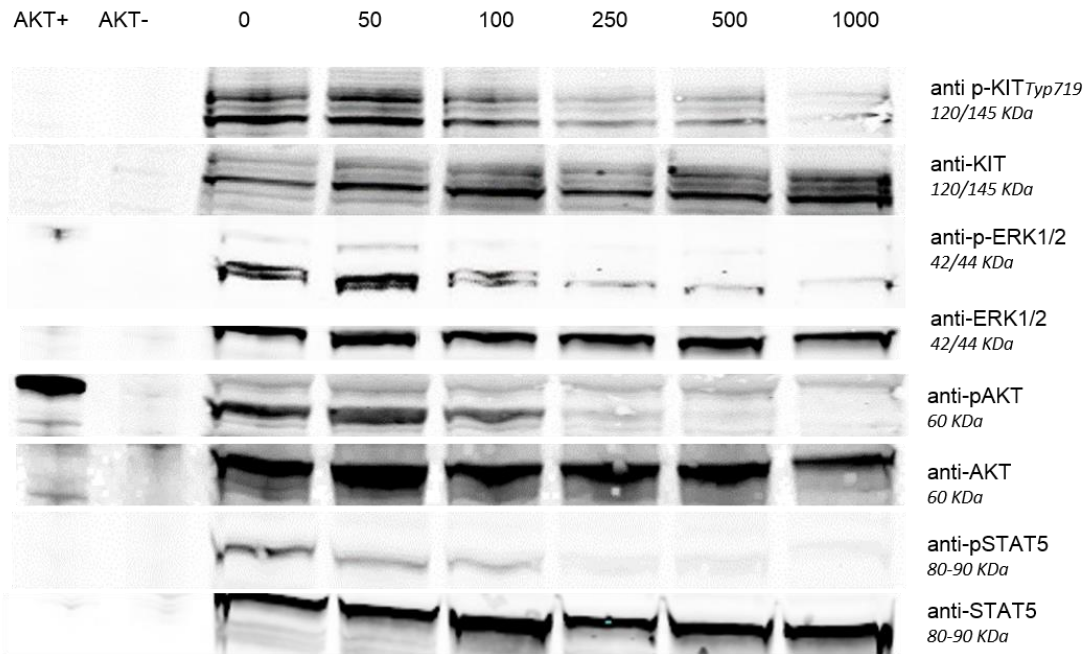
Crenolanib (nM), cultured in 10%FBS



C

P815

Crenolanib (nM), cultured in 10%FBS



D

Ba/F3 KIT D816Y

Crenolanib (nM), cultured in 10%FBS

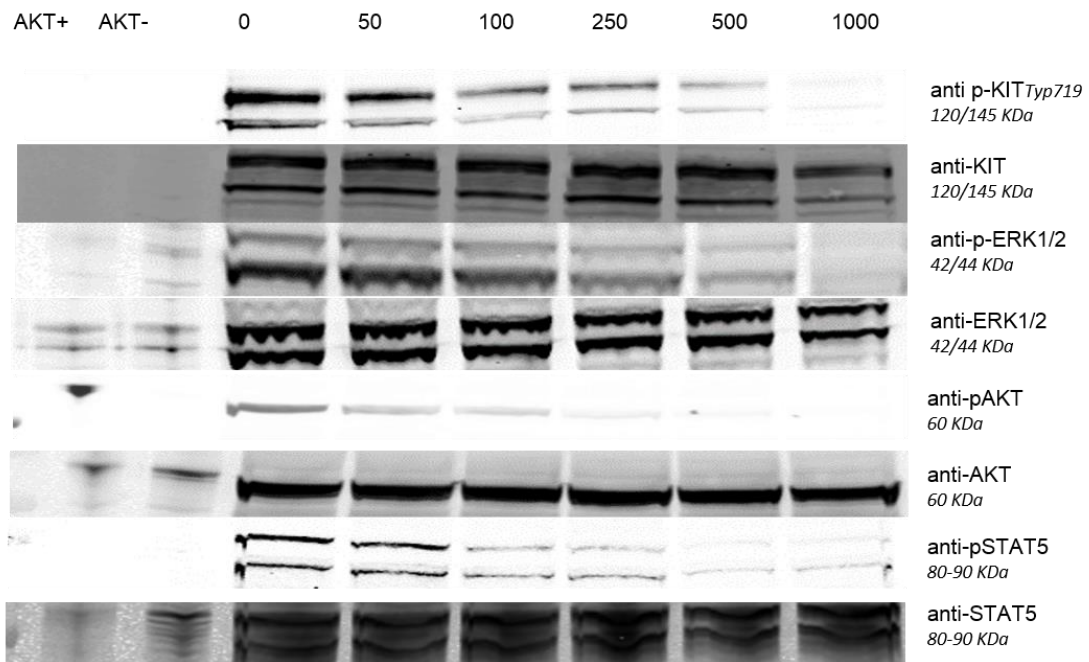


Abbildung 4.7 Crenolanib inhibiert die Phosphorylierung autoaktivierter KIT D816 Isoformen und führt zur verminderten Expression von typischerweise durch mutierte KIT-Isoformen aktivierten nachgeschalteten Signalwegen. Die beobachteten zellulären Effekte einer Crenolanib-Behandlung können direkt mit der Wirkung von Crenolanib auf die Hemmung der Phosphorylierung mutierter KIT-Isoformen in Verbindung gebracht werden. Die Zellysate der HMC1.2 (A), der transfizierten Ba/F3 *KIT* D816V (B), der p815 (C), sowie der Ba/F3 *KIT* D816Y (D) wurden für Western Blots mit einem Phospho-KIT Antikörper verwendet. Die Membranen wurden anschließend mit den Antikörpern total KIT, ppERK, total ERK, pAKTSerin473, total AKT, pSTAT5 und total STAT5 gestrippt (s.2.9.3) Die vorausgegangene 90-minütige Behandlung der Zellen mit Crenolanib führte zu einer Inhibition der Phosphorylierung der untersuchten Proteine, wobei die zu einer effektiven Dephosphorylierung führende Crenolanib-Konzentration bei der bisher resistenten *KIT* D816V Isoform (HMC1.2 und Ba/F3 *KIT* D816V) im Bereich der auf früher getestete Substanzen sensitiveren *KIT* D816Y Isoform (p815 und Ba/F3 *KIT* D816Y) liegt. Die Ergebnisse der Standardzelllinien gehen wie schon bei den auf zellulärer Ebene durchgeführten Experimenten mit den Ergebnissen der jeweiligen korrespondierenden Zelllinie des isogenen Ba/F3-Modells einher.

4.5 Plasmainhibitionstest –Crenolanib-Konzentrationen zur gezielten Inhibition von KIT D816 Isoformen sind auch *in vivo* erreichbar

Zelllinien, die KIT D816 Isoformen exprimieren, sind gegenüber Crenolanib 100-fach weniger sensitiv als die *FLT3*-ITD positive Zelllinie MOLM14. Um zu untersuchen, ob die in den durchgeführten Experimenten zur gezielten Inhibition von KIT D816 Isoformen mit Crenolanib erhobenen mittleren inhibitorischen Konzentrationen (IC50) auch *in vivo* erreichbar sind, wurde ein wie in 3.3.3 beschriebener Plasmainhibitionstest durchgeführt. Die im Plasmainhibitionstest simulierten physiologischen Bedingungen einer *in vivo* Crenolanib-Behandlung lassen Rückschlüsse darauf zu, ob Crenolanib *in vivo* auf Grund von Proteinbindungsphänomenen oder anderen Mechanismen eine geringere Wirkung aufweist als die Modellversuche *in vitro* oder *ex vivo* erwarten lassen. Die Ergebnisse zeigen für beide verwendeten Referenzzelllinien HMC1.2 (*KIT* D816V) und Ba/F3 *KIT* D816V eine signifikante proapoptische Wirkung mit IC50 von ~500nM Crenolanib. Diese Konzentrationen liegen im Bereich der Serumspiegel, die bei 4 von 6 im Rahmen einer Phase II-Studie mit Crenolanib (3xtäglich 100-120mg) behandelten Patienten erreicht wurden (118-1662 nmol/L,

durchschnittlich 826 nmol/L; persönliche Kommunikation mit AROG pharmaceuticals).

Abbildung 4.8

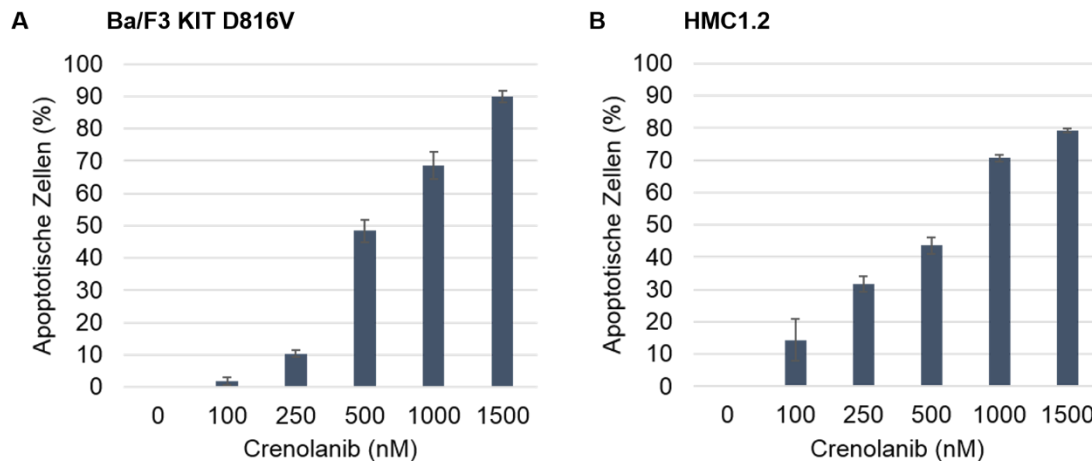


Abbildung 4.8 Plasmainhibitionstest. Die Referenzzelllinien Ba/F3 *KIT* D16V (A) und HMC1.2 (B) wurden für 48h im Serum eines gesunden Spenders mit Crenolanib in Konzentrationen von 0-1500nM behandelt. Die erreichten Apoptoseraten wurden mittels eines Annexin-V/PI-basierten Assays durchflusszytometrisch erhoben.

4.6 Vergleich von Crenolanib und Dasatinib in Ba/F3 *KIT* D816V Zellen

Dasatinib, ebenfalls ein Typ I TK-Inhibitor der zweiten Generation, konnte in präklinischen Studien *in vitro* und *ex vivo* eine potente Inhibition der *KIT* D816V Mutation aufweisen [121, 123]. Diese vielversprechenden Ergebnisse konnten jedoch enttäuschender Weise im klinischen Setting als Monotherapie nicht bestätigt werden, was möglicherweise an zu geringen klinisch-effektiven *in vivo* Konzentrationen liegen könnte [24]. Dasatinib befindet sich zur Therapie der CBF AML weiterhin in klinischer Erprobung [124].

Die Zelllinie Ba/F3 *KIT* D816V wurde für 48h sowohl mit Crenolanib als auch mit Dasatinib behandelt.

Für die Ba/F3 *KIT* D816V Zellen konnten in allen getesteten Konzentrationen unter Therapie mit Crenolanib höhere Apoptoseraten als unter Dasatinib erzielt werden.

Abbildung 4.9

Ba/F3 KIT D816V

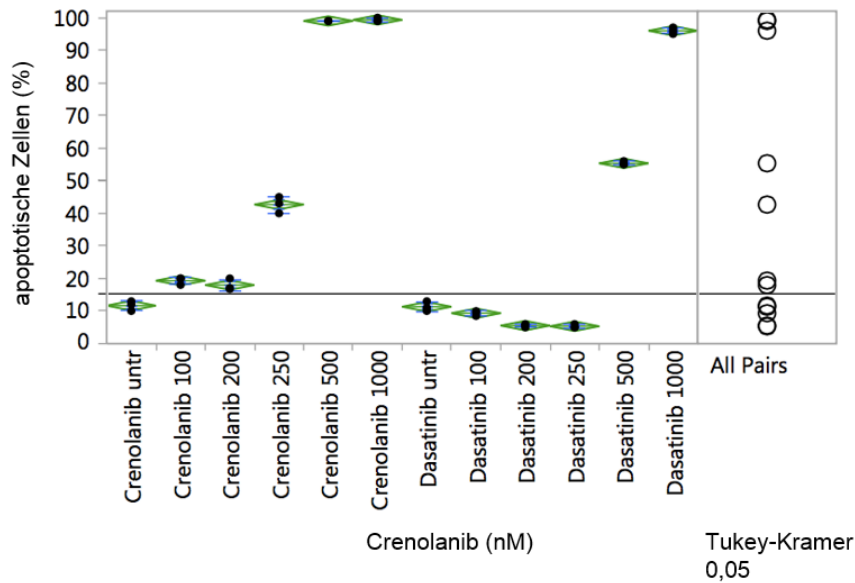


Abbildung 4.9 Apoptoseinduktion in Ba/F3 KIT D816V Zellen durch Crenolanib vs. Dasatinib Crenolanib erzielt in allen getesteten Konzentrationen bessere Apoptoseraten als Dasatinib. Die Messdaten wurde mittels eines Annexin-V/PI-basierten Assays am Durchflusszytometer erhoben.

