

Die kombinierte Inhibierung des Hedgehog- und FLT3-Signalwegs als therapeutische Zielstruktur zur Behandlung der akuten myeloischen Leukämie

Dissertation

zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften

im Fachbereich Biologie

der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

der Universität Hamburg

vorgelegt von

Emily-Marie Latuske

aus Hamburg

Hamburg 2018

1. Gutachter: Prof. Dr. Walter Fiedler
2. Gutachter: Prof. Dr. Julia Kehr

Tag der Disputation: 14. Dezember 2018

Widmung

All den Mäusen.

Zusammenfassung

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine maligne Erkrankung des hämatopoetischen Systems, bei welcher die genetische Transformation einer myeloiden Vorläuferzelle in deren Reifearettierung sowie massiver klonaler Vermehrung und letztlich Verdrängung der normalen Blutbildung des Patienten durch die leukämischen Blasten resultiert. Verbleibt die Erkrankung unbehandelt, führt sie innerhalb weniger Monate zum Tod des Patienten. Die Chemotherapie-basierte Standardtherapie der AML hat in den vergangenen Jahrzehnten keine maßgeblichen Veränderungen erfahren. Trotz anfänglich hoher Remissionsraten kommt es in einem Großteil der Patienten schlussendlich zu einem Rezidiv, sodass neue Therapieansätze dringend erforderlich sind. Derzeit werden zunehmend auf spezifische Mutationen und Signalnetzwerke zielgerichtete Therapien entwickelt.

Aktivierende Mutationen in der Rezeptor-Tyrosinkinase FLT3 (*fms-like tyrosine kinase 3*) stellen eine solche Zielstruktur dar. Sie treten bei etwa einem Drittel der AML-Patienten auf und gehen meist mit einer sehr schlechten Prognose aufgrund eines raschen Auftretens von Rezidiven einher. Für das Auftreten von Rezidiven werden therapieresistente Leukämienstammzellen (engl.: *leukemic stem cells*, LSCs) verantwortlich gemacht, sodass deren Eliminierung eine Prämisse für nachhaltige Therapieerfolge darstellt. Um auch die LSCs therapeutisch angreifen zu können, rücken zunehmend stammzellspezifische Signalwege als Zielstruktur in den Fokus der Forschung und Therapieentwicklung. Einen solchen Signalweg, mit Bedeutung für die Biologie und Therapieresistenz myeloider LSCs, stellt der Hedgehog(HH)-Signalweg mit seinen finalen Mediatoren, den *Glioma-associated oncogene homologue*(GLI)-Proteinen (GLI1-3), dar.

Ein dysregulierter HH-Signalweg ist in die Pathogenese verschiedener Krebsentitäten inklusive der AML involviert. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Akute Leukämien (Fiedler/Wellbrock) wurde ein negativer prognostischer Einfluss einer erhöhten *GLI2*- bzw. auch *GLI1*-Expression auf das Überleben von AML-Patienten sowie die Korrelation des negativen Einflusses von *GLI2* mit dem Auftreten von *FLT3*-Mutationen identifiziert. Zudem führte die therapeutische GLI1/2-Blockade mit dem kleinmolekularen Inhibitor

GANT61 zu anti-leukämischen *in vitro*-Effekten in AML-Zellen. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Spezifität von GANT61 mittels eines genetischen *Knockdowns* von *GLI1* und/oder *GLI2* in AML-Zellen *in vitro* sowie *in vivo* überprüft. Da bekannt ist, dass die FLT3-Signalweiterleitung über die Phosphatidylinositol-3-Kinase(PI3K)-Achse verläuft und durch Studien in verschiedenen Krebsentitäten bereits eine nicht-kanonische GLI1/2-Aktivierung über die PI3K-Kaskade identifiziert werden konnte, wurde anschließend eine potenzielle nicht-kanonische FLT3/PI3K/GLI1/2-Achse und deren kombinierte therapeutische Inhibierung in der AML analysiert.

Durch den gezielten shRNA-*Knockdown* der Gene *GLI1* bzw. *GLI2* wurden in AML-Zelllinien verstärkte anti-leukämische Effekte in funktionellen *in vitro*-Assays erzielt und der shRNA-Doppel*knockdown* von *GLI1* und *GLI2* in einer *FLT3*-mutierten AML-Zelllinie bewirkte einen signifikanten Überlebensvorteil der mit diesen Zellen transplantierten Mäuse im Vergleich zu mit Kontrollzellen transplantierten Tieren. Dadurch konnte zum einen die Spezifität von GANT61 als GLI1/2-Inhibitor in der AML verifiziert und zudem die Relevanz der Gene *GLI1* und *GLI2* für die Pathogenese einer *FLT3*-mutierten AML herausgestellt werden. Um eine potenzielle nicht-kanonische Aktivierung des HH-Signalwegs über FLT3 und PI3K zu untersuchen, wurden in Inhibitionsstudien, neben dem GLI1/2-Inhibitor GANT61, der FLT3-Inhibitor Sunitinib sowie der duale PI3K/*mammalian target of rapamycin*(mTOR)-Inhibitor PF-04691502 eingesetzt. Hierbei wurde der Effekt einer kombinierten Inhibierung auf verschiedene *in vitro*-Eigenschaften von *FLT3*-mutierten sowie *FLT3*-Wildtyp-AML-Zelllinien und primären Blasten analysiert und verglichen. Insgesamt bewirkte die kombinierte Inhibierung mit allen drei Inhibitoren in *FLT3*-mutierten AML-Zellen stärkere anti-leukämische Effekte als in *FLT3*-Wildtyp-AML-Zellen. Interessanterweise wurde die Koloniebildung von CD34⁺ hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen gesunder Spender, die als normale Kontrolle zu den leukämischen Blasten dienten, durch die Dreifachbehandlung mit allen Inhibitoren nicht verstärkt gehemmt. Dies eröffnet ein mögliches therapeutisches Fenster für die klinische Behandlung FLT3-mutierter AML-Patienten mit einer Kombination aus Inhibitoren der hier analysierten Signalwege. Zudem konnte in einem *FLT3*-mutierten AML-Xenograft-Mausmodell durch die kombinierte Behandlung mit Sunitinib, PF-04691502 und GANT61 das Überleben der Mäuse signifikant im Vergleich zu den Tieren, die die Lösungsmittelkontrolle oder die jeweiligen

Einzelbehandlungen erhielten, verlängert werden. Des Weiteren bewirkte die alleinige PI3K-Inhibierung sowie die kombinierte Inhibierung der potenziellen FLT3/PI3K/GLI1/2-Achse eine verringerte GLI1/2-Promotor-Aktivität in *FLT3*-mutierten AML-Zelllinien, nicht aber in *FLT3*-Wildtyp-AML-Zelllinien, wodurch die Existenz einer nicht-kanonischen GLI1/2-Aktivierung über FLT3/PI3K in *FLT3*-mutierter AML untermauert werden konnte. Eine vergleichende Behandlung der GLI1/2-Reporter-AML-Zelllinien mit GANT61 oder Cyclopamin – einem Inhibitor des kanonischen HH-Signalweg-Proteins *Smoothed* (SMO) – offenbarte, dass in den hier analysierten AML-Zelllinien der HH-Signalweg offenbar SMO-unabhängig und somit nicht-kanonisch aktiviert wird. Abschließend konnte – wiederum verstärkt in *FLT3*-mutierten AML-Zelllinien – eine nicht-kanonische GLI1-Regulierung über FLT3 auch auf Proteinebene im Western Blot angezeigt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen den Schluss zu, dass speziell in *FLT3*-mutierter AML eine nicht-kanonische FLT3/PI3K/GLI1/2-Kaskade mit pathophysiologischer Relevanz vorliegt und diese Achse eine aussichtsreiche therapeutische Zielstruktur zur nachhaltigen Behandlung insbesondere der schwer zu heilenden *FLT3*-mutierten AML darstellen könnte. Durch die Existenz nicht-kanonischer GLI-Aktivierung erscheint eine direkte GLI1/2-Inhibierung in Kombination mit effektiven FLT3- und PI3K-Inhibitoren sowie möglicherweise zusätzlich konventioneller Chemotherapie dabei als sinnvollster Behandlungsansatz. Somit stellt die Entwicklung spezifischer GLI1/2-Inhibitoren, die sicher in der Klinik eingesetzt werden können sowie die weitere klinische Erprobung potenziell geeigneter FLT3- und PI3K-Inhibitoren ein höchst wünschenswertes Ziel zukünftiger Studien dar.

Abstract

Acute myeloid leukemia (AML) is a malignant disease of the hematopoietic system, in which genetic transformation in a myeloid progenitor cell leads to its growth arrest as well as massive clonal expansion, and ultimately to repression of the patient's normal hematopoiesis by leukemic blasts. Left untreated, the disease results in death within a few months. Over the past decades, there have been no significant changes made to the standard chemotherapy-based approach for the treatment of AML. Despite initial high remission rates, the majority of the patients ultimately relapse. Therefore, there remains an urgent need for the development of new therapeutic options. Currently, strategies that target specific mutations or signaling networks are increasingly being researched.

Activating mutations in the receptor tyrosine kinase FLT3 (*fms-like tyrosine kinase 3*) are an example of such a target structure. They occur in approximately one third of AML patients and usually confer a poor prognosis due to the rapid rate of recurrence. Therapy-resistant leukemic stem cells (LSCs) are believed to be responsible for such relapses, making the eradication of the LSC population a prerequisite for sustained therapy success. In order to achieve this goal, therapeutic targeting of stem cell specific signaling is becoming an increasingly important focus of research and therapy development. The Hedgehog (HH) signaling pathway, along with its final mediators, the *glioma-associated oncogene homologue* (GLI) proteins (GLI1-3), plays a role in the biology and therapy resistance of myeloid LSCs, and represents one such signaling cascade.

A dysregulated version of the HH signaling pathway is involved in the pathogenesis of different cancer entities, including AML. In previous studies of the working group Acute Leukemia (Fiedler/Wellbrock), a negative prognostic impact of elevated *GLI2* and also *GLI1* expression on the survival of AML patients was identified, as well as a correlation of *GLI2*'s negative impact with the presence of *FLT3* mutations. Furthermore, the therapeutic GLI1/2 blockade with the small molecule inhibitor GANT61 led to anti-leukemic *in vitro* effects in AML cells. In the present thesis, at first, the specificity of GANT61 was examined *in vitro* as well as *in vivo* using a genetic knockdown approach of

GLI1 and/or *GLI2* in AML cells. Because it is known that FLT3 signals via the *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K) axis, and since a non-canonical *GLI1/2* activation via the PI3K cascade has already been identified in studies of different cancer entities, a potential non-canonical FLT3/PI3K/*GLI1/2* axis in AML and its combined therapeutic inhibition was subsequently analyzed.

Targeted shRNA knockdown of the genes *GLI1* or *GLI2* in AML cell lines led to increased anti-leukemic effects in functional *in vitro* assays, and the shRNA double-knockdown of *GLI1* and *GLI2* in a *FLT3*-mutated AML cell line caused a significant survival benefit of mice transplanted with these cells compared to animals transplanted with control cells. On the one hand, this verifies the specificity of GANT61 as a *GLI1/2* inhibitor in AML, and, on the other hand, it emphasizes the relevance of *GLI1* and *GLI2* genes for the pathogenesis of a *FLT3*-mutated AML. To analyze potential non-canonical activation of the HH signaling pathway via FLT3 and PI3K, in addition to the *GLI1/2* inhibitor GANT61, the FLT3 inhibitor sunitinib as well as the dual PI3K/*mammalian target of rapamycin* (mTOR) inhibitor PF-04691502 were utilized in blocking experiments. Here, the effect of combined inhibition on different *in vitro* properties of *FLT3*-mutated as well as *FLT3* wildtype AML cell lines and primary blasts was analyzed and compared. Overall, combined inhibition with all three inhibitors had stronger anti-leukemic effects in *FLT3*-mutated compared to *FLT3* wildtype AML cells. Interestingly, the colony growth of normal CD34⁺ hematopoietic stem and progenitor cells from healthy donors, which served as a healthy control to the leukemic blasts, did not exhibit increased inhibition by the triple inhibitor combination. This finding potentially opens a therapeutic window for the clinical treatment of *FLT3*-mutated AML with inhibitor combinations of the signaling pathways that were analyzed in the present thesis. Moreover, in a *FLT3*-mutated AML xenograft mouse model, combined treatment with sunitinib, PF-04691502, and GANT61 significantly prolonged the survival of mice compared to animals that received the solvent control or the single agent treatments. Furthermore, sole PI3K inhibition as well as combined inhibition of the potential FLT3/PI3K/*GLI1/2* axis reduced the activity of the *GLI1/2* promotor in *FLT3*-mutated AML cell lines, but not in *FLT3* wildtype cell lines, underscoring the existence of non-canonical *GLI1/2* activation via FLT3/PI3K in *FLT3*-mutated AML. A comparative treatment of *GLI1/2* reporter AML cell lines with GANT61 or cyclopamine – an inhibitor of the canonical HH signaling

protein *smoothened* (SMO) – revealed that the HH signaling pathway in the analyzed AML cell lines is apparently activated in a SMO-independent and therefore non-canonical way. Finally, a non-canonical regulation of GLI1 via FLT3 – again most pronounced in *FLT3*-mutated AML cell lines – was also demonstrated on the protein level in western blotting assays.

The results of the present thesis lead to the conclusion that a non-canonical FLT3/PI3K/GLI1/2 cascade with pathophysiological relevance exists in AML, especially in *FLT3*-mutated cases, and that this axis could represent a promising therapeutic target for a sustained treatment strategy, particularly for the hard-to-treat *FLT3*-mutated AML. On account of the existence of non-canonical GLI activation, direct GLI1/2 inhibition in combination with effective FLT3 and PI3K inhibitors, possibly in addition to conventional chemotherapy, appears to be the most reasonable therapeutic approach. Therefore, development of specific GLI1/2 inhibitors that can be safely transferred into clinical use, as well as further clinical testing of potentially suitable FLT3 and PI3K inhibitors, are highly desirable goals for future studies.

Inhaltsverzeichnis

Widmung	I
Zusammenfassung	II
Abstract	V
I Einleitung	13
1.1 Die akute myeloische Leukämie	13
1.1.1 Die Epidemiologie der AML	14
1.1.2 Die Ätiologie und Pathogenese der AML	14
1.1.3 Die Klassifikation und Prognose der AML	16
1.1.4 Die Rolle von FLT3 in der AML	19
1.1.5 Die Diagnose und Therapie der AML	24
1.2 Leukämienstammzellen	31
1.3 Der Hedgehog-Signalweg	34
1.3.1 Der kanonische Hedgehog-Signalweg	35
1.3.2 Der Hedgehog-Signalweg in der Hämatopoese	40
1.3.3 Der Hedgehog-Signalweg bei Krebserkrankungen	41
1.3.4 Der nicht-kanonische Hedgehog-Signalweg	43
1.3.5 Hedgehog-Inhibitoren	45
1.4 Zielsetzung der Arbeit	48
II Material und Methoden	51
2.1 Material	51
2.1.1 Geräte	51
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	53
2.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Zusätze	53
2.1.4 Kits und Enzyme	54
2.1.5 Medien	55
2.1.6 Puffer und Lösungen	56
2.1.7 DNA- und Protein-Größenstandards	58
2.1.8 <i>Short hairpin</i> RNAs (shRNAs)	58
2.1.9 Vektoren und Verpackungsplasmide	59
2.1.10 Primer	59
2.1.11 cDNA-Standards	60
2.1.12 Antikörper	60
2.1.13 Kleinmolekulare Inhibitoren	61
2.1.14 Software	62
2.2 Methoden	63

2.2.1 Zellbiologische Methoden.....	63
2.2.1.1 Zellkultur	63
2.2.1.1.1 Zelllinien	63
2.2.1.1.2 Primärmaterial	64
2.2.1.1.3 Kultivierung von Suspensionszellen und adhären-ten Zellen	66
2.2.1.1.4 Kryokonservierung und Lagerung von Zellen	66
2.2.1.1.5 Auftauen von Zellen	66
2.2.1.1.6 Zellzahlbestimmung	67
2.2.1.2 Lentivirale Transduktion von AML-Zelllinien und CD34 ⁺ hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen	67
2.2.1.3 Durchflusszytometrie	70
2.2.1.3.1 Durchflusszytometrische Charakterisierung von Zellen durch Oberflächenproteine	71
2.2.1.3.2 Durchflusszytometrische Analyse transduzierter Zellen	72
2.2.1.4 Proliferations-Assays.....	72
2.2.1.4.1 GM-CSF-Abhängigkeit der Zelllinie OCI-AML5	72
2.2.1.4.2 Effekt eines <i>GLI1</i> - oder <i>GLI2</i> -shRNA- <i>Knockdowns</i> auf die Proliferation von AML-Zelllinien	73
2.2.1.4.3 Effekt einer kombinierten Behandlung mit GANT61, Sunitinib und PF-04691502 auf die Proliferation von AML-Zelllinien und pAMLs.....	73
2.2.1.5 Apoptose-Assays	74
2.2.1.5.1 Effekt eines <i>GLI1</i> - oder <i>GLI2</i> -shRNA- <i>Knockdowns</i> auf die Apoptose-Induktion in AML-Zelllinien.....	75
2.2.1.5.2 Effekt einer kombinierten Behandlung mit GANT61, Sunitinib und PF-04691502 auf die Apoptose-Induktion in AML-Zelllinien.....	76
2.2.1.6 <i>Colony Formation</i> -Assays	76
2.2.1.6.1 Effekt eines <i>GLI1</i> - oder <i>GLI2</i> -shRNA- <i>Knockdowns</i> auf die Koloniebildung von AML-Zelllinien	76
2.2.1.6.2 Effekt einer kombinierten Behandlung mit GANT61, Sunitinib und PF-04691502 auf die Koloniebildung von AML-Zelllinien und CD34 ⁺ Zellen.....	77
2.2.1.7 <i>GLI1/2</i> -Reporter-Assays	78
2.2.1.7.1 Herstellung stabiler <i>GLI1/2</i> -Reporter-AML-Zelllinien	78
2.2.1.7.2 Effekt einer kombinierten Behandlung mit GANT61, Sunitinib und PF-04691502 sowie einer Einzelbehandlung mit GANT61 oder Cyclopamin auf die <i>GLI1/2</i> -Promotor-Aktivität von <i>GLI1/2</i> -Reporter-AML-Zelllinien	78
2.2.2 Molekularbiologische Methoden.....	79
2.2.2.1 RNA-Isolierung	79
2.2.2.2 cDNA-Synthese.....	79

2.2.2.3 Reverse Transcription quantitative Real-Time PCR-Analysen (RT-qPCR)...	80
2.2.2.4 shRNA-Klonierung	81
2.2.2.5 Sequenzierung.....	83
2.2.3 Bakterielle Arbeiten	83
2.2.3.1 Transformation von <i>E. coli</i>	83
2.2.3.2 Qualitative Kolonie-PCR	84
2.2.3.3 Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	84
2.2.4 Proteinbiochemische Methoden	85
2.2.4.1 Western Blot-Verfahren zur Analyse der GLI1-Proteinexpression in AML-Zelllinien	85
2.2.5 <i>In vivo</i> -Experimente	87
2.2.5.1 Mäuse.....	88
2.2.5.2 Vorversuche	88
2.2.5.2.1 Transplantation der AML-Zellen und Überwachung der Mäuse	88
2.2.5.2.2 Aufarbeitung von Mausorganen für die durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils humaner Blasten.....	89
2.2.5.3 Effekt eines <i>GLI1</i> - und <i>GLI2</i> -shRNA- <i>Knockdowns</i> auf die Progression einer humanen <i>FLT3</i> -mutierten AML im Mausmodell.....	89
2.2.5.4 Effekt einer kombinierten Behandlung mit GANT61, Sunitinib und PF-04691502 auf die Progression einer humanen <i>FLT3</i> -mutierten AML im Mausmodell	90
2.2.6 Statistische Analysen.....	91
III Ergebnisse	92
3.1 Der gezielte shRNA-<i>Knockdown</i> von <i>GLI1</i> und <i>GLI2</i> in AML-Zelllinien und im AML-Xenograft-Mausmodell	92
3.1.1.1 Bestimmung der Transduktionseffizienz in der mit shRNA transduzierten AML-Zelllinie MV4-11	92
3.1.1.2 Test der Transduzierbarkeit CD34 ⁺ hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen.....	93
3.1.2 Nachweis des shRNA- <i>Knockdowns</i> von <i>GLI1</i> bzw. <i>GLI2</i> in AML-Zelllinien mittels RT-qPCR.....	94
3.1.3 Effekt eines <i>GLI1</i> - oder <i>GLI2</i> -shRNA- <i>Knockdowns</i> auf die Proliferation von AML-Zelllinien	96
3.1.4 Effekt eines <i>GLI1</i> - oder <i>GLI2</i> -shRNA- <i>Knockdowns</i> auf die Apoptose-Induktion in AML-Zelllinien.....	97
3.1.5 Effekt eines <i>GLI1</i> - oder <i>GLI2</i> -shRNA- <i>Knockdowns</i> auf die Koloniebildung von AML-Zelllinien	98
3.1.6 Effekt eines <i>GLI1</i> - und <i>GLI2</i> -shRNA- <i>Knockdowns</i> auf die Progression einer humanen <i>FLT3</i> -mutierten AML im Mausmodell.....	100

3.1.6.1 Vorversuche zur Wahl der <i>FLT3</i> -mutierten AML-Zelllinie und zur optimalen zu transplantierenden Zellzahl	101
3.1.6.2.1 Hauptversuch zur Bestimmung des Effekts eines <i>GLI1/2</i> -Doppelknockdowns auf die Progression einer humanen <i>FLT3</i> -mutierten AML im Mausmodell	102
3.1.6.2.2 Bestimmung der Konsistenz des <i>GLI1</i> -, <i>GLI2</i> - und <i>BCL2</i> -Knockdowns in MV4-11/ <i>GLI1/2</i> -DKD-Zellen mittels RT-qPCR	107
3.2 Die kombinierte therapeutische Inhibierung des Hedgehog- und FLT3/PI3K-Signalwegs in der AML	109
3.2.1 Die kombinierte therapeutische Inhibierung des Hedgehog- und FLT3/PI3K-Signalwegs in AML-Zelllinien und in Primärmaterial	109
3.2.1.1 Effekt einer kombinierten Behandlung mit GANT61, Sunitinib und PF-04691502 auf die Proliferation von AML-Zelllinien.....	110
3.2.1.2 Effekt einer kombinierten Behandlung mit GANT61, Sunitinib und PF-04691502 auf die Proliferation von primären AML-Blasten	113
3.2.1.3 Effekt einer kombinierten Behandlung mit GANT61, Sunitinib und PF-04691502 auf die Apoptose-Induktion in AML-Zelllinien.....	115
3.2.1.4 Effekt einer kombinierten Behandlung mit GANT61, Sunitinib und PF-04691502 auf die Koloniebildung von AML-Zelllinien und CD34 ⁺ Zellen.....	118
3.2.2 Effekt einer kombinierten Behandlung mit GANT61, Sunitinib und PF-04691502 auf die Progression einer humanen <i>FLT3</i> -mutierten AML im Mausmodell	121
3.2.3 Effekt einer kombinierten Behandlung mit GANT61, Sunitinib und PF-04691502 auf die <i>GLI1/2</i> -Promotor-Aktivität von <i>GLI1/2</i> -Reporter-AML-Zelllinien	123
3.3 Analyse einer nicht-kanonischen Hedgehog-Signalweg-Aktivierung in AML-Zelllinien	127
3.3.1 Dosisabhängiger Effekt einer Behandlung mit GANT61 oder Cyclopamin auf die <i>GLI1/2</i> -Promotor-Aktivität von <i>GLI1/2</i> -Reporter-AML-Zelllinien	127
3.3.2 Analyse der <i>GLI1</i> -Proteinexpression nach <i>FLT3</i> -Inhibierung in AML-Zelllinien	130
IV Diskussion	132
4.1 Das anti-leukämische Potenzial des gezielten shRNA-Knockdowns von <i>GLI1</i> und <i>GLI2</i> in AML-Zelllinien und im AML-Xenograft-Mausmodell	133
4.1.1 Der gezielte shRNA-Knockdown von <i>GLI1</i> bzw. <i>GLI2</i> in AML-Zelllinien führt zu verstärkten anti-leukämischen Effekten in funktionellen <i>in vitro</i> -Assays.....	133
4.1.2 Der gezielte shRNA-Knockdown von <i>GLI1</i> und <i>GLI2</i> hat anti-leukämische Effekte im <i>FLT3</i> -mutierten humanen AML-Mausmodell.....	137

4.2 Das therapeutische Potenzial der kombinierten Inhibierung des Hedgehog- und FLT3/PI3K-Signalwegs in der AML	142
4.2.1 Die kombinierte therapeutische Inhibierung des Hedgehog- und FLT3/PI3K-Signalwegs führt zu verstärkten anti-leukämischen <i>in vitro</i> -Effekten in AML-Zellen, speziell in <i>FLT3</i> -mutierten Blasten	143
4.2.2 Die kombinierte therapeutische Inhibierung des Hedgehog- und FLT3/PI3K-Signalwegs führt zu anti-leukämischen Effekten im <i>FLT3</i> -mutierten humanen AML-Mausmodell	147
4.2.3 Die Effekte der kombinierten therapeutischen Inhibierung des Hedgehog- und FLT3/PI3K-Signalwegs in <i>FLT3</i> -mutierten AML-Zelllinien werden über die GLI1/2-Kaskade vermittelt	149
4.3 Der Hedgehog-Signalweg wird in AML-Zelllinien nicht-kanonisch aktiviert	150
4.4 Die Blockierung der FLT3/PI3K/GLI1/2-Achse zur Therapie der AML	157
4.5 Fazit und Ausblick	165
V Während dieser Arbeit entstandene Publikationen	167
VI Anhang	168
Referenzen	168
Abkürzungsverzeichnis	197
Abbildungsverzeichnis	203
Tabellenverzeichnis	205
Danksagung	206
Eidesstattliche Erklärung	208

I Einleitung

1.1 Die akute myeloische Leukämie

Die Leukämie ist eine maligne Erkrankung des blutbildenden Systems. Sie wurde Mitte des 19. Jahrhunderts erstmals von dem Mediziner Rudolf Virchow beschrieben, welcher auch den Begriff „Leukämie“, griechisch für „weißes Blut“, prägte ¹. Leukämien werden aufgrund ihrer Heterogenität bezüglich des zellulären Ursprungs und Krankheitsverlaufs in vier Subgruppen unterteilt. Ausgehend von der betroffenen hämatopoetischen Linie – myeloid oder lymphoid – werden die Leukämien zunächst in zwei Hauptgruppen und dann entsprechend ihres Krankheitsverlaufs in eine akute oder chronische Form unterschieden.

Die akute myeloische Leukämie (AML) zeichnet sich durch eine erhöhte Anzahl myeloider, in ihrer Reife arretierter Zellen im Knochenmark aus. Durch die klonale, massive Vermehrung der leukämischen Zellen (Blasten) kommt es zu einer Verdrängung der normalen Blutbildung des Patienten, was zumeist in hämatopoetischer Insuffizienz resultiert ^{2,3}. Oftmals kommt es zu einem massiven Anstieg der Leukozytenzahl im Blut, einer sogenannten Leukozytose. Die klinischen Symptome der AML sind der hämatopoetischen Insuffizienz durch die leukämische Infiltration des Knochenmarks und daraus resultierender Granulozytopenie, Thrombozytopenie oder Anämie zuzuschreiben ³. Auch kann es neben einer Blasteninfiltration des peripheren Blutes in selteneren Fällen auch zur Infiltration weiterer Organe wie u.a. der Milz, der Leber oder der Lymphknoten kommen. Die Patienten zeigen vielfältige und unspezifische Symptome wie Müdigkeit, Appetitlosigkeit, Gewichtsverlust, Blutungen, Infektionen und Fieber ^{3,4}. Verbleibt die Krankheit unbehandelt, führt sie innerhalb weniger Monate infolge der Knochenmarkinsuffizienz und daraus resultierender Krankheitserscheinungen zum Tod des Patienten ⁵.

1.1.1 Die Epidemiologie der AML

Mit einem Anteil von etwa 1 % der Krebserkrankungen stellt die AML eine relativ seltene Erkrankung dar ⁶. Sie macht etwa 80-90 % der akuten Leukämien und 25 % aller Leukämieformen im Erwachsenenalter in der sogenannten westlichen Welt aus ^{5,7}.

Laut Robert Koch-Institut erkrankten in Deutschland in den Jahren 2011-2013 jährlich im Mittel 3950 Erwachsene ab 15 Jahren und in den Jahren 2004-2013 jährlich im Mittel 80 Kinder unter 15 Jahren an einer AML, wobei altersunabhängig Männer generell etwas häufiger betroffen waren als Frauen ⁸. Das US-amerikanische Krebsregister SEER (*Surveillance Epidemiology and End Results Program* des *National Cancer Institute*) gibt für die Jahre 2010-2014 eine jährliche altersadjustierte Inzidenz an AML-Neuerkrankungen von 4,2/100 000 Einwohner an ⁹.

Die AML ist für etwa 15-20 % der Leukämiefälle im Kindesalter verantwortlich ¹⁰, ist aber mit einem Altersmedian von 71 Jahren bei Diagnosestellung primär eine Erkrankung des späten Erwachsenenalters ⁸, was sich in deutlichen Inzidenzunterschieden widerspiegelt. So gibt die SEER für die Jahre 2010-2014 eine Inzidenz bei einem Alter unter 65 Jahren von 2,0/100 000 Einwohner an, für Menschen ab 65 Jahren und älter stieg die Inzidenz deutlich auf 20,1/100 000 Einwohner an ⁹. Neben der Inzidenz der AML ist auch der Krankheitsverlauf stark altersabhängig. So hat sich zwar die relative 5-Jahres-Überlebensrate der AML-Patienten in den USA seit 1975 von 6,2 % bis 2013 mit 27,3 % kontinuierlich verbessert, das Überleben der älteren Patienten ab 65 Jahren verblieb mit 6,7 % in den Jahren 2007-2013 im Vergleich zu den Patienten unter 65 Jahren mit 45,2 % jedoch auf einem niedrigen Niveau ⁹.

1.1.2 Die Ätiologie und Pathogenese der AML

Neben dem bereits erwähnten Risikofaktor Alter gibt es weitere bekannte Faktoren, die die Ausbildung einer AML begünstigen. Wichtig ist hierbei die Unterscheidung einer primären *de novo*-AML von einer sekundären oder therapieassoziierten AML, welche etwa 10-20 % der AML-Fälle ausmacht ¹¹. Eine sekundäre AML entsteht bei Patienten, die zuvor an MDS (myelodysplastisches Syndrom) erkrankt waren oder therapiebedingt leukämogenen Substanzen und Einflüssen wie beispielsweise Topoisomerase-II-

Inhibitoren, Alkylanzien oder ionisierenden Strahlen ausgesetzt waren ¹². Auch die Exposition gegenüber Benzol, das Rauchen, sowie genetische Prädispositionen wie das Down-Syndrom oder eine Fanconi-Anämie können zur Entstehung einer AML führen ^{13–16}. Diese Risikofaktoren scheinen allerdings nur für einen geringen Anteil der AML-Fälle ursächlich zu sein und meist bleiben die genauen Gründe der Krankheitsentstehung weitestgehend ungeklärt.

Grundsätzlich aber liegt der Entstehung einer AML die Akkumulation genetischer Veränderungen zugrunde, die einer unreifen myeloiden Vorläuferzelle im Knochenmark einen massiven Wachstums- und Überlebensvorteil mit gleichzeitigem Differenzierungsblock verschaffen. Nur in sehr seltenen Fällen sind dafür Keimbahnmutationen ursächlich ⁷, somatische Mutationen finden sich jedoch in 50–80 % der AML-Fälle, mit verstärkter Häufigkeit bei Patienten mit sekundärer Leukämie und mit zunehmendem Alter, wobei gezeigt werden konnte, dass häufig schon vor der Entstehung der AML-Erkrankung prä-leukämische Mutationen vorliegen können ^{5,17–21}. Aus dem für die AML ursächlichen malignen Zellklon können Subklone hervorgehen, die über die Zeit noch weitere Mutationen akkumulieren und zur Progression der Krankheit und/oder zu einem späteren Rückfall beitragen können ²². So stellt die AML durch die Koexistenz dieser kompetitiven Zellklone eine sehr heterogene, komplexe und dynamische Erkrankung dar.

Die für die Leukämogenese ursächlichen genetischen Veränderungen werden als *Driver*-Mutationen bezeichnet. Hierzu zählen Punktmutationen und häufig auch zytogenetische Aberrationen wie Duplikationen, Translokationen, Inversionen, Deletionen und Aneuploidien ^{5,23}. Bei der Leukämogenese handelt es sich, wie auch bei anderen Krebserkrankungen, um einen mehrstufigen, sich oftmals über Jahre erstreckenden Prozess ^{24,25}. Dieser könnte dem Modell der „*Two-Hit*-Hypothese“ entsprechen, welche der Genetiker Alfred G. Knudson 1971 für das Retinoblastom formulierte ²⁶. So geht man in Anlehnung an die Knudson-Hypothese davon aus, dass es in einer undifferenzierten myeloiden Vorläuferzelle zu mindestens zwei voneinander unabhängigen Ereignissen zweier Mutationsklassen kommt, die eine maligne Transformation zur Folge haben. Mutationen der Klasse I beeinflussen das zelluläre Wachstum und/oder Überleben und Mutationen der Klasse II die Differenzierung und das Apoptoseverhalten der Zelle, sodass es durch einen massiven Proliferationsvorteil

zur klonalen Vermehrung der Zelle kommt ^{27,28}. Sie verbleibt als unreife Vorstufe und ist häufig unempfindlich gegenüber Apoptosesignalen. Der myeloide Blast verdrängt die gesunden Zellen, übernimmt dabei aber aufgrund seiner Undifferenziertheit keine physiologischen Aufgaben im hämatopoetischen System, was in dessen Insuffizienz resultiert. Neben den Klasse-I- und den Klasse-II-Mutationen scheinen Mutationen in epigenetischen Regulatoren eine mögliche dritte Klasse zu bilden, mit Einfluss sowohl auf die zelluläre Proliferation als auch auf die Differenzierung ⁴. Typische Klasse-I-Mutationen, wie beispielsweise in *FLT3* (*fms-like tyrosine kinase 3*), *K/NRAS* (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homologue/neuroblastoma RAS viral oncogene homologue*), *TP53* (*tumor protein p53*) oder *c-KIT* (*stem cell factor receptor*), finden sich in etwa 28 %, 12 %, 8 % bzw. 4 % der AML-Fälle, typische Klasse-II-Mutationen sind Veränderungen in *NPM1* (*nucleophosmin 1*) oder *CEBPA* (*CCAAT/enhancer-binding protein alpha*) und finden sich in etwa 27 % bzw. 6 % der AML-Fälle ^{4,29}. Mutationen in epigenetischen Regulatoren wie beispielsweise in *DNMT3A* (*DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A*), *TET2* (*tet methylcytosine dioxygenase 2*), *IDH1* oder *IDH2* (Isozitat-Dehydrogenase 1 oder 2) treten in 26 %, 8 % bzw. 20 % der AML-Fälle auf ^{4,29}.

Durch eine großangelegte Studie von Papaemmanuil und Kollegen ³⁰ mit 1540 AML-Patienten gelang die Identifikation und weiterführende Gruppierung von 5234 *Driver*-Mutationen, verteilt auf 76 Gene oder genomische Regionen. Bei 86 % der Patienten konnten zwei oder mehr dieser *Driver*-Mutationen identifiziert werden und die Analyse von Co-Mutationsmustern ließ neben Aussagen über den klinischen Verlauf und Behandlungserfolg der Erkrankung auch die Identifizierung einer spezifischen, geordneten Evolution, die der AML-Pathogenese zugrunde liegt, zu. So konnten Mutationen in epigenetischen Regulatoren als erste Ereignisse identifiziert werden, wohingegen Mutationen in *NPM1* später und oftmals nach Mutationen in *DNMT3A*, *IDH1* oder *NRAS* auftraten.

1.1.3 Die Klassifikation und Prognose der AML

Als erstes System zur Klassifikation der AML wurde 1976 das *French-American-British*(FAB)-System eingeführt, welches anhand von morphologischen und zytochemischen Merkmalen 8 AML-Subtypen (M0 bis M7) unterscheidet ^{31,32}. Heute

erfolgt die Klassifikation der AML zumeist durch das von der *World Health Organisation* (WHO) eingeführte Klassifikationssystem für Tumore hämatopoetischer und lymphoider Gewebe³³, welches zuletzt 2016 überarbeitet wurde³⁴ und neben den morphologischen und zytochemischen auch molekulargenetische und immunologische Merkmale sowie Informationen über die klinische Präsentation der Erkrankung berücksichtigt. Die WHO-Klassifikation der AML unterscheidet 6 Subtypen und ist, in modifizierter Form, in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der AML und verwandter Neoplasien (³⁴, modifiziert).

Subtyp	Spezifikation
AML mit wiederkehrenden genetischen Anomalien	AML mit t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
	AML mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
	Akute promyelozytische Leukämie mit <i>PML-RARA</i>
	AML mit t(9;11)(p21.3;q23,3); <i>MLLT3-KMT2A</i>
	AML mit t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>
	AML mit inv(3)(q21.3q26.2) oder t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM</i>
	AML (megakaryoblastisch) mit t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15-MKL1</i>
	<i>Provisorische Entität: AML mit BCR-ABL1</i>
	AML mit mutiertem <i>NPM1</i>
	AML mit biallelischen Mutationen von <i>CEBPA</i>
	<i>Provisorische Entität: AML mit mutiertem RUNX1</i>
AML mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen	
Therapieassoziierte myeloische Neoplasien	
AML, nicht anderweitig spezifiziert	AML mit minimaler Differenzierung
	AML ohne Reifung
	AML mit Reifung
	Akute myelomonozytäre Leukämie
	Akute monoblastische/monozytäre Leukämie
	Reine erythroide Leukämie
	Akute megakaryoblastische Leukämie
	Akute basophilische Leukämie
	Akute Panmyelose mit Myelofibrose

Subtyp	Spezifikation
Myeloisches Sarkom	
Myeloische Proliferationen assoziiert mit Down-Syndrom	Transiente abnormale Myelopoese Myeloische Leukämie assoziiert mit Down-Syndrom

Bei den prognostischen Faktoren für das Erreichen einer vollständigen Remission und für das Gesamtüberleben bei der AML werden grundsätzlich Patienten-assoziierte und AML-assoziierte, genetische Faktoren unterschieden ³⁵. Den wichtigsten Patienten-assoziierten prognostischen Faktor stellt dabei das Patientenalter dar. Weitere prognostische Faktoren sind der *Performance*-Status des Patienten ^{36,37} sowie eine therapieassoziierte oder infolge einer hämatologischen Vorerkrankung entstandene AML ³⁸. AML-assoziierte, genetische Anomalien in den leukämischen Blasten stellen jedoch den wichtigsten prognostischen Faktor bei der AML dar ⁴.

Eine internationale Expertengruppe hat kürzlich im Auftrag des *European LeukemiaNet* (ELN) Empfehlungen zur Diagnose und zum Umgang mit der AML veröffentlicht und dabei auch eine Risikostratifikation basierend auf genetischen Anomalien verfasst ³⁵. Die ELN-Risikostratifikation ist in modifizierter Form in Tabelle 2 dargestellt. Das ELN unterteilt die AML bezüglich der genetischen Anomalien in 3 Risikokategorien – günstig, intermediär und ungünstig. Hervorzuheben ist dabei, dass die prognostische Bedeutung vieler genetischer Marker kontextabhängig, d.h. von der An- oder Abwesenheit anderer Marker beeinflusst ist. So gilt beispielsweise ein mutiertes *NPM1* nur als günstiger Risikofaktor, wenn gleichzeitig keine *FLT3*-ITD (oder eine *FLT3*-ITD mit niedriger allelischer Ratio, vgl. Tabelle 2) vorliegt ³⁵.

Tabelle 2: ELN-Risikostratifikation der AML (³⁵, modifiziert).

Risikokategorie	Genetische Anomalie
Günstig	t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
	inv(16)(p13.1;q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
	Mutiertes <i>NPM1</i> ohne <i>FLT3</i> -ITD oder mit <i>FLT3</i> -ITD ^{low*}
	Biallelisch mutiertes <i>CEBPA</i>
Intermediär	Mutiertes <i>NPM1</i> und <i>FLT3</i> -ITD ^{high*}

Risikokategorie	Genetische Anomalie
	Wildtyp- <i>NPM1</i> ohne <i>FLT3</i> -ITD oder mit <i>FLT3</i> -ITD ^{low*} (ohne ungünstig-klassifizierte genetische Veränderungen)
	t(9;11)(p21.3;q23,3); <i>MLLT3-KMT2A</i> [§]
	Zytogenetische Anomalien, die nicht als günstig oder ungünstig klassifiziert werden
Ungünstig	t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>
	t(v;11q23.3); <i>KMT2A-Rearrangement</i>
	t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i>
	inv(3)(q21.3q26.2) oder t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2</i> , <i>MECOM(EVI1)</i>
	-5 oder del(5q); -7; -17/abn(17p)
	Komplexer Karyotyp [#] , monosomaler Karyotyp [^]
	Wildtyp- <i>NPM1</i> und <i>FLT3</i> -ITD ^{high*}
	Mutiertes <i>RUNX</i> **
	Mutiertes <i>ASXL1</i> **
	Mutiertes <i>TP53</i>
* Low = Niedrige allelische Ratio (< 0,5); High = Hohe allelische Ratio (> 0,5); semiquantitative Bestimmung der allelischen Ratio <i>FLT3</i> -ITD/ <i>FLT3</i> -Wildtyp durch DNA-Fragmentanalyse.	
§ t(9;11)(p21.3;q23,3) bewirkt die Einstufung in die intermediäre Risikogruppe, auch bei gleichzeitiger Anwesenheit als ungünstig klassifizierter genetischer Veränderungen.	
# Drei oder mehr unabhängige Chromosomenaberrationen in Abwesenheit einer von der WHO klassifizierten wiederkehrenden Translokation oder Inversion (d.h. t(8;21), inv(16) oder t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;q23.3), t(6;9), inv(3) oder t(3;3); AML mit <i>BCR-ABL1</i>).	
^ Eine Monosomie (mit Ausnahme eines Verlusts von einem X- oder Y-Chromosom) in Verbindung mit mindestens einer zusätzlichen Monosomie oder strukturellen Chromosomenanomalie [mit Ausnahme von Core-Binding-Factor-AML, d.h. AML mit t(8;21)(q22;q22.1) oder inv(16)(p13.1q22)/t(16;16)(p13.1;q22) ³⁹].	
** Nur als ungünstig einzustufen, wenn gleichzeitig keine als günstig klassifizierten Marker vorliegen.	

1.1.4 Die Rolle von FLT3 in der AML

Aktivierende Mutationen in der Rezeptor-Tyrosinkinase FLT3 stellen mit etwa 30 % eine der häufigsten genetischen Aberrationen in der AML dar und gehen mit einer schlechten Prognose für den Patienten einher^{35,40} (siehe Tabelle 1 und 2).

Struktur und Expression von FLT3

Das humane Gen für *FLT3*, bestehend aus 24 Exons, ist auf Chromosom 13q12 lokalisiert und kodiert den FLT3-Tyrosinkinase-Rezeptor, auch bekannt als FLK2 (*fetal liver tyrosine kinase 2*), STK-1 (*stem cell tyrosine kinase 1*) oder CD135^{41,42}. FLT3 gehört, wie auch

c-KIT, CSF1R (*colony-stimulating factor 1 receptor*) und PDGFR α/β (*platelet-derived growth factor receptor α/β*), der Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen der Klasse III (RTKIII) an⁴³. Strukturell weist FLT3 in der extrazellulären, Liganden-bindenden Region 5 Immunglobulin(Ig)-ähnliche Domänen gefolgt von einer transmembranen Domäne und in der intrazellulären Region eine Juxtamembran-Domäne (JM), eine durch eine Kinase-Insertionsdomäne geteilte Tyrosinkinase-Domäne (TKD) und eine Carboxy(C)-terminale Domäne auf^{44,45} (siehe Abbildung 1 A). Das humane *FLT3*-Gen kodiert ein Protein von 993 Aminosäuren (AS) Länge, wobei die AS 572-603 die JM-Domäne und die AS 604-958 die Tyrosinkinase-Domäne ausmachen⁴⁶. Der FLT3-Ligand (FL), ein Typ-I-Transmembranprotein und Cytokin, kann sowohl in membrangebundener als auch in gelöster Form vorliegen und spielt, in Synergie mit anderen Cytokinen wie Interleukin 3 (IL-3), eine wichtige Rolle bei der Stimulation hämatopoetischer Vorläuferzellen^{47,48}. Während FL weitestgehend ubiquitär exprimiert wird, ist die Expression von FLT3 hauptsächlich auf hämatopoetische Organe beschränkt⁴⁹, wobei eine *FLT3*-mRNA-Expression neben peripherem Blut und Knochenmark auch in anderen lymphohämatopoetischen Organen wie Leber, Milz, Thymus und Plazenta nachgewiesen werden konnte⁵⁰. Im gesunden Blut und Knochenmark scheint sich die Expression von FLT3 weitestgehend auf CD34⁺ hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen zu beschränken und markiert eine multipotente Stammzell-Population mit Kurzzeit-Rekonstitutionspotenzial, welche bereits die Fähigkeit, in Erythrozyten und Megakaryozyten zu differenzieren, verloren hat^{48,51,52}. Obwohl der zielgerichtete *Knockout* von *FLT3* oder *FL* in Mäusen nicht embryonal letal ist, offenbart er dennoch die wichtige Rolle des FLT3-Signalwegs für die Entwicklung lymphoider Vorläuferzellen und multipotenter Vorläufer, welche dendritische Zellen, B- und T-Zell-Vorläufer sowie natürliche Killerzellen hervorbringen^{53,54}.

Aktivierung und Signalweiterleitung von FLT3

Im inaktiven Zustand liegt FLT3 als Monomer vor. Bindet FL, dimerisiert der Rezeptor und es kommt zu einer Trans- und nachfolgenden Autophosphorylierung von Tyrosinresten in den zytoplasmatischen Domänen⁵⁵. Die phosphorylierten Tyrosinreste rekrutieren verschiedene zytoplasmatische Moleküle und Proteinkomplexe, was wiederum deren Phosphorylierung und somit die Aktivierung diverser, in die zelluläre Apoptose, Proliferation und in das Zellwachstum involvierter Signalkaskaden induziert⁴⁸

(siehe Abbildung 1 B). FLT3 bewirkt dabei die Aktivierung der Signaltransduktionsnetzwerke hauptsächlich über die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)- und RAS-Signalkaskaden⁵⁶. Grundsätzlich existieren verschiedene Klassen der PI3K, da in der hier beschriebenen Signalkaskade jedoch hauptsächlich die PI3K der Klasse I involviert ist⁵⁷, wird diese im Folgenden mit dem Begriff der PI3K gleichgesetzt. Im Falle der Aktivierung der PI3K-Kaskade erfolgt die Signalweiterleitung von FLT3 über die regulatorische p85-Untereinheit der PI3K, welche die katalytische p110-Untereinheit freisetzt, sodass diese ihre Kinase-Aktivität ausüben kann, indem sie Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) phosphoryliert⁵⁷. Die Signaltransduktion verläuft anschließend weiter über die Stimulation des *Downstream*-Proteins Akt (Proteinkinase B), was, durch Einflussnahme auf die Aktivität von Proliferations- und Apoptoseregulatoren wie beispielsweise GSK3 β (*glycogen synthase kinase-3 β*) und FOXO3 (*forkhead box O3*) oder BAD (*BCL2 antagonist of cell death*) sowie auf den Wachstumsregulator mTOR (*mammalian target of rapamycin*), in zellulärem Überleben, Zellteilung und Wachstum resultiert⁵⁸. Verläuft die Signalweiterleitung von FLT3 über die RAS-Signalkaskade, so werden die Kinasen RAF/MEK/MAPK aktiviert, was zur Transkription von in die Zellproliferation involvierten Zielgenen führt⁵⁶.

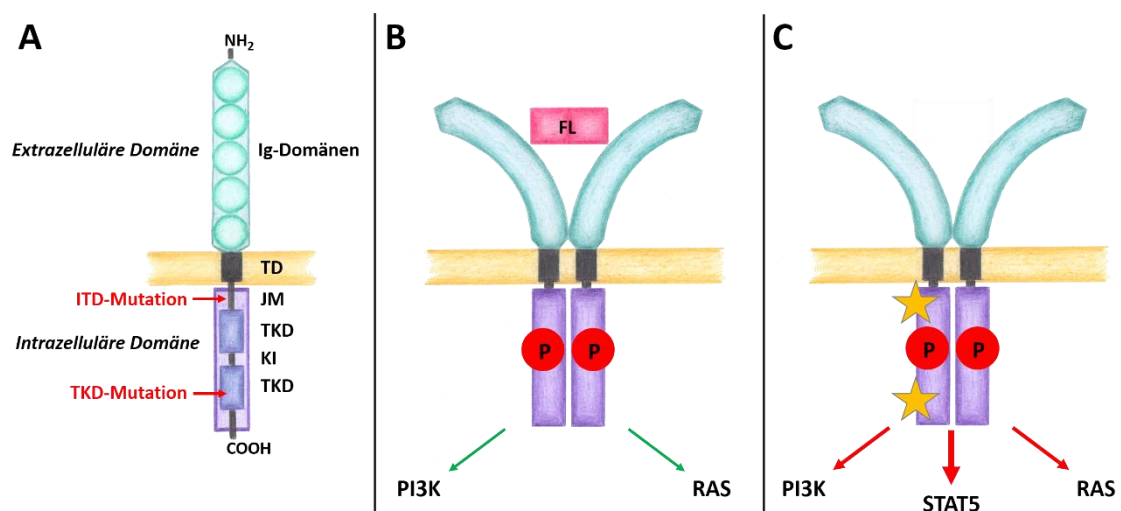


Abbildung 1: Schematische Darstellung von FLT3 mit normaler und aberranter Signalweiterleitung. A) Schematische Darstellung des FLT3-Monomers mit charakteristischen Regionen und Orten der typischen Mutationen. FLT3 weist in der extrazellulären, Liganden-bindenden Region 5 Ig-ähnliche Domänen gefolgt von einer transmembranären Domäne (TD) und in der intrazellulären Region eine Juxtamembran-Domäne (JM), eine durch eine Kinase-Insertionsdomäne (KI) geteilte Tyrosinkinase-Domäne (TKD) und eine Carboxy-terminale Domäne auf. In der intrazellulären Domäne können ITD-Mutationen in der JM-Domäne sowie TKD-Mutationen auftreten. **B)** Schematische Darstellung des FL-bindenden, aktivierten FLT3-

Homodimers mit nachfolgender normaler Signalweiterleitung (grüne Pfeile). Durch FL-Bindung dimerisieren die FLT3-Monomere, es kommt zu Phosphorylierungsereignissen (P) und nachfolgender Signalweiterleitung über die PI3K- oder RAS-Kaskade. C) Schematische Darstellung des mutierten und autoaktivierten FLT3-Dimers mit aberranter Signalweiterleitung. ITD- oder TKD-mutiertes FLT3 bildet ein Dimer aus (hier mit Wildtyp-FLT3). Mutationsbedingt kommt es zu einer Autophosphorylierung und -aktivierung mit nachfolgender aberrant verstärkter Signalweiterleitung über die PI3K- und RAS-Kaskade, insbesondere aber auch über STAT5 (rote Pfeile). Ig: Immunglobulin, -COOH: Carboxy-Terminus, -NH₂: Amino-Terminus, ITD: interne Tandemduplikation, Sterne: ITD- oder TKD-Mutation. Quelle: Eigene Darstellung, A) in Anlehnung an Small ⁵⁹.

FLT3 in der AML

Im Vergleich zu gesundem Knochenmark wird FLT3-RNA und -Protein in den leukämischen Blasten von etwa 90 % der AML-Patienten verstärkt exprimiert ^{60,61}, wobei eine FLT3-Expression hier nicht mehr mit der CD34-Expression einhergehen muss ⁶¹. Auch ein Großteil der humanen Leukämie-Zelllinien weist eine abnorme FLT3-mRNA-Expression sowie FLT3-Protein-Expression auf und FL wird von den meisten der untersuchten Leukämie/Lymphom-assoziierten Zelllinien sowie primären AML-Zellen exprimiert ^{56,62,63}. Bei dem verstärkt exprimierten FLT3 kann es sich um den Wildtyp-Rezeptor oder aber in etwa einem Drittel der AML-Patienten auch um mutiertes FLT3 handeln, dessen Auftreten ein eher spätes Event in der Leukämogenese darstellt, wobei FLT3-Mutationen häufig auch schon auf der Ebene der sogenannten Leukämienstammzellen (siehe Abschnitt 1.2) auftreten ^{22,64,65}. FLT3-Mutationen bei AML-Patienten wurden erstmals 1996 von Nakao *et al.* beschrieben ⁶⁶ und seither intensiv analysiert. Man unterscheidet grundsätzlich zwei am häufigsten auftretende Mutationstypen. In etwa 20 % der AML-Patienten findet sich eine interne Tandemduplikation in der JM-Domäne (FLT3-ITD), welche häufig mit einem normalen Karyotyp, NPM1-Mutationen sowie t(15;17) und t(6;9) assoziiert ist ⁴⁰ (siehe Abbildung 1 A). Die ITD besteht aus duplizierten kodierenden Abschnitten der JM-Domäne in der Länge eines Vielfachen von 3 bp (3 bis mehr als 400 bp), sodass das Leseraster stets bewahrt wird. Der duplizierte Abschnitt findet sich meist in Exon 14 – seltener 15 – und typischerweise in der Nähe der AS-Reste 590-600 ⁶⁷. Die ITD bewirkt eine konstitutive Aktivierung von FLT3 durch den Verlust der autoinhibierenden Funktion der JM-Domäne ⁵⁵. Der mutierte und somit katalytisch aktive Rezeptor bildet dabei nicht nur FLT3-ITD-Homodimere sondern auch Heterodimere mit dem Wildtyp-Rezeptor und führt somit auch zu dessen Liganden-unabhängiger Aktivierung ⁶⁸. Die

zweite große Gruppe der *FLT3*-Mutationen stellt eine *gain-of-function*-Mutation in der Aktivierungsschleife der Tyrosinkinase-Domäne (*FLT3*-TKD) dar, welche bei etwa 7-8 % der AML-Patienten zu finden ist und häufig mit einem normalen Karyotyp, Mutationen in *NPM1*, inv(16)/t(16;16) sowie t(15;17) assoziiert ist ⁴⁰ (siehe Abbildung 1 A). In der zweiten TKD von *FLT3* ist durch eine Punktmutation die Aminosäure Aspartat an der Stelle 835 ausgetauscht, häufig gegen Tyrosin (D835Y) ⁶⁹. Auch die TKD-Mutation resultiert in einer konstitutiv aktivierten *FLT3*-Signalweiterleitung mit aberranter Aktivierung nachfolgender Signalnetzwerke. Der Mechanismus der dauerhaften Aktivierung ist dabei vermutlich darauf zurückzuführen, dass durch den AS-Austausch die Flexibilität der Aktivierungsschleife zunimmt und so eine Tyrosin-Phosphorylierung gefördert wird ⁷⁰. Es wird somit eine aktive Kinase-Konformation induziert. Neben der verstärkten Aktivierung der normalen *FLT3*-induzierten Signalkaskaden durch sowohl die ITD- als auch die TKD-Mutation zeichnet sich die *FLT3*-ITD-Mutation insbesondere durch die ihr eigene aberrante Aktivierung des Transkriptionsfaktors *STAT5* (*signal transducer and activator transcription factor 5*) und nachfolgender Zielgene aus (siehe Abbildung 1 C) ⁷¹.

Klinische Relevanz von FLT3-Mutationen

Ein weiterer Unterschied zwischen *FLT3*-ITD und -TKD besteht in ihrer klinischen Bedeutung. Patienten mit einer *FLT3*-ITD präsentieren sich bei Diagnosestellung häufig mit einer Leukozytose und im Zuge der Therapie der AML kommt es zu kürzeren Remissionszeiten, höheren Rückfallraten und somit zu einem schlechteren Gesamtüberleben im Vergleich zu Patienten mit Wildtyp-*FLT3* ^{72,73}. So wurde beispielsweise in einer deutschen Studie mit 1003 AML-Patienten für die Gruppe mit *FLT3*-ITD-Mutation ein signifikant kürzeres Event-freies Überleben (EFS) mit 7,4 Monaten im Vergleich zu den Patienten mit *FLT3*-Wildtyp (12,9 Monate EFS) gezeigt ⁷⁴. Die prognostische Signifikanz der ITD hängt stark von dem gleichzeitigen Vorhandensein einer *NPM1*-Mutation sowie von der allelischen Ratio *FLT3*-ITD/*FLT3*-Wildtyp ab ⁴⁰. So bewirkt beispielsweise eine hohe allelische Ratio (> 0,5) ohne das gleichzeitige Vorhandensein einer *NPM1*-Mutation die Einordnung in das ungünstige AML-Risikoprofil des *European LeukemiaNet* (siehe Tabelle 2). Während einer ITD also spezifische Risikoprofile zugewiesen werden können, lässt sich hingegen bei Patienten mit *FLT3*-TKD die prognostische Signifikanz der Mutation bisher nicht eindeutig

beurteilen, da durch verschiedene klinische Studien teilweise kontroverse Ergebnisse erbracht wurden^{23,40,75–77}.

Die potenziell unterschiedliche klinische Relevanz der *FLT3*-ITD- und -TKD-Mutation spiegelt sich auch in transgenen Mausmodellen wider. So führt der genetische *Knockin* einer *FLT3*-ITD oder -TKD zwar jeweils zur Ausbildung einer letalen, myeloproliferativen Neoplasie – nicht zu einer vollständigen AML –, die ITD ruft hier jedoch einen aggressiveren Phänotyp hervor^{78,79}. Durch Kombination der *FLT3*-ITD-Mutation mit weiteren, in AML-Patienten beobachteten Mutationen, kann im Mausmodell ein AML-Phänotyp induziert werden^{80–83}.

In den letzten Jahrzehnten wurden große Anstrengungen unternommen, eine zielgerichtete Therapie mit kleinmolekularen FLT3-Inhibitoren zu entwickeln, um die teilweise sehr schlechte Prognose der *FLT3*-mutierten AML-Patienten zu verbessern. Auf diese Ansätze wird im folgenden Abschnitt näher eingegangen.

1.1.5 Die Diagnose und Therapie der AML

In der Regel wird eine AML bei einer Blastenzahl $\geq 20\%$ im peripheren Blut oder im Knochenmark diagnostiziert³⁵. Weitere diagnostische Methoden stellen die Immunophänotypisierung zur Identifizierung eines myeloiden Ursprungs der Blasten, die konventionelle zytogenetische Analyse zur Bestimmung des Karyotyps, die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung zur Detektion von Genumlagerungen und die molekulargenetische Mutationsanalyse zur Identifikation von Fusionsgenen und Leukämie-assoziierten Mutationen dar^{4,35}.

Die Standardtherapie der AML

Ziel der Therapie bei der AML ist das Erreichen einer kompletten Remission (engl.: *complete remission*, CR) und anschließend die Erhaltung dieser Remission. Trotz des wachsenden Verständnisses der Pathogenese und Evolution der AML hat sich die grundsätzliche Behandlungsstrategie in den vergangenen 40 Jahren nicht wesentlich verändert⁸⁴. Die Standardtherapie gliedert sich, sofern dies Faktoren wie das Alter und die Fitness des Patienten erlauben, in eine intensive Induktionschemotherapie gefolgt

von einer Konsolidierungstherapie, bestehend aus Chemotherapie oder Stammzelltransplantation.²

Die Standard-Induktionstherapie, nach dem sog. „7 + 3-Schema“, beinhaltet eine 7-tägige kontinuierliche Cytarabin(Ara-C)-Infusion bei einer Dosis von 100-200 mg/m² Körperoberfläche in Kombination mit einer täglichen intravenösen Gabe eines Anthrazyklins (≥ 60 mg/m² Daunorubicin, 12 mg/m² Idarubicin oder 12 mg/m² Mitoxantron) über 3 Tage³⁵. Bei der jüngeren Patientengruppe unter 60 Jahren werden mit diesem Schema CR-Raten von 60-80 % erreicht, bei Patienten über 60 Jahren erreichen 40-60 % eine CR³⁵.

Die Konsolidierungstherapie nach Erreichen der kompletten Remission dient der Auslöschung von Resterkrankung und somit der Verhinderung eines Rückfalls und kann entweder aus einer weiteren Chemotherapie oder aus einer autologen oder allogenen Transplantation hämatopoetischer Stammzellen (engl.: *hematopoietic stem cell transplantation*, HSCT) bestehen^{4,85}. Grundsätzlich stellt eine allogene HSCT (allo-HSCT) die beste Methode zur Verhinderung eines Krankheitsrückfalls dar, sie führt aber noch immer zu hoher Behandlungs-assoziiierter Morbidität und Mortalität (engl.: *treatment-related morbidity and mortality*, TRM) durch beispielsweise Organtoxizität und Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung, besonders in älteren Patienten^{85,86}. Die Wahl der Behandlungsmethode erfolgt nach Abschätzung des Risikos einer TRM und des Risikos eines Behandlungsmisserfolgs oder Krankheitsrückfalls unter Berücksichtigung von Parametern wie der zytogenetischen AML-Risikogruppe und der Fitness des Patienten. Eine allo-HSCT wird bei einer erwarteten Rückfall-Inzidenz ohne HSCT von > 35-40 % empfohlen³⁵. Patienten mit einem günstigen zytogenetischen Risikoprofil profitieren grundsätzlich nicht von einer allo-HSCT und sind demnach Kandidaten für eine Konsolidierungstherapie als Erstlinien-Therapie, während Patienten mit einem ungünstigen Risikoprofil eine allo-HSCT erhalten sollten^{85,87,88}. Die Konsolidierungstherapie besteht generell aus 2-4 Zyklen einer intermediären oder hohen Dosis Cytarabin (2-4 Zyklen mit je 6 Dosen Cytarabin zu 1000-3000 mg/m² Körperoberfläche), welche vergleichbare anti-leukämische Effekte wie eine Kombinationschemotherapie mit verschiedenen zytotoxischen Substanzen zeigt³⁵. In Patienten mit intermediärem Risikoprofil scheinen allo-HSCT, autologe HSCT (auto-HSCT) und Chemotherapie gleichwertige Therapieerfolge zu erzielen⁸⁸. In Patienten mit

günstigem und intermediärem AML-Risikoprofil kann eine auto-HSCT bei Nichtvorhandensein minimaler Resterkrankung eine gute Konsolidierungstherapieoption sein ³⁵.

Obwohl für einen großen Teil der AML-Patienten – auch für *FLT3*-ITD-mutierte Patienten mit ungünstigem Risikoprofil – eine HSCT angezeigt ist, erhält in der Realität aus Gründen wie fortgeschrittenem Alter, Begleiterkrankungen, Toxizität der vorangegangenen Therapie, Nichterreichen einer Remission, früher Krankheitsrückfall oder refraktärer Krankheitsverlauf nur ein sehr kleiner Teil der Patienten tatsächlich eine Transplantation und besonders ältere Patienten mit schweren Begleiterkrankungen können vorher oftmals keine intensive Chemotherapie zur Erlangung einer Remission erhalten ³⁵. Die Behandlungsalternativen für diese „unfitten“ Patienten beschränken sich auf niedrig dosierte Chemotherapie, die Teilnahme an klinischen Studien mit investigativen Therapien oder unterstützende Behandlungsmaßnahmen zur Lebensverlängerung bei möglichst guter Lebensqualität ³⁵.

Da sich das grundsätzliche Behandlungsschema zur Therapie der AML in den letzten Jahrzehnten nicht maßgeblich verändert hat und mit dieser Behandlungsstrategie zwar recht hohe CR-Raten erreicht werden, es in der großen Mehrheit der Fälle jedoch wieder zu einem Rezidiv mit schlechten Überlebenschancen – besonders bei der älteren Patientengruppe – kommt ⁸⁹, sind dringend neue Therapieansätze erforderlich. Durch das bessere Verständnis der molekularen Architektur der AML kommt dabei zielgerichteten Therapien eine immer größere Bedeutung zu.

Neue Therapieansätze

Neue therapeutische Ansätze werden zumeist erstmals in der Therapie rezidivierender/refraktärer AML-Fälle (R/R AML) oder bei älteren Patienten, die keine Standard-Chemotherapie erhalten können, untersucht ³⁵. Im Folgenden werden einige wichtige neue Therapieansätze vorgestellt.

- *Alternativen zum „7 + 3-Schema“*

Alternative Protokolle zum „7 + 3-Schema“ mit höheren Anthrazyklin- und Cytarabin-Dosis-Leveln ⁸⁶ und auch die Kombination der Standard-Induktionstherapie mit einem weiteren Arzneistoff, beispielsweise den Purin-Analoga Clofarabin ^{90,91} und Cladribin ⁹²

erbrachten keine wesentlichen oder bisher überzeugenden Unterschiede für das Überleben der Patienten. Eine Ausnahme stellt CPX-351 dar, eine liposomal verkapselte feste Kombination aus Cytarabin und Daunorubicin in der synergistischen Ratio 5:1. In einer Phase-III-Studie mit 60-75-jährigen Patienten mit Hochrisiko-/sekundärer AML führte die Behandlung mit CPX-351 im Vergleich zum „7 + 3-Schema“ zu höheren CR-Raten und verlängertem Gesamtüberleben (ClinicalTrials.gov: NCT01696084) ^{86,93,94}. Kürzlich erfolgte die Zulassung von CPX-351 zur Behandlung therapieassoziierter AML und AML mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen durch die *US Food and Drug Administration* (FDA) ⁹⁵. Seit kurzem ist ebenfalls die Substanz Gemtuzumab-Ozogamizin (GO), ein humanisierter monoklonaler anti-CD33 Antikörper, welcher mit dem Zytotoxin Calicheamicin konjugiert ist, in Kombination mit Chemotherapie für die Behandlung CD33⁺ R/R AML zugelassen ⁹⁶.

Auch eine Kombination der Standard-Chemotherapie mit FLT3-Inhibitoren wurde in diversen Studien untersucht ^{97–101}. Auf die teilweise aussichtsreichen Ergebnisse wird im kommenden Abschnitt eingegangen.

- *FLT3-Inhibitoren*

Aufgrund der hohen Rate aktivierender *FLT3*-Mutationen in der AML und der damit einhergehenden schlechten Prognose für die Patienten wurden in den vergangenen Jahrzehnten diverse potente FLT3-Inhibitoren entwickelt und in klinischen Studien getestet. Inhibitoren der ersten Generation sind Sunitinib, Tandutinib, Lestaurtinib, Sorafenib und Midostaurin, die der zweiten Generation Quizartinib, Crenolanib sowie Gilteritinib, mit Unterschieden in der Inhibierungsstärke gegenüber dem FLT3-ITD-, -TKD- oder Wildtyp-Rezeptor, der Selektivität für FLT3 und dem Toxizitätsprofil ³⁵. Die Wirkungsweise der Inhibitoren beruht dabei auf der kompetitiven Inhibierung der ATP-Bindungsstellen in der Kinase-Domäne des Rezeptors, wobei die meisten der bisher entwickelten Inhibitoren die inaktive Kinase-Konformation zur Zielstruktur haben ¹⁰². Im Folgenden werden einige Ergebnisse für 3 ausgewählte Inhibitoren dargestellt.

Der kleinmolekulare Inhibitor Sunitinib (SU11248, Sutent) ist ein Tyrosinkinase-Inhibitor (TKI) mit Selektivität für FLT3 sowie PDGF- und VEGF (*vascular endothelial growth factor*)-Rezeptoren, c-KIT, RET (*rearranged during transfection*) und CSF1R ^{103–105}.

Sunitinib ist für die Behandlung solider Tumoren wie des Nierenzellkarzinoms und des gastrointestinalen Stromatumors durch die FDA zugelassen ¹⁰³. In zwei Phase-I-Studien wurde der Effekt von Sunitinib als Monotherapie in der AML untersucht. Es wurden transiente anti-leukämische Effekte – typischerweise ein partielles Ansprechen von kurzer Dauer – erreicht, wobei die Effekte in *FLT3*-mutierter AML stärker ausgeprägt waren als bei Patienten mit *FLT3*-Wildtyp ^{106,107}. Zudem konnte für Sunitinib eine Äquipotenz gegenüber der *FLT3*-ITD- und *FLT3*-D835Y-Mutation gezeigt werden ¹⁰⁸. In einer Phase-I/II-Studie in *FLT3*-mutierten AML-Patienten über 60 Jahren wurde die Kombination einer Sunitinib-Behandlung mit intensiver Chemotherapie nach dem „7 + 3-Schema“ untersucht und es wurde eine CR oder CR_i (CR mit unvollständiger hämatologischer Erholung) in 59 % der Fälle erreicht ¹⁰⁹.

Sorafenib ist ein Multikinase-Inhibitor mit einer Aktivität gegenüber *FLT3* sowie *RAF* (*rapidly accelerated fibrosarcoma*), *VEGFR*, *PDGFR* und *c-KIT*, welcher von der FDA für die Behandlung des Leberzellkarzinoms und des Nierenzellkarzinoms zugelassen ist ¹¹⁰. Sorafenib zeigt eine stärkere Inhibierung der *FLT3*-ITD-Mutation als der *FLT3*-D835Y-Mutation ¹⁰⁸. Der TKI wurde bisher in verschiedenen klinischen Studien – beispielsweise als Monotherapie rezidivierender/refraktärer akuter Leukämie/AML ^{111–114} oder in Kombination mit der Standard-Chemotherapie der AML ^{99,115–117} – untersucht. In den Monotherapien konnten bei einigen Patienten Reduktionen der Blastenzahlen oder gar Remissionen verzeichnet werden, diese Effekte waren jedoch transient. In den verschiedenen Phase-II-Kombinationsstudien von Sorafenib mit konventioneller Chemotherapie wurden ambivalente Ergebnisse erzielt. So konnten beispielsweise in zwei Studien mit jüngeren AML-Patienten verstärkte anti-leukämische Effekte und hohe Remissionsraten erzielt werden, diese Effekte gingen allerdings teilweise mit einer erhöhten Toxizität einher ¹¹⁶ und waren in der Mehrheit der Fälle wiederum nur transient ^{98,99}. In älteren AML-Patienten erbrachte die zusätzliche Gabe von Sorafenib zwischen den Chemotherapie-Zyklen in einer kleinen, randomisierten Phase-II-Studie keinen Überlebensvorteil für die Patienten und es kam zu früherer Sterblichkeit aufgrund erhöhter Toxizität durch die Sorafenib-Behandlung ¹¹⁵.