Darüber hinaus konnte in für die Zelllinie Ba/F3 KIT D816V durchgeführten Western Blots gezeigt werden, dass eine 90-minütiger Behandlung mit Dasatinib verglichen mit Crenolanib eine geringere Inhibierung der KIT-Autophosphorylierung zur Folge hat.

Abbildung 4.10

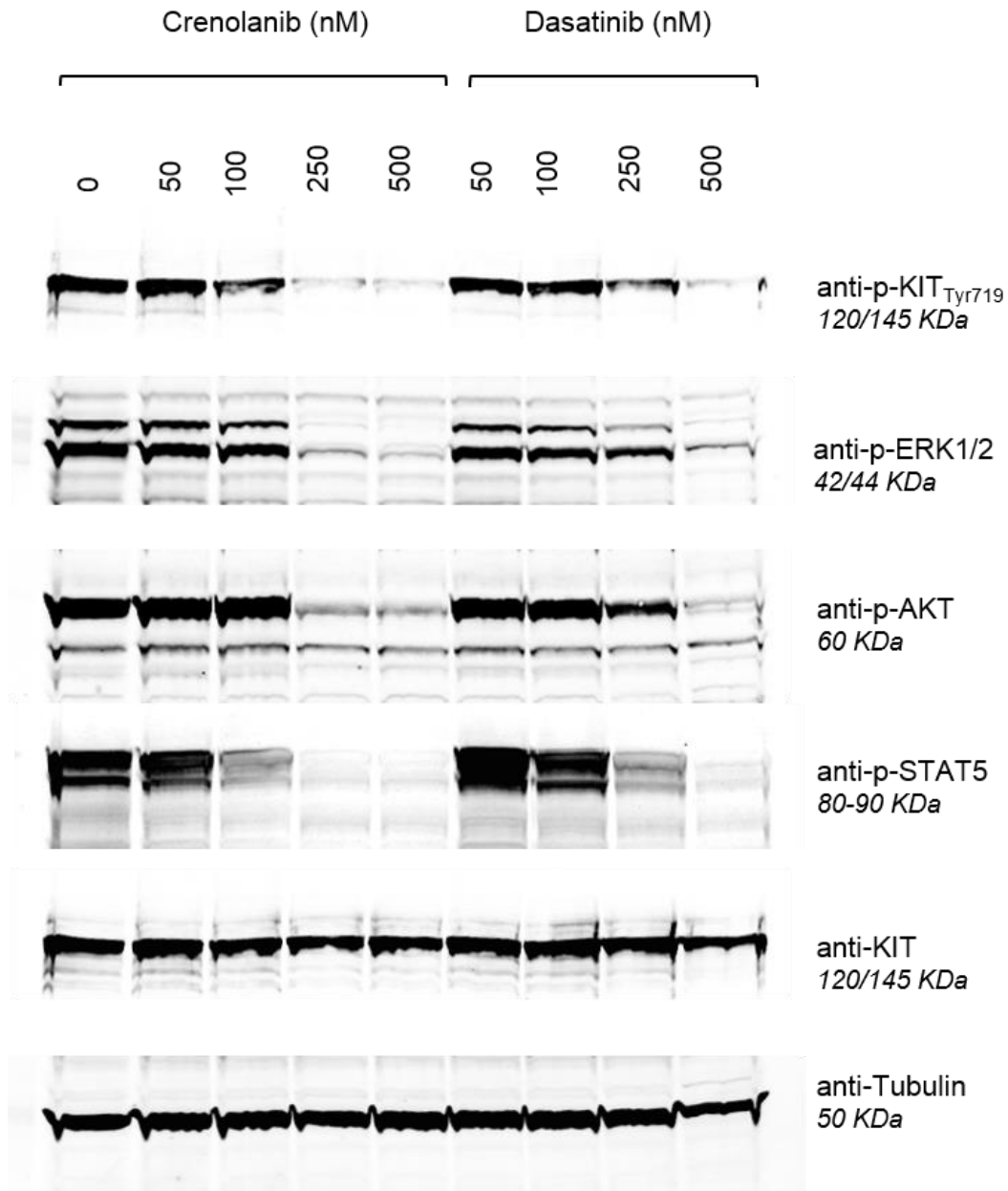


Abbildung 4.10 Inhibierung der KIT-Autophosphorylierung in Ba/F3 *KIT* D816V Zellen durch Crenolanib vs. Dasatinib. Crenolanib führt in geringerer Dosierung als Dasatinib zur effektiven KIT-Dephosphorylierung in Ba/F3 *KIT* D816V Zellen

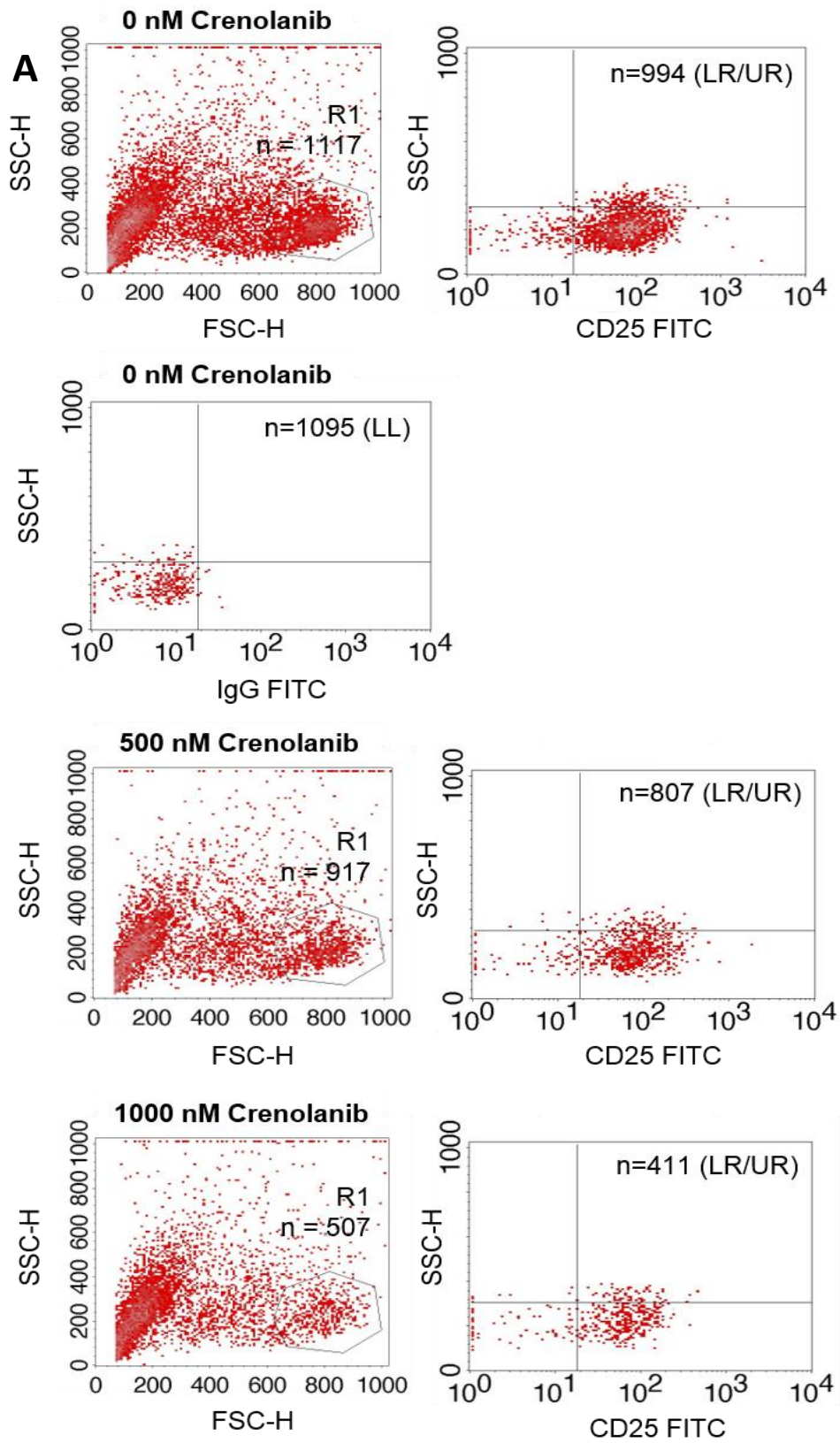
4.7 Crenolanib reduziert native, vitale Mastozytose-Zellen (*ex vivo*)

Im nächsten Schritt wurden mittels Ficoll isolierte native mononukleäre Knochenmarkszellen von 10 Patienten mit Systemischer Mastozytose für 48h mit Crenolanib behandelt, um zu überprüfen, ob SM gezielt mit Crenolanib therapiert werden können. Die Knochenmarksaspirate von Patienten mit diagnostizierter Systemischer Mastozytose weisen meist nur einen geringen Anteil an Mastzellen auf, die auf Grund dessen ohne geeignete Anfärbung nur schlecht von anderen Zellpopulationen des Knochenmarks differenziert werden können. Mastozytose-Zellen exprimieren im Gegensatz zu normalen Mastzellen typischerweise den Oberflächenmarker CD25, so dass die Detektion der Mastozytose-Zellen durch eine Färbung der Zellen mit dem monoklonalen Antikörpern CD25 (siehe 3.4.2) durchgeführt wurde [125]. Annähernd wurde die zytotoxische Potenz von Crenolanib durch Messung der Reduktion der CD25 positiven Mastozytose-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

Es zeigte sich eine deutliche dosisabhängige Reduktion der gegateten Blasten unter Therapie mit Crenolanib gegenüber der unbehandelten Kontrollprobe (*Abbildung 4.11 (A)*). Außerdem erwiesen sich die (physiologischen) mononukleären CD25 negativen Zellpopulationen als deutlich weniger sensitiv gegenüber der Behandlung mit Crenolanib, was ebenfalls für einen gezielten, Mutations-spezifischen Effekt von Crenolanib spricht.

Darüber hinaus zeigte sich wie für die Zelllinie Ba/F3 *KIT*D816V (*siehe Abbildung 4.9 und 4.10*), dass auch die nativen Mastozytose-Zellen gegenüber Crenolanib eine deutlich höhere Sensitivität als gegenüber Dasatinib aufweisen (*Abbildung 4.11 (B)*).

Abbildung 4.11



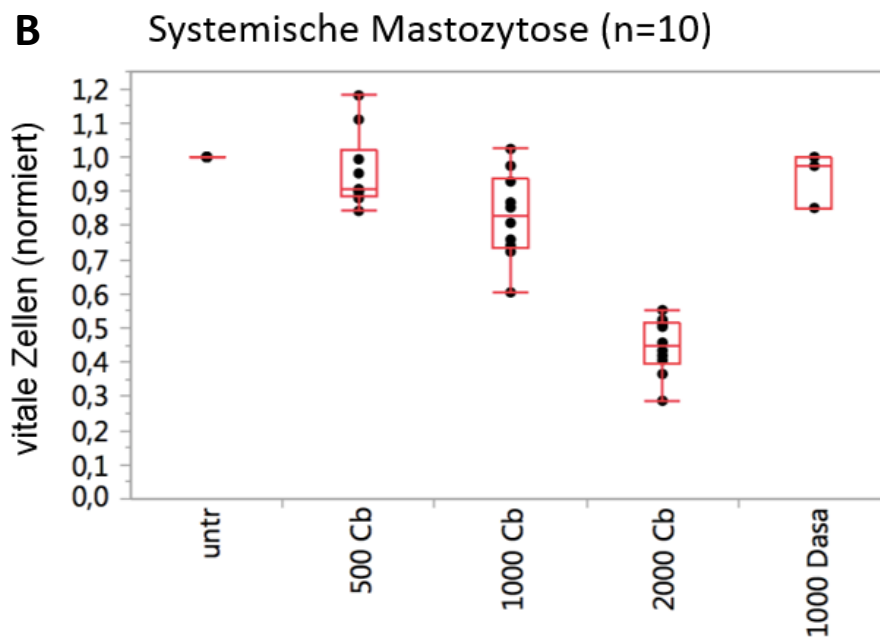


Abbildung 4.11 Crenolanib reduziert dosisabhängig die Anzahl vitaler, *ex vivo* behandelter Mastozytose-Zellen. Die am Beispiel einer Patientenprobe im FSC/SSC-Gate erfassten CD25 positiven Mastozytose-Zellen werden durch die 48-stündige Behandlung mit Crenolanib deutlich dosisabhängig reduziert. Die Verifizierung der gefärbten Mastozytose-Zellen erfolgte mit Hilfe einer unbehandelten, IgG-gefärbten Kontrollprobe **(A)**. Darstellung der Zellreduktion nativer Mastozytose-Zellen unter Therapie mit Crenolanib (Cb, nM) und Dasatinib (nM) in einem Box-Whisker-Plot **(B)**. Alle erhobenen Patienten zeigten durchschnittlich eine IC50 bei einer Behandlung mit ca. 2000nM Crenolanib (48h). Unter Therapie mit Crenolanib wurde außerdem eine höhere Reduktion der vitalen, *ex vivo* behandelten Mastozytose-Zellen erreicht als unter Dasatinib. **(B)**

4.8 Crenolanib reduziert native, vitale CBF-Leukämiezellen (*ex vivo*)

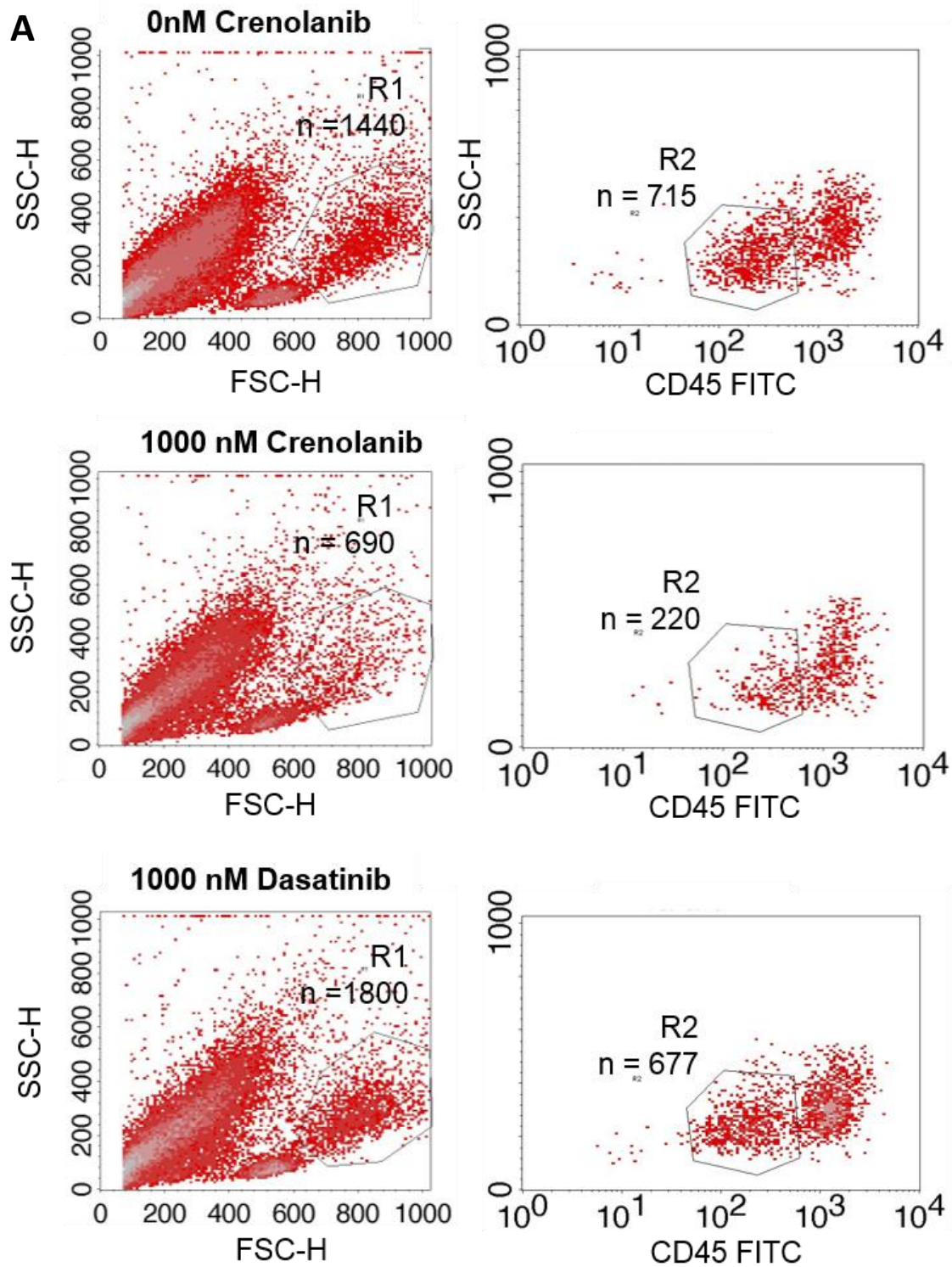
Native CBF Leukämiezellen von 24 Patienten, davon 12 Patienten mit CBF AML, *KIT* WT und 12 Patienten mit CBF AML, *KIT* D816V, wurden *ex vivo* für 48h mit Crenolanib behandelt und anschließend wie in *Punkt 3.4.2* beschrieben mit dem Antikörper CD45 (PE) angefärbt, der typischerweise an den auf hämatopoetischen Stammzellen exprimierten Oberflächenmarker CD45 bindet. Im nächsten Schritt wurde die Reduktion der vitalen, typischerweise gering CD45 positiven leukämischen Blasten in einem FSC/SSC basierten Viabilitätsassay durchflusszytometrisch erfasst. Es wurde ein Gate um die Blastenpopulation gesetzt und die Reduktion der vitalen Zellen innerhalb des Gates ermittelt.

Für *KIT* D816V positive Patientenproben konnte unter Crenolanib-Therapie eine bessere Reduktion der vitalen Blasten erzielt werden als für Proben, die *KIT* Wildtyp exprimieren.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die antileukämische Wirksamkeit von Crenolanib auch für *ex vivo* behandelte CBF-Leukämiezellen höher ist als von Dasatinib. Unter Therapie mit Dasatinib konnte bis 1000nM keine Zellreduktion beobachtet werden. Die Blasten zeigten aber ein deutliches Ansprechen auf Crenolanib. Unter Behandlung mit 1000nM Crenolanib konnte bereits eine Zellreduktion >50 % erreicht werden.

Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse der *ex vivo* behandelten Proben von Patienten mit Systemischer Mastozytose und CBF AML die auf Grund der *in vitro* Daten aufgestellten Hypothese, dass besonders Patienten mit *KIT* D816-Mutation von einer Therapie mit Crenolanib profitieren könnten.

Abbildung 4.12



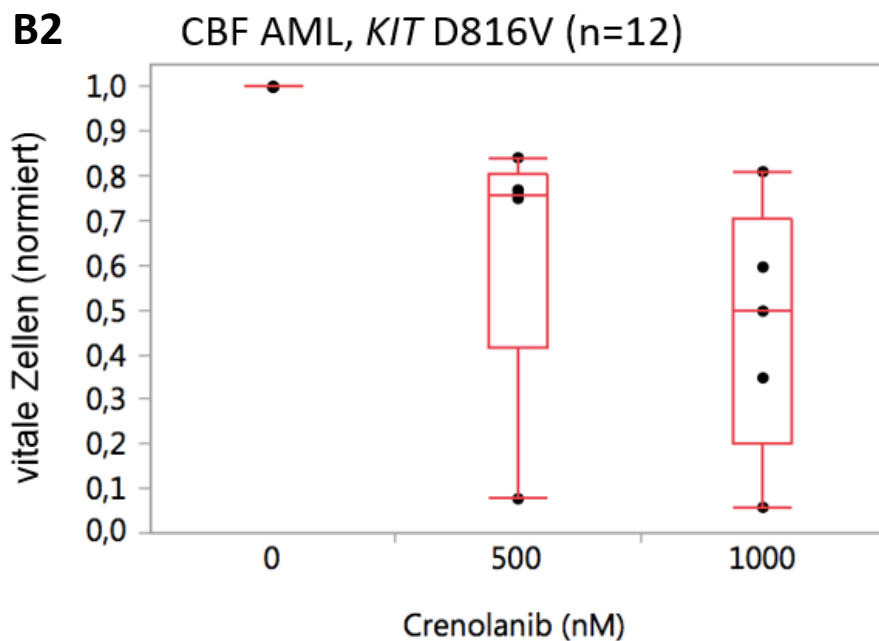
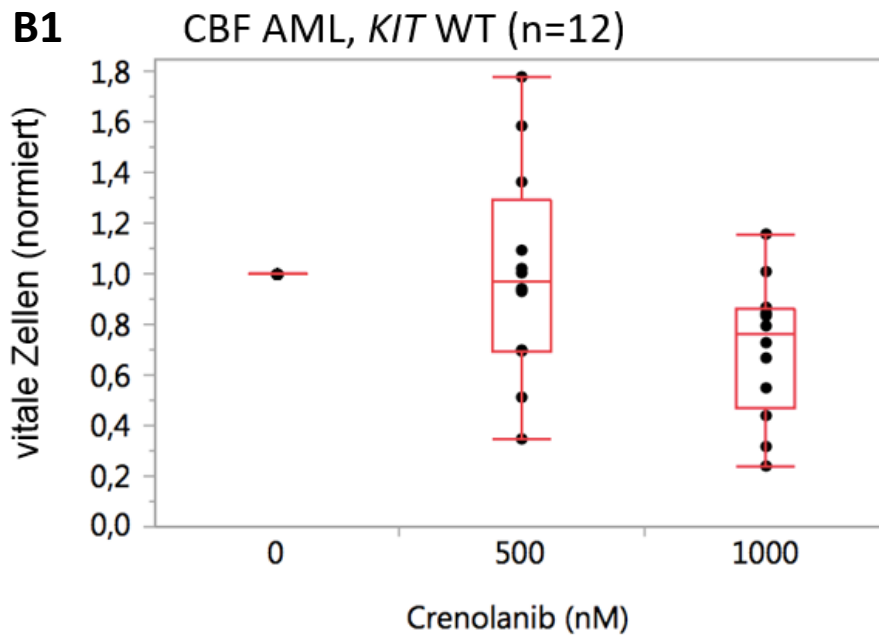


Abbildung 4.12 Crenolanib reduziert dosisabhängig die Anzahl vitaler, ex vivo behandelter CBF-Leukämiezellen. Durch die 48-stündige Behandlung mit Crenolanib werden die im FSC/SSC-Gate erfassten gering CD45-positiven vitalen CBF-Leukämiezellen dosisabhängig reduziert. Die Verifizierung der gefärbten CBF-Blasten erfolgte mit Hilfe einer unbehandelten, IgG-gefärbten Kontrollprobe. Unter Therapie mit Crenolanib wurde außerdem eine höhere Reduktion der vitalen, ex vivo behandelten Leukämiezellen erreicht als unter Dasatinib (A). Darstellung der Reduktion vitaler Blasten von Patienten mit *KIT* WT oder *KIT* D816V positiver

CFB-Leukämie unter Therapie mit Crenolanib in einem Box-Whisker-Plot. *KIT*-mutierte CBF AML (**B1**) zeigten sich sensibler gegenüber Crenolanib als CBF AML, die *KIT*WT exprimieren (**B2**).