Der Multikinase-Inhibitor Midostaurin (PKC412), mit Selektivität für *FLT3* (Wildtyp, *FLT3*-ITD und *FLT3*-D835Y) sowie u.a. *PKC* (Proteinkinase C), *PDGFR*, *CDK1* (*cyclin-dependent kinase 1*), *SYK* (*spleen tyrosine kinase*), *c-KIT* sowie für *VEGFR-2* ^{84,118},

erbrachte die bisher aussichtsreichsten Ergebnisse für die gezielte FLT3-Inhibierung bei der AML. Aufgrund der positiven Resultate aus klinischen Studien der Phasen I und II mit Midostaurin in Monotherapie oder in Kombination mit Chemotherapie^{100,119–121} wurde eine großangelegte Phase-III-Studie mit der Kombination aus Midostaurin und dem Standard-„7 + 3-Schema“ in jüngeren FLT3-mutierten AML-Patienten durchgeführt¹²². Durch die Kombination des FLT3-Inhibitors mit der Chemotherapie konnte ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben und Event-freies Überleben im Vergleich zu der Placebo-Gruppe erreicht werden. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde Midostaurin kürzlich von der FDA zur Behandlung FLT3-mutierter AML zugelassen¹²³.

Aufgrund der generell aussichtsreichen Ergebnisse für die gezielte FLT3-Inhibierung in der AML finden derzeit mit verschiedenen FLT3-Inhibitoren der ersten und zweiten Generation weitere klinische Studien im Monotherapie-, Kombinationstherapie- oder auch im Peri-Transplantations-Setting statt (ClinicalTrials.gov: NCT01578109 (Sorafenib), NCT01883362 (Midostaurin), NCT02039726 (Quizartinib), NCT01657682 (Crenolanib) und viele weitere⁷³).

- *Inhibitoren der PI3K/Akt/mTOR-Achse*

Der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg ist in der Mehrzahl der AML-Fälle überaktiviert⁵⁷, sodass eine Inhibierung dieser Signalkaskade als aussichtsreiche Option zur Behandlung der AML erscheint und Inhibitoren der verschiedenen potenziellen Angriffspunkte der PI3K/Akt/mTOR-Achse bereits in klinischen Studien der Phasen I und II zur Therapie der AML untersucht wurden. Bei den eingesetzten Substanzen handelt es sich neben mTOR-Inhibitoren und Isotyp-spezifischen PI3K-Inhibitoren auch um Pan-Klasse-I-PI3K-Inhibitoren, duale PI3K/mTOR-Inhibitoren sowie um Akt-Inhibitoren.

Der mTOR-Inhibitor Rapamycin (Sirolimus) sowie seine Derivate Temsirolimus (CCI-779), Everolimus (RAD001) und Deforolimus (AP23573) – sogenannte *Rapalogs* – wirken als allosterische Inhibitoren von mTORC1, einem Proteinkomplex aus mTOR und anderen Komponenten, der für die Akt-vermittelte Signalweiterleitung und schlussendlich u.a. für eine verstärkte zelluläre Proteinsynthese verantwortlich ist⁵⁷. Rapamycin sowie die verschiedenen *Rapalogs* wurden bereits in diversen klinischen Studien früher Phasen in R/R AML sowie in MDS-assoziiierter AML in Monotherapie^{124–128} sowie auch in Kombination mit Chemotherapie zur Behandlung der AML analysiert^{129–131}, wobei

zumeist ein unzureichendes Therapieansprechen erzielt wurde. Ursächlich für dieses Nichtansprechen eines Großteils der Patienten scheinen Resistenzmechanismen im Zuge der mTORC1-Inhibierung zu sein, beispielsweise die *Feedback*-Aktivierung von PI3K und Akt bei verminderter mTORC1-Aktivität ^{132,133}.

mTOR bildet im PI3K/Akt/mTOR-Signalweg einen weiteren Proteinkomplex – mTORC2 – welcher u.a. in die Akt-Aktivierung und in den durch die mTORC1-Inhibierung ausgelösten Resistenzmechanismus involviert ist ¹³⁴. Katalytische, ATP-kompetitive mTORC1/2-Inhibitoren sowie duale PI3K/mTORC1/2-Inhibitoren, welche die katalytische Region und Funktion von PI3K und mTORC1/2 blockieren, erscheinen somit als erfolgversprechende Option, die Ausbildung von Resistenzen zu verhindern ⁵⁷. mTORC1/2-Inhibitoren wie OSI-027, AZD8055 oder PP242 sowie duale PI3K/mTORC1/2-Inhibitoren wie NVP-BEZ235 oder NVP-BGT226 zeigten in prä-klinischen AML-Studien aussichtsreiche und im Vergleich zu alleinigen mTORC1-Inhibitoren ausgeprägtere anti-leukämische Effekte ^{135–139}. Mit Ausnahme von NVP-BEZ235 (ClinicalTrials.gov: NCT01756118) werden diese Substanzen jedoch noch nicht zur Behandlung der AML klinisch erprobt.

Die katalytische p110-Untereinheit der PI3K der Klasse I kann in vier verschiedenen Isoformen – α , β , γ oder δ – vorliegen, wobei die Untereinheiten α und β ubiquitär in vielen verschiedenen Gewebetypen, die Untereinheiten γ und δ jedoch hauptsächlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert werden und hier auch eine Rolle für die Pathogenese hämatologischer Krebserkrankungen zu spielen scheinen ^{140,141}. Durch den Einsatz Isotyp-spezifischer Inhibitoren wie dem PI3K δ -Inhibitor Idelalisib (CAL-101), oder aber dem in der klinischen Entwicklung wohl derzeit am weitesten fortgeschrittenen Pan-PI3K-Inhibitor Buparlisib (BKM120), sind auch alleinige PI3K-Inhibitoren Bestandteil klinischer Analysen in der AML. Die Ergebnisse dieser Phase-I-Studien stehen derzeit noch aus (ClinicalTrials.gov: NCT00710528 (Idelalisib)) bzw. zeigen kein ausgeprägtes Therapieansprechen (ClinicalTrials.gov: NCT01396499 (Buparlisib)) ¹⁴².

Eine Inhibierung von Akt zur Behandlung der AML wurde ebenfalls bereits in ersten klinischen Studien untersucht und erbrachte leider ebenfalls eher mäßige Erfolge ^{143,144}. Eine Kombinationsstudie des Akt-Inhibitors GSK2141795 mit einem MEK-Inhibitor zur

Behandlung der AML wurde aufgrund ausbleibender Effizienz frühzeitig abgebrochen (ClinicalTrials.gov: NCT01907815).

Derzeit werden verschiedenste Inhibitoren der PI3K/Akt/mTOR-Achse in Mono- oder Kombinationstherapie zur Behandlung der AML in klinischen Studien der Phasen I und II untersucht, bzw. es werden die Ergebnisse abgeschlossener Studien erwartet (ClinicalTrials.gov: NCT02438761 (Gedatolisib, dualer PI3K α / γ und mTOR-Inhibitor), NCT01154439 (Everolimus), NCT01449058 (Alpelisib, PI3K α -Inhibitor) und andere ⁵⁷).

1.2 Leukämiestammzellen

Trotz der besonders bei jüngeren Patienten recht hohen Remissionsraten durch die Standardtherapie der AML sowie der aussichtsreichen Ansätze mit neuen Therapiestrategien auf Basis eines besseren Verständnisses des Ursprungs und der Dynamik der Erkrankung, kommt es dennoch in einer großen Mehrheit der Patienten schlussendlich zu einem Krankheitsrückfall. Als Ursache rückt hierbei das Konzept der therapieresistenten Leukämiestammzelle als Ausgangspunkt der Erkrankung und des Rezidivs in den Fokus der Forschung.

So geht man davon aus, dass die Leukämie einer der normalen Hämatopoese vergleichbaren Hierarchie entspringt, an ihrem Ursprung also eine Leukämiestammzelle (engl.: *leukemic stem cell*, LSC) bzw. Leukämie-initiierende Zelle steht. Nachdem lange die Existenz von Krebsstammzellen postuliert wurde, konnte diese erstmals vor etwa 20 Jahren anhand der AML mittels eines Xenograft-Mausmodells nachgewiesen werden ^{145,146}. Als Leukämiestammzellen wurde eine kleine Subpopulation der AML-Zellen identifiziert, welche nach Transplantation in *non-obese diabetic*(NOD)/*severe combined immunodeficiency*(scid)-Mäuse in der Lage war, die Leukämie – auch in Ansätzen serieller Transplantation – hervorzurufen und eine breite Masse differenzierterer leukämischer Blasten hervorzubringen. Die AML-Zellen, die diese Fähigkeiten besaßen, wiesen einen CD34⁺CD38⁻-Immunophänotyp auf, wie er auch für normale hämatopoetische Stamm- und frühe Vorläuferzellen (engl.: *hematopoietic stem/progenitor cells*, HSPCs) typisch ist. Obwohl Leukämie-initiierende Zellen auch in der differenzierteren CD34⁺CD38⁺- und manchmal sogar in der CD34⁻-Zellfraktion

gefunden werden ¹⁴⁷, wird die primitivere CD34⁺CD38⁻-Subpopulation generell als die relevanteste LSC-Population angesehen ^{148,149}. Seither werden diese potenziellen LSCs umfangreich erforscht, denn die Krebsstammzell-Hypothese macht die LSCs für Chemotherapie-Resistenz und Krankheitsrückfälle verantwortlich ¹⁵⁰. Die Anzahl der LSCs innerhalb der gesamten Population mononukleärer Zellen kann von Patient zu Patient stark variieren. So wurden beispielsweise in einer Studie mit 16 AML-Patienten LSC-Häufigkeiten von $1/1,6 \times 10^3$ bis $1/1,1 \times 10^6$ gefunden ¹⁵¹.

LSCs zeichnen sich durch Eigenschaften vergleichbar mit denen normaler hämatopoetischer Stammzellen (engl.: *hematopoietic stem cells*, HSCs) aus. Zu diesen zählen das Potenzial zur Selbsterneuerung und unbegrenzter Proliferation, die Möglichkeit, in einem Ruhezustand außerhalb des Zellzyklus zu verbleiben (G₀-Phase), die Unempfindlichkeit gegenüber Apoptosesignalen sowie das Potenzial, in verschiedene Zelltypen zu differenzieren ^{7,148,152}. So stehen die LSCs am Ursprung der Hierarchie der AML und bringen durch begrenzte Differenzierung die breite Masse der leukämischen Blasten hervor. Ob die LSCs dabei durch Mutation aus normalen HSCs entstehen oder aber aus differenzierteren Vorläuferzellen, die durch Mutation Stammzeleigenschaften erlangt haben, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden ^{17,20,153–155} und ist vermutlich Patienten-abhängig ¹⁴⁹.

Als eine der Ursachen für die höhere Chemotherapieresistenz der LSCs im Vergleich zu der breiten Masse der AML-Blasten ¹⁵⁶ wird ihre protektive Interaktion mit der sogenannten Leukämiestammzellnische angesehen. In der normalen Hämatopoese spielen vielfältige Interaktionen der hämatopoetischen Stammzellen mit ihrer Mikroumgebung im Knochenmark, der sogenannten Knochenmarknische, eine wichtige Rolle. Anatomisch wird die Knochenmarknische in einen endostalen, nahe dem kortikalen Knochen gelegenen, und einen perivaskulären, nahe der Sinusoide gelegenen, Bereich unterteilt ¹⁵⁷ und beinhaltet ein dynamisches Gefüge aus Komponenten verschiedener Zelltypen. Zu diesen zählen u.a. Osteoblasten, Osteoklasten, Endothelzellen, Adipozyten und Mesenchymzellen ^{157–159}. Auch extrazelluläre Komponenten wie Osteopontin oder Calcium-Ionen sind wichtige Bestandteile der Knochenmarknische ^{160,161}. Die Knochenmarknische schafft so mit seinen zellulären und extrazellulären Komponenten ein Umfeld, welches essentiell für die spezifischen Eigenschaften der HSCs ist. Durch die Expression von Signalmolekülen kommt es zu

einem *Crosstalk* der Nischenzellen mit den HSCs, was deren Selbsterneuerung, Ruhezustand, Differenzierung und Mobilisierung reguliert ¹⁶². Diese Merkmale finden sich auch bei Leukämienstammzellen und man geht davon aus, dass die LSCs in ähnlicher Weise mit der Knochenmarknische wechselwirken und dadurch Fähigkeiten wie ihre Resistenz gegen Chemotherapie und Apoptose erlangen, indem die ruhenden Zellen vor Zellzyklus-aktiven Chemotherapeutika geschützt werden ¹⁶³. Dabei genutzte Interaktionsmechanismen beinhalten Cytokin-Signalwege, *Homing*-Mechanismen, Selbsterneuerungs-Signalwege oder Interaktionen mit Zelladhäsions-Molekülen ¹⁵⁷. Es konnte gezeigt werden, dass LSCs nicht nur in der physiologischen Knochenmarknische beheimatet sind, sondern diese auch zu einem ihnen eigenen Mikromilieu modulieren, der Leukämienstammzellnische, in welcher das Fortbestehen der Leukämiezellen gefördert wird, während parallel die normale Hämatopoese unterdrückt wird, was zur Progression der Erkrankung beiträgt ¹⁶⁴. Es deutet zudem vieles darauf hin, dass auch erst die Nische ursächlich für die Entstehung der LSCs sein kann, indem durch Veränderungen in beispielsweise Signalwegen der maligne Phänotyp gefördert wird ¹⁶⁵.

Da LSCs also häufig eine Resistenz gegen Chemotherapie aufweisen und das Selbsterneuerungspotenzial ihr Fortbestehen über einen langen Zeitraum sichert, werden sie, indem sie als minimale Resterkrankung verbleiben, für die hohe Rezidivrate bei der AML verantwortlich gemacht ¹⁶⁶. Dies spiegelt sich in den Ergebnissen diverser Studien wider, in welchen ein hoher Anteil an als LSCs definierter Zellen bei Diagnosestellung mit einem schlechten Überleben der AML-Patienten einhergeht ¹⁶⁷⁻¹⁶⁹. So wiesen Patienten mit einem hohen Anteil an CD34⁺CD38⁻ Zellen von über 3,5 % ein mittleres Rezidiv-freies Überleben von nur 5,6 Monaten auf, während Patienten mit einem geringeren Anteil an CD34⁺CD38⁻ Zellen ein mittleres Rezidiv-freies Überleben von 16 Monaten zeigten ¹⁶⁷. Bei der Therapie der AML ist es also von entscheidender Bedeutung, nicht nur den großen Teil der differenzierteren Blasten, sondern insbesondere auch die kleine Population der Leukämie-initiierenden Zellen auszulöschen.

Mittlerweile wurde eine Reihe von HSC-Markern identifiziert, die sich auch auf der Oberfläche von LSCs der AML finden. Hierzu zählen beispielsweise die myeloiden Antigene CD33, CD123 und CD13 ¹⁷⁰. Zudem wurden weitere Marker entdeckt, die verstärkt in LSCs und nicht bzw. wesentlich geringer in normalen HSCs exprimiert

werden und eine Unterscheidung dieser Zellen ermöglichen, was hinsichtlich der Suche nach neuen Angriffspunkten für eine gezielte Therapie von großer Bedeutung ist ^{149,152}. Zu diesen LSC-spezifischen Markern zählen u.a. CLL-1 (*C-type lectin-like molecule-1*) ¹⁷¹ sowie TIM-3 (*T cell Ig mucin-3*) ¹⁷², CD45RA ¹⁷³ und CD96 ¹⁷⁴. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Expressionsmuster zwischen den AML-Patienten stark variieren können und nicht alle Oberflächenmarker auf den LSCs exprimiert werden. So konnte bisher noch kein Marker identifiziert werden, der universell in CD34⁺CD38⁻ LSCs aller AML-Patienten exprimiert wird, dabei aber weder in der großen Masse der leukämischen Blasten noch in normalen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen zu finden ist ¹⁴⁸. Generell ist es aber ein großes Ziel der aktuellen Forschung, Medikamente wie beispielsweise therapeutische Antikörper zu entwickeln, die spezifisch die LSCs angreifen, dabei aber eine möglichst geringe Toxizität für die normalen HSCs aufweisen.

Neben aberrant exprimierten Strukturen auf der Zelloberfläche der Leukämie-initiiierenden Zellen können auch in HSCs und LSCs unterschiedlich regulierte Stammzell-Signalwege als therapeutische Zielstruktur genutzt werden. So spielt beispielsweise neben dem Wnt- und dem Notch-Signalweg auch der Hedgehog-Signalweg eine wichtige Rolle für das Überleben von LSCs in verschiedenen Krebsentitäten ^{175,176}.

1.3 Der Hedgehog-Signalweg

Der Hedgehog(HH)-Signalweg – entdeckt in den 1980ern in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) und benannt nach dem „stacheligen“ Phänotyp einer HH-Protein-defizienten Fliegenlarve mit gestörter anterior-posteriorer Segmentbildung ¹⁷⁷ – ist ein wichtiger Stammzell-Signalweg, der eine Rolle sowohl in embryonalen als auch in adulten Stammzellen spielt ^{178,179}. Die Schlüsselkomponenten des Signalwegs sind dabei evolutionär von der Fliege bis zum Menschen konserviert ¹⁸⁰. In der Embryonalentwicklung von Vertebraten, Insekten und möglicherweise weiteren Invertebraten reguliert die HH-Signaltransduktion Wachstum, Musterbildung und Morphogenese vieler Körperregionen ¹⁸⁰. HH-Signale können dabei kontextabhängig vielfältige Funktionen haben. Als Morphogene können sie durch Ausbildung eines Konzentrationsgradienten bestimmte Zellschicksale induzieren, als Mitogene die

Proliferation von Zellen regulieren und bei der Organogenese Einfluss auf Form und Struktur der Organe nehmen ¹⁸⁰. So spielt die HH-Signalweiterleitung beispielsweise eine essentielle Rolle bei der neuronalen Musterbildung im zentralen Nervensystem und bei der Ausbildung der Extremitäten von Wirbeltieren ¹⁸¹. In adulten Organismen ist der HH-Signalweg weitestgehend inaktiv und spielt lediglich in der Stammzell-Homöostase adulter Gewebe und bei der verletzungsbedingten Geweberegeneration eine Rolle ¹⁸². Eine Dysregulation des Signalwegs kann zu schweren angeborenen Anomalien wie Holoprosencephalie oder dem Pallister-Hall-Syndrom, einer genetischen Erkrankung, die schwere Organfehlbildungen und Polydaktylie einschließt, führen und ist mit der Entstehung verschiedener Krebsentitäten assoziiert ¹⁸¹. Trotz intensiver Forschung konnten bisher noch nicht alle Mechanismen der HH-Signaltransduktion vollständig aufgeklärt werden.

1.3.1 Der kanonische Hedgehog-Signalweg

Der klassische, kanonische HH-Signalweg wird durch die Bindung eines HH-Proteins bzw. -Liganden an seinen Rezeptor auf der Zielzelle initiiert. Im Gegensatz zu *D. melanogaster*, in welcher ein einziges HH-Protein identifiziert wurde, werden in Säugetierzellen drei verschiedene HH-Proteine mit sich teilweise überschneidenden Funktionen exprimiert: *Sonic Hedgehog* (SHH), *Desert Hedgehog* (DHH) und *Indian Hedgehog* (IHH) ¹⁸¹. Die finalen Mediatoren des HH-Signalwegs sind die Mitglieder der *Glioma-associated oncogene homologue* (GLI)-Transkriptionsfaktor-Familie. In Säugetieren existieren 3 GLI-Proteine: GLI1, GLI2 und GLI3. Sie gehören der Familie der Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren an und teilen eine hochkonservierte DNA-Bindungsdomäne, bestehend aus 5 Zinkfinger-Domänen der C₂H₂-Klasse (C: Cystein, H: Histidin), welche die Bindung an die Konsensussequenz 5'-GACCACCCA-3' auf der DNA in der Promotorregion der HH-Zielgene vermittelt ^{183,184}. Trotz ihrer Homologie weisen die GLI-Proteine unterschiedliche Hauptfunktionen im HH-Signalweg auf. GLI1 wirkt ausschließlich als Transkriptionsaktivator (GLI_A), bei GLI2 und GLI3 handelt es sich um bifunktionelle Transkriptionsfaktoren, die sowohl als GLI_A oder aber als Repressor (GLI_R) der Transkription fungieren können ¹⁸⁵. In Mausexperimenten zeigte sich, dass GLI2 und GLI3 eine essentielle Funktion in der Embryogenese haben, wohingegen GLI1 für die

Entwicklung der Tiere entbehrlich ist ^{186,187}. Ein Grund dafür könnte der Umstand sein, dass von den GLI-Proteinen GLI3 den Hauptrepressor der Signalkaskade ausmacht, während GLI2 den Hauptaktivator darstellt und GLI1 nicht als ursächlicher Aktivator, sondern als Verstärker des Signals fungiert ^{186,188,189}.

Im inaktiven HH-Signalweg blockiert das 12-spannige Transmembranprotein *Patched 1* (PTCH1) über einen noch nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus die Aktivität des 7-spannigen, transmembranen G-Protein-gekoppelten Rezeptors *Smoothed* (SMO), welcher für die kanonische HH-Signalweiterleitung essentiell ist ^{178,190}. Im inaktiven HH-Signalweg dominiert die Repressor-Funktion von GLI3; GLI1 hingegen wird – als Zielgen des aktiven Signalwegs ^{186,188} – nicht exprimiert und GLI2 wird zumeist vollständig degradiert oder liegt, wenn auch nur zu sehr geringen Anteilen, in seiner Repressor-Form vor ^{188,191}. So verhindert GLI_R im Zellkern die Transkription der HH-Zielgene.

Wird ein HH-Ligand, nach autoproteolytischer Spaltung und posttranslationaler Lipidierung, mithilfe des Transporter-ähnlichen Transmembranproteins *Dispatched* sekretiert ^{181,192}, kann er auf der Zielzelle von seinem Rezeptor PTCH1 gebunden werden ¹⁹³. Durch diese Bindung wird HH-PTCH1 durch Internalisierung inaktiviert und die Inhibierung von SMO aufgehoben. Für die HH-Signaltransduktion in Säugetieren ist dabei ein Schritt von besonderer Bedeutung: die reziproke Translokation von PTCH1 aus und von SMO in die primäre Zilie, in welcher SMO in den Prozess der GLI-Aktivierung involviert ist ^{188,194}. Die primäre Zilie ist ein einzigartiges Zellorganell, welches sich auf fast allen Vertebratenzellen inklusive der humanen hämatopoetischen Zellen findet ^{195,196}. Es handelt sich dabei um eine unmotile, Mikrotubuli-basierte und Antennen-ähnliche Ausstülpung der Zellmembran, deren zelluläre Funktionen noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Es ist jedoch bekannt, dass es sich bei dem Organell um eine Art „Sensor“ handelt, der sowohl mechanische als auch chemische Signale ins Zellinnere übertragen kann ^{197,198}. Aufbau und Erhaltung der Zilie erfolgen durch den Prozess des sogenannten intraflagellaren Transports (IFT), bei welchem ein bi-direktionaler Transport von IFT-Partikeln mithilfe von Kinesinen (anterograder Transport zur Zilien-Spitze) und Dynein-Motorproteinen (retrograder Transport zum Zellkörper) gewährleistet wird ¹⁹⁹.

Grundsätzlich resultiert die durch die Bindung eines HH-Proteins an PTCH1 induzierte Aktivierung des Signalwegs in eine Veränderung der GLI_R/GLI_A -Ratio, welche schlussendlich die Aktivität des Signalwegs bestimmt ¹⁹¹. Die Funktion der GLI-Proteine – als Repressor oder Aktivator der Transkription – erfordert dabei ein Zusammenspiel vielfältiger Komponenten, zu denen u.a. direkte GLI-Inhibitoren, verschiedene posttranslational modifizierende Enzyme wie Kinasen sowie Kinesin-Familien-Proteine, Ubiquitin-Ligasen, das Proteasom und nicht zuletzt die primäre Zilie zählen. Auf einige der GLI-Regulatoren wird im Folgenden eingegangen.

Strukturell ist für die GLI_A -Funktion aller GLI-Proteine ihre Carboxy(C)-terminale Aktivator-Domäne essentiell, die GLI_R -Funktion von GLI2 und GLI3 wird durch ihre zusätzliche Amino-terminale Repressor-Domäne in Abwesenheit der Aktivator-Domäne vermittelt ¹⁸⁵. In Abbildung 2 sind die GLI-Proteine mit ihren charakteristischen Domänen und Motiven schematisch dargestellt.

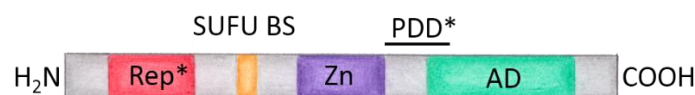


Abbildung 2: Schematische Darstellung der charakteristischen Domänen und Motive der GLI-Proteine.

Alle GLI-Proteine weisen Carboxy-terminal (COOH) eine Aktivator-Domäne (AD), gefolgt von den Zinkfinger-Domänen (Zn) sowie der SUFU-Bindungsstelle (SUFU BS) auf. GLI2 und GLI3 weisen zusätzlich am Amino-Terminus (NH₂) eine Repressor-Domäne (Rep) und mittig eine die Prozessierung bestimmende Domäne (PDD, *processing determinant domain*) auf. Die nur bei GLI2 und GLI3 vorkommenden Regionen sind mit * gekennzeichnet. Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an Hui *et al.* ¹⁸⁸.

Der GLI2- oder GLI3-Repressor GLI_R wird gebildet, indem die C-terminale Aktivator-Domäne (siehe Abbildung 2) des GLI2- oder GLI3-*full-length*-Proteins ($GLI2/3FL$) proteolytisch abgespalten wird. Nacheinander phosphorylieren die Serin/Threonin-Kinasen PKA (Proteinkinase A), GSK3 β und CK1 (Caseinkinase 1) definierte Serinreste in der C-terminalen Region des $GLI2/3FL$ -Proteins, was dessen *Beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase* (β -TrCP)-vermittelte Ubiquitinierung und nachfolgend den teilweisen Abbau durch das Proteasom bewirkt ^{200,201}. Es wird vermutet, dass der Prozess der limitierten Proteolyse von $GLI2/3FL$ durch eine spezifische, die Prozessierung bestimmende Protein-Domäne (engl.: *processing determinant domain*, PDD) reguliert wird ²⁰². Bei dem $GLI2FL$ -Protein führt die

PKA/GSK3 β /CK1-abhängige Phosphorylierung jedoch meist zu einem vollständigen Abbau von GLI2 durch das Proteasom und es wird nur ein sehr geringer Anteil GLI2_R gebildet^{203,204}. Man geht davon aus, dass der unterschiedliche Grad der Prozessierung von GLI2 und GLI3 durch die Potenz der jeweiligen PDD vermittelt wird^{188,202}. GLI1 hingegen weist weder eine PDD noch Repressor-Domäne auf und kann somit ausschließlich als Aktivator der Transkription fungieren^{185,188}. Die Aktivierung der GLIFL-Proteine zu GLI_A wiederum erfordert eine PKA-unabhängige Phosphorylierung von spezifischen Serin/Threoninresten^{205,206}.

Das Protein SUFU (*supressor of fused*) ist ein in Säugetieren essentieller GLI-Regulator²⁰⁷. Die regulatorische Funktion von SUFU beruht dabei vermutlich auf zytoplasmatischen, nukleären und Zilien-assoziierten Prozessen, wobei die zugrundeliegenden Mechanismen noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Bekannt scheint, dass SUFU in Abwesenheit des HH-Signals direkt die GLIFL-Proteine bindet und sie so im Zytoplasma zurückhält, wodurch ihre Aktivierung und die Signalweiterleitung inhibiert werden¹⁸⁸. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass SUFU zum einen die Ausbildung der GLI-Repressor-Form GLI_R durch Bindung von GSK3 β fördert²⁰⁸ und zudem die transkriptionelle Aktivität des Aktivators GLI_A im Zellkern durch Rekrutierung eines Co-Repressor-Komplexes inhibieren kann²⁰⁷.

Die primäre Zilie ist ein essentielles Element der kanonischen HH-Signaltransduktion in Säugetieren und für die Ausbildung der adäquaten, kontextabhängigen GLI_R/GLI_A-Ratio notwendig¹⁷⁷. Schlüsselkomponenten des HH-Signalwegs, wie PTCH1, SMO, die GLI-Proteine, SUFU und KIF7 (*kinesin family member 7*) – ein Kinesin-ähnliches Protein, das als ein weiterer Regulator der GLI-Proteine gilt^{209,210} und für welches eine essentielle Rolle bei der Ausbildung der Zilien-Spitze nachgewiesen wurde²¹¹ – lokalisieren in die primäre Zilie und man geht davon aus, dass viele der kritischen Reaktionen des Signalwegs in diesem Organell stattfinden, in welchem sie räumlich konzentriert werden und so ihre Interaktion gefördert wird^{177,194,211–214}. Während die Bindung und Inhibierung der GLI-Proteine durch SUFU Zilien-unabhängig zu sein scheint^{212,215}, wurde durch verschiedene Studien gezeigt, dass die für die kanonische Bildung der GLI-Aktivator-Form notwendige Dissoziation der GLIFL-Proteine von SUFU in der primären Zilie stattfindet^{212,216}.

Der genaue Mechanismus, durch welchen SMO innerhalb der primären Zilie das aktivierende HH-Signal auf die GLI-Proteine überträgt und aus den GLIFL-Proteinen GLI_A gebildet wird, ist nicht bekannt, das folgende grundsätzliche Szenario der kanonischen HH-Signalweiterleitung ist jedoch, nach derzeitigem Erkenntnisstand¹⁸⁸, denkbar (siehe Abbildung 3): In Abwesenheit eines HH-Signals lokalisiert PTCH1 in die primäre Zilie und blockiert dort die Akkumulation von SMO¹⁹⁴. Niedrige Level der SUFU-GLIFL-Proteinkomplexe translozieren in die Zilie, dies führt jedoch nicht zu einer Bildung der GLI_A-Form, stattdessen wird – möglicherweise auch unter Beteiligung von KIF7²⁰⁹ – die Bildung von GLI_R durch das Ubiquitin-Proteasom-System, welches an der Zilien-Basis lokalisiert ist²¹⁷, bewirkt. Im Zellkern blockiert GLI_R die Transkription der HH-Zielgene (Abbildung 3 A). Ein vorhandenes HH-Signal führt zu einer Deaktivierung von PTCH1 und nachfolgend der Akkumulation von SMO und den SUFU-GLIFL-Komplexen in der Zilien-Spitze^{213,214}. Aktiviertes SMO fördert, durch noch nicht vollständig verstandene Mechanismen, die Dissoziation der SUFU-GLIFL-Komplexe, die Aktivierung der GLIFL-Proteine zu GLI_A und die Mikrotubuli-abhängige Translokation von GLI_A in den Nukleus, wo die Transkription der HH-Zielgene initiiert wird¹⁸⁸ (Abbildung 3 B). Ein positiver Rückkopplungsmechanismus bewirkt die Expression von *GLI1*, sodass auch der GLI1-Aktivator gebildet und das HH-Signal noch potenziert wird¹⁸⁶.

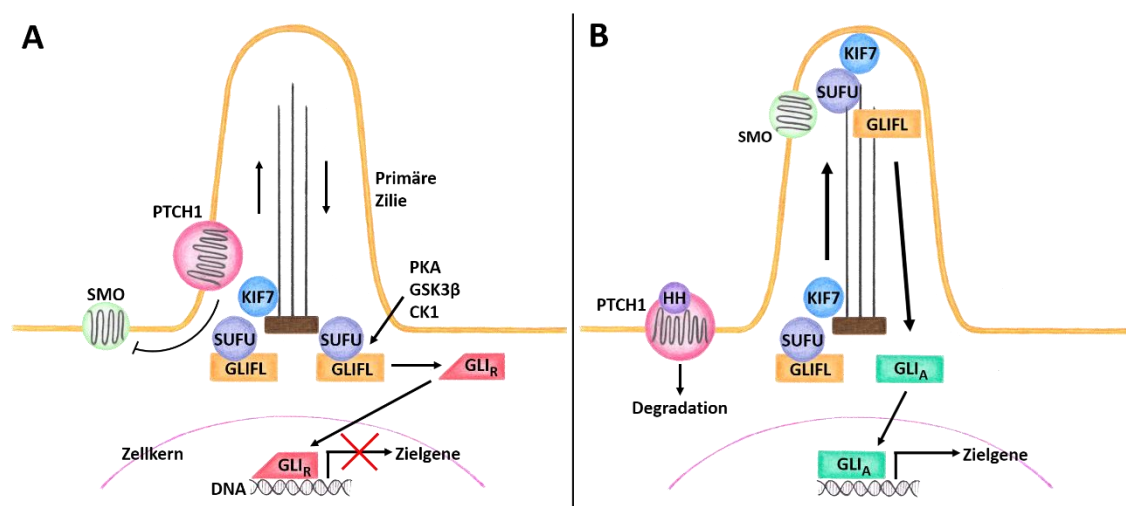


Abbildung 3: Schematische Darstellung des kanonischen HH-Signalwegs mit seinen Schlüsselkomponenten. A) In Abwesenheit eines HH-Liganden inhibiert PTCH1 die Aktivität von SMO. Geringe Mengen KIF7 und SUFU-GLIFL translozieren in die primäre Zilie, was zu einer Proteasom-abhängigen Bildung des Repressors GLI_R nach Phosphorylierung von GLIFL durch PKA, GSK3β und CK1 führt. GLI_R blockiert im Zellkern die Transkription der HH-Zielgene. B) Nach Bindung eines HH-Liganden (HH) an PTCH1 werden Ligand und Rezeptor internalisiert und degradiert. Aktiviertes SMO lokalisiert in die primäre Zilie. Auch KIF7 und der SUFU-GLIFL-Komplex akkumulieren in der Zilien-Spitze, in welcher

aktiviertes SMO die Dissoziation von SUFU-GLIFL und die nachfolgende GLI-Aktivierung fördert. Der Aktivator GLI_A induziert im Zellkern die Transkription der HH-Zielgene. Quelle: Abbildung (eigene Darstellung) und Text in Anlehnung an Pak *et al.* ²⁰⁵.