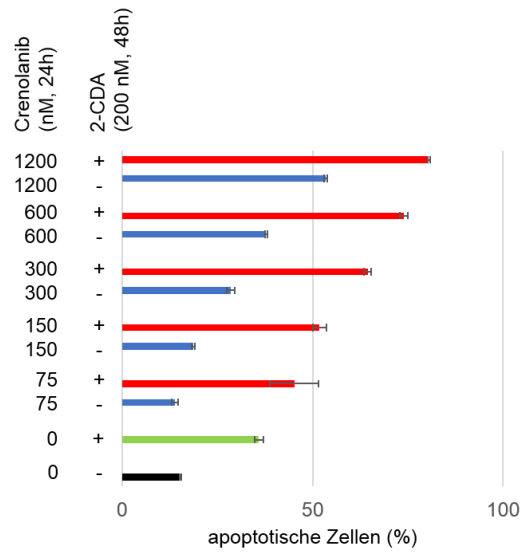
4.9 (Super)additiver Effekt der Kombination aus Crenolanib und Cladribin in Mastozytose-Zelllinien

Die Mastozytose-Zelllinien HMC1.2 und p815 wurden zu definierten Zeitpunkten mit Crenolanib und/oder Cladribin behandelt (*siehe Tabelle 3.1*) und die erzielten Apoptoseraten mittels Annexin/PI-Assay durchflusszytometrisch ermittelt.

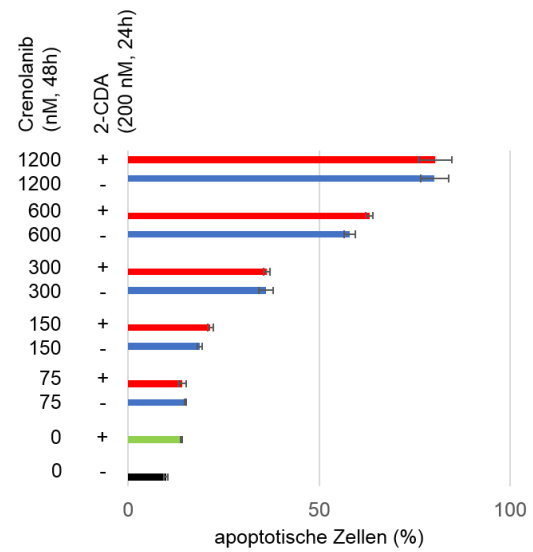
Die Zelllinien p815 (*KIT* D814Y Mutation, entspricht der humanen *KIT* D816Y Mutation) und HMC1.2 (*KIT* V560G Mutation mit zusätzlicher *KIT* D816V Mutation) zeigten unter Kombinationstherapie mit Crenolanib und Cladribin verglichen mit den jeweiligen Substanzen als Monotherapie, einen additiven Effekt. Unter Kombinationstherapie konnte für beide untersuchten Zelllinien verglichen mit den Monosubstanzen eine erhöhte Apoptoseinduktion beobachtet werden. Die Kombination aus Crenolanib und Cladribin wurde sequentiell zu unterschiedlichen Zeitpunkten, sowie mit verschiedenen Konzentrationen der Einzelsubstanzen durchgeführt. Der additive Effekt zeigte sich am deutlichsten, wenn die Zellen zuerst für 24h mit Cladribin vorbehandelt wurden und Crenolanib anschließend für weitere 24h hinzugefügt wurde. Dies sollte in die Überlegungen zur Planung klinischer Studien mit einbezogen werden.

Abbildung 4.13

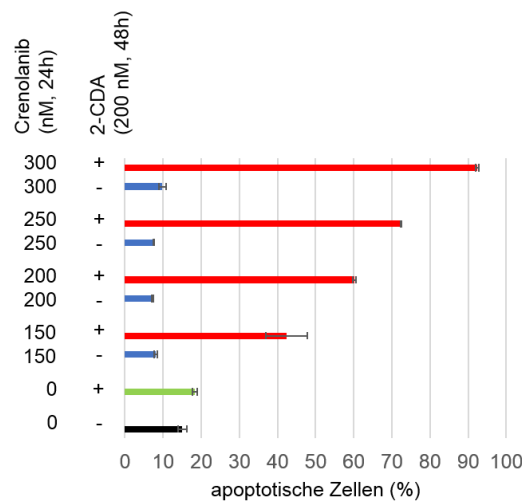
A HMC1.2 – 2-CDA 48h, Crenolanib 24h



B HMC1.2 – Crenolanib 48h, 2-CDA 24h



C p815 – 2-CDA 48h, Crenolanib 24h



D p815 – Crenolanib 48h, 2-CDA 24h

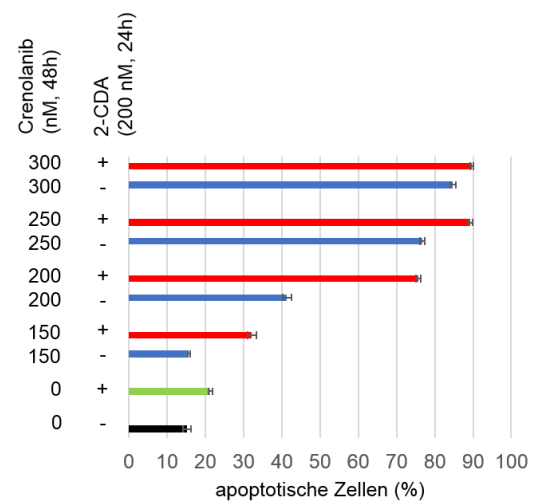


Abbildung 4.13 Apoptoseinduktion in HMC1.2- und p815-Zellen unter Kombinationstherapie mit Crenolanib und 200nM Cladribin. Die Kombination aus Crenolanib und Cladribin zeigt in den Zelllinien HMC1.2 (**A+B**) und p815 (**C+D**) einen (super)additiven Effekt. Der beste additive Effekt dieser beiden Substanzen konnte erzielt werden, wenn die Zellen bereits 24h mit Cladribin behandelt wurden, bevor für weitere 24h Crenolanib hinzugegeben wurde (**A+C**). Die Kombination Crenolanib 0-48h + Cladribin 24-48h (**B+D**) erwies sich sowohl bezüglich des (super)additiven Effekts als auch der erzielten Gesamtapoptoserate der Kombination als weniger effektiv. Die Messdaten wurden mit Hilfe eines Annexin-V/PI-basierten Assays am Durchflusszytometer erhoben.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die schwer therapierbare *KIT* D816V Mutation gegenüber Cladribin sensitiviert und eine Kombination aus Crenolanib und Cladribin bei *KIT* D816V positiven (Beispiel: HMC1.2), ebenso wie bei *KIT* D816Y positiven (Beispiel: p815) Systemischen Mastozytosen empfehlenswert zu sein scheint.

4.10 (Super)Additiver Effekt der Kombination aus Crenolanib und Cladribin in *ex vivo* behandelten Systemischen Mastozytosen

Native Mastozytose-Zellen wurden zunächst für 24h mit Cladribin behandelt und anschließend weitere 24h einer Kombinationsbehandlung aus Crenolanib und Cladribin ausgesetzt. Die Zellen wurden mit dem monoklonalen Antikörper CD25 gefärbt, um die Mastozytose-Zellen im nächsten Schritt durchflusszytometrisch bestimmen zu können.

Der *in vitro* beobachtete additive Effekt von Crenolanib und Cladribin bei Systemischer Mastozytose mit *KIT* D816V Mutation lässt sich auch in *ex vivo* Versuchen reproduzieren. Ebenso wie bei den untersuchten Mastozytose-Zelllinien HMC1.2 und p815 zeigte sich auch bei den *ex vivo* therapierten nativen Mastozytose-Zellen ein mindestens additiver Effekt dieser Kombination.

Abbildung 4.14

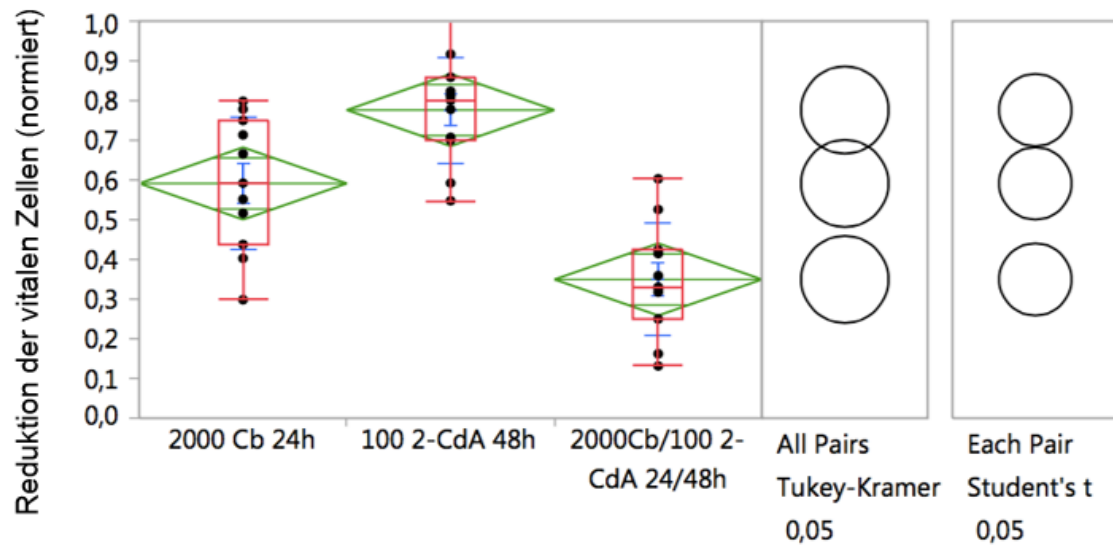


Abbildung 4.14 Kombinationsbehandlung aus Crenolanib und Cladribin in *ex vivo* Systemischer Mastozytose. Die Anzahl vitaler, *ex vivo* behandelter Mastozytose-Zellen konnte durch die Kombinationsbehandlung aus Crenolanib (24h) und Cladribin (48h) effektiv gesenkt werden. Es zeigte sich ein additiver Effekt der beiden eingesetzten Substanzen. Die Verifizierung der gefärbten Mastozytose-Zellen erfolgte mit Hilfe einer unbehandelten, IgG-gefärbten Kontrollprobe. Darstellung der Kombinationstherapie von Patientenproben mit *KIT*-mutierter Systemischer Mastozytose in einem Box-Whisker-Plot. Die Reduktion der CD25+ vitalen Mastozytosezellpopulation wurde durchflusszytometrisch erfasst. Der signifikante Vorteil einer Kombinationstherapie mit Crenolanib und Cladribin gegenüber der Monotherapie wurde mit Hilfe des Tukey Kramer und des Student's t-Test nachgewiesen.

Patient	Anzahl vitaler Zellen			
	Unb	Cb, 2000nM (24h)	2-CdA, 100nM (48)	Cb, 2000nM (24h) / 2-CdA, 100nM (48h)
636	470	95	248	96
640	1161	696	935	596
664	1458	364	1082	174
698	2422	1547	2254	1205
742	651	351	594	224
792	820	492	752	363
800	3552	1316	1345	1133
806	1090	766	847	455
808	1692	881	1414	510
869	940	453	790	344

Tabelle 4.1 Reduktion der vitalen Zellen ex vivo behandelter Systemischer Mastozytosen unter Therapie mit Crenolanib (24h), Cladribin (48h) und der Kombination aus beiden Substanzen. Die Kombinationsbehandlung mit Crenolanib und Cladribin erwies sich für 9 von 10 erhobenen Patienten als effektiv. Nachdem die Zellen mit einem CD25 Antikörper markiert wurden, erfolgte die durchflusszytometrische Erhebung der Messdaten.

5 Diskussion

Autoaktivierte Tyrosinkinase sind häufig an der Entstehung verschiedenster maligner Neoplasien, wie auch der AML oder der systemischen Mastozytose beteiligt. Die gezielte Inhibition mutierter Rezeptortyrosinkinase durch Tyrosinkinase-Inhibitoren stellt für viele Erkrankungen eine vielversprechende Therapieoption dar. Für die Behandlung Akuter Leukämien konnten im Zuge intensiver Forschung einige Tyrosinkinase-Inhibitoren entwickelt werden, die sich bereits in mehreren Studien in klinischer Erprobung befinden. Auch in der Therapie der KIT-assoziierten Systemischen Mastozytosen gewinnen Tyrosinkinase-Inhibitoren, die gezielt die mutierte RTK KIT hemmen, zunehmend an Bedeutung. Inhibitoren gegen mutierte ABL-1-, FLT3-, PDGFR- oder KIT-Rezeptortyrosinkinase, die unter anderem auch mit Akuten Myeloischen Leukämien oder Systemischer Mastozytose assoziiert sind, werden in klinischen Studien untersucht (clinicaltrials.gov): Sorafenib (z.B. AML: *NCT02530476*, *NCT02196857*, *NCT00217646*, *NCT00373373*), Sunitinib (z.B. AML: *NCT00783653*), Dasatinib (z.B. CBF-AML: *NCT00850382*; SM: *NCT00979160*; Ph+ALL: *NCT00103701*, *NCT00940524*), Imatinib (z.B. AML: *NCT00707408*, *NCT00744081*; activated RTKs/various tumors: *NCT00171912*, Mastocytosis/HES: *NCT00038675*), Lestaurtinib (z.B. AML: *NCT00030186*, *NCT00079482*), Tandutinib (z.B. AML: *NCT00064584*, *NCT00274248*), Semaxanib (z.B. AML: *NCT00005942*), Quizartinib (z.B. AML: *NCT01565668*, *NCT02039726*, *NCT01390337*) Masitinib (z.B. SM: *NCT00814073*), Nilotinib (z.B. AML: *NCT01222143*; SM/HES: *NCT00109707*) und Midostaurin (z.B. SM/Mastzell-Leukämie: *NCT00233454*)

Crenolanib, ein 4-Piperidinamin, 1-[2-[5-[(3-Methyl-3-oxetanyl) methoxy]-1H-benzimidazol-1-yl]- 8-quinoliny]-, monobenzenesulfonat, ist ein neuer, oraler Klasse-III-Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor der zweiten Generation. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zeigte Crenolanib erfolgversprechende Aktivität gegenüber Akuten Myeloischen Leukämien mit *FLT3*-Wildtyp oder mutierten *FLT3*-Isoformen [75, 76, 81] und wird aktuell in weiteren klinischen Studien für *FLT3*-

assoziierte Akute Myeloische Leukämien sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit Standardchemotherapeutika untersucht. (NCT01522469, NCT01522469, NCT02400281, NCT01657682, NCT02283177, NCT02400255).

Crenolanib besitzt Typ I TKI - Eigenschaften und bindet somit an die aktive, phosphorylierte Form einer RTK, während Typ II TKI wie Imatinib, Sorafenib und Quizartinib an die inaktive RTK-Konformation binden [75-77]. Bestimmte Mutationen in der Aktivierungsschleife einer Rezeptortyrosinkinase wie bspw. an *FLT3* D835, *PDGFR* D842 und *KIT* D816 führen zu einer Destabilisierung der inaktiven Rezeptorkonformation, so dass der Rezeptor Wachstumsfaktor-unabhängig dauerhaft in aktivierter Konformation vorliegt. Folglich kommt es zur dauerhaften Apoptosehemmung und überschießenden Proliferation, die eine maligne Transformation des betroffenen Gewebes auslösen können [4, 13, 76]. Im Falle einer durch dauerhafte Aktivierung eines Rezeptors ausgelösten malignen Erkrankung ist die Therapie mit Typ I TKI wie Crenolanib von Vorteil, da diese an die aktivierte Rezeptorkonformation binden können, wohingegen einige Typ II TKI wie bspw. Imatinib auf Grund von fehlenden Bindungsmöglichkeiten an den aktivierten Rezeptor nur unzureichend zu einer Hemmung der onkogenen Signaltransduktion führen.

Des Weiteren hemmen viele der aktuell in klinischen Studien getesteten TKIs mehrere Kinasen, sowie KIT Wildtyp, wodurch das Risiko für nicht zielgerichtete Effekte und unerwünschte Nebenwirkungen wie bspw. schwere Knochenmarksdepression erhöht wird [126]. Crenolanib ist hingegen ein sehr selektiver Tyrosinkinase-Inhibitor und weist eine geringere Wirksamkeit gegenüber KIT Wildtyp auf [76].

In einer Phase-I-Studie erwies sich Crenolanib als gut tolerierbar und zeigte ein akzeptables Sicherheitsprofil. Die überwiegend gute Verträglichkeit von Crenolanib bestätigen auch die ersten veröffentlichten Ergebnisse einer Phase-II-Studie an Patienten mit rezidivierender oder therapierefraktärer *FLT3* positiver Akuter Myeloischer Leukämie. Behandlungsbedingte Nebenwirkungen, die bei mindestens 5% der Studienteilnehmer auftraten, waren Übelkeit, Erbrechen,

Diarrhö, abdominelle Schmerzen, Kraftlosigkeit, reversibel erhöhte Leberenzyme (AP, γ -GT, AST, ALT), Kopfschmerzen, Geschmacksstörungen, Anorexie, Verdauungsstörungen, Ödeme (periorbital, peripher), Dehydratation, Elektrolytverschiebungen (Hyponatriämie, Hyperkaliämie), Hyperglykämie, Schwindel, Kreatininanstieg, hämatologische Blutbildveränderungen, orale Candidose und Hautausschlag. Die häufigsten therapiebedingten Nebenwirkungen waren Übelkeit, Erbrechen und Diarrhö. Als Dosis-limitierende Toxizitäten erwiesen sich vor allem die gastrointestinalen Beschwerden, sowie erhöhte ALT, Hämaturie oder Schlaflosigkeit. Die meisten der unter Therapie aufgetretenen unerwünschten Wirkungen wie unter anderem hämatologische Blutbildveränderungen entsprachen dem Schweregrad 1 oder 2. Nebenwirkungen vom Schweregrad 3 oder 4 waren sehr selten und beinhalteten Übelkeit und Erbrechen oder Laborveränderungen wie Hyponatriämie, Hyperkaliämie, Hyperglykämie und γ -GT- oder Kreatininanstieg. Durch begleitende antiemetische Prophylaxe mit 5HT3-Rezeptorantagonisten konnte die häufig aufgetretene ausgeprägte Übelkeit jedoch nahezu komplett unterdrückt werden [79-81].

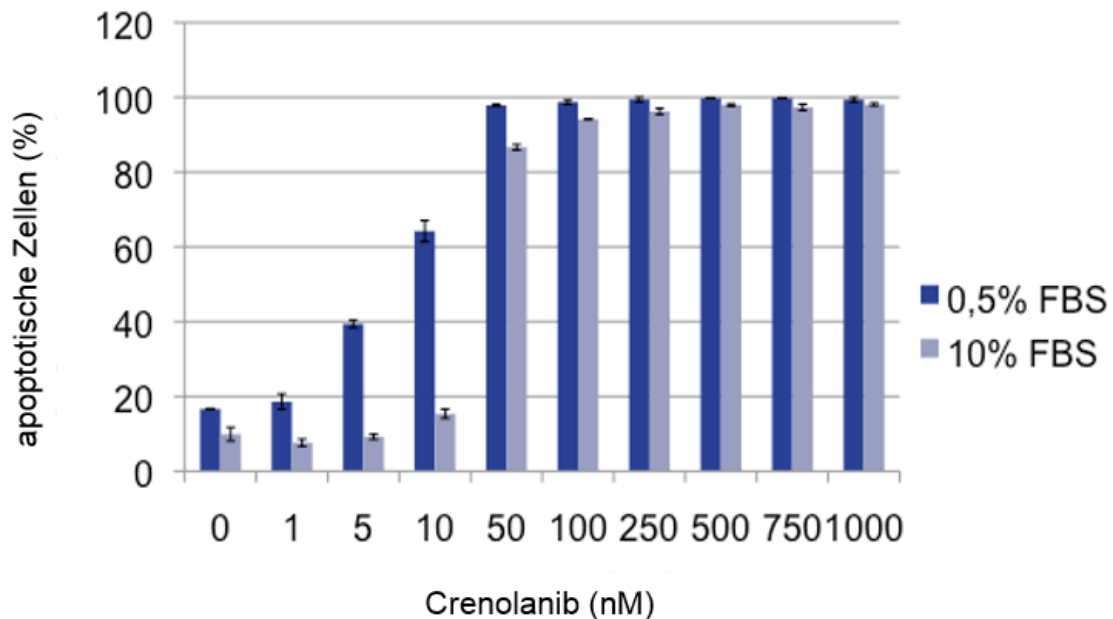
Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen nun, dass Crenolanib nicht nur wie bereits bekannt, ein potenter Inhibitor für mutierte FLT3- und PDGFR-Rezeptortyrosinkinasen ist [76], sondern auch zu einer potenten Inhibition von Gain-of-function Mutationen in KIT-Rezeptortyrosinkinasen führt. Entscheidend ist hervorzuheben, dass sich auch die KIT D816 Isoform sensitiv gegenüber Crenolanib zeigte. Da diese Mutation in fast allen Fällen der Systemischen Mastozytose zu Grunde liegt [24], stellt Crenolanib möglicherweise in Zukunft eine vielversprechende Therapieoption für Patienten mit diagnostizierter Mastozytose dar. Darüber hinaus exprimieren ca. 30% aller Patienten mit CBF-Leukämien eine *KIT*-Mutation [127], so dass auch Patienten mit einer *KIT*-positiven CBF-Leukämie von einer Therapie mit Crenolanib profitieren könnten. Obwohl Crenolanib deutlich potenter mutierte FLT3-Isoformen als KIT-Isoformen inhibieren kann [76], sind die zur KIT-Inhibition erforderlichen IC₅₀ ebenfalls in einem klinischen Setting anwendbar. In *ex vivo* durchgeführten Versuchen

zeigten sich vor allem die nativen, *KIT* D816 positiven Mastozytose-Zellen sensitiv gegenüber Crenolanib. Darüber hinaus stützen die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse des Plasmainhibitionstests (*siehe Punkt 4.5*) die Hypothese, dass die zur gezielten Inhibition von *KIT* D816-Isoformen benötigten Crenolanib-Konzentrationen auch *in vivo* erreichbar sind.

Allerdings ist festzuhalten, dass die IC50 zur Reduktion der nativen Mastozytose-Zellen deutlich höher lagen, als im zuvor erstellten Modell mit *KIT*-mutierten Mastozytose-Zelllinien.

Diese Tatsache könnte einerseits durch zusätzliche, für Mastozytose-Zellen spezifische Effekte wie beispielsweise weitere Mutationen erklärt werden, die die Signaltransduktion oder die Sensitivität gegenüber Crenolanib modulieren. Andererseits müssen zur Erklärung dieser Diskrepanz zwischen *in vitro* und *ex vivo* Ergebnissen auch der Methodik geschuldete Aspekte in Betracht gezogen werden. Da die nativen Zellen in den *ex vivo* Versuchen in 20% FBS, die Zelllinien jedoch standardmäßig nur in 10% FBS kultiviert wurden, ist es wahrscheinlich, dass Crenolanib im Kulturmedium mit höherem Proteinanteil (20% FBS) stärker durch Proteine gebunden wurde als im Zellkulturmedium (nur 10% FBS), wodurch die Bioverfügbarkeit der Substanz verringert wurde. Um dieser Hypothese Nachdruck zu verleihen, wurden in einem ergänzenden Versuch Ba/F3 *FLT3* ITD – Zellen, die bekannterweise sehr sensitiv auf Crenolanib reagieren (*siehe Abbildung 2.7 A*), sowohl in Serum-reichem (10% FBS) als auch in Serum-armem (0,5% FBS) Medium unter ansonsten identischen Bedingungen kultiviert und jeweils mit einer Crenolanib-Verdünnungsreihe behandelt. Wie erwartet bestätigte sich die Annahme, dass die Zellen im Serum-armen Milieu (0,5%FBS) sensitiver gegenüber Crenolanib reagierten, als im Serum-reichen Milieu (10% FBS).