Die durch einen aktiven Signalweg initiierte Transkription von HH-Zielgenen kann einerseits eine positive Regulation durch den Transkriptionsaktivator GLI_A erfordern, andererseits kann die Transkription der Zielgene auch durch Aufhebung der Blockade durch den Transkriptionsrepressor GLI_R eingeleitet werden ¹⁸¹. Die Zielgene des HH-Signalwegs umfassen sowohl universell, d.h. in den meisten Zelltypen durch GLI-Proteine regulierte Gene, als auch solche, die nur in einem speziellen Kontext durch GLI aktiviert bzw. blockiert werden ¹⁸⁸. Zu den HH-Zielgenen zählen beispielsweise die für die Embryogenese wichtigen Gene *NKX2.2* (*NK2 homeobox 2*) ²¹⁸ oder *TBX2* (*T-box 2*) ¹⁸³ sowie allgemeiner exprimierte Gene, die u.a. zu Proliferation und Differenzierung sowie zu zellulärem Überleben und Selbsterneuerung beitragen. Hierzu zählen *CCND1* und *CCND2* (*Cyclin D1* und *Cyclin D2*) ²¹⁹, *MYCN* ²²⁰, *BCL2* (*B-cell lymphoma 2*) ²²¹, *BMI1* (*B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1*) ²²², *NANOG* ²²³, *SOX2* (*sex determining region Y (SRY)-box 2*) ²²⁴ und viele weitere ²²⁵. Ein wichtiger Aspekt der HH-Signaltransduktion ist seine Regulation durch vielfältige positive und negative Rückkopplungsmechanismen. So sind beispielsweise die HH-Schlüsselkomponenten *PTCH1* ²²⁶ und *GLI1* ^{227,228} selbst wichtige universelle Zielgene des HH-Signalwegs, wodurch die kontextabhängige Regulation des Signalwegs gewährleistet wird. Zudem wurde gezeigt, dass GLI_R in Abwesenheit eines HH-Signals die Expression von *GLI1* und *GLI2* in Maus-Nierenzellen blockiert und Chromatin-Immunopräzipitationsstudien offenbarten, dass GLI_R neben der Konsensussequenz in *GLI1* auch an seinen eigenen Promotor binden kann ²²⁹.

1.3.2 Der Hedgehog-Signalweg in der Hämatopoese

In Vertebraten unterscheidet man zwei Hauptphasen der Blutbildung: die primitive Hämatopoese, die während der frühen Embryonalentwicklung die Bildung von Erythrozyten und Makrophagen bewirkt sowie die definitive Hämatopoese, die die Bildung von multipotenten HSCs und die Aufrechterhaltung der Blutbildung im adulten Organismus gewährleistet ²³⁰. Durch Mausexperimente konnte gezeigt werden, dass der

HH-Signalweg grundsätzlich in den Prozess der Blutbildung involviert ist. Seine exakte Rolle und Relevanz scheint dabei jedoch von dem jeweiligen Entwicklungsstadium (primitiv oder definitiv), dem Zelltyp (HSCs oder adulte Blutzellen) und dem physiologischen Kontext (Homöostase oder regenerative Hämatopoese) abzuhängen²³¹. So konnte für den HH-Signalweg eine wichtige Rolle in frühen Stadien der Hämatopoese und Vaskulogenese in Mäusen nachgewiesen werden^{231–233}, Studien zu der Relevanz des Signalwegs in der normalen Hämatopoese adulter Tiere erbrachten jedoch kontroverse Ergebnisse bezüglich der Relevanz von SMO^{234–237} und auch PTCH1^{234,238}. In einem Mausmodell zur Analyse der Bedeutung von *GLI1* für die definitive Hämatopoese wurde gezeigt, dass *GLI1* zwar ein wichtiger Regulator der Proliferation und Differenzierung von HSCs und der Myelopoese ist und eine essentielle Rolle bei der Stress-induzierten regenerativen Hämatopoese innehat, für die Aufrechterhaltung einer stabilen adulten Hämatopoese jedoch entbehrlich zu sein scheint²³⁹. Die Relevanz des HH-Signalwegs in der normalen Vertebraten-Hämatopoese ist folglich noch nicht ausreichend aufgeklärt und bedarf weiterer Forschung, insbesondere im Hinblick auf potenzielle Nebenwirkungen einer HH-Signalweg-assoziierten Krebstherapie.

1.3.3 Der Hedgehog-Signalweg bei Krebserkrankungen

Aufgrund der physiologischen Rolle, die der HH-Signalweg in bestimmten Kontexten für die zelluläre Proliferation und Differenzierung sowie für das Überleben und die Selbsterneuerung von embryonalen und adulten Stammzellen spielt, überrascht es nicht, dass ein aktiver HH-Signalweg in die Entstehung und Aufrechterhaltung verschiedener Krebsentitäten involviert ist.

Ein erster Hinweis auf eine Beteiligung des HH-Signalwegs in die Karzinogenese erfolgte vor etwa 30 Jahren durch die Identifikation des amplifizierten und hoch exprimierten *GLI1* in einem humanen Gliom, nach welchem die GLI-Proteine anschließend benannt wurden²⁴⁰. Später wurde eine definitive Verbindung zwischen dem HH-Signalweg und Krebs durch die Entdeckung von Funktionsverlust-vermittelnden Keimbahnmutationen in *PTCH1* als Ursache des Nevoiden Basalzellkarzinom(Gorlin)-Syndroms hergestellt, einer autosomal-dominant vererbten Erkrankung, die u.a. für die frühe Ausbildung verschiedener Krebserkrankungen, jedoch hauptsächlich des Basalzellkarzinoms (BZK)

aber auch beispielsweise des Medulloblastoms (MB) oder Rhabdomyosarkoms prädisponiert ^{241,242}. Auch bei dem sporadischen BZK und MB spielt ein konstitutiv aktiver HH-Signalweg – durch inaktivierende bzw. aktivierende Mutationen in *PTCH1* oder seltener in *SUFU* oder *SMO* – eine wichtige Rolle ^{243–246}. Zusätzlich zu solchen Mutationen in den Komponenten der HH-Signalkaskade, die zu einer Liganden-unabhängigen Signalweg-Aktivierung führen, wurde in verschiedenen Krebsentitäten wie beispielsweise in Tumoren des oberen Gastrointestinaltraktes ^{247,248}, der Lunge ^{249,250} und des Pankreas ²⁵¹ aber auch beim Prostata- und Kolonkarzinom ^{252–254} eine verstärkte Expression von HH-Proteinen und eine damit verbundene anormale Liganden-abhängige HH-Signalweg-Aktivierung in den Tumorzellen oder in den sie umgebenden Stromazellen identifiziert.

Auch in hämatologischen Krebserkrankungen wie dem Multiplen Myelom ^{255–257} – einer malignen Plasmazell-Erkrankung im Knochenmark – sowie in der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) ^{258,259}, der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) ²⁶⁰, aber auch der chronischen myeloischen Leukämie (CML) ^{234,237,261} und der AML ^{262,263} spielt ein aktiver HH-Signalweg eine wichtige Rolle.

Die vorliegende Arbeit baut auf Ergebnissen aus Studien der Arbeitsgruppe Akute Leukämien (Fiedler/Wellbrock) auf ²⁶⁴, durch welche mittels einer Analyse von Genexpressionsdaten zweier unabhängiger Patientenkohorten mit neu diagnostizierter AML ein signifikant negativer prognostischer Einfluss erhöhter *GLI2*-Expression in der AML identifiziert wurde. Die erste Patientenkohorte (Kohorte A) umfasste 104 AML-Patienten, die im Rahmen der AMLSG 07-04-Studie (ClinicalTrials.gov: NCT00151242) behandelt wurden, die zweite Patientenkohorte (Kohorte B) bestand aus 290 AML-Patienten einer klinischen Studie von Löwenberg und Kollegen ²⁶⁵, deren *Microarray*-basierte Genexpressionsdaten von Verhaak *et al.* ²⁶⁶ publiziert wurden. Die Daten *Reverse Transcription quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction*(RT-qPCR)-basierter Genexpressionsanalysen für Komponenten des HH-Signalwegs in mononukleären Zellen des Knochenmarks und des peripheren Bluts der Kohorte A wurden mit den klinischen Patientendaten verglichen und ein signifikant negativer Einfluss einer *GLI2*-Expression auf das Event-freie und Rückfall-freie Überleben sowie auf das Gesamtüberleben gefunden. Die Analyse der Kohorte B bestätigte den negativen Einfluss einer hohen *GLI2*-Expression auf das Gesamt- und Event-freie Überleben der

Patienten, Daten über das Rückfall-freie Überleben standen nicht zur Verfügung. In dieser zweiten Kohorte hatte eine hohe *GLI1*-Expression ebenfalls einen signifikant negativen Einfluss auf das Patientenüberleben. Die Relevanz von *GLI1/2* für die Pathogenese der AML wurde durch zusätzliche Studien der Arbeitsgruppe Akute Leukämien (Fiedler/Wellbrock) verdeutlicht, in welchen eine therapeutische *GLI1/2*-Inhibierung zu anti-leukämischen Effekten in Proliferations-, Apoptose- und *Colony Formation*-Assays mit AML-Zelllinien und primären Blasten führte, während diese anti-leukämischen Effekte in *CD34*⁺ Zellen gesunder Spender weniger stark ausgeprägt waren. Interessanterweise ergab bei der Studie der beiden AML-Patientenkohorten die Analyse einer Korrelation der *GLI2*-Expression mit den Patientencharakteristika, dass die *GLI2*-Expression mit einem *FLT3*-Mutationsstatus – ITD oder TKD – signifikant assoziiert war. So wiesen beispielsweise in Kohorte A 80 % der *GLI2*-Expressoren eine *FLT3*-Mutation auf, während in lediglich 13 % der Patienten ohne *GLI2*-Expression eine *FLT3*-Mutation vorlag. Eine Subgruppenanalyse innerhalb der Kohorte B zeigte zudem, dass sich der signifikant negative Einfluss einer hohen *GLI2*-Expression auf das Überleben auf *FLT3*-mutierte Patienten beschränkte. Diese Ergebnisse unterstreichen die Relevanz des HH-Signalwegs in der AML und deuten zudem auf eine Verbindung des HH- mit dem *FLT3*-Signalweg hin.

1.3.4 Der nicht-kanonische Hedgehog-Signalweg

Vor allem im Kontext von Krebserkrankungen wurde neben einer klassischen, kanonischen HH-Signalweiterleitung auch eine nicht-kanonische Regulierung des HH-Signalwegs beobachtet²⁶⁷. Hierbei handelt es sich um eine Liganden- und *PTCH1*/*SMO*-unabhängige *GLI*-Aktivierung^{268,269}. Neben einer nicht-kanonischen negativen Regulation von *GLI*-Transkriptionsaktivatoren durch klassische Tumorsuppressoren wie *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog*)²⁷⁰ oder *p53*²⁷¹ wurde eine nicht-kanonische *GLI1/2*-Aktivierung insbesondere für verschiedene onkogene Signalmoleküle und -wege beschrieben, die in die Regulation vielzähliger grundlegender zellulärer Funktionen wie die Transkription, Translation und Proliferation sowie in das Wachstum, die Differenzierung und in das Überleben der Zellen involviert sind. Hierzu zählen u.a. *RAS*/*RAF*/*MEK*/*MAPK*, *TGF-β* (*transforming growth factor-β*), epigenetische Regulatoren

wie der Chromatin-Reader BRD4 (*bromodomain-containing protein 4*) – ein Mitglied der BET(*bromodomain and extra terminal domain*)-Familie – sowie ErbB2 (*erb-b2 receptor tyrosine kinase 2*), PI3K/Akt und mTOR ^{267,272–278}.

So wurde beispielsweise im dukalen Adenokarzinom des Pankreas eine SMO-unabhängige *GLI1*-Expression ²⁷⁶ bzw. *GLI1*-Aktivierung ²⁷⁷ über onkogenes KRAS und nachfolgend über die RAF/MEK/MAPK-Achse ²⁷⁷ nachgewiesen. Durch Studien in verschiedenen humanen Zelltypen wie Fibroblasten und Keratinozyten sowie in diversen humanen Krebszelllinien und im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eine *GLI2*- und darauf folgende *GLI1*-Expression durch die TGF- β /SMAD3-Achse induziert wird ²⁷⁴ und auch epigenetische Regulatoren wie BRD4 können die *GLI*-Transkription nicht-kanonisch aktivieren. In zwei parallelen Studien wurde gezeigt, dass BRD4 die *GLI1/2*-Transkription SMO- und SUFU-unabhängig reguliert, indem es direkt den *GLI1*- bzw. *GLI2*-Promotor bindet ^{278,279}. Eine weitere SMO-unabhängige *GLI1*-Aktivierung wurde über die Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)/mTOR/*ribosomal protein S6 kinase 1*(S6K1)-Achse beim Ösophaguskarzinom sowie beim Prostatakarzinom identifiziert ^{275,280}. Ebenfalls beim Ösophaguskarzinom wurde eine SMO-unabhängige *GLI1*-Aktivierung über ErbB2 und nachfolgend über die PI3K/Akt/mTOR-Achse gefunden ²⁷³ und auch in anderen Krebsentitäten sowie in embryonalen Vertebratenzellen konnte durch verschiedene Studien eine Verbindung zwischen sowohl dem kanonischen HH-Signalweg als auch einer nicht-kanonischen HH-Signalweg-Aktivierung und der PI3K/Akt-Signalkaskade identifiziert werden. Riobó und Kollegen wiesen eine essentielle Rolle der PI3K-induzierten Aktivität von Akt für den HH-Signalweg in verschiedenen Vertebratenzellen nach ²⁸¹ und auch in einer Studie im Nierenzellkarzinom wurde eine SMO-unabhängige *GLI1/2*-Aktivierung über den PI3K/Akt-Signalweg identifiziert ²⁷².

Auch in der AML weisen erste Analysen auf einen *Crosstalk* der PI3K/mTOR-Kaskade mit dem HH-Signalweg auf der Ebene der *GLI1/2*-Transkriptionsfaktoren hin ^{282–284} und durch die Ergebnisse der in Abschnitt 1.3.3 bereits beschriebenen Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Akute Leukämien (Fiedler/Wellbrock) ²⁶⁴, welche auf eine Verbindung zwischen aktivierenden *FLT3*-Mutationen und erhöhter *GLI1/2*-Expression in der AML hindeuten, erscheint eine *GLI1/2*-Aktivierung über *FLT3* und möglicherweise

nachfolgend über die PI3K-Kaskade als ein weiterer nicht-kanonischer Mechanismus der onkogenen GLI1/2-Aktivierung.

Das Vorhandensein einer nicht-kanonischen HH-Signalweg-Aktivierung bei einer Krebserkrankung kann von therapeutischer Bedeutung sein, da eine SMO-unabhängige GLI-Aktivierung in eine Therapieresistenz gegenüber HH-Inhibitoren auf der Ebene von SMO resultiert ²⁶⁹. Auf die derzeit in prä-klinischen und klinischen Studien eingesetzten sowie bereits für die Behandlung einiger Krebsentitäten zugelassenen HH-Inhibitoren wird im folgenden Abschnitt eingegangen.

1.3.5 Hedgehog-Inhibitoren

Welche Relevanz der HH-Signalweg bei Krebserkrankungen hat, wird auch durch die teilweise recht aussichtsreichen Ergebnisse, die eine gezielte Inhibierung des HH-Signalwegs sowohl in prä-klinischen und klinischen Studien als auch bereits in der klinischen Anwendung liefern kann, deutlich. Die Strategien zur Inhibierung des HH-Signalwegs beruhen dabei weitgehend auf rational designten, kleinmolekularen Substanzen, die den HH-Signalweg auf verschiedenen Ebenen blockieren können – von den HH-Liganden über SMO bis hin zu den GLI1/2-Aktivatoren.

Die Strategie der direkten SMO-Inhibierung stellt das derzeit größte und aktivste Feld der Forschung dar ²⁸⁵. Im Folgenden wird auf einige ausgewählte Substanzen näher eingegangen. Der erste identifizierte SMO-Inhibitor ist Cyclopamin, ein in der Kornlilie *Veratrum californicum* vorkommendes steroidales Alkaloid, auf welches die Wissenschaft in den 1960er Jahren durch seine teratogene Wirkung auf Lämmer, deren Mütter in der Schwangerschaft auf Wiesen mit Kornlilienbewuchs geweidet hatten, aufmerksam wurde ²⁸⁶. Die Lämmer zeigten schwere Geburtsdefekte wie Zyklopie, wodurch die Substanz ihren Namen erhielt. Cyclopamin erwies sich als effektiver Inhibitor des HH-Signalwegs und zeigte eine hohe Effizienz in prä-klinischen Studien, beispielsweise in Xenograft-Mausmodellen zur Behandlung verschiedener Krebsentitäten wie Melanom, Kolon-, Pankreas- oder Prostatakarzinom ^{254,270,287–290}. Aufgrund negativer pharmakokinetischer Charakteristika (Schwerlöslichkeit in physiologischen Lösungen, chemische Instabilität in saurem Milieu), niedriger Potenz

sowie unerwünschter Toxizität eignet sich die Substanz jedoch nicht für die klinische Anwendung, stellt aber noch immer eine wichtige Referenzsubstanz für die SMO-Inhibierung in prä-klinischen Studien dar ^{285,291}.

Der erste für die Krebstherapie zugelassene HH-Signalweg-Inhibitor ist der vollsynthetisch hergestellte, kleinmolekulare SMO-Inhibitor Vismodegib (GDC-0449) ^{292,293}. Nach aussichtsreichen Ergebnissen klinischer Studien in soliden Tumoren inklusive Medulloblastom und Basalzellkarzinom (BZK) ^{294–296} erfolgte 2012 die Zulassung durch die FDA zur Behandlung des metastasierten oder lokal fortgeschrittenen BZK bei Patienten, die weder einer kurativen Operation noch einer Radiotherapie unterzogen werden können ²⁹². Im Jahr 2015 wurde mit Sonidegib (LDE-225, NVP-LDE225) ein weiterer synthetischer, selektiver, kleinmolekularer SMO-Inhibitor zur Behandlung dieser BZK-Formen zugelassen ²⁹⁷. Derzeit sind diverse klinische Studien der Phasen I-IV mit Vismodegib in Mono- bzw. Kombinationstherapie oder auch in Verbindung mit Bestrahlung zur Behandlung verschiedener Krebsentitäten aktiv oder befinden sich in der Rekrutierungsphase (ClinicalTrials.gov: NCT02523014 (Meningiom), NCT02436408 und NCT02690948 (BZK), NCT01835626 (Kopf-Hals-Tumore), NCT02465060 (solide Tumore, Lymphom, Multiples Myelom), NCT02073838 (AML) und andere). Sonidegib wird derzeit in verschiedenen klinischen Studien der Phasen I und II zur Behandlung solider Tumore aber auch hämatologischer Erkrankungen in Mono- oder Kombinationstherapie analysiert (ClinicalTrials.gov: NCT02303041 (BZK), NCT03434262 (Hirntumore), NCT02195973 (Ovarialkarzinom), NCT02151864 (Hepatozelluläres Karzinom), NCT02086552 (Multiples Myelom), NCT02129101 (Myeloide Erkrankungen inklusive AML)). Sowohl für Vismodegib als auch für Sonidegib wurden in den bisherigen klinischen Studien zumeist milde unerwünschte Nebenwirkungen wie beispielsweise Muskelspasmen und -krämpfe, Haarausfall und Geschmacksstörungen beobachtet, Ereignisse, die für diese Inhibitor-Klasse typisch zu sein scheinen ^{292,297}.

Glasdegib (PF-04449913), ein weiterer synthetischer, kleinmolekularer Inhibitor, der SMO selektiv bindet und hemmt ²⁹⁸, erscheint als der bisher aussichtsreichste SMO-Inhibitor zur Therapie hämatologischer Erkrankungen. Eine erste kleine Phase-I-Studie in Patienten mit verschiedenen hämatologischen Erkrankungen – größtenteils AML –, die sich als refraktär, resistent oder intolerant gegenüber einer vorherigen Behandlung

gezeigt hatten, erbrachte positive Ergebnisse ²⁹⁹. Bei über der Hälfte der Patienten konnten ein objektives Therapieansprechen oder zumindest Anzeichen einer biologischen Aktivität der PF-04449913-Behandlung beobachtet werden. Basierend auf diesen aussichtsreichen Ergebnissen sind diverse weitere klinische Studien der Phasen I-III mit PF-04449913 in Mono- bzw. in Kombinationstherapie mit Chemotherapie oder hypomethylierenden Agenzien (HMAs), die die aberrante DNA-Hypermethylierung als mögliche Ursache für die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und die Störung der myeloiden Reifung und Differenzierung inhibieren ³⁰⁰, zur Behandlung verschiedener hämatologischer Erkrankungen, insbesondere aber der AML, aktiv oder befinden sich in der Rekrutierungsphase (ClinicalTrials.gov: NCT01546038 (AML, Hochrisiko-MDS), NCT03416179 (AML), NCT01841333 (AML nach allo-HSCT mit hohem Rückfallrisiko), NCT02367456 (AML, Hochrisiko-MDS, chronische myelomonozytäre Leukämie), NCT02038777 (AML, Hochrisiko-MDS)).

Substanzen wie der monoklonale anti-SHH-Antikörper 5E1 und die kleinmolekulare Substanz Robotnikinin sind Beispiele für Inhibitoren, die die Interaktion zwischen den HH-Liganden und PTCH1 und somit die kanonische HH-Signalweiterleitung *upstream* von SMO hemmen ^{301,302}. Bisher beschränkt sich der Einsatz dieser Art HH-Inhibitoren auf prä-klinische Studien ^{256,258,262,302,303} und so werden weder 5E1 noch Robotnikinin derzeit klinisch erprobt.

In den vergangenen Jahren wurden auch zunehmend Bemühungen unternommen, HH-Signalweg-Inhibitoren zu entwickeln, die in der Signalkaskade *downstream* von SMO, beispielsweise auf der Ebene der GLI-Proteine, agieren. So identifizierten Lauth und Kollegen mithilfe eines großangelegten Zell-basierten Screens kleinmolekularer Substanzen zwei potente GLI-Antagonisten, die sogenannten GANTs – GANT58 (ein Thiophen-Kern mit 4 Pyridin-Ringen) und GANT61 (ein Hexahydro-Pyrimidin-Derivat) ³⁰⁴. Die Substanzen waren in der Lage, die GLI1- und GLI2-vermittelte Gen-Transaktivierung Dosis-abhängig *downstream* von SMO und SUFU zu inhibieren, wobei gezeigt werden konnte, dass beide Substanzen die GLI1-Funktion im Nukleus blockieren. GANT61, das sich als der effektivere der beiden Inhibitoren herausstellte, zeigte zudem eine hohe Spezifität für den HH/GLI-Signalweg ohne Effekte auf andere Signalwege wie NF-κB (*nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B-cells*) oder RAS/RAF/MEK/MAPK und auch die Spezifität der GANT61-GLI-Interaktion ohne Bindung von GANT61 an

andere Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren konnte nachgewiesen werden. Den genauen Mechanismus, durch welchen GANT61 die Bindung von GLI1 an die DNA inhibiert, haben Agyeman *et al.* identifiziert ³⁰⁵. Grundsätzlich beinhalten die GLI-Proteine 5 Zinkfinger-Domänen, von denen nur Zinkfinger 1 keinen direkten Kontakt mit der DNA eingeht. Zinkfinger 2-5 binden in die große Furche der DNA und umfassen die Helix, wobei Zinkfinger 2 und 3 hauptsächlich das DNA-Rückgrat binden, während Zinkfinger 4 und 5 direkten Kontakt zu den DNA-Basen haben ^{306,307}. Agyeman *et al.* konnten berechnen, dass GANT61 nicht an die DNA, sondern in eine zwischen GLI1 und GLI2 konservierte Region der Furche zwischen Zinkfinger 2 und 3 des GLI-Proteins bindet und so die Interaktion zwischen GLI1 bzw. GLI2 und der DNA inhibiert, auch wenn sich diese Region nicht in der direkten DNA-Bindungsregion des GLI-Proteins befindet. In der Studie von Lauth und Kollegen inhibierte GANT61 das Wachstum von Tumorzellen *in vitro* – auch in Systemen, in denen eine direkte SMO-Inhibierung durch Cyclopamin keinen Effekt hatte – und zeigte zudem eine aussichtsreiche anti-kanzerogene Wirkung in einem Prostatakarzinom-Xenograft-Mausmodell mit aktiver HH-Signalweg-Aktivierung ³⁰⁴. GANT61 wurde bereits erfolgreich in vielzähligen *in vitro*- und auch *in vivo*-Studien zu verschiedenen Krebsentitäten einschließlich der AML eingesetzt ^{263,282,283,308–315}, befindet sich jedoch nicht in der klinischen Erprobung. Mechanistische Studien haben gezeigt, dass GANT61 auf verschiedenste zelluläre Prozesse, die in Verbindung mit der Entstehung und Aufrechterhaltung von Krebs stehen – sogenannte „*hallmarks of cancer*“ – Einfluss nimmt ³⁰⁷. Hierzu zählen Vorgänge, die beispielsweise die Viabilität der Zellen sowie Proliferation, Apoptose, DNA-Reparaturmechanismen oder Stammzeleigenschaften bedingen ³⁰⁷.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Standardtherapie der AML hat in den vergangenen Jahrzehnten kaum Veränderungen erfahren. Trotz tieferer Einsichten in die Biologie und Evolution der AML und damit einhergehender neuer Therapieansätze verbleibt die Prognose für den Großteil der Patienten schlecht und es kommt schlussendlich in der Mehrheit der Fälle zu einem Rezidiv, sodass neue Behandlungsstrategien, die dem Auftreten von Krankheitsrückfällen vorbeugen können, dringend erforderlich sind.

Aktivierende Mutationen in der Rezeptor-Tyrosinkinase FLT3 treten bei etwa einem Drittel der AML-Patienten auf und gehen häufig mit einer schlechten Prognose aufgrund des raschen Auftretens von Rezidiven einher. Eine gegen diese Mutation zielgerichtete Therapie erscheint als sinnvolle Behandlungsstrategie. Anti-leukämische Effekte durch FLT3-Inhibitoren in Monotherapie oder Kombination mit Chemotherapie waren bisher jedoch aufgrund von Resistenzmechanismen häufig nur transient. Als mögliche Ursache für das spätere Wiederaufkeimen der Erkrankung nach einer Chemotherapie gelten sogenannte Leukämienstammzellen (LSCs), die die Behandlung im Schutze der Knochenmarknische überleben. Eine langfristige Heilung von der AML kann somit nur erreicht werden, wenn neben der großen Masse der AML-Blasten auch die LSCs eliminiert werden.

Ein für die Biologie und Therapieresistenz der LSCs wichtiger Signalweg ist der Hedgehog-Signalweg. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Akute Leukämien (Fiedler/Wellbrock) wurde gezeigt, dass eine hohe *GLI2*- bzw. auch *GLI1*-Expression mit einem schlechten Patientenüberleben in der AML korreliert und dass eine Behandlung mit dem spezifischen *GLI1/2*-Inhibitor GANT61 zu anti-leukämischen *in vitro*-Effekten bei AML-Zelllinien und Primärmaterial führt. Zudem wurde gezeigt, dass der negative Einfluss der hohen *GLI2*-Expression mit dem Vorhandensein von *FLT3*-Mutationen korreliert, weshalb – zusätzlich gestützt durch Daten aus anderen Krebsentitäten und Tiermodellen – eine nicht-kanonische Aktivierung der Hedgehog-Mediatoren *GLI1/2* über die *FLT3*/*PI3K*-Achse vermutet wurde.

Mit dem Ziel vor Augen, eine therapeutische Zielstruktur zur Behandlung der AML – insbesondere auch der schwer zu heilenden *FLT3*-mutierten AML – zu identifizieren, sollten zunächst die in den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Akute Leukämien (Fiedler/Wellbrock) beobachteten anti-leukämischen Effekte der GANT61-Behandlung mittels eines gezielten *shRNA-Knockdowns* von *GLI1* und *GLI2* in AML-Zelllinien und im *FLT3*-mutierten AML-Xenograft-Mausmodell verifiziert werden. Anschließend sollte das therapeutische Potenzial einer kombinierten Behandlung mit kleinmolekularen Inhibitoren des HH- und *FLT3*/*PI3K*-Signalwegs *in vitro* in AML-Zelllinien und in Primärmaterial sowie *in vivo* in einem *FLT3*-mutierten AML-Xenograft-Mausmodell analysiert werden. Zusätzlich sollte die potenziell nicht-kanonisch über die *FLT3*/*PI3K*-Achse aktivierte, *GLI*-vermittelte, HH-Signalweiterleitung durch den Einsatz eines

GLI1/2-Reporter-Systems verifiziert und darüber hinaus analysiert werden, ob in der AML eine nicht-kanonische oder kanonische GLI1/2-Aktivierung überwiegt. Abschließend sollte eine mögliche nicht-kanonische Verbindung zwischen dem FLT3-Signalweg und aktiver HH-Signalweiterleitung auf Proteinebene untersucht werden.

II Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 3: Verwendete Geräte.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Agarose-Gelelektrophoresekammer	DNA Sub Cell	BIO-RAD (Hercules, USA)
Analysenwaagen	Pioneer™ PA213 AT261 DeltaRange®	Ohaus Corp. (Pine Brook, USA) Mettler-Toledo GmbH (Greifensee, CH)
Blotting-Kammer	Mini-PROTEAN® 3 Cell	Bio-Rad (Hercules, USA)
Chemilumineszenz-Detektionssystem	Fusion SL 4 3500 WL	Vilber Lourmat (Sud Torcy, FR)
CO₂-Inkubatoren	Labotect Incubator C200 Forma Scientific 3165	Labotect (Göttingen) Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Durchflusszytometer	FACSCalibur™	BD (Franklin Lakes, USA)
Einfrierbehältnis	Mr. Frosty™	Nalgene, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Geldokumentations-system	E-BOX VX2 2.0 MP	PEQLAB (Erlangen)
Heizblock	Thermomixer Comfort	Eppendorf (Hamburg)
Inkubationsschüttler	Certomat® IS	B. Braun Biotech International (Melsungen)
Kamera	AxioCam MRc	Carl Zeiss AG (Oberkochen)
Laborschüttler	KM-2	Edmund Bühler GmbH (Hechingen)
Light Cycler	LightCycler® 96	Roche (Mannheim)
Magnetischer Zellseparator	VarioMACS™ Separator	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach)
Magnetrührer	IKAMAG RH	Janke & Kunkel, IKA (Staufen)
Mikrobiologischer Brutschrank	Heraeus® Kendro Typ B12	Heraeus (Hanau)
Mikroplatten-Leser	Infinite® F200 Pro	Tecan Life Sciences (Männedorf, CH)
Mikroskop	Axiovert 25	Zeiss (Jena)

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Narkose-Anlage	Sigma Delta Vaporizer	Penlon Limited (Abingdon, UK)
Neubauer-Zählkammer	Neubauer improved bright line	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda-Königshofen)
pH-Meter	pH 192, WTW	Xylem Analytics (Weilheim)
Rollschüttler	Stuart® roller mixer SRT9D	Cole-Parmer (Staffordshire, UK)
SDS-PAGE-Kammer	XCell SureLock™ Electrophoresis Cell	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Spannungsgerät	PowerPac™ 300	BIO-RAD (Hercules, USA)
Spectrophotometer	NanoDrop™ Spectrophotometer ND-1000	PEQLAB (Erlangen)
Sterilwerkbänke	LaminAir HB 2448	Heraeus (Hanau)
	Sicherheitswerkbank HERAsafe	Heraeus (Hanau)
Stickstoff-Lagerungstank	CryoPlus™	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Thermocycler	T1 Thermocycler	Biometra (Göttingen)
	FTS-320 Thermal Sequencer	Corbett Research (Mortlake, AU)
Ultraschallprozessor	UP50H Ultrasonic Processor	Hielscher Ultrasonics (Teltow)
Vortexer	VF-2	Janke & Kunkel, IKA (Staufen)
Wasserbad	GFL 1002	GFL (Burgwedel)
Zellzählgerät	Vi-Cell™ XR, Cell Viability Analyzer	Beckmann Coulter (Brea, USA)
Zentrifugen	Centrifuge 5415 D	Eppendorf (Hamburg)
	Centrifuge 5424	Eppendorf (Hamburg)
	Centrifuge 5804 D	Eppendorf (Hamburg)
	Centrifuge 5810 R	Eppendorf (Hamburg)
	Labofuge™ 400 R	Heraeus (Hanau)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Die Reaktionsgefäße und Plastikwaren sowie andere Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur und die Experimente wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen B. Braun Biotech International GmbH (Melsungen), Falcon (Heidelberg), Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen), Roche (Mannheim) und Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

2.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Zusätze

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Zusätze.

Bezeichnung	Hersteller
10 × Annexin V Binding Buffer	Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)
2-Propanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
AB-Serum	BIO-RAD (Hercules, USA)
Aceton	Merck (Darmstadt)
Ampicillin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Annexin V-APC	MabTag GmbH (Friesoythe)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
BSA, Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Chloroquine	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
D(+)-Glucose, wasserfrei	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
DEPC-Treated Water	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
DTT	AppliChem (Darmstadt)
EDTA	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Ethanol, absolut	Merck (Darmstadt)
Ethidium bromide Solution, 10 mg/mL	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Forene® 100 % (V/V)	AbbVie AG (Baar, CH)
Formafix 4 % gepuffert	Grimm med. Logistik GmbH (Torgelow)
Fötales Bovines Serum (FBS)	Biochrom GmbH (Berlin)
Gibco™ DPBS (1 ×), [-] CaCl₂, [-] MgCl₂, bezeichnet als PBS	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Glycerol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Glycin	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
GM-CSF (human, rekombinant)	PreproTech (Hamburg)
Heparin-Natrium Braun „Multi“ 10.000 I.E./mL	B. Braun Biotech International (Melsungen)
Hexadimethrine bromide (Polybrene)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Horse Serum (HS)	Gibco, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Hydrocortisone	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

Bezeichnung	Hersteller
Hygromycin B-Lösung	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Kanamycinsulfat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Ketanest® S 25mg/mL	Pfizer (New York City, USA)
KHCO₃	Merck (Darmstadt)
Na₂EDTA	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
NaCl	J.T. Baker, Avantor (Center Valley, USA)
NaCl 0,9 %	B. Braun Biotech International (Melsungen)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
NH₄Cl	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Polysucrose 400 Trennmedium	BioClot GmbH (Aidenbach)
Propidium iodide, 1 mg/mL solution	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Puromycin dihydrochloride	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
RNAlater RNA Stabilization Reagent	Quiagen (Hilden)
Rompun® 2 % Injektionslösung	Bayer AG (Leverkusen)
Salzsäure 6 mol/L – 6 N HCl	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
SeaKem LE Agarose	Lonza (Basel, CH)
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Trichloroacetic acid (TCA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Tris-base	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Tris-HCl	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Trypanblau-Lösung, 0,4 %	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Trypsin	PAA Laboratories (Pasching, AT)
Tween® 20	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

2.1.4 Kits und Enzyme

Tabelle 5: Verwendete Kits und Enzyme.

Bezeichnung	Hersteller
Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare (Little Chalfont, UK)
Cignal™ Lenti CMV Renilla Control (Hygro), CLS-RHL	Quiagen (Venlo, NL)
Cignal™ Lenti GLI Reporter (luc), CLS-3030L	Quiagen (Venlo, NL)
DC Protein Assay	BIO-RAD (Hercules, USA)
DreamTaq™ Green PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Dual-GLO® Luciferase Assay Kit	Promega Corporation (Madison, USA)
FastDigest Sall	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
FastDigest XbaI	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
FastDigest XhoI	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Indirect CD34 MicroBead Kit, human	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach)

Bezeichnung	Hersteller
innuPREP RNA Mini Kit	Analytik Jena AG (Jena)
Library Efficiency™ DH5α™ Competent Cells	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit	Lonza (Basel, CH)
NucleoBond® Xtra Midi Plus	Macherey-Nagel (Düren)
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel (Düren)
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel (Düren)
Phusion High Fidelity Kit	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
PrimeScript™ RT Master Mix	Takara Bio Inc. (Shiga, JP)
ProFection® Mammalian Transfection System – Calcium Phosphate	Promega Corporation (Madison, USA)
SYBR® Premix Ex Taq™ II	Takara Bio Inc. (Shiga, JP)
T4 DNA Ligase	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

2.1.5 Medien

Tabelle 6: Verwendete Medien für die Bakterien- und Zellkultur.