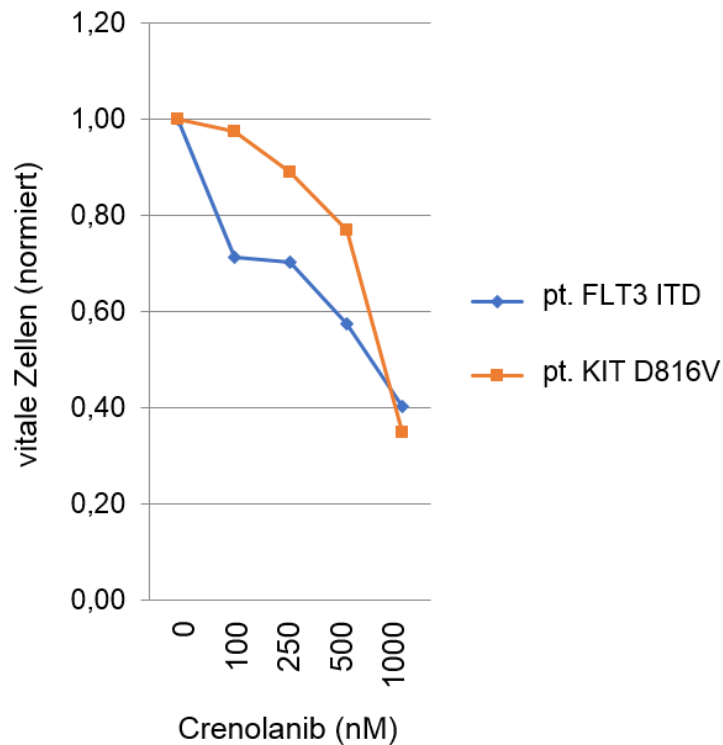
Ergänzende Abbildung 5.1



Ergänzende Abbildung 5.1 Die Sensitivität gegenüber Crenolanib unter verschiedenen Kulturbedingungen. Ba/F3 *FLT3* ITD Zellen wurden in Zellkulturmedium mit 0,5%FBS bzw. 10%FBS kultiviert und unter ansonsten identischen Bedingungen mit einer Crenolanib-Verdünnungsreihe behandelt.

Darüber hinaus wurden die Blasten eines Patienten mit *FLT3* ITD-Mutation, sowie die Blasten eines Patienten mit *KIT* D816V Mutation *ex vivo* unter gleichen Bedingungen mit Crenolanib behandelt. Beide Patientenproben waren sensitiv gegenüber Crenolanib, jedoch zeigten sich auch in diesem Fall die benötigten IC50 ungefähr 10fach höher, als die zuvor durchgeführten *in vitro* Versuche mit *FLT3*-ITD bzw. *KIT* D816V positiven Zelllinien erwarten ließen. Da *Zimmermann et al* bereits zeigen konnte, dass Crenolanib in klinischen Studien zu einer gezielten und potenten *FLT3* ITD Inhibition führt [75], scheint diese Beobachtung ein weiterer Hinweis darauf zu sein, dass die Abweichungen der IC50 in den *ex vivo* Versuchen mit *KIT* D816 mutierten Patientenproben im Vergleich zu den Zellmodell-Experimenten verfahrensbedingt sind.

Ergänzende Abbildung 5.2



Ergänzende Abbildung 5.2 Native *FLT3* ITD–bzw. *KIT* D816V-positive Blasten unter Therapie mit Crenolanib.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die in Versuchen zur proapoptotischen Kapazität von Crenolanib erzielten IC50 sowohl *in vitro* im Zelllinienmodell als auch *ex vivo* in nativen mononukleären Blasten eines *KIT*-AML Patienten den Ergebnissen des *KIT*-Inhibitors Dasatinib überlegen sind. Der *KIT*-Inhibitor Dasatinib wird bereits in klinischen Studien für Patienten mit CBF AML erprobt. Leider konnten die erfolgversprechenden präklinischen Daten von Dasatinib im klinischen Rahmen in der Monotherapie nicht ausreichend bestätigt werden [24]. Crenolanib weist, verglichen mit anderen TKI, erfreulicherweise ein ausgezeichnetes pharmakokinetisches Profil auf, wodurch Crenolanib möglicherweise auch *in vivo* bessere Resultate als bspw. Dasatinib erzielen könnte [82].

Eine Anwendung von Crenolanib könnte darüber hinaus auch für einige solide Tumoren wie bspw. GIST, Keimzelltumoren oder Maligne Melanome, die

ebenfalls eine *KIT* Gain-of-function Mutation exprimieren, interessant sein [12]. Die sehr gute Pharmakokinetik von Crenolanib und die dadurch erwartete hohe Plasmakonzentration [79] könnten im Rahmen der Therapie großer, solider Tumoren, die nur noch vermindert antineoplastische Substanzen aufnehmen, einen Vorteil darstellen. Die Sensitivitätsprofile weiterer mutierter *KIT*-Isoformen für Crenolanib, die in diesen Tumoren häufig auftreten, sollten auf Grund dessen in weiteren Studien ermittelt werden.

Trotz guter Ergebnisse in *in vitro* Modellen wurden auch bei Mastozytose-Zellen in klinischen Studien Therapieresistenzen gegenüber *KIT*-Inhibitoren beobachtet [46-48]. Obwohl die genauen Mechanismen der Resistenzbildung noch nicht ausreichend verstanden sind, stellt die pharmakokinetische Überlegenheit von Crenolanib gegenüber vergleichbaren Substanzen einen Vorteil dar und lässt auf bessere klinische Erfolge hoffen. Darüber hinaus kann versucht werden, die Therapieresistenz durch kombinierte Anwendung mehrerer Substanzen zu minimieren.

Die in dieser Arbeit eingesetzte Substanzkombination aus Crenolanib und dem bereits standardmäßig zur Therapie Systemischer Mastozytosen eingesetzten Cladribin (2-CdA) erwies sich als vielversprechend. Sowohl im Zellmodell mit verschiedenen Mastozytose-Zelllinien als auch in nativen Mastozytose-Zellen wurden (super)additive Effekte von Crenolanib und Cladribin beobachtet. Für bessere additive Effekte war es von Vorteil, die Zellen zunächst mit einer Cladribin-Monotherapie und anschließend mit der Kombination aus beiden Substanzen zu behandeln.

Bemerkenswerterweise scheint auch die *KIT* D816V Mutation, die gegenüber vielen TKI eine Resistenz aufweist, Mastozytose-Zellen gegenüber einer Behandlung mit Cladribin und Crenolanib zu sensibilisieren. In Anbetracht der Tatsache, dass Systemische Mastozytosen zu über 90% diese Mutation exprimieren, könnte diese Beobachtung für die klinische Anwendung dieser Substanzkombination in der Therapie Systemischer Mastozytosen von entscheidender Bedeutung sein.

Da sich die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zum möglichen Benefit einer Kombinationstherapie aus Crenolanib und Cladribin ausschließlich auf die

Behandlung von Mastozytose-Zellen beschränken, bleibt die Frage offen, ob auch andere Neoplasien mit *KIT* D816V-Mutation von einer Kombination aus Crenolanib und Cladribin profitieren würden. Hierzu zählen bspw. Akute Myeloische Leukämien (<5%), die beim Vorliegen einer *KIT* D816V Mutation mit einer ungünstigen Prognose und schlechtem Therapieansprechen einhergehen. *KIT* D816V Mutationen treten außerdem seltener in Keimzelltumoren (10%-20%) und in GIST (< 1%) auf [61, 128]. Hier sind jedoch Zelltyp-spezifische, weiterführende Untersuchungen notwendig.

6 Zusammenfassung:

Crenolanib ist ein neuer, oraler Klasse-III-RTK-Inhibitor, der sich für Neoplasien mit Mutationen der RTK FLT3 oder PDGFR in verschiedenen Studien bereits erfolgreich in klinischer Erprobung befindet.

In dieser Arbeit wird die Wirkung des TKI Crenolanib auf autoaktive Isoformen der Klasse-III-RTK KIT untersucht, die vorwiegend bei Systemischer Mastozytose und CBF Leukämie auftreten.

Hierzu wurden zunächst *in vitro* und *ex vivo* Versuche zur Proliferationsinhibition und Apoptoseinduktion mit Crenolanib an Zelllinien und nativen Zellen mit mutierter KIT-Isoform durchgeführt. Zusätzlich zu diesen Versuchen auf zellbiologischer Ebene wurde die „Target-Spezifität“ von Crenolanib hinsichtlich KIT-Inhibition auf Proteinebene mittels Western Blot untersucht. Darüber hinaus wurde die Wirksamkeit von Crenolanib gegenüber der schwer therapierbaren *KIT*D816V Mutation im Vergleich zu dem nachgewiesenermaßen potenten KIT-Inhibitor Dasatinib getestet. In weiteren *in vitro* und *ex vivo* Versuchen wurde zudem der Effekt einer Kombinationstherapie mit Crenolanib und dem bereits in der Therapie Systemischer Mastozytosen und Akuter Myeloischer Leukämien eingesetzten Zytostatikum Cladribin untersucht.

Die vielversprechenden Ergebnisse der durchgeführten Experimente zeigen, dass klinisch anwendbare Crenolanib-Konzentrationen zu einer gezielten Inhibition mutierter KIT-Isoformen führen, die sich zum Teil gegenüber anderen Tyrosinkinase-Inhibitoren als resistent erwiesen haben und mit einem schlechten Therapieansprechen und Outcome der betroffenen Patienten assoziiert sind.

Es empfiehlt sich somit auf Grund der Ergebnisse dieser Arbeit, den Einsatz von Crenolanib bei Systemischer Mastozytose sowie Akuter Leukämie mit einer *KIT* Gain-of-function Mutation in künftige klinische Studienkonzepte einzubeziehen.

Des Weiteren scheint die Kombination aus Crenolanib und Cladribin ein vielversprechendes Vorgehen in der Behandlung der Systemischen Mastozytose zu sein und sollte ebenfalls im klinischen Setting weiterführend untersucht werden.

7 Abkürzungsverzeichnis

2-CdA	2-Chlor-2'-desoxyadenosin, Cladribin
AKT	Proteinkinase B (PKB)
CBF AML	Core binding factor Leukämie
Cb	Crenolanib (1-[2-[5-[(3-Methyl-3-oxetanyl) methoxy]-1H-benzimidazol-1-yl]-8-quinoliny]-, monobenzenesulfonate)
DMEM	Dulbecco'smodified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FACS	Fluorescence-activated cell scanning
FBS	Fetal bovine serum
FLT3	Fms like tyrosine kinase 3
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration
ITD	Interne Tandem-Duplikation
KIT	KIT Rezeptortyrosinkinase
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
PDGFR	Platelet derived growth factor receptor
RPMI	RPMI-1640 Medium
SCFR	Mast/stem cell growth factor receptor
SM	Systemische Mastozytose
STAT	Signal transducer and activator of Transcription
TKD	Tyrosinkinase-Domäne

TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
XTT	2,3 – bis (2 – methoxy – 4 – nitro – 5 – sulfophenyl) – 5 - [(phenylamino)carbonyl] - 2H - tetrazolium hydroxide

8 Literaturverzeichnis

1. Lemmon, M.A. and J. Schlessinger, *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. Cell, 2010. **141**(7): p. 1117-34.
2. Reilly, J.T., *Class III receptor tyrosine kinases: role in leukaemogenesis*. Br J Haematol, 2002. **116**(4): p. 744-57.
3. Robinson, D.R., Y.M. Wu, and S.F. Lin, *The protein tyrosine kinase family of the human genome*. Oncogene, 2000. **19**(49): p. 5548-57.
4. Zwick, E., J. Bange, and A. Ullrich, *Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies*. Endocr Relat Cancer, 2001. **8**(3): p. 161-73.
5. Trempat, P., et al., *Chronic myeloproliferative disorders with rearrangement of the platelet-derived growth factor alpha receptor: a new clinical target for STI571/Imatinib*. Oncogene, 2003. **22**(36): p. 5702-5706.
6. Ullrich, A. and J. Schlessinger, *Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity*. Cell, 1990. **61**(2): p. 203-12.
7. Yarden, Y., et al., *Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand*. EMBO J, 1987. **6**(11): p. 3341-51.
8. Andre, C., et al., *Sequence analysis of two genomic regions containing the KIT and the FMS receptor tyrosine kinase genes*. Genomics, 1997. **39**(2): p. 216-26.
9. Zsebo, K.M., et al., *Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor*. Cell, 1990. **63**(1): p. 213-24.
10. Edling, C.E. and B. Hallberg, *c-Kit - A hematopoietic cell essential receptor tyrosine kinase*. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2007. **39**(11): p. 1995-1998.
11. Roskoski, R., *Structure and regulation of Kit protein-tyrosine kinase - The stem cell factor receptor*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005. **338**(3): p. 1307-1315.
12. Ronnstrand, L., *Signal transduction via the stem cell factor receptor/c-Kit*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2004. **61**(19-20): p. 2535-2548.
13. Kitamura, Y. and S. Hirotaka, *Kit as a human oncogenic tyrosine kinase*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2004. **61**(23): p. 2924-2931.
14. Berenstein, R., *Class III Receptor Tyrosine Kinases in Acute Leukemia - Biological Functions and Modern Laboratory Analysis*. Biomarker Insights, 2015. **10**: p. 1-14.
15. Dirnhofer, Z., Went, *Die diagnostische und prädiktive Bedeutung von Kit (CD117)* Therapeutische Umschau, 2006. **63**(4): p. 273-278.
16. Valent, P., et al., *Induction of differentiation of human mast cells from bone marrow and peripheral blood mononuclear cells by recombinant human stem cell factor/kit-ligand in long-term culture*. Blood, 1992. **80**(9): p. 2237-45.
17. Yong, L.C., *The mast cell: origin, morphology, distribution, and function*. Exp Toxicol Pathol, 1997. **49**(6): p. 409-24.
18. Krishnaswamy, G., et al., *The human mast cell: functions in physiology and disease*. Front Biosci, 2001. **6**: p. D1109-27.

19. Hartmann, K. and B.M. Henz, *Mastocytosis: recent advances in defining the disease*. Br J Dermatol, 2001. **144**(4): p. 682-95.
20. Longley, B.J., Jr., et al., *Activating and dominant inactivating c-KIT catalytic domain mutations in distinct clinical forms of human mastocytosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(4): p. 1609-14.
21. Pardanani, A., *Systemic mastocytosis in adults: 2013 update on diagnosis, risk stratification, and management*. Am J Hematol, 2013. **88**(7): p. 612-24.
22. Valent, P., et al., *Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: a consensus proposal*. Leuk Res, 2001. **25**(7): p. 603-25.
23. Ryan, R.J., et al., *Mast cell sarcoma: a rare and potentially under-recognized diagnostic entity with specific therapeutic implications*. Mod Pathol, 2013. **26**(4): p. 533-43.
24. Verstovsek, S., et al., *Phase II study of dasatinib in Philadelphia chromosome-negative acute and chronic myeloid diseases, including systemic mastocytosis*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(12): p. 3906-15.
25. Hennessy, B., et al., *Management of patients with systemic mastocytosis: Review of M. D. Anderson cancer center experience*. American Journal of Hematology, 2004. **77**(3): p. 209-214.
26. Garcia-Montero, A.C., et al., *KIT mutation in mast cells and other bone marrow hematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders: a prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients*. Blood, 2006. **108**(7): p. 2366-2372.
27. Pardanani, A., et al., *CHIC2 deletion, a surrogate for FIP1L1-PDGFR α fusion, occurs in systemic mastocytosis associated with eosinophilia and predicts response to imatinib mesylate therapy*. Blood, 2003. **102**(9): p. 3093-3096.
28. Horny, H.P., et al., *Mastocytosis*. Deutsches Arzteblatt International, 2008. **105**(40): p. 686-U21.
29. Jennings, S., et al., *The Mastocytosis Society survey on mast cell disorders: patient experiences and perceptions*. J Allergy Clin Immunol Pract, 2014. **2**(1): p. 70-6.
30. Jensen, R.T., *Gastrointestinal abnormalities and involvement in systemic mastocytosis*. Hematology-Oncology Clinics of North America, 2000. **14**(3): p. 579-+.
31. Castells, M. and K.F. Austen, *Mastocytosis: Mediator-related signs and symptoms*. International Archives of Allergy and Immunology, 2002. **127**(2): p. 147-152.
32. van der Veer, E., et al., *High prevalence of fractures and osteoporosis in patients with indolent systemic mastocytosis*. Allergy, 2012. **67**(3): p. 431-438.
33. Kushnir-Sukhov, N.M., et al., *Elevated tryptase levels are associated with greater bone density in a cohort of patients with mastocytosis*. International Archives of Allergy and Immunology, 2006. **139**(3): p. 265-270.
34. Moura, D.S., et al., *Neuropsychological Features of Adult Mastocytosis*. Immunology and Allergy Clinics of North America, 2014. **34**(2): p. 407-+.

35. Lim, K.H., et al., *Systemic mastocytosis in 342 consecutive adults: survival studies and prognostic factors*. *Blood*, 2009. **113**(23): p. 5727-5736.
36. Tolar, J., W.D. Tope, and J.P. Neglia, *Leukotriene-receptor inhibition for the treatment of systemic mastocytosis*. *New England Journal of Medicine*, 2004. **350**(7): p. 735-736.
37. Lim, K.H., et al., *Cytoreductive therapy in 108 adults with systemic mastocytosis: Outcome analysis and response prediction during treatment with interferon-alpha, hydroxyurea, imatinib mesylate or 2-chlorodeoxyadenosine*. *American Journal of Hematology*, 2009. **84**(12): p. 790-794.
38. Akin, C. and D.D. Metcalfe, *The biology of Kit in disease and the application of pharmacogenetics*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2004. **114**(1): p. 13-19.
39. Akin, C., et al., *Effects of tyrosine kinase inhibitor STI571 on human mast cells bearing wild-type or mutated c-kit*. *Experimental Hematology*, 2003. **31**(8): p. 686-692.
40. Akin, C., et al., *A novel form of mastocytosis associated with a transmembrane c-kit mutation and response to imatinib*. *Blood*, 2004. **103**(8): p. 3222-3225.
41. Vega-Ruiz, A., et al., *Phase II study of imatinib mesylate as therapy for patients with systemic mastocytosis*. *Leukemia Research*, 2009. **33**(11): p. 1481-1484.
42. Pardanani, A., et al., *Imatinib for systemic mast-cell disease*. *Lancet*, 2003. **362**(9383): p. 535-537.
43. Droogendijk, H.J., et al., *Imatinib mesylate in the treatment of systemic mastocytosis - A phase II trial*. *Cancer*, 2006. **107**(2): p. 345-351.
44. Gotlib, J., et al., *Midostaurin (PKC412) Demonstrates a High Rate of Durable Responses in Patients with Advanced Systemic Mastocytosis: Results from the Fully Accrued Global Phase 2 CPKC412D2201 Trial*. *Blood*, 2014. **124**(21).
45. Gotlib, J., et al., *Efficacy and Safety of Midostaurin in Advanced Systemic Mastocytosis*. *New England Journal of Medicine*, 2016. **374**(26): p. 2530-2541.
46. Paul, C., et al., *Masitinib for the treatment of systemic and cutaneous mastocytosis with handicap: A phase 2a study*. *American Journal of Hematology*, 2010. **85**(12): p. 921-925.
47. Hochhaus, A., et al., *Nilotinib in patients with systemic mastocytosis: analysis of the phase 2, open-label, single-arm nilotinib registration study*. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2015. **141**(11): p. 2047-2060.
48. Aichberger, K.J., et al., *Treatment responses to cladribine and dasatinib in rapidly progressing aggressive mastocytosis*. *European Journal of Clinical Investigation*, 2008. **38**(11): p. 869-873.
49. Zentrum für Krebsregisterdaten des RKI. *Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2014*. 2017 06.12.2017 [cited 2018 1.11.]; Available from:

- https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/krebsarten_no_de.html.
50. Zentrum für Krebsregisterdaten des RKI. *Leukämien*. 2017 06.12.2017 [cited 2018 01.11.]; Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Leukaemien/leukaemien_inhalt.html.
 51. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer Statistics, 2016*. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians*, 2016. **66**(1): p. 7-30.
 52. Lowenberg, B., J.R. Downing, and A. Burnett, *Medical progress - Acute myeloid leukemia*. *New England Journal of Medicine*, 1999. **341**(14): p. 1051-1062.
 53. Swerdlow, S.H., et al., *The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms*. *Blood*, 2016. **127**(20): p. 2375-2390.
 54. 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.
 55. 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.
 56. Paschka, P. and K. Dohner, *Core-binding factor acute myeloid leukemia: can we improve on HiDAC consolidation?* *Hematology-American Society of Hematology Education Program*, 2013: p. 209-219.
 57. Sangle, N.A. and S.L. Perkins, *Core-Binding Factor Acute Myeloid Leukemia*. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 2011. **135**(11): p. 1504-1509.
 58. Schmid, C., et al., *Outcome of patients with distinct molecular genotypes and cytogenetically normal AML after allogeneic transplantation*. *Blood*, 2015. **126**(17): p. 2062-2069.
 59. Whitman, S.P., et al., *FLT3 internal tandem duplication associates with adverse outcome and gene- and microRNA-expression signatures in patients 60 years of age or older with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study*. *Blood*, 2010. **116**(18): p. 3622-3626.
 60. Kayser, S., et al., *Insertion of FLT3 internal tandem duplication in the tyrosine kinase domain-1 is associated with resistance to chemotherapy and inferior outcome*. *Blood*, 2009. **114**(12): p. 2386-2392.
 61. Schnittger, S., et al., *KIT-D816 mutations in AML1-ETO-positive AML are associated with impaired event-free and overall survival*. *Blood*, 2006. **107**(5): p. 1791-1799.
 62. Paschka, P., et al., *Adverse prognostic significance of KIT mutations in adult acute myeloid leukemia with inv(16) and t(8;21): A Cancer and Leukemia Group B study*. *Journal of Clinical Oncology*, 2006. **24**(24): p. 3904-3911.
 63. Lowenberg, B., et al., *High-Dose Daunorubicin in Older Patients with Acute Myeloid Leukemia*. *New England Journal of Medicine*, 2009. **361**(13): p. 1235-1248.
 64. Burnett, A.K., et al., *The impact of dose escalation and resistance modulation in older patients with acute myeloid leukaemia and high risk*

- myelodysplastic syndrome: the results of the LRF AML14 trial*. British Journal of Haematology, 2009. **145**(3): p. 318-332.
65. Teuffel, O., et al., *Anthracyclines during induction therapy in acute myeloid leukaemia: a systematic review and meta-analysis*. British Journal of Haematology, 2013. **161**(2): p. 192-203.
 66. Crump, M., et al., *A randomized phase I clinical and biologic study of two schedules of sorafenib in patients with myelodysplastic syndrome or acute myeloid leukemia: a NCIC (National Cancer Institute of Canada) Clinical Trials Group Study*. Leukemia & Lymphoma, 2010. **51**(2): p. 252-260.
 67. Ravandi, F., et al., *Phase I/II Study of Combination Therapy With Sorafenib, Idarubicin, and Cytarabine in Younger Patients With Acute Myeloid Leukemia*. Journal of Clinical Oncology, 2010. **28**(11): p. 1856-1862.
 68. Fiedler, W., et al., *A phase 2 clinical study of SU5416 in patients with refractory acute myeloid leukemia*. Blood, 2003. **102**(8): p. 2763-2767.
 69. Fiedler, W., et al., *A phase 1 study of SU11248 in the treatment of patients with refractory or resistant acute myeloid leukemia (AML) or not amenable to conventional therapy for the disease*. Blood, 2005. **105**(3): p. 986-993.
 70. Fischer, T., et al., *Phase IIB Trial of Oral Midostaurin (PKC412), the FMS-Like Tyrosine Kinase 3 Receptor (FLT3) and Multi-Targeted Kinase Inhibitor, in Patients With Acute Myeloid Leukemia and High-Risk Myelodysplastic Syndrome With Either Wild-Type or Mutated FLT3*. Journal of Clinical Oncology, 2010. **28**(28): p. 4339-4345.
 71. Knapper, S., et al., *A phase 2 trial of the FLT3 inhibitor lestaurtinib (CEP701) as first-line treatment for older patients with acute myeloid leukemia not considered fit for intensive chemotherapy*. Blood, 2006. **108**(10): p. 3262-3270.
 72. Levis, M., et al., *Results from a randomized trial of salvage chemotherapy followed by lestaurtinib for patients with FLT3 mutant AML in first relapse*. Blood, 2011. **117**(12): p. 3294-3301.
 73. Cortes, J.E., et al., *Phase I Study of Quizartinib Administered Daily to Patients With Relapsed or Refractory Acute Myeloid Leukemia Irrespective of FMS-Like Tyrosine Kinase 3-Internal Tandem Duplication Status*. Journal of Clinical Oncology, 2013. **31**(29): p. 3681-+.
 74. Kasamon, Y.L., et al., *FDA Approval Summary: Midostaurin for the Treatment of Advanced Systemic Mastocytosis*. Oncologist, 2018.
 75. Zimmerman, E.I., et al., *Crenolanib is active against models of drug-resistant FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia*. Blood, 2013. **122**(22): p. 3607-3615.
 76. Smith, C.C., et al., *Crenolanib is a selective type I pan-FLT3 inhibitor*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014. **111**(14): p. 5319-5324.
 77. Hojjat-Farsangi, M., *Small-Molecule Inhibitors of the Receptor Tyrosine Kinases: Promising Tools for Targeted Cancer Therapies*. International Journal of Molecular Sciences, 2014. **15**(8): p. 13768-13801.