Bezeichnung	Hersteller
BioWhittaker® DMEM, with 4,5 g/L Glucose, without L-Glutamine	Lonza (Basel, CH)
Fast-Media® Amp Agar	InvivoGen (San Diego, USA)
Gibco™ IMDM (1 ×) + GlutaMAX™ -I, [+] 25 mM HEPES, [+] 3,024 g/L Sodium Bicarbonate	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Gibco™ MEM Alpha Medium (1 ×) + GlutaMAX™ -I, [-] Ribonucleosides, [-] Deoxyribonucleosides	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Gibco™ RPMI Medium 1640 (1 ×) + GlutaMAX™ -I, [+] 25 mM HEPES	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
LB-Agar	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
LB-Medium	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
MethoCult™ H4230	STEM CELL Technologies (Vancouver, CAN)
MethoCult™ H4435 Enriched	STEM CELL Technologies (Vancouver, CAN)

2.1.6 Puffer und Lösungen

Die Puffer und Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, in deionisiertem Wasser (dH₂O) gelöst und bei Raumtemperatur (RT) gelagert.

1 % Agaroselösung

1 g Agarose, ad 100 mL mit TAE-Puffer

1 % Bromphenolblau-Stammlösung

100 mg Bromphenolblau, ad 10 mL mit Millipore-H₂O (Reinstwasser)

1 × Ladepuffer Tris-Glycerol-SDS

0,0625 M Tris-HCl (6,25 mL 1 M Tris-HCl, pH 6,8), 10 % Glycerol (10 mL Glycerol), 3 % SDS (30 mL 10 % SDS), ad 100 mL mit Millipore-H₂O

1 × TBS-T

1:10-Verdünnung von 10 × TBS mit Millipore-H₂O, 0,1 % Tween® 20

1 M DTT-Stammlösung

1,542 g DTT, ad 10 mL mit Millipore-H₂O, Lagerung bei -20 °C

1 M Tris-HCl, pH 6,8

24,228 g Tris-base, ad 200 mL mit Millipore-H₂O, Einstellen des pH-Werts auf 6,8 mit 6 N HCl, Lagerung bei 4 °C

1 M Tris-HCl, pH 8,8

12,114 g Tris-base, ad 100 mL mit Millipore-H₂O, Einstellen des pH-Werts auf 8,8 mit 6 N HCl, Lagerung bei 4 °C

10 % SDS-Stammlösung

20 g SDS, ad 200 mL mit Millipore-H₂O

10 × TBS

24,2 g Tris-base, 80,1 g NaCl, Einstellen des pH-Werts auf 7,6 mit 6 N HCl

10 × Tris-Glycin-SDS-Puffer (10 × Western Blot-Laufpuffer)

29 g Tris-base, 144 g Glycin, 10 g SDS, ad 1 L mit Millipore-H₂O

10 × Western Blot-Transferpuffer

121,14 g Tris-base, 145,89 g Glycin, ad 1 L mit Millipore-H₂O

25 mM Chloroquine-Stammlösung

129 mg Chloroquine, ad 10 mL mit PBS, steril filtriert, Lagerung bei -20 °C

5 % Glucose-Lösung

50 mg/mL Glucose in sterilem dH₂O, Lagerung bei 4 °C

50 × TAE-Puffer

40 mM Tris-HCl, 20 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 8,2

8 mg/mL Polybrene-Stammlösung (1000 ×)

40 mg Polybrene, ad 5 mL mit PBS, steril filtriert, Lagerung bei 4 °C

Erythrozytenlyse-Puffer

0,155 M NH₄Cl (8,29 g), 0,01 M KHCO₃ (1 g), 0,0001 M EDTA (45,2 mg), ad 1 L, steril filtriert, zum Gebrauch Lagerung bei 4 °C

FACS-Puffer

10 % AB-Serum in PBS, Lagerung bei 4 °C

Ketanest®-Rompun®-Narkose

24 mL Ketanest®, 4 mL Rompun®, 22 mL 0,9 % NaCl

Kryo-Medium

50 % RPMI, 40 % FBS, 10 % DMSO, Lagerung bei 4 °C

LB-Agar

40 g LB-Agar, ad 1L, sterilisiert im Autoklaven, noch heiß in 10 cm-Petrischalen gegossen

LB-Medium

25 g LB-Medium, ad 1L, sterilisiert im Autoklaven

MACS-Puffer

PBS mit 0,5 % BSA, 2 mM EDTA, steril filtriert, Lagerung bei 4 °C

Propidiumiodid(PI)-Gebrauchslösung

Verdünnung der Stammlösung (1 mg/mL) auf 100 µg/mL in PBS, lichtgeschützte Lagerung bei 4 °C

2.1.7 DNA- und Protein-Größenstandards

Tabelle 7: Verwendete DNA- und Protein-Größenstandards.

Bezeichnung	Hersteller
GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, ready-to-use	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

2.1.8 *Short hairpin* RNAs (shRNAs)

Die in Tabelle 8 gelisteten shRNAs wurden von der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) bezogen und sind vom Hersteller bezüglich ihrer Effizienz verifiziert.

Tabelle 8: Verwendete shRNAs.

shRNA	Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
GLI1-shRNA in pLKO.1-puro	TRCN0000020485	CCGGCCTGATTATCTTCCTTC- AGAACTCGAGTTCTGAAGGA- AGATAATCAGGTTTTT
GLI2-shRNA in pLKO.1-puro	TRCN0000238361	CCGGCTGGACAGGGATGAC- TGTAAGCTCGAGCTTACAGT- CATCCCTGTCCAGTTTTTG
Scrambled-shRNA in pLKO.1-puro	SHC002	CCGGCAACAAGATGAAGAGCACC AACTCGAGTTGGTGCT- CTTCATCTTGTTGTTTTT

2.1.9 Vektoren und Verpackungsplasmide

Tabelle 9: Verwendete Vektoren und Verpackungsplasmide.

Bezeichnung	Hersteller
LeGO-C/Zeo ⁺	K. Riecken, B. Fehse (UKE, Hamburg) www.LentiGO-Vectors.de
LeGO-G/Puro ⁺	K. Riecken, B. Fehse (UKE, Hamburg) www.LentiGO-Vectors.de
phCMV-VSV-G (<i>Envelope</i>)	Addgene (Cambridge, USA)
pMD2.G (<i>Envelope</i>)	Addgene (Cambridge, USA)
pMDLg/pRRE (<i>Packaging</i>)	Addgene (Cambridge, USA)
pRSV-Rev (<i>Packaging</i>)	Addgene (Cambridge, USA)
psPAX2 (<i>Packaging</i>)	Addgene (Cambridge, USA)

2.1.10 Primer

Die verwendeten Primer (siehe Tabelle 10) wurden, wenn möglich, mit Hilfe der Primer 3-Software (siehe Tabelle 13) designt und von der Firma Eurofins MWG GmbH (Ebersberg) synthetisiert.

Tabelle 10: In der RT-qPCR, Klonierung und Sequenzierung verwendete Primer.

Primer	Sequenz 5' → 3'	Anwendung
hBCL2 for 927	GGAGGATTGTGGCCTTCTTT	RT-qPCR
hBCL2 rev 1102	GCCGTACAGTTCCACAAAGG	RT-qPCR
hGAPDH for 822	GTCAGTGGTGGACCTGACCT	RT-qPCR
hGAPDH rev 1066	TGCTGTAGCCAAATTCGTTG	RT-qPCR
hGLI1 for 1594	CTACATCAACTCCGGCCAAT	RT-qPCR
hGLI1 rev 1748	CGGCTGACAGTATAGGCAGA	RT-qPCR
hGLI2 for 1080	CACCAACCAGAACAAGCAGA	RT-qPCR
hGLI2 rev 1325	ACCTCAGCCTCCTGCTTACA	RT-qPCR
p43	GGGGAAAGAATAGTAGACAT-AATAGCA	Sequenzierung
p75	ACGAAGTTATTAGGTCCCTCG-AC	Sequenzierung
shRNA Sall rev	TACTGCCATTTGTGTCGACGT-CGAGAATTC	Klonierung
shRNA XbaI for	ATATTCTAGACCGAGGGCCTA-TTCCCATG	Klonierung

2.1.11 cDNA-Standards

Tabelle 11: In der RT-qPCR verwendete cDNA-Standards.

Bezeichnung	Resistenz	Hersteller
hGAPDH in pCMV-Sport6	Ampicillin	BioCat GmbH (Heidelberg)
hGLI1 in pOTB7	Chloramphenicol	BioCat GmbH (Heidelberg)
hGLI2 in pCR-BluntII-TOPO	Kanamycin	BioCat GmbH (Heidelberg)

2.1.12 Antikörper

Tabelle 12: In der Durchflusszytometrie und im Western Blot verwendete Antikörper.

Antikörper	Bezeichnung	Herkunft	Hersteller	Anwendung
Anti-hβ-Actin	β -Actin (C4): sc-47778	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, USA)	Western Blot
Anti-Kaninchen IgG	Anti-Rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Ziege	Cell Signaling Technology (Cambridge, UK)	Western Blot
Anti-hCD34	FITC Mouse Anti-Human CD34	Maus	Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)	Durchflusszytometrie
Anti-hCD45	APC Mouse Anti-Human CD45	Maus	Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)	Durchflusszytometrie
Anti-hGLI1	GLI1 (C68H3) Rabbit mAb	Kaninchen	Cell Signaling Technology (Cambridge, UK)	Western Blot
Anti-Maus IgG	Amersham ECL Anti-mouse IgG, HRP-linked whole Ab	Schaf	GE Healthcare (Little Chalfont, UK)	Western Blot
APC-Isotyp-Kontrolle	APC Mouse IgG1 κ Isotype Control	Maus	Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)	Durchflusszytometrie
FITC-Isotyp-Kontrolle	FITC Mouse IgG1 κ Isotype Control	Maus	Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)	Durchflusszytometrie

2.1.13 Kleinmolekulare Inhibitoren

Cyclopamin

Der kleinmolekulare *Smoothed*-Inhibitor Cyclopamin (Cyclopamine, 2'R,3S,3'R,3'a-S,6'S,6aS,6bS,7'aR,11aS,11bR)1,2,3,3'a,4,4',5',6,6',6a,6b,7,7',7'a,8,11,11a,11b-octadecahydro-3',6',10,11b-tetramethyl-spiro[9H-benzo-[a]fluorene-9,2'-(3'H)furo-[3,2-b]pyridin]-3-ol; STEMCELL Technologies (Vancouver, CAN)) ist ein steroidales Alkaloid mit einem Molekulargewicht von 411,63 g/mol und einer Löslichkeit zu 20 mM in absolutem Ethanol. Für die Experimente wurde eine Stammlösung von 4,12 mg/mL angesetzt, was 10 mM entspricht.

GANT61

Der kleinmolekulare Inhibitor GANT61 (2,2'-[[Dihydro-2-(4-pyridinyl)-1,3(2*H*,4*H*)-pyrimidinediyl]]bis(methylene)]bis-[*N,N*-dimethylbenzenamine; Tocris Bioscience (Bristol, UK)) ist ein spezifischer GLI1- und GLI2-Inhibitor, der die Bindung der Transkriptionsfaktoren an die Promotorregionen in der DNA blockiert³⁰⁵. Der Inhibitor hat ein Molekulargewicht von 429,61 g/mol und eine Löslichkeit zu 50 mM in DMSO und zu 100 mM in absolutem Ethanol. Für die *in vitro*-Experimente wurde eine Stammlösung von 21,48 mg/mL in DMSO angesetzt, was 50 mM entspricht, für das *in vivo*-Experiment wurde eine Stammlösung von 42,96 mg/mL in absolutem Ethanol angesetzt, was 100 mM entspricht.

PF-04691502

Der kleinmolekulare Inhibitor PF-04691502 (2-Amino-8-[*trans*-4-(2-hydroxyethoxy)cyclohexyl]-6-(6-methoxy-3-pyridinyl)-4-methyl-pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7(8*H*)-one; Tocris Bioscience (Bristol, UK)) ist ein dualer ATP-kompetitiver PI3K($\alpha/\beta/\gamma/\delta$)/mTOR-Inhibitor mit einem Molekulargewicht von 425,48 g/mol und einer Löslichkeit zu 100 mM in DMSO. Für die *in vitro*-Experimente wurde eine Stammlösung von 4,26 mg/mL angesetzt, was 10 mM entspricht, für das *in vivo*-Experiment wurde eine Stammlösung von 42,55 mg/mL in DMSO angesetzt, was 100 mM entspricht.

Sunitinib

Der kleinmolekulare Inhibitor Sunitinib (Sunitinib Malate Salt, N-[2-(diethylamino)ethyl]-5-[(Z)-(5-fluoro-2-oxo-1H-indol-3-ylidene)methyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrro-le-3-carboxamide;(2S)-2-hydroxybutanedioic acid; LC Laboratories (Woburn, USA)) ist ein Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor mit Selektivität für FLT3, PDGF- und VEGF-Rezeptoren sowie KIT, RET und CSF1R^{103–105}. Das Sunitinib-Malat hat ein Molekulargewicht von 532,56 g/mol und eine Löslichkeit zu 75 mM in DMSO. Für die *in vitro*-Experimente wurde eine Stammlösung von 26,63 mg/mL angesetzt, was 50 mM entspricht, für das *in vivo*-Experiment wurde eine Stammlösung von 39,94 mg/mL in DMSO angesetzt, was 75 mM entspricht.

2.1.14 Software

Tabelle 13: Verwendete Software.

Software	Hersteller
Adobe Acrobat Reader DC	Adobe Systems Inc. (San José, USA)
AxioVision Release 4.8.2-SP2	Carl Zeiss AG (Oberkochen)
CellQuest Pro 5.2.1	Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)
GraphPad PRISM 7.00	GraphPad Software (La Jolla, USA)
IBM SPSS Statistics 21	IBM (Armonk, USA)
LightCycler® 96 SW 1.1	Roche (Mannheim)
Mendeley Desktop 1.17.11	Mendeley Ltd. (London, UK)
MS Office 2013 und 2016	Microsoft (Redmond, USA)
Primer 3	Whitehead Institute for Biomedical Research (Boston, USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Zellkultur

Allgemeine Zellkulturbedingungen

Alle verwendeten eukaryotischen Zellen wurden in einem CO₂-Inkubator bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert. Alle Arbeiten wurden unter einer Sterilwerkbank mit sterilen Arbeitsmaterialien durchgeführt. Zentrifugationen der Zellen zum Waschen oder zum Wechseln von Medien und Lösungen wurden in der Regel für 5 Minuten bei 300 × g und RT durchgeführt.

In regelmäßigen Abständen wurden die Zelllinien mithilfe des *MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kits* auf eine mögliche Mycoplasmen-Kontamination hin untersucht. Es wurde ausschließlich mit Mycoplasmen-freien Zellen gearbeitet.

Die AML-Zelllinie OCI-AML5 wurde mehrmals in zeitlichen Abständen auf das Fortbestehen ihrer GM-CSF-Abhängigkeit hin untersucht (siehe Abschnitt 2.2.1.4.1).

2.2.1.1.1 Zelllinien

Die Zelllinien, mit Ausnahme von UKE-1 und IMS-M2, wurden bei der ATCC (*American Type Culture Collection*, Manassas, USA) oder der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) käuflich erworben und bei längerem Zurückliegen des Erwerbs durch den *Multiplex human Cell line Authentication Test* (Multiplexion GmbH, Heidelberg) verifiziert. Die AML-Zelllinie UKE-1 wurde im Labor der Arbeitsgruppe Akute Leukämien (Fiedler/Wellbrock) am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf etabliert ³¹⁶. Die AML-Zelllinie IMS-M2 wurde freundlicherweise von Prof. Daniel G. Tenen (*Cancer Science Institute*, National University of Singapore) zur Verfügung gestellt.

In Tabelle 14 findet sich eine Übersicht über die verwendeten humanen AML-Zelllinien sowie Informationen zu ihrem Ursprung, ihrem *FLT3*-Mutationsstatus und ihren Kultivierungsmedien.

Tabelle 14: Verwendete AML-Zelllinien und ihre Kultivierungsmedien.

Zelllinie	Quelle	<i>FLT3</i> -Mutationsstatus	Kultivierungsmedium
HL-60	36-jährige Frau mit promyelozytischer Leukämie (1976)	Wildtyp	RPMI + 10 % FBS
IMS-M2	59-jährige Frau mit AML FAB M2 (1995)	Wildtyp	IMDM + 10 % FBS
MOLM-13	20-jähriger Mann mit AML FAB M5a (1995)	<i>FLT3</i> -ITD	RPMI + 10 % FBS
MV4-11	10-jähriger Junge mit AML FAB M5 (1987)	<i>FLT3</i> -ITD	RPMI + 10 % FBS
OCI-AML3	57-jähriger Mann mit AML FAB M4 (1987)	Wildtyp	α -MEM + 20 % FBS
OCI-AML5	77-jähriger Mann mit AML FAB M4 (1990)	Wildtyp	α -MEM + 20 % FBS + 2,5 ng/mL GM-CSF
UKE-1	62-jährige Frau mit AML, entstanden aus essentieller Thrombozythämie (1999)	Wildtyp	IMDM + 10 % FBS + 10 % HS + 1 μ M Hydrocortison

HEK 293T (Human Embryonic Kidney 293T)

Bei der adhärent wachsenden Zelllinie HEK 293T handelt es sich um eine hochtransfizierbare Variante der humanen embryonalen Nierenepithelzelllinie 293, welche konstitutiv das *Simian virus 40 (SV40) large T antigen* exprimiert. Die Zellen wurden in DMEM + 10% FBS kultiviert.

2.2.1.1.2 Primärmaterial

Gewinnung von AML-Patientenmaterial (pAML)

Aus dem Knochenmark von AML-Patienten mit Erstdiagnose wurden die mononukleären Zellen mittels Polysucrose-Dichtezentrifugation und anschließender Erythrozytenlyse durch einen hypotonen Erythrozytenlyse-Puffer isoliert.

In einem 50 mL-Zentrifugenröhrchen wurde die mit PBS gemischte Knochenmarkprobe auf Polysucrose geschichtet und für 30 Minuten bei $400 \times g$, RT ohne Bremse zentrifugiert. Aufgrund ihrer Dichte verblieben die mononukleären Zellen als sogenannter *Buffy Coat* auf der Polysucrose-Lösung und konnten mit einer serologischen Pipette abgenommen und in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt werden. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und, je nach Größe des Zellpellets, einige mL kalten Erythrozytenlyse-Puffers auf das Pellet gegeben. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT wurden die Zellen mit der doppelten Menge PBS gewaschen, das Zellpellet in einer der Pelletgröße angepassten Menge PBS resuspendiert und die Zellzahl und Vitalität mit der Neubauer Zählkammer bestimmt. Die pAML-Zellen wurden in IMDM + 10 % FBS + 10 % HS + 1 μ M Hydrocortison kultiviert. Die Aufarbeitung und die anschließenden *in vitro*-Experimente wurden ausschließlich mit Zustimmung der Patienten und der Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg (Ethikvotum PV3469) durchgeführt.

Gewinnung von CD34⁺ hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen

Die CD34⁺ hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen wurden aus Leukaphereseprodukten (zur Verfügung gestellt durch das Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf) gesunder, anonymer Stammzellspender isoliert. Die Spender wurden zuvor mit dem Wachstumsfaktor G-CSF (*granulozyte-colony stimulating factor*) behandelt, was ein Übertreten der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut bewirkte. Aus den anschließend gewonnenen Leukaphereseprodukten wurden zunächst die mononukleären Zellen mittels Polysucrose-Dichtezentrifugation und anschließender Erythrozytenlyse isoliert (siehe Abschnitt „Gewinnung von AML-Patientenmaterial“). Die Anreicherung der CD34⁺ Zellen erfolgte durch immunomagnetische Separation mithilfe des *Indirect CD34 MicroBead Kits* und eines magnetischen Zellseparators nach Herstellerangaben. Die Reinheit der CD34⁺-Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt (siehe Abschnitte 2.2.1.3 und 2.2.1.3.1).

2.2.1.1.3 Kultivierung von Suspensionszellen und adhären- ten Zellen

Die Suspensionszellen (AML-Zelllinien) wurden alle 2-3 Tage passagiert, wobei weitestgehend die Empfehlungen zur minimalen und maximalen Zelldichte der ATCC und DSMZ eingehalten wurden. In Abhängigkeit von der Wachstumsdichte der Zellen wurde ein Teil der Zellsuspension durch frisches Medium ersetzt.

Die adhären-ten, als *Monolayer* auf dem Kulturflaschenboden wachsenden HEK 293T-Zellen wurden ebenfalls alle 2-3 Tage bei 80-90 % Konfluenz passagiert. Hierzu wurde das Medium abgenommen und die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 × Trypsin (2 mL/T75-Kulturflasche) für 2-5 Minuten bei RT oder bei 37 °C im Inkubator vom Kulturflaschenboden abgelöst und diese Reaktion mit der doppelten Menge an Kulturmedium gestoppt. Ein ausgewähltes Volumen an trypsinierter Zellsuspension wurde mit frischem Medium versetzt und weiterkultiviert.

2.2.1.1.4 Kryokonservierung und Lagerung von Zellen

Zur Lagerung der Zellen wurden in der Regel $2,5 \times 10^6$ Zellen abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 800 µL 4 °C kaltem Kryo-Medium resuspendiert und in ein Röhrchen zur Kryokonservierung überführt. Das Einfrieren der Zellen erfolgte in einem mit 2-Propanol befüllten Einfrierbehälter (*Mr. Frosty*) bei -80 °C. Dadurch wurde ein behutsames Einfrieren der Zellen in Schritten von -1 °C/min gewährleistet. Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

2.2.1.1.5 Auftauen von Zellen

Die kryokonservierten Zellen wurden bei 37 °C im Wasserbad vorsichtig aufgetaut und die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen mit 3 mL vorgewärmtem Medium überführt. Die Zellen wurden für 3 Minuten bei $160 \times g$ und RT abzentrifugiert und der

Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 5 mL frischem Medium aufgenommen und die Zellsuspension in eine T25-Kulturflasche überführt.

2.2.1.1.6 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl sowie des Anteils vitaler Zellen erfolgte mittels der Trypanblau-Methode. Hierbei werden die Zellen mit Trypanblau-Lösung gemischt und tote Zellen blau angefärbt, da der Farbstoff durch deren perforierte Zellmembran dringen kann. Vitale Zellen mit intakter Zellmembran nehmen den Farbstoff nicht auf, somit ist eine deutliche Unterscheidung lebender und toter Zellen möglich. In der Regel wurde für die Zellzahlbestimmung das Zellzählgerät Vi-Cell™ XR eingesetzt, welches die manuelle Trypanblau-Methode automatisiert. Da das Vi-Cell™ XR ein Probenvolumen von mindestens 500 µL erforderte, wurde bei Zellsuspensionen mit geringer Gesamtzellzahl die Zellzahl mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt, welche ein Probenvolumen von nur 10 µL erforderte.

2.2.1.2 Lentivirale Transduktion von AML-Zelllinien und CD34⁺ hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen

Virusproduktion in HEK 293T

Für die Produktion lentiviraler Viren wurden Verpackungssysteme der sogenannten „dritten Generation“ gewählt, welche eine besonders hohe Biosicherheit gewährleisten, da die in der Verpackungszelllinie (hier HEK 293T) produzierten Viren zwar in der Lage sind, das Insert stabil in das Wirtszellgenom zu integrieren, dabei aber replikationsinkompetent sind. Die Transfektion der Verpackungszelllinie erfolgte nach der Methode der Calcium-Phosphat-Präzipitation. Hierbei wird die DNA mit Calcium und Phosphatpuffer gemischt, es bildet sich ein feinkörniges Calciumphosphat-DNA-Präzipitat, welches sich auf den Zellen niederschlägt und durch Endozytose von diesen aufgenommen wird.

Für die *in vitro*-Experimente mit den AML-Zelllinien UKE-1, OCI-AML5 und MV4-11 (siehe Abschnitte 2.2.1.4.2, 2.2.1.5.1 und 2.2.1.6.1) sowie für das *in vivo*-Experiment (siehe

Abschnitt 2.2.5.3) wurden je 5×10^5 bzw. 5×10^6 HEK 293T-Zellen in das Well einer 6-Well-Platte bzw. in eine 10 cm Petrischale ausgesät. Nach Anwachsen der Zellen bei einer Konfluenz von 30-40 % erfolgte die Transfektion mithilfe des Kits *ProFection® Mammalian Transfection System*. Für die Experimente mit den UKE-1- und OCI-AML5-Zellen wurden die vom Hersteller verifizierten shRNA-Konstrukte *GLI1-shRNA in pLKO.1-puro* und *GLI2-shRNA in pLKO.1-puro* sowie als Kontrolle *Scrambled-shRNA in pLKO.1-puro* eingesetzt. Die *Scrambled-shRNA* ist dabei so konstruiert, dass sie durch die Vermittlung der Antibiotikum-Resistenz als positive Transduktionskontrolle dient, dabei aber kein Zielgen im humanen Genom besitzt. Für die Experimente mit MV4-11 (*in vitro* und *in vivo*) wurden die in LeGO-Vektoren umklonierten und durch Sequenzierung überprüften (Daten nicht gezeigt) shRNA-Konstrukte *GLI1-shRNA in LeGO-C/Zeo⁺*, *GLI2-shRNA in LeGO-G/Puro⁺* und als Kontrolle *Scrambled-shRNA in LeGO-C/Zeo⁺* und *Scrambled-shRNA in LeGO-G/Puro⁺* (siehe Abschnitt 2.2.2.4) eingesetzt. Die Plasmide (UKE-1 und OCI-AML5: 1 µg shRNA-Plasmid + 750 ng psPAX2 + 250 ng pMD2.G; MV4-11: 10 µg shRNA-Plasmid + 10 µg pMDLg/pRRE + 5 µg pRSV-Rev + 2 µg pHCMV-VSV-G, siehe Tabelle 9) wurden in sterilem dH₂O verdünnt und eine 2 M CaCl₂-Lösung zugegeben. In einem Reaktionsgefäß wurde 2 × HBS-Puffer vorgelegt und die DNA/CaCl₂-Lösung tröpfchenweise zugegeben, während mit einer Pasteurpipette Luft in das Gemisch geblasen wurde. Der Ansatz wurde für 10-20 Minuten bei RT inkubiert. Von den HEK 293T-Zellen wurde das Medium abgenommen und durch frisches, mit 25 µM Chloroquine versetztes, Medium ersetzt. Das DNA/CaCl₂/HBS-Gemisch wurde tröpfchenweise auf die Zellen gegeben und nach einer Inkubation über Nacht erfolgte ein Mediumwechsel. Nach 24-stündiger Inkubationszeit wurde der Überstand, der die Virus-Partikel enthielt, geerntet. Hierzu wurde der Überstand mit einer Spritze von den Zellen abgenommen und durch einen 0,45 µm-Spritzenfilter in Reaktionsgefäße filtriert. Die Virus-Produktion erfolgte für jedes shRNA-Konstrukt in Mehrfachansätzen, wobei die geernteten Virusüberstände vereinigt wurden. Wegen der potentiellen Infektiosität wurden die Arbeiten unter Bedingungen der gentechnischen Sicherheitsstufe S2 durchgeführt.

Qualitative Titration der Virusüberstände

Zur Abschätzung ihrer Infektiosität wurden qualitative Titrations der Virusüberstände (nur für shRNA-LeGO-Vektor-Konstrukte) in MV4-11- oder UKE-1-Zellen durchgeführt.

Auch ein Test der Transduzierbarkeit von CD34⁺ hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen wurde durch einen Titrationsansatz erbracht. Hierzu wurden in Duplikaten oder Einzelansätzen jeweils 50 000 Zellen in 500 µL Medium mit 8 µg/mL Polybrene in eine 24-Well-Platte ausgesät und der Virus-Überstand in steigender Konzentration (beispielsweise 0,1 µL, 1 µL, 10 µL, 100 µL) zu den Zellen gegeben. Es wurde eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt. Die Zellen wurden für 1 Stunde bei 805 x g und 30 °C zentrifugiert. Nach einer Inkubation über Nacht wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt und 2 Tage nach Mediumwechsel wurde der Anteil GFP⁺ (*green fluorescent protein*) bzw. mCherry⁺ Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (siehe Abschnitte 2.2.1.3 und 2.2.1.3.2).

Transduktion der AML-Zelllinien

Um deutliche Effekte des shRNA-*Knockdowns* (KD) beobachten zu können, sollten möglichst hohe Transduktionseffizienzen in den AML-Zelllinien erreicht werden. Für jede Zelllinie erfolgte die Transduktion in zwei unabhängigen Experimenten.

Für die *in vitro*-Experimente mit UKE-1 und OCI-AML5 wurden für jedes shRNA-Konstrukt je 3×10^6 Zellen in mit 8 µg/mL Polybrene versetztem Medium in eine 6-Well-Platte ausgesät und jeweils 250 µL Virus-Überstand/ $0,5 \times 10^6$ Zellen auf die Zellen gegeben. Es ergaben sich folgende Ansätze:

1. UKE-1 bzw. OCI-AML5/*Scrambled-shRNA* bzw. Kontrolle
2. UKE-1 bzw. OCI-AML5/*GLI1-shRNA* bzw. *GLI1*-KD
3. UKE-1 bzw. OCI-AML5/*GLI2-shRNA* bzw. *GLI2*-KD

Die Zellen wurden für 1 Stunde bei 30 °C und 805 x g zentrifugiert und nach 24-stündiger Inkubation wurde das Medium gewechselt. Drei Tage nach Mediumwechsel wurde eine Selektion der transduzierten Zellen mit 2 µg/mL Puromycin gestartet und während der gesamten Experimentdauer beibehalten. Um den Erfolg der Puromycin-Selektion zu überprüfen, wurde eine Wildtyp-Kontrolle der jeweiligen Zelllinie mitgeführt.

Für die Experimente mit MV4-11 (*in vitro* und *in vivo*) wurden in Mehrfachansätzen je 1×10^6 bzw. $0,5 \times 10^6$ Zellen in mit 8 µg/mL Polybrene versetztem Medium in eine 6-Well-Platte ausgesät. Das zugegebene Volumen Virus-Überstand wurde auf Basis der

Titrationsergebnisse so gewählt, dass hohe Transduktionseffizienzen von > 95 % erreicht würden. Es wurden Volumina von 375-500 µL Virus-Überstand/ $0,5 \times 10^6$ Zellen zugegeben und es ergaben sich folgende Ansätze:

In vitro-Experiment

1. MV4-11/*Scrambled-shRNA-mCherry* + *Scrambled-shRNA-GFP* bzw. Kontrolle
2. MV4-11/*GLI1-shRNA-mCherry* bzw. *GLI1-KD*
3. MV4-11/*GLI2-shRNA-GFP* bzw. *GLI2-KD*

In vivo-Experiment

1. MV4-11/*Scrambled-shRNA-mCherry* + *Scrambled-shRNA-GFP* bzw. Kontrolle
2. MV4-11/*GLI1-shRNA-mCherry* + *GLI2-shRNA-GFP* bzw. *GLI1/2-Doppel-KD* (DKD)

Die Zellen wurden für 1 Stunde bei 30 °C und 805 x g zentrifugiert und nach 24-stündiger Inkubation das Medium gewechselt. Die Mehrfachansätze wurden vereinigt und die Transduktionseffizienz 2 Tage nach Mediumwechsel am Mikroskop überprüft und für das *in vivo*-Experiment dokumentiert sowie durchflusszytometrisch bestimmt (siehe Abschnitte 2.2.1.3 und 2.2.1.3.2).

Alle Arbeiten mit transduzierten Zellen wurden bis 7 Tage nach Transduktion unter Bedingungen der gentechnischen Sicherheitsstufe S2, anschließend unter Bedingungen der gentechnischen Sicherheitsstufe S1 durchgeführt.

2.2.1.3 Durchflusszytometrie

Das Verfahren der Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated cell sorting*, FACS) ermöglicht die Analyse einzelner Zellen aus einer Zellsuspension bezüglich verschiedener Parameter wie ihrer Größe und Granularität sowie beispielsweise Oberflächenproteinen und fluoreszierenden Proteinen und Farbstoffen im Zellinnern.

Im Durchflusszytometer werden die Zellen mit einer Kapillare angesaugt und passieren als Einzelzellen einen Laserstrahl. Dessen Licht wird durch die Zelle gestreut und das Maß und die Richtung der Streuung geben Auskunft über die Größe der Zelle (gemessen

am Vorwärtsstreulicht, engl.: *forward scatter*, FSC) und deren Granularität (gemessen am Seitwärtsstreulicht, engl.: *side scatter*, SSC). Neben der Lichtstreuung können mit dem Durchflusszytometer auch Emissionen von Fluoreszenzfarbstoffen detektiert werden. Dies ermöglicht die Analyse von Fluoreszenzfarbstoff-markierten oder fluoreszierende Proteine exprimierenden Zellen und deren Quantifizierung. Für alle durchgeführten Analysen wurde das Gerät *FACSCalibur* mit der Software *CellQuest Pro 5.2.1* verwendet.

2.2.1.3.1 Durchflusszytometrische Charakterisierung von Zellen durch Oberflächenproteine

Es sollte der Reinheitsgrad der mithilfe immunomagnetischer Separation gewonnenen CD34⁺ Stamm- und Vorläuferzellen (siehe Abschnitt 2.2.1.1.2) durchflusszytometrisch ermittelt werden.

Des Weiteren sollten die aus den *in vivo*-Versuchen (siehe Abschnitte 2.2.5.2.2, 2.2.5.3 und 2.2.5.4) gewonnenen mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut, dem Knochenmark und der Milz der Mäuse durchflusszytometrisch auf ihren Anteil humaner Blasten (CD45⁺ Zellen) untersucht werden.

Die verwendeten Antikörper und Isotyp-Kontrollen sind in Tabelle 12 aufgelistet. Die zu analysierenden Zellen wurden, als letzter Schritt ihrer Aufarbeitung, in einem FACS-Röhrchen (Rundbodenröhrchen) mit PBS gewaschen und das Zellpellet in 100 µL FACS-Puffer resuspendiert und je 7 µL des entsprechenden Antikörpers zugegeben. Es wurde jeweils eine Isotyp-Kontrolle mit entsprechendem Fluoreszenzfarbstoff mitgeführt, um eine unspezifische Bindung des Antikörpers bestimmen zu können. Die Zellen wurden für 20 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert, die nichtgebundenen Antikörper durch Waschen mit PBS entfernt, die Zellen in 300 µL PBS resuspendiert und am Durchflusszytometer analysiert.

2.2.1.3.2 Durchflusszytometrische Analyse transduzierter Zellen

Der Anteil fluoreszierender MV4-11-Zellen nach Transduktion (siehe Abschnitt 2.2.1.2) sowie der Anteil transduzierter Zellen in der Population humaner Blasten in Blut, Knochenmark und Milz MV4-11-transplantierte Mäuse am Ende des *in vivo*-Experiments (siehe Abschnitt 2.2.5.3) wurde durchflusszytometrisch bestimmt.

Da die Zellen nach Transduktion wegen der potentiellen Infektiosität der gentechnischen Sicherheitsstufe S2 unterlagen, mussten sie vor der Analyse mit paraformaldehydhaltiger Lösung (*Formafix* 4 %) fixiert werden. Es wurde eine Wildtyp-Kontrolle mitgeführt. Ein Teil der zu analysierenden Zellen wurde in ein FACS-Röhrchen gegeben, abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde für 30 Minuten in *Formafix*-Lösung bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und in 300 µL PBS resuspendiert, bevor sie durchflusszytometrisch bezüglich ihrer Fluoreszenz analysiert wurden.

Zur Bestimmung der Fluoreszenz in Zellen der Mausorgane wurde parallel zur Analyse des Anteils humaner Blasten (siehe Abschnitt 2.2.1.3.1) die mCherry- und GFP-Fluoreszenz in der Zellsuspension durchflusszytometrisch analysiert. Als Kontrolle wurden MV4-11-Wildtyp-Zellen mitgeführt.

2.2.1.4 Proliferations-Assays

2.2.1.4.1 GM-CSF-Abhängigkeit der Zelllinie OCI-AML5

Die AML-Zelllinie OCI-AML5 wird in Abhängigkeit des Wachstumsfaktors GM-CSF kultiviert. Suboptimale Kulturbedingungen, wie verringerte Wirksamkeit des Wachstumsfaktors oder inadäquate Zelldichte, können das Herauswachsen GM-CSF-unabhängiger Zellklone bewirken. Um ein Fortbestehen der Wachstumsfaktor-Abhängigkeit der Zellen zu gewährleisten, wurden diese in zeitlichen Abständen auf ihre GM-CSF-Abhängigkeit hin untersucht.

Die OCI-AML5-Zellen wurden zu $0,2 \times 10^6$ Zellen in 1 mL Kulturmedium ohne GM-CSF in zwei Triplikaten in eine 24-Well-Platte ausgesät. Ein Triplikat blieb unbehandelt, dem

zweiten Triplikat wurden 2,5 ng/mL GM-CSF zugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen wurde die Zellzahl am Vi-Cell™ XR bestimmt. Proliferierten die unbehandelten Zellen deutlich schlechter als die mit GM-CSF-behandelten Zellen, wurde die Zelllinie als GM-CSF-abhängig angesehen. Experimente wurden ausschließlich mit GM-CSF-abhängigen Zellen durchgeführt.

2.2.1.4.2 Effekt eines *GLI1*- oder *GLI2*-shRNA-Knockdowns auf die Proliferation von AML-Zelllinien

Es sollte untersucht werden, welchen Effekt ein *Knockdown* der Gene *GLI1* oder *GLI2* auf die Proliferation der AML-Zelllinien UKE-1, OCI-AML5 sowie MV4-11 hat.

Die Zellen wurden wie in Abschnitt 2.2.1.2 – „Transduktion der AML-Zelllinien“ – beschrieben lentiviral transduziert und es wurden die dort aufgeführten Ansätze analysiert. Da sich die Transduktionseffizienzen in den Zelllinien UKE-1 und OCI-AML5 durchflusszytometrisch nicht quantifizieren ließen und ein hoher Anteil transduzierter Zellen gewährleistet werden sollte, wurde das Experiment unter Puromycin-Selektion durchgeführt und an Tag 4 nach Selektionsbeginn gestartet. Die Experimente mit MV4-11 wurden nach durchflusszytometrischer Überprüfung hoher Transduktionseffizienzen (siehe Abschnitt 2.2.1.3 und 2.2.1.3.2) an Tag 4 nach Transduktion gestartet. Für alle Zelllinien wurden jeweils $0,5 \times 10^6$ Zellen in 500 µL Medium in eine 24-Well-Platte in Triplikaten ausgesät und nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen wurde die Zellzahl am Vi-Cell™ XR bestimmt. Um mögliche Differenzen in der ausgesäten Zellzahl berücksichtigen zu können, wurde die Zelldichte der Ausgangszellsuspensionen am Vi-Cell™ XR überprüft und in die Berechnung der Ergebnisse einbezogen.

2.2.1.4.3 Effekt einer kombinierten Behandlung mit GANT61, Sunitinib und PF-04691502 auf die Proliferation von AML-Zelllinien und pAMLs

Der Effekt einer kombinierten Behandlung der *FLT3*-mutierten AML-Zelllinien MV4-11 und MOLM-13 sowie der *FLT3*-Wildtyp-Zelllinie OCI-AML5 mit den kleinmolekularen

Inhibitoren GANT61, Sunitinib und PF-04691502 auf das Zellwachstum wurde untersucht.

Die Zellen wurden in mindestens drei unabhängigen Experimenten in Triplikaten zu $0,5 \times 10^6$ Zellen in 500 μ L des jeweiligen Kulturmediums in 24-Well-Platten ausgesät und mit den kleinmolekularen Inhibitoren behandelt. Die Stimulation erfolgte mit den Einzelsubstanzen, der Kombination aus jeweils zwei Substanzen, der Kombination aus allen drei Inhibitoren sowie DMSO als Lösungsmittelkontrolle. Die pAMLs wurden mit den Einzelsubstanzen, der Kombination aller drei Substanzen sowie DMSO behandelt. Die Sensitivität der Zelllinien auf die Inhibitoren wurde in Vorversuchen getestet. Die eingesetzten Inhibitor-Konzentrationen wurden so gewählt, dass sie eine moderate Proliferationshemmung bewirkten, damit Effekte der Kombinationsbehandlungen gut detektierbar wären. Für die pAMLs wurden die gleichen Inhibitor-Konzentrationen wie für MV4-11 eingesetzt. Der Effekt der Behandlung auf das Zellwachstum wurde nach 3-tägiger Inkubation durch Zellzahlbestimmung mithilfe des Vi-Cell™ XR ermittelt.

2.2.1.5 Apoptose-Assays

Nachweis von Apoptose durch Annexin V/Propidiumiodid-Färbung

Der Anteil apoptotischer Zellen in einer Zellsuspension kann durch eine Annexin V/Propidiumiodid-Doppelfärbung durchflusszytometrisch bestimmt werden.

Das Calcium-abhängige Protein Annexin V hat die Eigenschaft, an Phosphatidylserin (PS) zu binden. Dieses Phospholipid befindet sich in lebenden Zellen auf der Innenseite der Zellmembran. Während der Apoptose wird das PS auf die Membranaußenseite transloziert, wo es von Annexin V gebunden wird. In der späten Apoptose und der Nekrose wird die Zellmembran porös, Annexin V kann in die Zelle eindringen und dort auch an das PS der Membraninnenseite binden. Um dennoch eine Unterscheidung apoptotischer und sicher nekrotischer Zellen zu gewährleisten, wird eine Doppelfärbung mit Fluorochrom-gekoppeltem Annexin V und dem Farbstoff Propidiumiodid (PI) als zusätzlichem Marker durchgeführt. Der Nukleinsäureinterkalator PI kann nicht durch die intakte Zellmembran frühapoptotischer Zellen dringen, färbt jedoch spätapoptotische und nekrotische Zellen an. Somit erscheinen lebende Zellen doppeltnegativ,

frühapoptotische Zellen Annexin V-positiv und PI-negativ, spätapoptotische/nekrotische Zellen doppelt-positiv und sicher nekrotische Zellen Annexin V-negativ und PI-positiv.

2.2.1.5.1 Effekt eines *GLI1*- oder *GLI2*-shRNA-Knockdowns auf die Apoptose-Induktion in AML-Zelllinien

Es sollte untersucht werden, welchen Effekt ein *Knockdown* der Gene *GLI1* oder *GLI2* auf die Apoptose-Induktion in den AML-Zelllinien UKE-1, OCI-AML5 sowie MV4-11 hat.

Die Zellen wurden wie in Abschnitt 2.2.1.2 – „Transduktion der AML-Zelllinien“ – beschrieben lentiviral transduziert und es wurden die dort aufgeführten Ansätze analysiert. Die Experimente mit UKE-1 und OCI-AML5 wurden an Tag 3 und Tag 7 der Puromycin-Selektion, die mit MV4-11 an Tag 3 und Tag 7 nach Transduktion gestartet. Es wurden jeweils $0,2 \times 10^6$ Zellen in 200 μL des jeweiligen Kulturmediums in Triplikaten in eine 96-Well-Platte ausgesät und die Induktion der Apoptose nach 24-stündiger Inkubation mittels Annexin V/PI-Doppelfärbung bestimmt. Hierzu wurden die Zellen aus den Wells in FACS-Röhrchen überführt, einmal mit PBS gewaschen und das Zellpellet in 100 μL Calcium-haltigem $1 \times$ *Annexin V Binding Buffer* resuspendiert. Nach Zugabe von jeweils 5 μL Annexin V-APC und PI-Gebrauchslösung wurden die Zellen für 20 Minuten bei RT unter Lichtausschluss inkubiert und der Zellsuspension 200 μL $1 \times$ *Annexin V Binding Buffer* zugefügt. Anschließend wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert (nähere Informationen zur Durchflusszytometrie in Abschnitt 2.2.1.3). Bei den MV4-11-Zellen, welche mit den shRNAs in LeGO-Vektoren transduziert wurden, war eine Doppelfärbung mit PI nicht möglich, da das Fluoreszenzprotein mCherry und PI Fluoreszenz sehr ähnlicher Wellenlänge emittieren (mCherry: 610 nm, PI: 617 nm).

2.2.1.5.2 Effekt einer kombinierten Behandlung mit GANT61, Sunitinib und PF-04691502 auf die Apoptose-Induktion in AML-Zelllinien

Die Apoptose-Induktion nach einer kombinierten Behandlung der *FLT3*-mutierten AML-Zelllinien MV4-11 und MOLM-13 und der *FLT3*-Wildtyp-Zelllinie OCI-AML5 mit den kleinmolekularen Inhibitoren GANT61, Sunitinib und PF-04691502 wurde untersucht.

Die Zellen wurden in zwei unabhängigen Experimenten in Duplikaten zu $0,05 \times 10^6$ Zellen (MV4-11 und OCI-AML5) bzw. zu $0,1 \times 10^6$ Zellen (MOLM-13) in 500 μ L des jeweiligen Kulturmediums in 24-Well-Platten ausgesät und mit den kleinmolekularen Inhibitoren behandelt. Die Stimulation erfolgte mit den Einzelsubstanzen, der Kombination aus jeweils zwei Substanzen, der Kombination aus allen drei Inhibitoren sowie DMSO als Lösungsmittelkontrolle. Für OCI-AML5 wurden höhere Inhibitor-Konzentrationen gewählt als für MV4-11 und MOLM-13. Nach einer Inkubationsdauer von 48 Stunden wurden die Zellen analog zu Abschnitt 2.2.1.5.1 mit Annexin V und PI gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

2.2.1.6 Colony Formation-Assays

2.2.1.6.1 Effekt eines *GLI1*- oder *GLI2*-shRNA-Knockdowns auf die Koloniebildung von AML-Zelllinien

Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen besitzen die Fähigkeit, in semisolidem Medium, nach Zugabe spezifischer Wachstumsfaktoren, Kolonien auszubilden, was das klonale Proliferationspotential dieser Zellen widerspiegelt. Leukämiezellen teilen diese Fähigkeit zur Koloniebildung.

Es sollte untersucht werden, welchen Effekt ein *Knockdown* der Gene *GLI1* oder *GLI2* auf die Koloniebildung der AML-Zelllinien UKE-1, OCI-AML5 sowie MV4-11 hat.

Die Zellen wurden wie in Abschnitt 2.2.1.2 – „Transduktion der AML-Zelllinien“ – beschrieben lentiviral transduziert und es wurden die dort aufgeführten Ansätze analysiert. Die Experimente mit UKE-1 und OCI-AML5 wurden an Tag 3 der Puromycin-Selektion, die mit MV4-11 an Tag 4 nach Transduktion gestartet. Basierend auf den

Ergebnissen von Vorversuchen mit den Wildtyp-Zellen zur optimalen ausgesäten Zelldichte, wurden jeweils Triplikate mit 250 Zellen/mL angesetzt. Es wurde humanspezifisches, semisoliden Methylzellulose-basiertes Medium (*MethoCult™ H4230*) verwendet. Auf die Zugabe von Wachstumsfaktoren konnte verzichtet werden, da die AML-Zelllinien in der Lage sind, auch in wachstumsfaktorfreiem Medium Kolonien auszubilden. Unter diesen Bedingungen differenzieren die Zellen nicht weiter aus, was in diesem Versuchsansatz auch nicht von Bedeutung war. Jeweils 1,1 mL der Zellsuspension wurden in einer 3,5 cm-Petrischale blasenfrei ausplattiert und die Ansätze bei 37 °C inkubiert. Die Kolonien der transduzierten AML-Zelllinien wurden nach 5-8 Tagen mithilfe eines Rasters am Umkehrmikroskop ausgezählt.

2.2.1.6.2 Effekt einer kombinierten Behandlung mit GANT61, Sunitinib und PF-04691502 auf die Koloniebildung von AML-Zelllinien und CD34⁺ Zellen

Es wurde untersucht, welchen Einfluss eine kombinierte Behandlung mit den kleinmolekularen Inhibitoren GANT61, Sunitinib und PF-04691502 auf die Koloniebildung der *FLT3*-mutierten AML-Zelllinien MV4-11 und MOLM-13 und der *FLT3*-Wildtyp-Zelllinie OCI-AML5 sowie auf CD34⁺ Stamm- und Vorläuferzellen hat.

Die Kolonieausbildung der CD34⁺ Zellen erforderte ein humanspezifisches, semisoliden Methylzellulose-basiertes Medium mit Wachstumsfaktorzusätzen (*MethoCult™ H4435 Enriched*), die AML-Zelllinien wurden in Wachstumsfaktor-freiem Medium (*MethoCult™ H4230*) kultiviert. Für die AML-Zelllinien wurden, in zwei unabhängigen Experimenten, jeweils Triplikate mit 250 Zellen/mL angesetzt. Für die CD34⁺ Stamm- und Vorläuferzellen wurden in drei unabhängigen Experimenten Triplikate mit 1000 Zellen/mL angesetzt. Die Zellen, im jeweiligen Medium, wurden mit den kleinmolekularen Inhibitoren behandelt. Die Stimulation erfolgte mit den Einzelsubstanzen, der Kombination aus jeweils zwei Substanzen, der Kombination aus allen drei Substanzen sowie DMSO als Lösungsmittelkontrolle. Die Zellen wurden analog zu Abschnitt 2.2.1.6.1 ausplattiert und kultiviert und die Kolonien der AML-Zelllinien nach 5-6 Tagen, die der CD34⁺ Zellen nach 9-11 Tagen mithilfe eines Rasters am Umkehrmikroskop ausgezählt.

2.2.1.7 GLI1/2-Reporter-Assays

2.2.1.7.1 Herstellung stabiler GLI1/2-Reporter-AML-Zelllinien

Es wurden stabile GLI1/2-Reporter-AML-Zelllinien durch lentivirale Transduktion mit Viruspartikeln, welche das *Firefly*-Luciferase-Gen unter der Kontrolle von GLI1/2-Transkriptions-Reponse-Elementen und als eine interne Kontrolle das *Renilla*-Luciferase-Gen unter der Kontrolle von CMV-Promotor-Elementen enthielten, hergestellt. Transduzierte Zellen konnten mithilfe der Antibiotika Puromycin und Hygromycin selektioniert werden. Die Arbeiten wurden in Kooperation mit Mitgliedern der Arbeitsgruppe Akute Leukämien (Fiedler/Wellbrock) durchgeführt. Für die Transduktion wurden die Kits *Signal™ Lenti GLI Reporter (luc)* und *Signal™ Lenti CMV Renilla Control (Hygro)* verwendet. Die Arbeiten wurden bis 7 Tage nach Transduktion unter Bedingungen der gentechnischen Sicherheitsstufe S2, anschließend unter Bedingungen der gentechnischen Sicherheitsstufe S1 durchgeführt.

Je 1×10^5 AML-Zellen der Zelllinien MV4-11, MOLM-13, OCI-AML3, OCI-AML5, IMS-M2 und HL60 wurden in 500 μ L Medium mit 8 μ g/mL Polybrene in eine 24-Well-Platte ausgesät. Zur Transduktion wurden jeweils 50 μ L der *Signal™ Lenti GLI Reporter*- und *Signal™ Lenti CMV Renilla Control*-Viruspartikel auf die Zellen gegeben und diese für 1 Stunde bei 805 x g und 30 °C zentrifugiert. Nach einer Inkubation über Nacht erfolgte ein Mediumwechsel und 6 Tage nach Transduktion wurde die Antibiotikum-Selektion mit 2 μ g/mL Puromycin und 300 μ g/mL Hygromycin gestartet. Als Selektionskontrolle wurden mit den Antibiotika behandelte Wildtyp-Zellen mitgeführt. Ab 14 Tagen nach Transduktion wurden GLI-Reporter-Assays durchgeführt.

2.2.1.7.2 Effekt einer kombinierten Behandlung mit GANT61, Sunitinib und PF-04691502 sowie einer Einzelbehandlung mit GANT61 oder Cyclopamin auf die GLI1/2-Promotor-Aktivität von GLI1/2-Reporter-AML-Zelllinien

Es sollte analysiert werden, welchen Effekt eine kombinierte Behandlung mit GANT61, Sunitinib und PF-04691502 bzw. eine Einzelbehandlung mit GANT61 oder Cyclopamin in aufsteigenden Konzentrationen auf die GLI1/2-Promotor-Aktivität in AML-Zelllinien hat.

Hierzu wurden die stabilen GLI1/2-Reporter-AML-Zelllinien in mindestens drei unabhängigen Experimenten zu 1×10^5 Zellen in 100 μL Medium in Triplikaten in eine weiße 96-Well-Platte mit lichtdurchlässigem Boden ausplattiert und mit 2,5 μM GANT61, 100 nM Sunitinib oder 100 nM PF-04691502, der Kombination aus allen drei Substanzen sowie DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt. Für die Analyse des dosisabhängigen Effekts von GANT61 bzw. Cyclopamin auf den GLI1/2-Promotor wurden die Zellen mit GANT61 in aufsteigenden Konzentrationen (5 μM , 10 μM , 25 μM und 50 μM) bzw. Cyclopamin in aufsteigenden Konzentrationen (0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM und 5 μM), beginnend mit dem jeweiligen vom Hersteller publizierten IC_{50} -Wert, sowie dem Lösungsmittel als Kontrolle behandelt. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die *Firefly*-Luciferase-vermittelte GLI1/2-Promotor-Aktivität und die *Renilla*-Luciferase-vermittelte CMV-Promotor-Aktivität als interne Normalisierungskontrolle mithilfe des *Dual-GLO® Luciferase Assay Kits* und des Mikroplatten-Lesers *Infinite® F200 Pro* nach Herstellerangaben gemessen.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 RNA-Isolierung

Vor der Isolierung der RNA aus Zellen wurden diese einmal mit PBS gewaschen, das Zellpellet in *RNAlater RNA Stabilization Reagent* aufgenommen und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Zur Verwendung wurden die Zellen aufgetaut, bei $20\,000 \times g$ und RT für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die RNA-Isolierung aus dem Zellpellet erfolgte mithilfe des *innuPREP RNA Mini Kits* nach Herstellerangaben. Die RNA wurde in 30 μL *DEPC-Treated Water* gelöst, ihre Konzentration photometrisch am *NanoDrop™* bestimmt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Alle verwendeten Materialien und Reagenzien waren RNase frei.

2.2.2.2 cDNA-Synthese

Es wurden jeweils 1 μg oder 5 μg isolierter RNA mithilfe der Kits *PrimeScript™ RT Master Mix* oder *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR* nach Herstellerangaben

in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde 1:5 in DEPC-behandeltem Wasser verdünnt und bei -20 °C gelagert. Alle Arbeiten wurden auf Eis mit RNase freien Materialien durchgeführt.

2.2.2.3 Reverse Transcription quantitative Real-Time PCR-Analysen (RT-qPCR)

Eine relative Quantifizierung der mRNA-Expression in Zellen, bzw. der umgeschriebenen cDNA, erfolgte durch das Verfahren der RT-qPCR. Die verwendeten Primer wurden in einer Ausgangskonzentration von 2 µM eingesetzt und sind in Tabelle 10 aufgelistet. Für die RT-qPCR-Analysen wurden das Kit *SYBR® Premix Ex Taq™ II* und das plattenbasierte Heizblocksystem *LightCycler® 96* nach Herstellerangaben verwendet und es wurden jeweils Triplikate angesetzt.

Der im Kit eingesetzte Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green I* interkaliert in die in der PCR entstehende doppelsträngige DNA. Der messbare Anstieg an Fluoreszenz korreliert dabei direkt mit der Anzahl an Genkopien. Zur Abschätzung der relativen Menge der exprimierten mRNA, bzw. der umgeschriebenen cDNA, wurden cDNA-Standards der zu untersuchenden Gene (siehe Tabelle 11) in log-Verdünnungen eingesetzt. Für die *BCL2*-Genexpressionsanalysen wurde cDNA der *BCL2*-exprimierenden AML-Zelllinie MV4-11 in log-Verdünnungen eingesetzt.

Für alle verwendeten Primer konnte eine Annealing-Temperatur von 61 °C gewählt werden und die RT-qPCR-Bedingungen gestalteten sich wie in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: RT-qPCR-Bedingungen.

Vorgang	Schritt	Temperatur und Dauer
Initiale Denaturierung	1.	95 °C – 6 min
Denaturierung	2.	95 °C – 15 sec
Annealing	3.	61 °C – 5 sec
Elongation	4.	72 °C – 26 sec
Schmelzkurve	5.	95 °C – 10 sec
	6.	65 °C – 1 min
	7.	97 °C – 1 sec
Kühlung	8.	37 °C – 30 sec

Die Schritte 2.-4. wurden zyklisch 40 × wiederholt. Durch Erhitzen von 65 °C auf 97 °C mit einer Heizrate von 2,2 °C/sec wurde die Schmelzkurve ermittelt, um Auskunft über die Spezifität der PCR zu erhalten. Zur relativen Quantifizierung der Genexpression nach Pfaffl³¹⁷ wurden alle erhaltenen RT-qPCR-Daten unter Berücksichtigung der Spezifität der PCR auf die Expressionsdaten des Referenz-Haushaltsgens GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) normiert.

2.2.2.4 shRNA-Klonierung

Für *in vitro*-Experimente mit der AML-Zelllinie MV4-11 (siehe Abschnitte 2.2.1.4.2, 2.2.1.5.1 und 2.2.1.6.1) sowie für ein *in vivo*-Experiment (siehe Abschnitt 2.2.5.3) wurden die shRNAs (siehe Tabelle 8) in die Fluoreszenzproteine mCherry oder GFP kodierende lentivirale LeGO-Vektoren (siehe Tabelle 9) umkloniert. Die Arbeiten wurden in Kooperation mit Marianne Klokow im Labor der Arbeitsgruppe Akute Leukämien (Fiedler/Wellbrock) durchgeführt.

Einfügen von Restriktionsschnittstellen mittels Klonierungs-PCR

Mittels PCR wurden 50-100 ng shRNA (siehe Tabelle 8) amplifiziert, wobei die dabei eingesetzten Primer (*shRNA XbaI for* und *shRNA Sall rev*, 10 µM, siehe Tabelle 10) bereits Schnittstellen für die Restriktionsenzyme XbaI bzw. Sall enthielten. Die PCR erfolgte mithilfe des *Phusion High Fidelity Kits* nach Herstellerangaben und es wurde nach dem in Tabelle 16 dargestellten Programm amplifiziert, wobei die Schritte 2.-4. zyklisch 30 × wiederholt wurden.

Tabelle 16: Klonierungs-PCR-Bedingungen.

Vorgang	Schritt	Temperatur und Dauer
Initiale Denaturierung	1.	98 °C – 30 sec
Denaturierung	2.	98 °C – 10 sec
Annealing	3.	55 °C-65 °C – 30 sec
Elongation	4.	72 °C – 30 sec
Finale Elongation	5.	72 °C – 5 min
Lagerung	6.	4 °C

Analytische Agarose-Gelelektrophorese

Um den Erfolg der Klonierungs-PCR zu überprüfen, wurden 5 µL der PCR-Produkte sowie ein DNA-Größenstandard in einem 1 %igen Agarosegel, versetzt mit 5 µL Ethidiumbromid/100 mL, elektrophoretisch bei 100 V für 60 Minuten aufgetrennt und die DNA-Banden im Gel mittels UV-Licht sichtbar gemacht.

Aufreinigung des PCR-Produkts

Die Aufreinigung der Klonierungs-PCR-Produkte erfolgte mithilfe des Kits *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* nach Herstellerangaben. Die Konzentration der gereinigten Amplifikate wurde am *NanoDrop™* ermittelt.

Restriktionsverdau

Die gesamten aufgereinigten shRNA-Amplifikate sowie je 1 µg der LeGO-Vektoren wurden mit den Restriktionsenzymen *FastDigest XbaI* und *FastDigest SalI* bzw. *FastDigest XbaI* und *FastDigest XhoI* nach Herstellerangaben verdaut. Die Reaktionsansätze wurden für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert und die enzymatische Reaktion anschließend für 5 Minuten bei 80 °C hitzeinaktiviert.

Präparative Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion von DNA

Um die enzymatisch verdauten shRNA-Amplifikate sowie die LeGO-Vektoren aufzureinigen, wurde eine präparative Gelelektrophorese durchgeführt. Die gesamten Restriktionsansätze sowie entsprechende DNA-Größenstandards wurden in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt (100 V, 60 Minuten), die DNA-Banden mittels UV-Licht sichtbar gemacht und die verdauten shRNAs sowie die linearisierten Vektoren mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA erfolgte mit dem Kit *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* nach Herstellerangaben. Die Konzentration der aufgereinigten DNA wurde am *NanoDrop™* bestimmt.

Ligation

Die Ligation der shRNAs mit den LeGO-Vektoren wurde mit der *T4 DNA Ligase* im Verhältnis 5:1 nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Inkubation der Ligationsansätze erfolgte über Nacht bei 4 °C.

Die Ligationsansätze wurden anschließend in *Escherichia coli* (*E. coli*) transformiert, die rekombinanten Bakterien selektioniert, Bakterienklone mittels Kolonie-PCR auf das Vorhandensein des gewünschten Inserts hin analysiert, entsprechende Bakterienklone vermehrt und das Plasmid präpariert. Die bakteriellen Arbeiten zur shRNA-Klonierung sind in Abschnitt 2.2.3 beschrieben. Die LeGO-Vektoren mit shRNA-Insert wurden abschließend sequenziert (siehe Abschnitt 2.2.2.5)

2.2.2.5 Sequenzierung

Es wurden Sequenzierungen der umklonierten Plasmide *GLI1-shRNA in LeGO-C/Zeo⁺*, *GLI2-shRNA in LeGO-G/Puro⁺*, *Scrambled-shRNA in LeGO-C/Zeo⁺* und *Scrambled-shRNA in LeGO-G/Puro⁺* durch die Firma Eurofins MWG GmbH (Ebersberg) unter speziell auf die Sekundärstrukturen der shRNA angepassten Sequenzierungsbedingungen durchgeführt. Es wurden die Primer *p43* und *p75* (10 µM, siehe Tabelle 10) verwendet.

2.2.3 Bakterielle Arbeiten

2.2.3.1 Transformation von *E. coli*

Zur Vermehrung von Plasmiden wurden kompetente *E. coli*-Bakterien (*Library Efficiency™ DH5α™ Competent Cells*) durch Hitzeschock transformiert. Zu 50 µL auf Eis aufgetauten Bakterienzellen wurden 10 ng Plasmid-DNA, bzw. 5 µL eines Ligationsansatzes gegeben und die Suspension für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock der Bakterien erfolgte für 45 Sekunden bei 42 °C im Wasserbad. Nach einer 2-minütigen Inkubation der Zellen auf Eis wurden 500 µL SOC-Medium zugegeben und der Transformationsansatz für 1 Stunde bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde pur sowie durch Zentrifugation aufkonzentriert in Petrischalen mit einem das entsprechende Antibiotikum enthaltenden Agar (Ampicillin: 100 µg/mL, Chloramphenicol: 25 µg/mL, Kanamycin: 50 µg/mL) über Nacht bei 37 °C im mikrobiologischen Brutschrank inkubiert.

2.2.3.2 Qualitative Kolonie-PCR

Rekombinante Bakterienklone wurden mittels qualitativer PCR auf das Vorhandensein des gewünschten shRNA-Inserts hin analysiert. Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde ein Teil des Klons abgenommen und in 10 µL dH₂O gelöst. 2 µL der Suspension wurden, nach 5-minütigem Erhitzen im Heizblock auf 95 °C, in der folgenden PCR als DNA eingesetzt. Es wurden die Primer *shRNA XbaI for* und *shRNA Sall rev* verwendet (siehe Tabelle 10), als Positivkontrolle dienten die shRNA-Konstrukte in *pLKO.1 puro* (siehe Tabelle 8). Die PCR erfolgte mithilfe des Kits *DreamTaq™ Green PCR Master Mix* nach Herstellerangaben und es wurde nach folgendem Programm amplifiziert, wobei die Schritte 2.-4. zyklisch 35 × wiederholt wurden:

Tabelle 17: Kolonie-PCR-Bedingungen.

Vorgang	Schritt	Temperatur und Dauer
Initiale Denaturierung	1.	98 °C – 3 min
Denaturierung	2.	98 °C – 45 sec
Annealing	3.	59 °C – 30 sec
Elongation	4.	72 °C – 1,5 min
Finale Elongation	5.	72 °C – 10 min
Lagerung	6.	4 °C

Zur Analyse der PCR-Produkte wurden die Proben neben dem DNA-Größenstandard *GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder* in einem 1 %igen Agarosegel, versetzt mit 5 µL Ethidiumbromid/100 mL, elektrophoretisch bei 100 V für 60 Minuten aufgetrennt und die DNA-Banden im Gel mittels UV-Licht sichtbar gemacht.

2.2.3.3 Plasmidpräparation aus *E. coli*

Zur Vermehrung von Plasmid-tragenden Bakterien wurden Übernachtskulturen angesetzt. In einem Zentrifugenröhrchen oder einem Erlenmeyerkolben wurde LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (Konzentrationen siehe Abschnitt 2.2.3.1) vorgelegt und mit einer sterilen Pipettenspitze entweder der zu vermehrende Bakterienklon von der Agar-Platte abgetragen oder etwas von gefrorenem Bakterien-Glycerolstock (s.u.) abgekratzt und zu dem LB-Medium gegeben. Das Volumen des

Ansatzes variierte je nach nachfolgendem Präparationsmaßstab (Mini- oder Midipräparation). Die Bakterien wurden über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Die Plasmidpräparation aus den Bakterienzellen erfolgte mit dem *NucleoSpin® Plasmid*- bzw. dem *NucloBond® Xtra Midi Plus*-Kit nach Herstellerangaben und die DNA-Konzentration wurde am *NanoDrop™* bestimmt. Zur Herstellung von Bakterien-Glycerolstocks wurde 1 mL der Übernachtskultur vorsichtig mit 500 µL Glycerol gemischt, die Zellsuspension in ein Röhrchen zur Kryokonservierung überführt und die Bakterien bei -80 °C eingefroren.

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 Western Blot-Verfahren zur Analyse der GLI1-Proteinexpression in AML-Zelllinien

Herstellung von Protein-Lysaten durch TCA-Präzipitation

Es sollte untersucht werden, welchen Effekt eine Behandlung mit dem kleinmolekularen Inhibitor Sunitinib auf die GLI1-Proteinexpression in den *FLT3*-mutierten AML-Zelllinien MV4-11 und MOLM-13 sowie in der *FLT3*-Wildtyp-Zelllinie OCI-AML5 hat.

Die Zellen wurden, in jeweils zwei unabhängigen Experimenten, zu je 5×10^6 Zellen in 10 mL des jeweiligen Kulturmediums in 10 cm-Petrischalen ausgesät und als Kontrolle für eine spezifische GLI1/2-Inhibierung mit GANT61 in Konzentrationen von 20-60 µM behandelt. Sunitinib wurde in Konzentrationen von 50 nM (MV4-11 und MOLM-13) bzw. zusätzlich 100 nM (OCI-AML5) eingesetzt. Eine Lösungsmittelkontrolle wurde mitgeführt. Nach einer Inkubationsdauer von 3 Tagen wurden die Zellen geerntet und die Proteine durch TCA (*trichloroacetic acid*, Trichloressigsäure) gefällt. Alle Schritte wurden, wenn möglich, auf Eis durchgeführt, es wurden gekühlte Lösungen verwendet und es wurde bei 4 °C zentrifugiert. Die Zellen wurden pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet zweimal mit 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen. Das Pellet wurde in 500 µL 0,9 % NaCl-Lösung resuspendiert und 1/10 Volumen 99 % TCA-Lösung zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation wurde der Lyse-Ansatz 5 Minuten bei maximaler Zentrifugen-Geschwindigkeit ($3220 \times g$) abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Zum Entfernen von TCA-Resten wurde das Pellet mit eiskaltem Aceton

gewaschen und die Aceton-Reste nach Abgießen bei RT mit offenem Deckel verdampft. Zu dem Proteinpellet wurden 80-150 µL 1 × Ladepuffer gegeben und das Pellet durch Sonifizierung mit einem Ultraschallprozessor gelöst. Die Proteinkonzentration wurde mithilfe des *DC Protein Assays* nach Herstellerangaben bestimmt. Die Protein-Lysate wurden bei -80 °C gelagert.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Proteintransfer

Zur Analyse wurden jeweils 20 µg Protein mit 1 × Ladepuffer, versetzt mit 0,005 % des pH-Indikators Bromphenolblau, auf 20 µL aufgefüllt und 1/10 Volumen 1 M DTT (Dithiothreitol) zur Reduktion der Disulfidbrücken hinzugegeben. Bei zu saurem pH-Wert wurde dieser mit 1 M Tris-HCl (pH 8,8) eingestellt. Die Proben wurden für 5 Minuten bei 95 °C im Heizblock denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels Gelelektrophorese in der mit Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammer in 4-12 % SDS-Polyacrylamid-Gelen (*Invitrogen™ Novex™ 4-12 % Tris-Glycine Mini Protein Gels*, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)) für etwa 60 Minuten bei 185 V. Zur Abschätzung der Proteingröße wurde der Größenstandard *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* mitgeführt. Der Proteintransfer erfolgte im Tank-Blotting-Verfahren in einer mit Transferpuffer gefüllten Blotting-Kammer für 99 Minuten bei 350 mA auf eine Nitrozellulose-Membran (*Amersham™ Protran™ 0,45 µM NC*, GE Healthcare (Little Chalfont, UK)).