78. US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov Crenolanib*. 2018 05.07.2018 [cited 2018 28.10.]; Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=Crenolanib&Search=Search>.
79. Lewis, N.L., et al., *Phase I Study of the Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of Oral CP-868,596, a Highly Specific Platelet-Derived Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor in Patients With Advanced Cancers*. *Journal of Clinical Oncology*, 2009. **27**(31): p. 5262-5269.
80. Michael, M., et al., *Phase Ib study of CP-868,596, a PDGFR inhibitor, combined with docetaxel with or without axitinib, a VEGFR inhibitor*. *British Journal of Cancer*, 2010. **103**(10): p. 1554-1561.
81. Randhawa, J.K., et al., *Results of a Phase II Study of Crenolanib in Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia Patients (Pts) with Activating FLT3 Mutations*. *Blood*, 2014. **124**(21).
82. Kampa-Schittenhelm, K.M., et al., *Quizartinib (AC220) is a potent second generation class III tyrosine kinase inhibitor that displays a distinct inhibition profile against mutant-FLT3, -PDGFRA and -KIT isoforms*. *Molecular Cancer*, 2013. **12**.
83. Heinrich, M.C., et al., *Crenolanib Inhibits the Drug-Resistant PDGFRA D842V Mutation Associated with Imatinib-Resistant Gastrointestinal Stromal Tumors*. *Clinical Cancer Research*, 2012. **18**(16): p. 4375-4384.
84. Galanis, A., et al., *Crenolanib is a potent inhibitor of FLT3 with activity against resistance-conferring point mutants*. *Blood*, 2014. **123**(1): p. 94-100.
85. Nagar, B., et al., *Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571)*. *Cancer Res*, 2002. **62**(15): p. 4236-43.
86. Kreitman, R.J. and E. Arons, *Update on hairy cell leukemia*. *Clin Adv Hematol Oncol*, 2018. **16**(3): p. 205-215.
87. Wierzbowska, A., et al., *Cladribine combined with high doses of arabinoside cytosine, mitoxantrone, and G-CSF (CLAG-M) is a highly effective salvage regimen in patients with refractory and relapsed acute myeloid leukemia of the poor risk: a final report of the Polish Adult Leukemia Group*. *European Journal of Haematology*, 2008. **80**(2): p. 115-126.
88. Robak, T., *Purine nucleoside analogues in the treatment of myeloid leukemias*. *Leukemia & Lymphoma*, 2003. **44**(3): p. 391-409.
89. Tefferi, A., et al., *Treatment of systemic mast-cell disease with cladribine*. *New England Journal of Medicine*, 2001. **344**(4): p. 307-309.
90. Tefferi, A., *Treatment of systemic mast cell disease: beyond interferon*. *Leukemia Research*, 2004. **28**(3): p. 223-224.
91. Kluin-Nelemans, H.C., et al., *Cladribine therapy for systemic mastocytosis*. *Blood*, 2003. **102**(13): p. 4270-4276.
92. Pardanani, A., *How I treat patients with indolent and smoldering mastocytosis (rare conditions but difficult to manage)*. *Blood*, 2013. **121**(16): p. 3085-3094.

93. Valent, P., *Mastocytosis: a paradigmatic example of a rare disease with complex biology and pathology*. American Journal of Cancer Research, 2013. **3**(2): p. 159-172.
94. Leibniz Institut DSMZ. *Cell line p-815*. 2018 [cited 2018 28.10.]; Available from: [https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-1.html?tx_dsmzresources_pi5\[returnPid\]=192](https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-1.html?tx_dsmzresources_pi5[returnPid]=192).
95. Tsujimura, T., et al., *Ligand-Independent Activation of C-Kit Receptor Tyrosine Kinase in a Murine Mastocytoma Cell-Line P-815 Generated by a Point Mutation*. Blood, 1994. **83**(9): p. 2619-2626.
96. Chan, I.J., S. Kasproicz, and M.D. Tharp, *Distinct signalling pathways for mutated KIT(V560G) and KIT(D816V) in mastocytosis*. Clinical and Experimental Dermatology, 2013. **38**(5): p. 538-544.
97. Cools, J., et al., *The EOL-1 cell line as an in vitro model for the study of FIP1L1-PDGFR α -positive chronic eosinophilic leukemia*. Blood, 2004. **103**(7): p. 2802-2805.
98. Saito, H., et al., *Establishment and Characterization of a New Human Eosinophilic Leukemia-Cell Line*. Blood, 1985. **66**(6): p. 1233-1240.
99. Leibniz Institut DSMZ. *Cell line MOLM-14*. 2018 [cited 2018 28.10.]; Available from: <https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-777.html>.
100. Quentmeier, H., et al., *FLT3 mutations in acute myeloid leukemia cell lines*. Leukemia, 2003. **17**(1): p. 120-124.
101. Leibniz Institut DSMZ. *Cell line BA/F3*. 2018 [cited 2018 28.10.]; Available from: <https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-300.html>.
102. Dalton, W.T., et al., *HI-60 Cell-Line Was Derived from a Patient with Fab-M2 and Not Fab-M3*. Blood, 1988. **71**(1): p. 242-247.
103. Schneider, U., H.U. Schwenk, and G. Bornkamm, *Characterization of Ebv-Genome Negative Null and T-Cell Lines Derived from Children with Acute Lymphoblastic Leukemia and Leukemic Transformed Non-Hodgkin Lymphoma*. International Journal of Cancer, 1977. **19**(5): p. 621-626.
104. Lozzio, C.B. and B.B. Lozzio, *Human Chronic Myelogenous Leukemia Cell-Line with Positive Philadelphia Chromosome*. Blood, 1975. **45**(3): p. 321-334.
105. Drexler, H.G., *Leukemia-Cell Lines - in-Vitro Models for the Study of Chronic Myeloid-Leukemia*. Leukemia Research, 1994. **18**(12): p. 919-&.
106. Boyum, A., *Isolation of Mononuclear Cells and Granulocytes from Human Blood - Isolation of Mononuclear Cells by One Centrifugation and of Granulocytes by Combining Centrifugation and Sedimentation at L G*. Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation, 1968. **S 21**: p. 77-&.
107. GE Healthcare. *Isolation of mononuclear cells - Methodology and applications*. 08/2010 [cited 2018 28.10.]; Available from: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/General_Information/1/ge-isolation-of-mononuclear-cells.pdf.
108. Levis, M., et al., *Plasma inhibitory activity (PIA): a pharmacodynamic assay reveals insights into the basis for cytotoxic response to FLT3 inhibitors*. Blood, 2006. **108**(10): p. 3477-3483.

109. Rothe, G., *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. 2007, KARGER. 27-70.
110. BD Biosciences. *BD FACSCalibur Instructions For Use*. 2007 11/2007 [cited 2018 28.10.]; Available from: https://www.bdbiosciences.com/documents/BD_FACSCalibur_instructions.pdf.
111. 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.
112. Vermes, I., et al., *A Novel Assay for Apoptosis - Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on Early Apoptotic Cells Using Fluorescein-Labeled Annexin-V*. Journal of Immunological Methods, 1995. **184**(1): p. 39-51.
113. Rieger, A.M., et al., *Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death*. Jove-Journal of Visualized Experiments, 2011(50).
114. Scudiero, D.A., et al., *Evaluation of a Soluble Tetrazolium Formazan Assay for Cell-Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor-Cell Lines*. Cancer Research, 1988. **48**(17): p. 4827-4833.
115. AppliChem GmbH. *Cell Proliferation Assay XTT*. 2010 09/2010 [cited 2018 28.10.]; Available from: https://www.applichem.com/fileadmin/Application_Notes/Applications_No12_XTT_Cell_Proliferation_150dpi_100915_e.pdf.
116. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
117. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
118. Smith, B.J., *Acetic Acid-urea polyacrylamide gel electrophoresis of proteins*. Methods Mol Biol, 1984. **1**: p. 63-73.
119. Thermo Fisher Scientific. *PageRuler*. 2018 [cited 2018 28.10.]; Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/26619>.
120. O'Hare, T., et al., *Inhibition of wild-type and mutant Bcr-Abl by AP23464, a potent ATP-based oncogenic protein kinase inhibitor: implications for CML*. Blood, 2004. **104**(8): p. 2532-2539.
121. Schittenhelm, M.M., et al., *Dasatinib (BMS-354825), a dual SRC/ABL kinase inhibitor, inhibits the kinase activity of wild-type, juxtamembrane, and activation loop mutant KIT isoforms associated with human malignancies*. Cancer Res, 2006. **66**(1): p. 473-81.
122. Schittenhelm, M.M., et al., *FLT3 K663Q is a novel AML-associated oncogenic kinase: determination of biochemical properties and sensitivity to Sunitinib (SU11248)*. Leukemia, 2006. **20**(11): p. 2008-2014.
123. Shah, N.P., et al., *Dasatinib (BMS-354825) inhibits KITD816V, an imatinib-resistant activating mutation that triggers neoplastic growth in most patients with systemic mastocytosis*. Blood, 2006. **108**(1): p. 286-291.
124. Deutsches Leukämie Studienregister. *Dasatinib in patients with newly diagnosed Core-Binding Factor AML*. 2018 09.11.2015 [cited 2018

28.10.]; Available from: <https://www.leukemia-net.org/trial/detail.html?id=550>.

125. Sotlar, K., et al., *CD25 indicates the neoplastic phenotype of mast cells - A novel immunohistochemical marker for the diagnosis of systemic mastocytosis (SM) in routinely processed bone marrow biopsy specimens*. American Journal of Surgical Pathology, 2004. **28**(10): p. 1319-1325.
126. Galanis, A. and M. Levis, *Inhibition of c-Kit by tyrosine kinase inhibitors*. Haematologica, 2015. **100**(3): p. E77-E79.
127. Lim, K.H., A. Pardanani, and A. Tefferi, *KIT and mastocytosis*. Acta Haematologica, 2008. **119**(4): p. 194-198.
128. Valent, P., et al., *Standards and standardization in mastocytosis: Consensus statements on diagnostics, treatment recommendations and response criteria*. European Journal of Clinical Investigation, 2007. **37**(6): p. 435-453.

9 Erklärung zum Eigenanteil

Ich erkläre hiermit,

1. dass ich bisher keine Promotions- oder entsprechende Prüfungsverfahren abgebrochen oder abgeschlossen habe.

2. dass die vorgelegte Dissertation noch nie ganz oder teilweise als Dissertation oder sonstige Prüfungsarbeit eingereicht worden ist.

3. dass ich die zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel „*Die Wirkung des Tyrosinkinase-Inhibitors Crenolanib auf autoaktive Isoformen der Rezeptortyrosinkinase KIT*“ selbstständig erarbeitet und verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet habe. Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Abgabe einer Versicherung an Eides statt mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft wird.

4. dass ich bisher weder strafrechtlich verurteilt, noch Disziplinarmaßnahmen und anhängigen Straf- und Disziplinarverfahren unterzogen worden bin.

Stuttgart, den

.....

(Unterschrift)

Danksagung

Nach einigen Jahren intensiver Arbeit im Labor und am Schreibtisch freue ich mich sehr, meine Dissertationsschrift in den Händen zu halten und möchte mich bei all den Menschen bedanken, die mich auf dem langen, herausfordernden aber auch sehr lehrreichen und lohnenden Weg begleitet haben.

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater PD Dr. Marcus M. Schittenhelm und meiner Betreuerin Dr. Kerstin M. Kampa-Schittenhelm für die wissenschaftliche und methodische Unterstützung während der gesamten Bearbeitungszeit meiner Promotion. Neben den zahlreichen Hilfestellungen und Ratschlägen in fachlicher Hinsicht möchte ich mich vor allem für die angenehme Zusammenarbeit bedanken.

Darüber hinaus habe ich den freundschaftlichen und respektvollen Umgang in unserem Labor, sowie den konstruktiven Austausch von neuen Ideen und Aspekten sehr geschätzt. Hierfür möchte ich mich auch herzlich bei meinen Mitdotorandinnen Natalie Haug und Mihada Bajrami und den MTAs Figen Akmut und Barbara Illing bedanken.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere meiner Mutter Silke, meinem Freund Jan und meinem Bruder Yannick für unzählige motivierende, stärkende und aufbauende Gespräche und die Fürsorge, den Rückhalt und die Unterstützung jeglicher Art während meines gesamten Studiums.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei meinen Großeltern, die ganz selbstverständlich immer an mich glauben und ein offenes Ohr für meine Sorgen und Freuden haben.