Immunfärbung und Detektion von Proteinen

Die Detektion der Proteine erfolgte durch Immunfärbung mit Zielprotein-spezifischen Primärantikörpern und HRP(*horseradish peroxidase*)-gekoppelten Sekundärantikörpern sowie anschließender Chemilumineszenz-Detektion. Die Waschschrte erfolgten in 1 × TBS-T bei RT auf dem Schüttler, die Antikörper zur Immunfärbung wurden in 5 % BSA in 1 × TBS-T verdünnt. Zur Minimierung unspezifischer Antikörperbindung an die Nitrozellulose-Membran wurde diese für eine Stunde in 5 % BSA in 1 × TBS-T bei RT auf dem Schüttler geblockt. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 Minuten gewaschen. Die Immunfärbung mit den Primärantikörpern erfolgte über Nacht bei 4 °C in einem 50 mL-Zentrifugenröhrchen auf dem Rollschüttler. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 12 aufgelistet. Vor der Immunfärbung wurde die Membran auf der Höhe der 55 kDa-Bande mit einem Skalpell horizontal in zwei Teile getrennt, um

parallel eine Färbung mit zwei unterschiedlichen Primärantikörpern durchführen zu können. Der obere Teil der Membran wurde für die Färbung mit dem primären Kaninchen-Anti-hGLI1-Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet. Als Ladekontrolle wurde eine Immunfärbung des unteren Membranteils mit dem primären Maus-Anti-h β -Actin-Antikörper in einer Verdünnung von 1:5000 durchgeführt. Die Membranen wurden anschließend dreimal für 10 Minuten gewaschen und mit den Sekundärantikörpern Anti-Kaninchen IgG bzw. Anti-Maus IgG in einer Verdünnung von 1:10 000 bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Die Membranen wurden je zweimal für 5 Minuten und 20 Minuten gewaschen und die Proteinbanden nach Herstellerangaben mit dem *Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent* und anschließender Chemilumineszenz-Detektion mit dem *Fusion SL 4 3500 WL* sichtbar gemacht.

2.2.5 *In vivo*-Experimente

Mithilfe von AML-Xenograft-Modellen sollte der Effekt eines *GLI1*- und *GLI2*-Doppelknockdowns sowie der Effekt einer kombinierten Behandlung mit den kleinmolekularen Inhibitoren GANT61, Sunitinib und PF-04691502 auf die Progression einer *FLT3*-mutierten AML untersucht werden.

Im Fokus der Experimente stand die Überlebensdauer der Mäuse, eine parallele Bestimmung des Anteils humaner Blasen in Blut, Knochenmark und Milz der Tiere zum Zeitpunkt des Exitus sollte den leukämischen Phänotyp bestätigen. Die Tierexperimente wurden mit Genehmigung des Tierschutzkomitees des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf und der Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz der Stadt Hamburg durchgeführt (Genehmigungsnummer 18/13). Es wurden die Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes sowie die EU-Richtlinien zum Schutz von Versuchstieren (2010/63/EU) eingehalten.

2.2.5.1 Mäuse

Für die Tierexperimente in dieser Arbeit wurden weibliche Mäuse des Stammes NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ, sogenannte NSGTM-Mäuse (auch NOD *scid* gamma, Stock-Nummer 005557 bei *The Jackson Laboratory*), verwendet. Durch die *scid*-Mutation und durch ein komplettes Nullallel in der Interleukin-2-Rezeptor- γ -Kette (*Il2rg*) weist dieser Mausstamm eine starke Immundefizienz durch Mangel an reifen B- und T-Zellen sowie funktionellen natürlichen Killerzellen auf, was zur besonderen Eignung des Mausstammes für Xenografts führt. Die Mäuse wurden in der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gezüchtet und spezifisch pathogenfrei in einzelbelüfteten Käfigen mit unbegrenztem Wasser- und Nahrungsmittelzugang in einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten.

2.2.5.2 Vorversuche

In Vorversuchen sollte ermittelt werden, welche der beiden *FLT3*-mutierten AML-Zelllinien – MV4-11 oder MOLM-13 – sich am besten für das Xenograft-Experiment eignete. Zudem sollte die optimale zu transplantierende Zellzahl ermittelt werden. Das Kriterium hierfür war die zuverlässige Ausprägung eines leukämischen Phänotyps in einem Zeitrahmen, der die Beobachtung von Unterschieden durch den *Knockdown* bzw. die Inhibitor-Behandlungen erlauben würde.

2.2.5.2.1 Transplantation der AML-Zellen und Überwachung der Mäuse

In den Vorversuchen mit jeweils randomisiert in Gruppen aufgeteilten Tieren wurden je 4-5 Mäusen unter Isofluran-Narkose (Forene®) 2×10^5 bzw. 1×10^5 MV4-11- oder MOLM-13-Zellen in PBS intravenös in die Schwanzvene injiziert. Die Mäuse wurden täglich überwacht und ihr Gesundheitszustand bezüglich Merkmalen wie Körpergewicht, Allgemeinzustand, Spontanverhalten und versuchsspezifischen Kriterien (Auftreten großer solider Tumore, Aszites) anhand einer *Scoring*-Liste beurteilt und die Tiere bei gegebener kritischer Belastung aus dem Versuch genommen. Hierzu wurde der

Maus intraperitoneal eine Ketanest®-Rompun®-Narkose zu 10 µL/g Körpergewicht injiziert, es wurde das Blut terminal entnommen und das Tier durch zervikale Dislokation getötet. Die Milz und ein Femur wurden entnommen.

2.2.5.2.2 Aufarbeitung von Mausorganen für die durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils humaner Blasten

Um die leukämische Infiltration zu überprüfen, sollte mittels Durchflusszytometrie der prozentuale Anteil humaner Blasten (CD45⁺ Zellen) in peripherem Blut, Knochenmark und in der Milz der Mäuse zum Zeitpunkt ihres Exitus bestimmt werden.

Auf das bei der Blutentnahme bereits mit einem Tropfen Heparin gemischte periphere Blut wurde etwa 1 mL PBS gegeben. Zur Gewinnung des Knochenmarks wurden die Enden des Femurs mit einem Skalpell entfernt und das Knochenmark durch ein kurzes Beschleunigen der Tischzentrifuge auf 8000 × g in ein Eppendorf-Tube zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 500 µL PBS aufgenommen. Aus der Hälfte der Milz wurde durch behutsames Homogenisieren durch einen 70 µm-Filter und anschließendem Nachspülen mit etwas PBS eine Einzelzellsuspension hergestellt. Aus dem peripheren Blut, dem Knochenmark und der Milzzellsuspension wurden mittels Polysucrose-Dichtezentrifugation und bei Bedarf Erythrozytenlyse (siehe Abschnitt 2.2.1.1.2) die mononukleären Zellen gewonnen. Die mononukleären Zellen wurden, wie in Abschnitt 2.2.1.3.1 beschrieben, durchflusszytometrisch analysiert.

2.2.5.3 Effekt eines *GLI1*- und *GLI2*-shRNA-*Knockdowns* auf die Progression einer humanen *FLT3*-mutierten AML im Mausmodell

Es sollte untersucht werden, welchen Effekt ein gezielter *Knockdown* von *GLI1* und *GLI2* mittels shRNA auf die Progression einer *FLT3*-mutierten AML in Mäusen hat.

Basierend auf den Ergebnissen der Vorversuche, wurde die AML-Zelllinie MV4-11 gewählt. Um die mit den verschiedenen shRNAs transduzierten Zellen am Mikroskop

und Durchflusszytometer identifizieren zu können, wurden die in die Fluoreszenzproteine mCherry oder GFP kodierende lentivirale LeGO-Vektoren (siehe Tabelle 9) umklonierten shRNAs (siehe Abschnitt 2.2.2.4) verwendet. Die Zellen wurden, wie in Abschnitt 2.2.1.2 dargestellt, lentiviral transduziert. Es sollte der Effekt eines *GLI1*- und *GLI2*-Doppelknockdowns (DKD) untersucht werden. Als Kontrolle dienten mit *Scrambled-shRNA* doppelt transduzierte Zellen. Es ergaben sich folgende Ansätze:

1. MV4-11/*Scrambled-shRNA-mCherry* + *Scrambled-shRNA-GFP* bzw. Kontrolle
2. MV4-11/*GLI1-shRNA-mCherry* + *GLI2-shRNA-GFP* bzw. *GLI1/2*-DKD

Es wurden, ausgehend von den Ergebnissen der Vorversuche, jeweils 1×10^5 transduzierte MV4-11-Zellen in die Schwanzvene von 10-11 randomisiert aufgeteilten Mäusen pro Gruppe injiziert. Die Transplantation der Zellen in die Mäuse, die Überwachung ihres Gesundheitszustandes, die anschließende Aufarbeitung der Mausorgane (Blut, Knochenmark und Milz) sowie die durchflusszytometrische Analyse der leukämischen Infiltration erfolgten analog zu den Abschnitten 2.2.5.2.1 und 2.2.5.2.2. Die Population der humanen Blasten in den jeweiligen Mausorganen wurde durchflusszytometrisch bezüglich der mCherry- und GFP-Fluoreszenz auf ihre Anteile nicht-transduzierter sowie einfach- oder doppelt-positiver Zellen analysiert (siehe Abschnitt 2.2.1.3.2). Kontroll- und *GLI1/2*-DKD-Zellen wurden ohne Antibiotika *in vitro* kultiviert und die mRNA-Expression der Gene *GLI1*, *GLI2* und des Hedgehog-Signalweg-Zielgens *BCL2* über einen Zeitraum von 28 Tagen mittels RT-qPCR analysiert. Die Transplantation der Zellen in die Mäuse sowie die Überwachung der Tiere erfolgten unter Bedingungen der gentechnischen Sicherheitsstufe S2, die Aufarbeitung der Mausorgane sowie die durchflusszytometrische Analyse der Zellen erfolgten unter Bedingungen der gentechnischen Sicherheitsstufe S1.

2.2.5.4 Effekt einer kombinierten Behandlung mit GANT61, Sunitinib und PF-04691502 auf die Progression einer humanen *FLT3*-mutierten AML im Mausmodell

Es sollte untersucht werden, welchen Effekt eine kombinierte Behandlung von Mäusen mit den kleinmolekularen Inhibitoren GANT61, Sunitinib und PF-04691502 auf die

Progression einer MV4-11-vermittelten AML hat. Um eine unerwünschte Lösungsmittelbedingte Toxizität zu minimieren, wurden in der Literatur publizierte mittlere Inhibitor-Dosen eingesetzt^{105,304,318}. Für die Behandlung ergaben sich folgende Gruppen:

1. Lösungsmittelkontrolle bzw. Kontrolle
2. GANT61 (50 mg/kg Körpergewicht)
3. Sunitinib (10 mg/kg Körpergewicht)
4. PF-04691502 (2,5 mg/kg Körpergewicht)
5. GANT61 (50 mg/kg Körpergewicht) + Sunitinib (10 mg/kg Körpergewicht) + PF-04691502 (2,5 mg/kg Körpergewicht) bzw. Kombination

Es wurden je 1×10^5 MV4-11-Zellen in die Schwanzvene von 5-7 randomisiert aufgeteilten Mäusen pro Gruppe injiziert. Die kleinmolekularen Inhibitoren sowie deren Lösungsmittel zur Kontrolle wurden in 5 % Glucose als Trägerlösung verdünnt und den Mäusen mithilfe einer Schlundsonde oral verabreicht. Die Therapiegabe wurde einen Tag nach der Transplantation der MV4-11-Zellen begonnen. Die Transplantation der Zellen in die Mäuse, die Überwachung ihres Gesundheitszustandes, die anschließende Aufarbeitung der Mausorgane (peripheres Blut, Knochenmark und Milz) sowie die durchflusszytometrische Analyse der leukämischen Infiltration erfolgten analog zu den Abschnitten 2.2.5.2.1, 2.2.5.2.2 und 2.2.1.3.1.

2.2.6 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen in dieser Arbeit wurden mit dem Programm *IBM SPSS Statistics 21* durchgeführt. Für die Analysen der *in vitro*-Experimente wurde der Welch-Test angewandt, bei den *in vivo*-Experimenten wurden die Unterschiede im Überleben mittels Kaplan-Meier-Schätzung analysiert und für den Vergleich der Überlebensdaten ein Log-Rank-Test durchgeführt. Bei einem *P*-Wert von ≤ 0.05 wurde Signifikanz angenommen und es galt folgende Definition: *ns* (nicht signifikant) bei $P \geq 0.05$, * $P \leq 0.05$ sowie ** $P \leq 0.001$.

III Ergebnisse

3.1 Der gezielte shRNA-*Knockdown* von *GLI1* und *GLI2* in AML-Zelllinien und im AML-Xenograft-Mausmodell

In den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Akute Leukämien (Fiedler/Wellbrock) konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung von AML-Zelllinien und primären AML-Blasten mit dem kleinmolekularen GLI1- und GLI2-Inhibitor GANT61 anti-leukämische Effekte bezüglich der *in vitro*-Eigenschaften Proliferation, Apoptose und Koloniebildung hat ²⁶⁴. Diese Effekte waren in CD34⁺ hämatopoetischen Vorläuferzellen gesunder Spender weniger stark ausgeprägt.

In der vorliegenden Arbeit sollten diese Ergebnisse mittels eines gezielten shRNA-*Knockdowns* der Gene *GLI1* oder *GLI2* in AML-Zelllinien verifiziert und der Effekt eines *GLI1/2*-Doppel*knockdowns* in einem AML-Xenograft-Mausmodell untersucht werden.

3.1.1.1 Bestimmung der Transduktionseffizienz in der mit shRNA transduzierten AML-Zelllinie MV4-11

In den AML-Zelllinien UKE-1, OCI-AML5 und MV4-11 wurde mittels lentiviraler Transduktion (siehe Abschnitt 2.2.1.2) ein shRNA-*Knockdown* der Gene *GLI1* und *GLI2* erzielt. Als Kontrolle dienten mit *Scrambled*-shRNA transduzierte Zellen.

Für die Zelllinien UKE-1- und OCI-AML5 wurden die shRNAs in dem Vektor *pLKO.1-puro* verwendet, für die Zelllinie MV4-11 wurden die in LeGO-Vektoren umklonierten shRNAs verwendet. Die UKE-1- und OCI-AML5-Zellen wurden während der gesamten Experimentdauer unter Puromycin-Selektion kultiviert, die Experimente mit MV4-11 wurden nach Bestätigung hoher Transduktionseffizienzen gestartet. Die Transduktionseffizienzen wurden 4 Tage nach der Transduktion durchflusszytometrisch bestimmt (siehe Abschnitt 2.2.1.3.2). Die Ergebnisse beider Messungen finden sich in Tabelle 18.

Tabelle 18: Transduktionseffizienzen an Tag 4 nach Transduktion in mit *Scrambled-shRNA*, *GLI1-shRNA* oder *GLI2-shRNA* transduzierten MV4-11-Zellen in zwei unabhängigen Experimenten.

shRNA-Konstrukt	Experiment	Transduktionseffizienz [%]
<i>Scrambled-shRNA</i>	1	99,5
	2	99,7
<i>GLI1-shRNA</i>	1	97,0
	2	99,5
<i>GLI2-shRNA</i>	1	98,2
	2	99,2

Es wurden in allen Ansätzen hohe Transduktionseffizienzen von über 97 % erzielt.

3.1.1.2 Test der Transduzierbarkeit CD34⁺ hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen

Da in den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Akute Leukämien (Fiedler/Wellbrock) gezeigt werden konnte, dass die anti-leukämischen Effekte des GLI1/2-Inhibitors GANT61 in CD34⁺ hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen gesunder Spender weniger stark ausgeprägt sind, wurde der Versuch unternommen, die aus Leukaphereseprodukten isolierten CD34⁺ Zellen (siehe Abschnitt 2.2.1.1.2) lentiviral zu transduzieren (siehe Abschnitt 2.2.1.2) um die Ergebnisse der Vorarbeiten durch einen gezielten *Knockdown* von *GLI1* und *GLI2* zu verifizieren.

Die Zellen wurden in zwei unabhängigen Experimenten mit *Scrambled-shRNA* in *LeGO-G/Puro⁺* enthaltenden Virus-Überständen in aufsteigenden Konzentrationen von 0,1 µL-100 µL transduziert. Mit demselben Virus-Überstand wurden UKE-1-Zellen in aufsteigenden Konzentrationen von 1,25 µL-30 µL transduziert. Das Ergebnis der durchflusszytometrischen Bestimmung der Transduktionseffizienz an Tag 4 nach Transduktion ist in Abbildung 4 dargestellt.

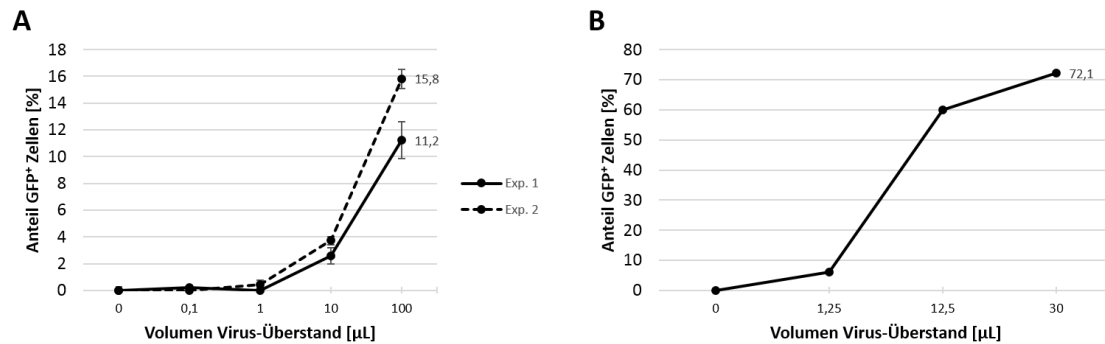


Abbildung 4: Qualitative Titration eines lentiviralen Virus-Überstandes in CD34⁺ hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen gesunder Spender und in UKE-1-Zellen. CD34⁺ Zellen (A) wurden in zwei unabhängigen Experimenten (Exp.) mit *Scrambled-shRNA* in *LeGO-G/Puro⁺*-Virus-Überständen transduziert, UKE-1-Zellen (B) wurden in einem Experiment mit demselben Virus-Überstand der angegebenen Volumina transduziert. Die Transduktionseffizienz wurde an Tag 4 nach Transduktion durchflusszytometrisch durch die Bestimmung des Anteils GFP⁺ Zellen analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung der Duplikate (A) bzw. die Einzelwerte (B).

In den CD34⁺ hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen wurden mit allen Virus-Überstand-Volumina nur geringe Transduktionseffizienzen erzielt (Abbildung 4 A). In Experiment 1 wurde mit dem maximalen Virus-Überstand-Volumen von 100 µL ein Anteil GFP⁺ Zellen von $11,2 \pm 1,4$ %, in Experiment 2 ein Anteil GFP⁺ Zellen von $15,8 \pm 0,7$ % erreicht. Mit 30 µL desselben Virus-Überstandes wurde hingegen in UKE-1-Zellen (Abbildung 4 B) eine hohe Transduktionseffizienz von 72,1 % erzielt, der Virus-Überstand wies demnach ein hohes Transduktionspotenzial auf.

Die getesteten CD34⁺ Zellen wiesen folglich keine gute Transduzierbarkeit auf, sodass eine Transduktion mit *GLI1*- und *GLI2*-shRNA nicht durchgeführt werden konnte. Eine Selektion der wenigen transduzierten CD34⁺ Zellen bot sich nicht an, da diese *in vitro* unter den möglichen Selektionsbedingungen nicht proliferieren, bzw. schnell ausdifferenzieren oder absterben würden.

3.1.2 Nachweis des shRNA-*Knockdowns* von *GLI1* bzw. *GLI2* in AML-Zelllinien mittels RT-qPCR

Die *Knockdown*-Effizienz in den transduzierten Zellen wurde an Tag 4 nach Puromycin-Selektionsbeginn (UKE-1 und OCI-AML5) bzw. an Tag 4 nach Transduktion mittels RT-qPCR (siehe Abschnitt 2.2.2.3) bestimmt.

Die Ergebnisse der relativen, auf das Haushaltsgen *GAPDH* normierten, *GLI1*- und *GLI2*-mRNA-Expression finden sich in Abbildung 5. Dargestellt ist die verbliebene *GLI1*- bzw. *GLI2*-mRNA-Expression im Vergleich zu der jeweiligen mRNA-Expression in den mit *Scrambled*-shRNA transduzierten Kontrollzellen.

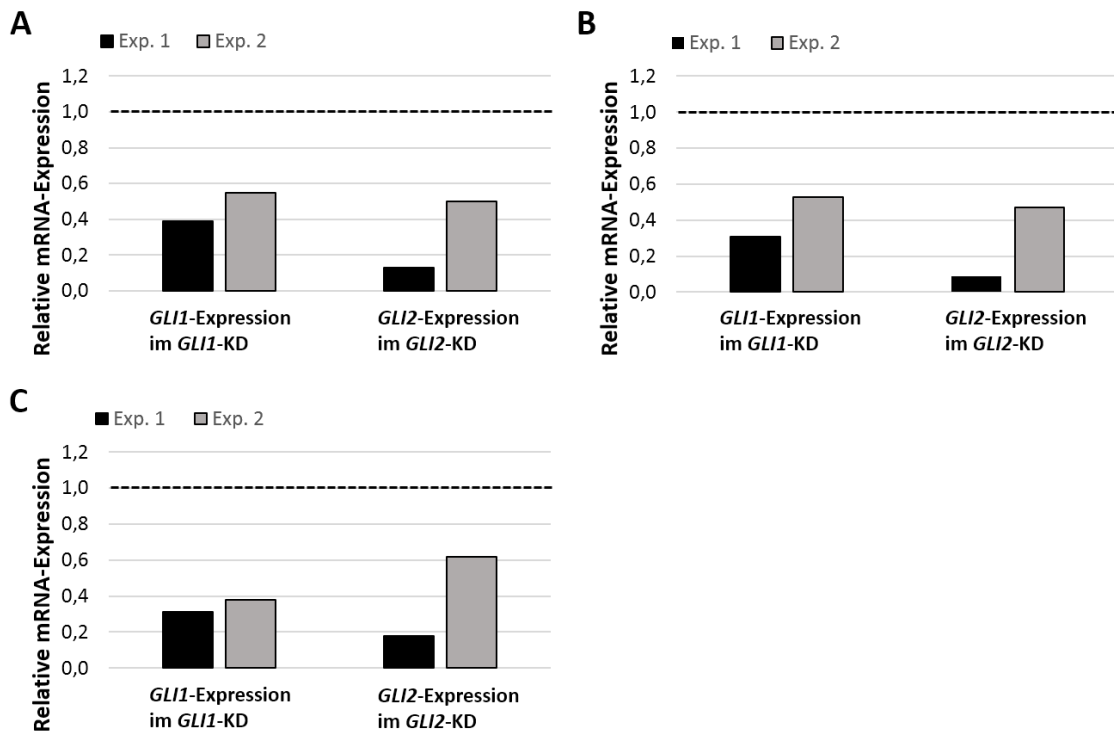


Abbildung 5: Relative *GLI1*- und *GLI2*-mRNA-Expression der mit *GLI1*- bzw. *GLI2*-shRNA transduzierten AML-Zelllinien. Mittels RT-qPCR wurde die relative *GLI1*- bzw. *GLI2*-mRNA-Expression in UKE-1/*GLI1*-KD und UKE-1/*GLI2*-KD (**A**), in OCI-AML5/*GLI1*-KD und OCI-AML5/*GLI2*-KD (**B**) und in MV4-11/*GLI1*-KD und MV4-11/*GLI2*-KD (**C**) aus zwei unabhängigen Experimenten (Exp.) 4 Tage nach Puromycin-Selektionsbeginn (UKE-1 und OCI-AML5) bzw. nach Transduktion (MV4-11) ermittelt. Die Expressionsdaten wurden auf die der jeweiligen *Scrambled*-shRNA-Kontrolle (schwarze, gestrichelte Linie, = 1) normalisiert. KD: *Knockdown*.

In allen mit *GLI1*- oder *GLI2*-shRNA transduzierten Zellen konnte ein erfolgreicher *Knockdown* der Gene auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden, unabhängig von dem verwendeten Vektor.

3.1.3 Effekt eines *GLI1*- oder *GLI2*-shRNA-Knockdowns auf die Proliferation von AML-Zelllinien

Es wurde der Effekt des *GLI1*- oder *GLI2*-shRNA-Knockdowns auf die Proliferationskapazität der AML-Zelllinien UKE-1, OCI-AML5 und MV4-11 untersucht (siehe Abschnitt 2.2.1.4.2).

Die Experimente wurden an Tag 4 nach Selektionsbeginn (UKE-1 und OCI-AML5) bzw. nach Transduktion (MV4-11) gestartet. Die Ergebnisse der 3-tägigen Proliferations-Assays sind in Abbildung 6 dargestellt.

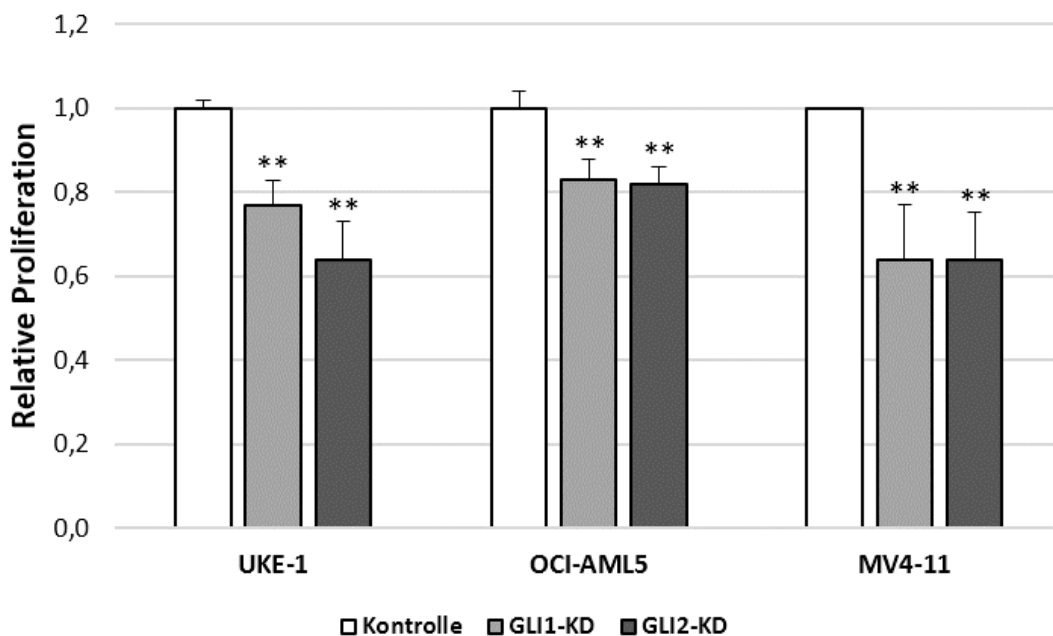


Abbildung 6: Effekt eines *GLI1*- oder *GLI2*-shRNA-Knockdowns auf die Proliferation von AML-Zelllinien.

Die mit shRNA transduzierten Zellen UKE-1/*GLI1*-KD und UKE-1/*GLI2*-KD, OCI-AML5/*GLI1*-KD und OCI-AML5/*GLI2*-KD, MV4-11/*GLI1*-KD und MV4-11/*GLI2*-KD sowie die jeweiligen *Scrambled*-shRNA-Kontrollzellen wurden in gleicher Zelldichte ausgesät und die Zellzahl nach 3-tägiger Inkubation mithilfe des Vi-Cell™ XR bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ Standardabweichung zweier unabhängiger Experimente in Triplikaten. Die Werte wurden auf die jeweilige Kontrolle normalisiert. Es gilt ** $P \leq 0.001$ im Welch-Test. KD: *Knockdown*.

In UKE-1/*GLI1*-KD wurde die Proliferation im Verhältnis zu den Kontrollzellen auf $76,5 \pm 6,2$ % der relativen Proliferation und in UKE-1/*GLI2*-KD auf $63,9 \pm 8,7$ % verringert. In OCI-AML5/*GLI1*-KD wurde die Proliferation auf $83,2 \pm 4,9$ % und in OCI-AML5/*GLI2*-KD auf $82,4 \pm 4,0$ % der relativen Proliferation im Vergleich zu den Kontrollzellen vermindert. Im Vergleich zu den Kontrollzellen betrug die verbliebene Proliferation bei

den MV4-11/*GLI1*-KD-Zellen $63,8 \pm 13,1$ % und bei MV4-11/*GLI2*-KD $64,3 \pm 11,3$ %. Alle Unterschiede in den Proliferationsraten der KD-Zellen waren signifikant im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollzellen.

In allen drei AML-Zelllinien bewirkte der *Knockdown* von *GLI1* oder *GLI2* folglich eine signifikante Verringerung der Proliferationskapazität.

3.1.4 Effekt eines *GLI1*- oder *GLI2*-shRNA-*Knockdowns* auf die Apoptose-Induktion in AML-Zelllinien

Der Effekt des *GLI1*- oder *GLI2*-shRNA-*Knockdowns* auf die Apoptose-Induktion der AML-Zelllinien UKE-1, OCI-AML5 und MV4-11 wurde untersucht (siehe Abschnitt 2.2.1.5.1).

Die Experimente mit UKE-1 und OCI-AML5 wurden an Tag 3 und Tag 7 der Puromycin-Selektion, die mit MV4-11 an Tag 3 und Tag 7 nach Transduktion gestartet. Die Zellen wurden in definierter Zelldichte ausgesät und nach 24-stündiger Inkubation wurde die Induktion der Apoptose mittels Annexin V/PI-Doppelfärbung am Durchflusszytometer bestimmt. Bei den MV4-11-Zellen, welche mit den shRNAs in LeGO-Vektoren transduziert wurden, war eine Doppelfärbung mit PI nicht möglich, da das Fluoreszenzprotein mCherry und PI Fluoreszenz sehr ähnlicher Wellenlänge emittieren. Die Ergebnisse der Bestimmung der Apoptose-Induktion sind in Abbildung 7 dargestellt.

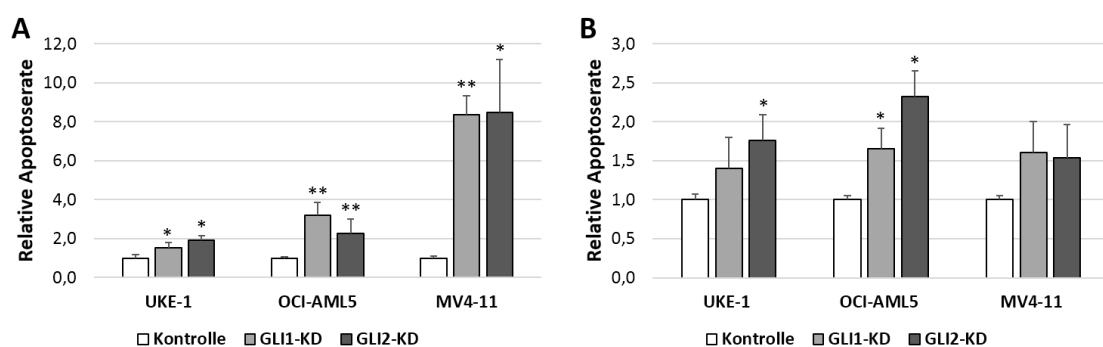


Abbildung 7: Effekt eines *GLI1*- oder *GLI2*-shRNA-*Knockdowns* auf die Apoptose-Induktion in AML-Zelllinien. Die mit shRNA transduzierten Zellen UKE-1/*GLI1*-KD und UKE-1/*GLI2*-KD, OCI-AML5/*GLI1*-KD und OCI-AML5/*GLI2*-KD, MV4-11/*GLI1*-KD und MV4-11/*GLI2*-KD sowie die jeweiligen *Scrambled*-shRNA-Kontrollzellen wurden an Tag 3 (**A**) und an Tag 7 (**B**) der Puromycin-Selektion (UKE-1 und OCI-AML5) bzw. nach Transduktion (MV4-11) in definierter Zelldichte ausgesät und die Induktion der Apoptose nach 24-stündiger Inkubation durch eine Annexin V/PI-Färbung (UKE-1 und OCI-AML5) bzw. eine alleinige Annexin V-Färbung (MV4-11) und anschließende durchflusszytometrische Messung bestimmt. Dargestellt ist jeweils der relative, auf die Kontrollzellen normalisierte, Anteil an früh- und spätapoptotischen

Annexin V⁺ Zellen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung zweier unabhängiger Experimente in Duplikaten. Es gilt * $P \leq 0.05$ und ** $P \leq 0.001$ im Welch-Test. KD: *Knockdown*.

In allen drei untersuchten Zelllinien bewirkte der *Knockdown* von *GLI1* oder *GLI2* eine erhöhte Induktion der Apoptose im Vergleich zu den Kontrollzellen.

In den UKE-1/*GLI1*-KD-Zellen war sowohl nach Tag 3 (Abbildung 7 A) als auch nach Tag 7 (Abbildung 7 B) nach Selektionsbeginn ein ähnlich ausgeprägter Anstieg der Apoptoserate zu beobachten ($1,6 \pm 0,3$ -fach bzw. $1,4 \pm 0,4$ -fach), wobei dieser nach Tag 3 verglichen mit den Kontrollzellen signifikant war. In UKE-1/*GLI2*-KD war zu beiden untersuchten Zeitpunkten ein fast identischer und signifikanter Anstieg der Apoptoserate zu verzeichnen ($1,9 \pm 0,3$ -fach (Abbildung 7 A) und $1,8 \pm 0,3$ -fach (Abbildung 7 B)). In den OCI-AML5/*GLI1*-KD-Zellen stieg die Apoptoserate nach Tag 3 und nach Tag 7 nach Selektionsbeginn signifikant um das $3,2 \pm 0,7$ -Fache (Abbildung 7 A) und um das $1,7 \pm 0,3$ -Fache (Abbildung 7 B). In OCI-AML5/*GLI2*-KD war zu beiden untersuchten Zeitpunkten eine gleichermaßen ausgeprägte signifikante Erhöhung der Apoptoserate im Vergleich zu den Kontrollzellen zu beobachten ($2,3 \pm 0,8$ -fach (Abbildung 7 A) und $2,3 \pm 0,3$ -fach (Abbildung 7 B)). Während bei den Zelllinien UKE-1 und OCI-AML5 zu beiden untersuchten Zeitpunkten durch den *Knockdown* von *GLI1* oder *GLI2* eine ähnliche Steigerung der Apoptose-Induktion zu beobachten war, war in den MV4-11-Zellen nach Tag 3 für beide Gene ein hoher und signifikanter Anstieg der Apoptoserate zu verzeichnen ($8,4 \pm 1,0$ -fach für MV4-11/*GLI1*-KD und $8,5 \pm 2,7$ -fach für MV4-11/*GLI1*-KD (Abbildung 7 A)), wohingegen nach Tag 7 für beide KD-Ansätze ein geringerer und nicht signifikanter Anstieg der Apoptoserate zu beobachten war ($1,6 \pm 0,4$ -fach für MV4-11/*GLI1*-KD und $1,5 \pm 0,4$ -fach für MV4-11/*GLI1*-KD (Abbildung 7 B)).

3.1.5 Effekt eines *GLI1*- oder *GLI2*-shRNA-*Knockdowns* auf die Koloniebildung von AML-Zelllinien

Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen besitzen die Fähigkeit, in semisolidem Medium, nach Zugabe spezifischer Wachstumsfaktoren, Kolonien auszubilden. Leukämiezellen teilen diese Fähigkeit zur Koloniebildung und eine hohe

Colony Formation-Kapazität kann eine wichtige Rolle bei der Progression der Leukämieerkrankung oder bei einem Rückfall spielen. Demnach stellt der *Colony Formation*-Assay einen informativen Versuchsansatz dar, die anti-leukämische Wirkung einer Behandlung oder eines genetischen *Knockdowns/Knockouts* zu beurteilen.

Aus diesem Grund sollte untersucht werden, welchen Effekt ein *Knockdown* der Gene *GLI1* oder *GLI2* auf die Koloniebildung der AML-Zelllinien UKE-1, OCI-AML5 sowie MV4-11 hat (siehe Abschnitt 2.2.1.6.1).

Die Experimente mit UKE-1 und OCI-AML5 wurden an Tag 3 der Puromycin-Selektion, die mit MV4-11 an Tag 4 nach Transduktion gestartet. Die Zellen wurden in gleicher Zelldichte in semisolidem Medium ausgesät und die Kolonien nach 5-8-tägiger Inkubation am Umkehrmikroskop ausgezählt. Das Ergebnis der *Colony Formation*-Assays ist in Abbildung 8 dargestellt.

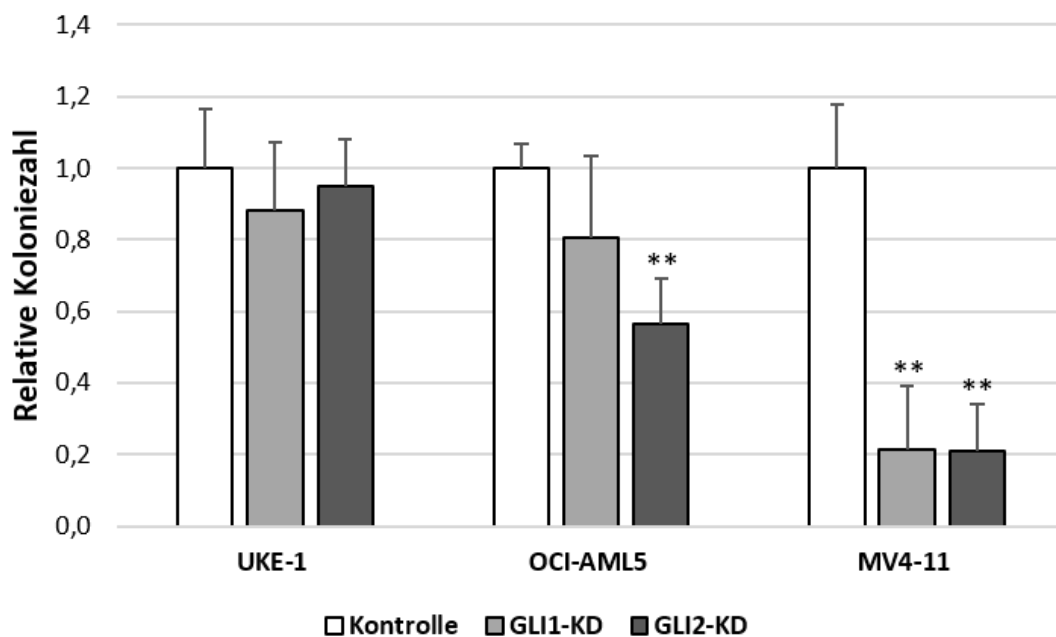


Abbildung 8: Effekt eines *GLI1*- oder *GLI2*-shRNA-Knockdowns auf die Koloniebildung von AML-Zelllinien. Die mit shRNA transduzierten Zellen UKE-1/*GLI1*-KD und UKE-1/*GLI2*-KD, OCI-AML5/*GLI1*-KD und OCI-AML5/*GLI2*-KD, MV4-11/*GLI1*-KD und MV4-11/*GLI2*-KD sowie die jeweiligen *Scrambled*-shRNA-Kontrollzellen wurden an Tag 3 der Puromycin-Selektion (UKE-1 und OCI-AML5) bzw. an Tag 4 nach Transduktion (MV4-11) in gleicher Zelldichte in semisolidem Medium ausgesät und die Kolonien nach 5-8 Tagen am Umkehrmikroskop gezählt. Die auf die jeweilige Kontrolle normalisierten Daten repräsentieren die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung zweier unabhängiger Experimente in Triplikaten. Es gilt ** $P \leq 0.001$ im Welch-Test. KD: *Knockdown*.

In den mit *GLI1*- oder *GLI2*-shRNA transduzierten UKE-1-Zellen war nur eine geringe Verminderung der Koloniezahl im Vergleich zu den Kontrollzellen auf $88,2 \pm 19,1 \%$ für den *GLI1*-KD und auf $95,1 \pm 12,9 \%$ für den *GLI2*-KD zu verzeichnen. In OCI-AML5/*GLI1*-KD wurde die Koloniezahl auf $80,7 \pm 22,7 \%$ im Vergleich zu den Kontrollzellen verringert, in den OCI-AML5/*GLI2*-KD-Zellen konnte eine signifikante Verminderung der Koloniebildung auf $56,3 \pm 12,8 \%$ beobachtet werden. In der Zelllinie MV4-11 wurde die Koloniebildung durch den *Knockdown* von *GLI1* oder *GLI2* am stärksten und für beide Gene signifikant, verglichen mit den Kontrollzellen, inhibiert (auf $21,5 \pm 17,8 \%$ der relativen Koloniezahl für MV4-11/*GLI1*-KD und auf $21,1 \pm 13,1 \%$ für MV4-11/*GLI2*-KD).

Insgesamt bewirkte der *Knockdown* von *GLI1* oder *GLI2* in allen untersuchten AML-Zelllinien eine Inhibierung der Koloniebildung, wobei dieser anti-leukämische Effekt bei UKE-1 nur gering und bei MV4-11 am stärksten ausgeprägt war.

3.1.6 Effekt eines *GLI1*- und *GLI2*-shRNA-*Knockdowns* auf die Progression einer humanen *FLT3*-mutierten AML im Mausmodell

Um die Ergebnisse der *in vitro*-Assays *in vivo* zu verifizieren und den therapeutischen Effekt des *GLI1/2*-Inhibitors GANT61 optimal mittels eines gezielten shRNA-*Knockdowns* zu imitieren, wurde ein Doppel*knockdown*-Ansatz beider Gene, *GLI1* und *GLI2*, gewählt (*GLI1/2*-DKD). Da in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Akute Leukämien (Fiedler/Wellbrock) gezeigt werden konnte, dass der negative Einfluss einer hohen *GLI2*-Expression auf das Überleben von AML-Patienten mit dem Vorhandensein einer *FLT3*-Mutation korreliert, sollte im Xenograft die Progression einer *FLT3*-mutierten AML-Zelllinie untersucht werden.

3.1.6.1 Vorversuche zur Wahl der *FLT3*-mutierten AML-Zelllinie und zur optimalen zu transplantierenden Zellzahl

In Vorversuchen wurde untersucht, welche *FLT3*-mutierte AML-Zelllinie – MV4-11 oder MOLM-13 – sich am besten für das AML-Xenograft-Mausmodell eignete und welche Zellzahl in den Hauptversuchen transplantiert werden sollte (siehe Abschnitt 2.2.5.2).

In den Vorversuchen wurden jeweils 4-5 NSGTM-Mäusen (siehe Abschnitt 2.2.5.1) je 2×10^5 bzw. 1×10^5 MV4-11- oder MOLM-13-Zellen intravenös in die Schwanzvene injiziert und das Überleben der Tiere überwacht und analysiert. Zum Zeitpunkt des Exitus wurde mittels Durchflusszytometrie die leukämische Infiltration humaner Blasten in die Mausorgane peripheres Blut, Knochenmark und Milz bestätigt (Daten nicht gezeigt) (siehe Abschnitt 2.2.1.3.1). Die Überlebensdauer der Tiere in Abhängigkeit von der transplantierten Zellzahl der jeweiligen Zelllinie ist in Abbildung 9 graphisch dargestellt.

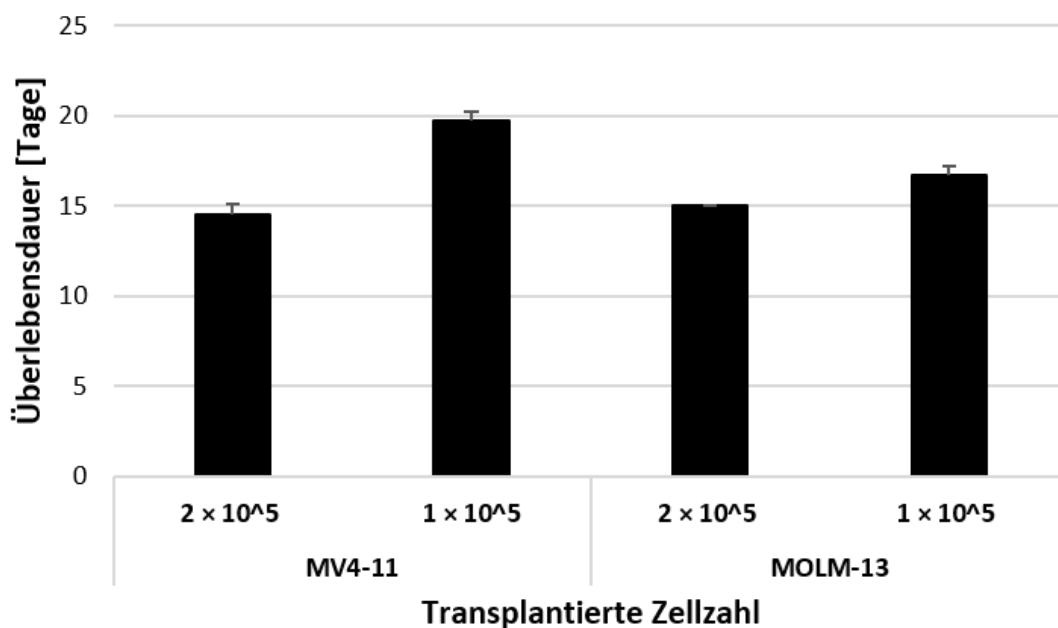


Abbildung 9: Überlebensdauer von NSGTM-Mäusen nach Transplantation von *FLT3*-mutierten AML-Zelllinien in unterschiedlichen Zellzahlen. NSGTM-Mäusen wurden je 2×10^5 bzw. 1×10^5 MV4-11- oder MOLM-13-Zellen intravenös in die Schwanzvene injiziert und die Progression der Leukämie überwacht. Bei Krankheitsanzeichen wurden die Tiere aus dem Versuch genommen und die Überlebensdauer in Abhängigkeit von der transplantierten Zellzahl analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert der Replikate jeder Gruppe mit 4-5 Tieren $\pm$ Standardabweichung.

Beide *FLT3*-mutierten AML-Zelllinien führten zu einer raschen und zuverlässigen Ausprägung des leukämischen Phänotyps im AML-Xenograft-Mausmodell, wobei eine

höhere transplantierte Zellzahl ein kürzeres Überleben der Mäuse zur Folge hatte. Die mit 2×10^5 MV4-11-Zellen transplantierten Mäuse überlebten nach Transplantation $14,5 \pm 0,6$ Tage, die mit 1×10^5 MV4-11-Zellen transplantierten Tiere überlebten $19,8 \pm 0,5$ Tage. Die Tiere, denen 2×10^5 MOLM-13-Zellen transplantiert wurden, überlebten $15 \pm 0,0$ Tage und die mit 1×10^5 MOLM-13-Zellen transplantierten Mäuse überlebten $16,8 \pm 0,5$ Tage. Insgesamt zeigten beide Zelllinien eine sehr ähnliche und innerhalb der Gruppe gleichförmige Progression der AML in den NSG™-Mäusen und somit eine ähnliche Eignung für die Hauptversuche. Bei allen Tieren konnte die leukämische Infiltration der Mausorgane bestätigt werden, wobei der Grad der Infiltration in die verschiedenen Organe stark variierte und keine Rückschlüsse auf die Überlebensdauer zuließ (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden die Daten in dem Vorversuch und auch in den späteren Hauptversuchen (siehe Abschnitte 3.1.6.2.1 und 3.2.2) lediglich zur Bestätigung des leukämischen Phänotyps herangezogen.

Da die Tiere mit 1×10^5 transplantierten MV4-11-Zellen etwas länger überlebten und dieser Zeitrahmen die Beobachtung von Unterschieden durch den *Knockdown* besser erlauben würde und zudem in den vorangegangenen *in vitro*-Versuchen ebenfalls die Zelllinie MV4-11 verwendet wurde, wurde diese für die Hauptversuche gewählt.

3.1.6.2.1 Hauptversuch zur Bestimmung des Effekts eines *GLI1/2*-Doppelknockdowns auf die Progression einer humanen *FLT3*-mutierten AML im Mausmodell

MV4-11-Zellen wurden lentiviral mittels *Scrambled*-shRNA oder *GLI1*- und *GLI2*-shRNA in LeGO-Vektoren jeweils doppelt transduziert (siehe Abschnitt 2.2.1.2). Es ergaben sich folgende Ansätze:

1. MV4-11/*Scrambled-shRNA-mCherry* + *Scrambled-shRNA-GFP* bzw. Kontrolle
2. MV4-11/*GLI1-shRNA-mCherry* + *GLI2-shRNA-GFP* bzw. *GLI1/2*-DKD

Die Fluoreszenz der Zellen wurde an Tag 4 nach Transduktion am Mikroskop überprüft und dokumentiert (siehe Abbildung 10).

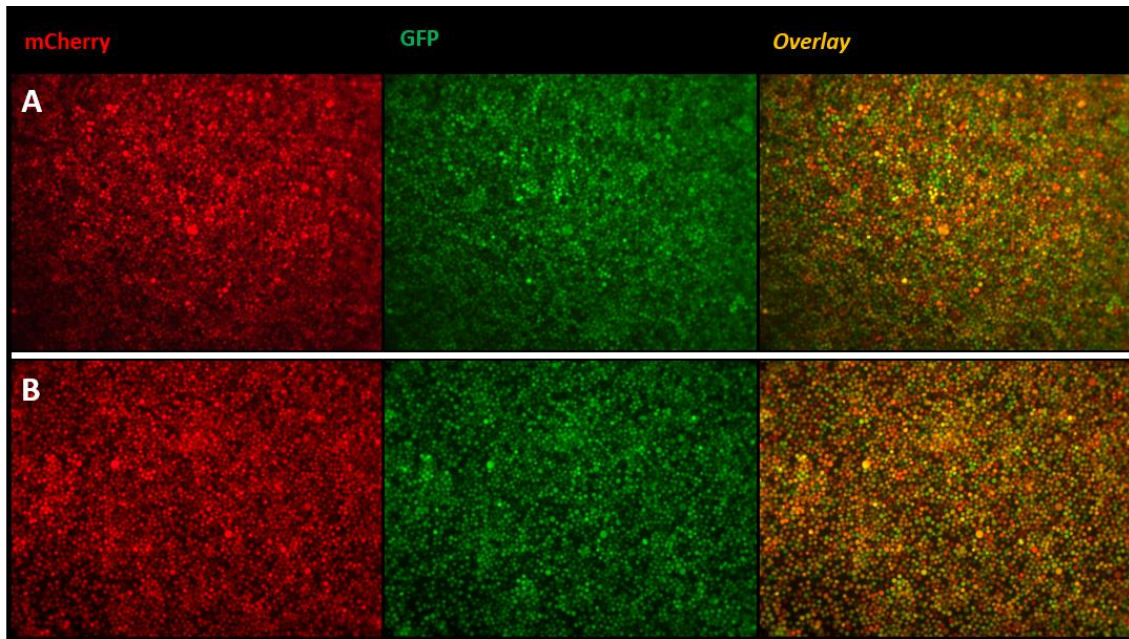


Abbildung 10: Mikroskopischer Vergleich der mCherry- und GFP-Fluoreszenz in mit *Scrambled*-shRNA bzw. *GLI1*- und *GLI2*-shRNA doppelt transduzierten MV4-11-Zellen. MV4-11-Zellen wurden lentiviral mittels *Scrambled*-shRNA oder *GLI1*- und *GLI2*-shRNA in mCherry oder GFP exprimierenden LeGO-Vektoren jeweils doppelt transduziert und die Fluoreszenz an Tag 4 nach Transduktion am Mikroskop analysiert. Dargestellt ist die mCherry-Fluoreszenz (rot), die GFP-Fluoreszenz (grün) und der *Overlay* beider Fluoreszenzen (gelb) in den MV4-11/*Scrambled*-shRNA-mCherry + *Scrambled*-shRNA-GFP-Zellen (**A**) und den MV4-11/*GLI1*-shRNA-mCherry + *GLI2*-shRNA-GFP-Zellen (**B**) mit 100-facher Vergrößerung.

Parallel wurde die Transduktionseffizienz beider Ansätze an Tag 4 nach Transduktion durchflusszytometrisch bestimmt. Das Ergebnis der Messung ist in Abbildung 11 dargestellt.

Die mikroskopische Analyse der MV4-11-Zellen an Tag 4 nach Transduktion mit *Scrambled*- oder *GLI1*- und *GLI2*-shRNA in mCherry bzw. GFP exprimierenden LeGO-Vektoren zeigte eine deutliche Fluoreszenz in beiden Ansätzen, was eine erfolgreiche Transduktion widerspiegelte (Abbildung 10). In beiden Transduktionsansätzen traten neben den doppelt-positiven mCherry⁺/GFP⁺ Zellen (gelbe Fluoreszenz im *Overlay*) sowohl ausschließlich mCherry⁺ Zellen (rote Fluoreszenz im *Overlay*) als auch GFP⁺ Zellen (grüne Fluoreszenz im *Overlay*) auf. Der Anteil alleiniger GFP⁺ Zellen erschien bei den Kontrollzellen (Abbildung 10 A) größer als bei den *GLI1/2*-DKD-Zellen (Abbildung 10 B).

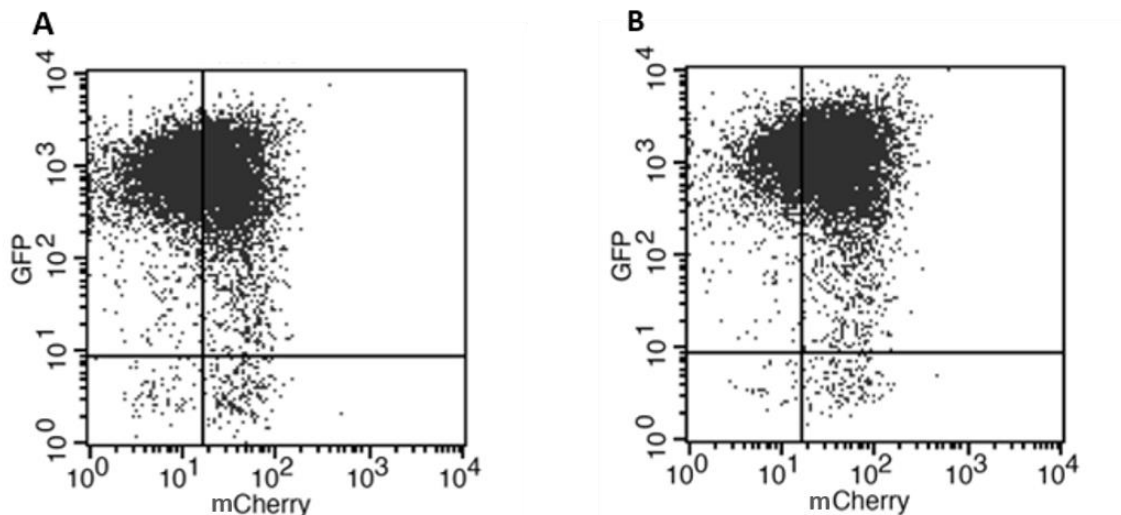


Abbildung 11: Durchflusszytometrische Analyse der Transduktionseffizienz in MV4-11/Kontrolle und MV4-11/*GLI1/2*-DKD. Die mit *Scrambled*-shRNA (MV4-11/Kontrolle, **A**) oder *GLI1*- und *GLI2*-shRNA (MV4-11/*GLI1/2*-DKD, **B**) in mCherry bzw. GFP exprimierenden LeGO-Vektoren doppelt transduzierten MV4-11-Zellen wurden an Tag 4 nach Transduktion durchflusszytometrisch auf ihre prozentualen Anteile mCherry⁺/GFP⁺, mCherry⁺ und GFP⁺ Zellen hin untersucht.

Dieses Bild wurde durch die durchflusszytometrische Bestimmung der Transduktionseffizienzen bestätigt (Abbildung 11). Insgesamt wurde in den Kontrollzellen eine Transduktionseffizienz von 99,3 % erreicht (Abbildung 11 A). Von diesen Zellen waren 49,7 % mCherry⁺/GFP⁺-doppelt-positiv, 2,1 % der Zellen waren allein mCherry⁺ und 47,5 % der transduzierten Kontrollzellen waren allein GFP⁺. Die MV4-11/*GLI1/2*-DKD-Zellen wiesen eine Gesamt-Transduktionseffizienz von insgesamt 99,7 % auf. Von diesen Zellen waren 76,3 % mCherry⁺/GFP⁺-doppelt-positiv, 1,5 % waren allein mCherry⁺ und 21,9 % der Zellen wiesen eine alleinige GFP-Fluoreszenz auf. Trotz des höheren Anteils doppelt-positiver Zellen in MV4-11/*GLI1/2*-DKD wiesen beide Ansätze insgesamt hohe Transduktionsraten auf und wurden für das Mausmodell verwendet.

Basierend auf den Ergebnissen der Vorversuche wurden jeweils 1×10^5 der transduzierten Zellen in die Schwanzvene von 10-11 Mäusen pro Gruppe injiziert und die Progression der AML in den Mäusen analysiert (siehe Abschnitt 2.2.5.3). Bei Krankheitsanzeichen wurden die Tiere aus dem Experiment genommen und die leukämische Infiltration der humanen Blasten in das periphere Blut, das Knochenmark und die Milz der Mäuse zum Zeitpunkt des Exitus durchflusszytometrisch analysiert (siehe Abschnitte 2.2.5.2.2 und 2.2.1.3.1). Im Mittelpunkt des Experiments stand dabei

das Überleben der Mäuse, die durchflusszytometrische Analyse der Blasteninfiltration sollte lediglich den leukämischen Phänotyp als Krankheitsursache bestätigen. Bei allen Tieren konnte eine Infiltration humaner Blasten in die untersuchten Organe nachgewiesen werden, wobei der Grad der Blasteninfiltration in die Mausorgane zum Zeitpunkt des Exitus stark variierte, zudem nicht mit dem Zeitpunkt des Exitus korrelierte und es keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Gruppen gab (Daten nicht gezeigt). Das Überleben der Mäuse über die Zeit ist in einer Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abbildung 12 dargestellt.

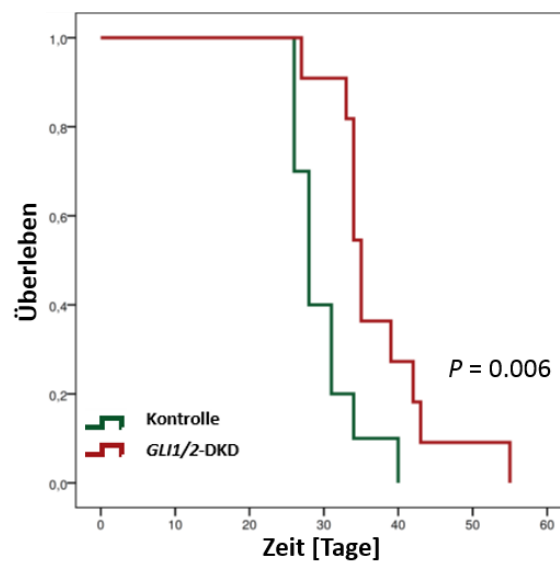


Abbildung 12: Kaplan-Meier-Überlebenskurve der mit MV4-11/Kontrolle oder MV4-11/GLI1/2-DKD transplantierten NSGTM-Mäuse. Jeweils 10-11 NSGTM-Mäusen pro Gruppe wurden je 1×10^5 mit *Scrambled*-shRNA doppelt transduzierte MV4-11-Zellen (Kontrolle, n = 10) bzw. mit *GLI1*- und *GLI2*-shRNA doppelt transduzierte MV4-11-Zellen (*GLI1/2*-DKD, n = 11) transplantiert und das Überleben der Mäuse mittels Kaplan-Meier-Schätzung und Log-Rank-Test analysiert. DKD: Doppelknockdown.

Die mit MV4-11/*GLI1/2*-DKD transduzierten NSGTM-Mäuse (Abbildung 12, rote Linie) überlebten durchschnittlich $37,4 \pm 7,3$ Tage, während die mit den Kontrollzellen transduzierten Tiere (Abbildung 12, grüne Linie) durchschnittlich $29,8 \pm 4,4$ Tage überlebten. Dieser Unterschied in der Überlebenszeit war statistisch signifikant ($P = 0.006$).

Ein *Knockdown* beider Gene – *GLI1* und *GLI2* – in der *FLT3*-mutierten AML-Zelllinie MV4-11 hat demnach einen anti-leukämischen Effekt im Mausmodell.

Um zu analysieren, welche der möglichen Zellpopulationen – nicht-transduziert bzw. Wildtyp, mCherry⁺, GFP⁺ oder mCherry⁺/GFP⁺ – verstärkt zu der Ausprägung des leukämischen Phänotyps in den Mäusen beigetragen haben, wurde die mCherry- und GFP-Fluoreszenz in den humanen Blasten (CD45⁺ Zellen) aus peripherem Blut, Knochenmark und Milz der Mäuse zum Zeitpunkt des Exitus durchflusszytometrisch bestimmt (siehe Abschnitte 2.2.1.3.1 und 2.2.1.3.2). Die Verteilung der Anteile der jeweiligen Zellpopulationen in den verschiedenen Mausorganen ist in Abbildung 13 dargestellt.

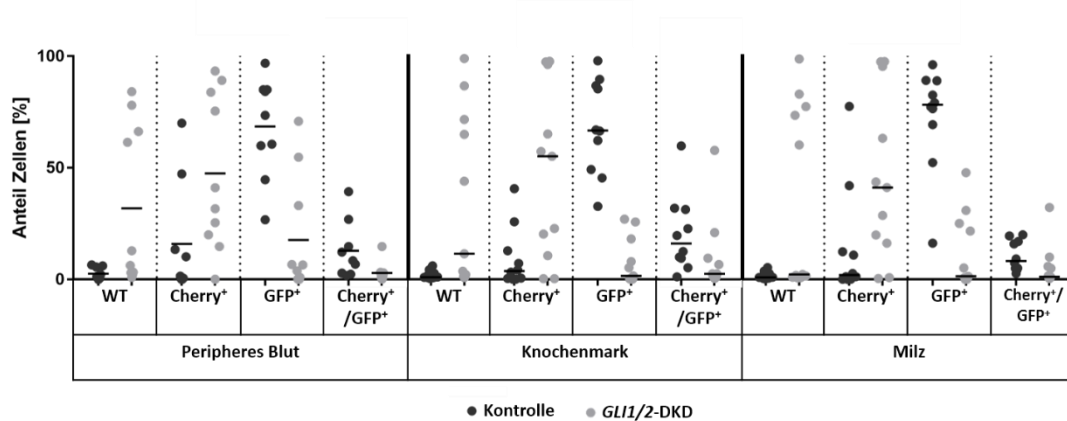


Abbildung 13: Verteilung der Anteile humaner Wildtyp-, mCherry⁺, GFP⁺ und mCherry⁺/GFP⁺ Blasten in Organen der mit MV4-11/Kontrolle oder MV4-11/GLI1/2-DKD transplantierten NSG[™]-Mäuse beim Auftreten des leukämischen Phänotyps. Zum Zeitpunkt des Exitus der mit MV4-11/Kontrolle (Kontrolle) bzw. MV4-11/GLI1/2-DKD (GLI1/2-DKD) transplantierten NSG[™]-Mäuse wurden die Anteile mCherry⁺ und GFP⁺ Zellen in der Population humaner Blasten (CD45⁺ Zellen) im peripheren Blut, Knochenmark und in der Milz der Mäuse durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist jeweils der Median der Einzelwerte (schwarze horizontale Markierung) im *Dot Plot*, jeder Punkt repräsentiert den prozentualen Anteil der jeweiligen Zellpopulation in dem entsprechenden Organ einer Maus. WT: MV4-11-Wildtyp, nicht-fluoreszierende, d.h. untransduzierte Zellen; Cherry⁺: mCherry⁺ MV4-11-Zellen, nur *Scrambled-shRNA-mCherry* bei mit MV4-11/Kontrolle, bzw. nur *GLI1-shRNA-mCherry* bei mit MV4-11/GLI1/2-DKD transplantierten Mäusen; GFP⁺: GFP⁺ MV4-11-Zellen, nur *Scrambled-shRNA-GFP* bei mit MV4-11/Kontrolle, bzw. nur *GLI2-shRNA-GFP* bei mit MV4-11/GLI1/2-DKD transplantierten Mäusen; Cherry⁺/GFP⁺: mCherry⁺/GFP⁺ MV4-11-Zellen, *Scrambled-shRNA-mCherry* + *Scrambled-shRNA-GFP* bei mit MV4-11/Kontrolle, bzw. *GLI1-shRNA-mCherry* + *GLI2-shRNA-GFP* bei mit MV4-11/GLI1/2-DKD transplantierten Mäusen. DKD: Doppelknockdown.

In den mit MV4-11/Kontrolle-Zellen transplantierten Mäusen wurden – ausgehend von dem jeweiligen ermittelten Median – in allen drei analysierten Mausorganen sehr geringe Anteile MV4-11-Wildtyp-Zellen, tendenziell mittlere bis niedrige Anteile mCherry⁺ Zellen, hohe Anteile GFP⁺ Zellen und mittlere Anteile mCherry⁺/GFP⁺ Zellen gefunden. Diese Verteilung der Populationen entspricht in etwa der der transplantierten

MV4-11/Kontrolle-Ausgangszellsuspension, wobei die Population der doppelt-transduzierten Zellen in einigen Tieren etwas zugunsten der einfach-transduzierten Zellen abgenommen zu haben scheint. In den mit MV4-11/*GLI1*/2-DKD-Zellen transplantierten Mäusen wurden im Vergleich zu der Kontrolle und zu der MV4-11/*GLI1*/2-DKD-Ausgangszellsuspension tendenziell höhere Anteile nicht-transduzierter Wildtyp- und mCherry⁺ Zellen sowie niedrigere Anteile GFP⁺ und mCherry⁺/GFP⁺ Zellen identifiziert. Hier schienen demnach bei einigen Tieren die nicht-transduzierten Zellen und/oder die *GLI1*-Knockdown-Zellen die anderen transduzierten Zellen überwuchert zu haben und somit möglicherweise verstärkt leukämische Blasten mit potenziell aktivem *GLI2*, wie es in den Wildtyp-Zellen und den *GLI1*-Knockdown-Zellen zu erwarten gewesen war, für die Ausprägung des leukämischen Phänotyps verantwortlich gewesen zu sein.

3.1.6.2.2 Bestimmung der Konsistenz des *GLI1*-, *GLI2*- und *BCL2*- *Knockdowns* in MV4-11/*GLI1*/2-DKD-Zellen mittels RT-qPCR

Um zu überprüfen, wie konsistent der *Knockdown* der Gene in den shRNA-transduzierten MV4-11-Zellen über einen längeren Zeitraum ist, wurden MV4-11/Kontrolle- und MV4-11/*GLI1*/2-DKD-Zellen ohne Antibiotika-Selektion *in vitro* kultiviert und die mRNA-Expression der Gene *GLI1* und *GLI2* über einen Zeitraum von 28 Tagen mittels RT-qPCR analysiert. Um zu untersuchen, ob ein *Knockdown* von *GLI1* und *GLI2* ebenfalls Auswirkungen auf die Genexpression von HH-Signalweg-Zielgenen hat, wurde zusätzlich die mRNA-Expression von *BCL2* untersucht.

Die gewonnenen Informationen sollten eine *in vitro*-Kontrolle zu dem Mausexperiment (siehe Abschnitt 3.1.6.2.1) darstellen. Die Ergebnisse der relativen, auf das Haushaltsgen *GAPDH* normierten, *GLI1*-, *GLI2*- und *BCL2*-mRNA-Expression finden sich in Abbildung 14. Dargestellt ist die verbliebene *GLI1*-, *GLI2*- und *BCL2*-mRNA-Expression zu 4 verschiedenen Zeitpunkten im Vergleich zu der jeweiligen mRNA-Expression in den mit *Scrambled*-shRNA transduzierten Kontrollzellen. Der 1. analysierte Zeitpunkt (Tag 0) entspricht Tag 4 nach Transduktion, dem Zeitpunkt der Transplantation von MV4-11/Kontrolle und MV4-11/*GLI1*/2-DKD in die Mäuse.

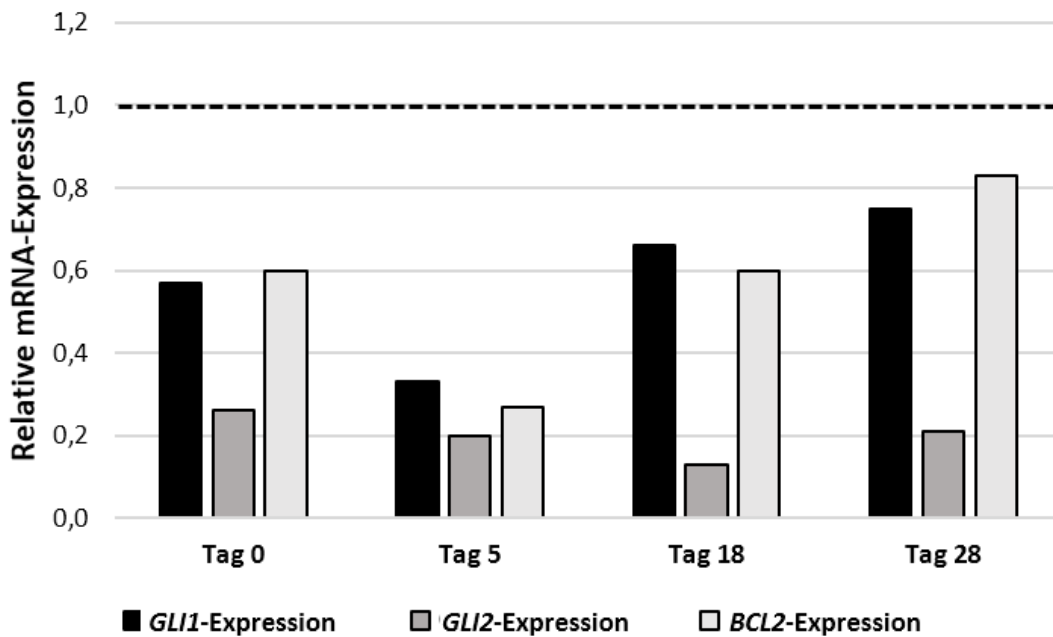


Abbildung 14: Relative *GLI1*-, *GLI2*- und *BCL2*-mRNA-Expression der mit *GLI1*- und *GLI2*-shRNA transduzierten MV4-11-Zellen über einen Zeitraum von 28 Tagen. Mittels RT-qPCR wurde die relative *GLI1*-, *GLI2*- und *BCL2*-mRNA-Expression in ohne Antibiotika-Zusatz kultivierten MV4-11/*GLI1/2*-DKD-Zellen zu 4 verschiedenen Zeitpunkten über einen Zeitraum von 28 Tagen ermittelt. Tag 0 entspricht Tag 4 nach Transduktion, dem Zeitpunkt der Transplantation in die NSGTM-Mäuse (siehe Abschnitt 3.1.6.2.1). Die jeweiligen Expressionsdaten wurden auf die der *Scrambled*-shRNA-Kontrolle (schwarze, gestrichelte Linie, = 1) normalisiert.

Während die verbliebene relative *GLI2*-mRNA-Expression über den gesamten Zeitraum von 28 Tagen auf einem sehr niedrigen Niveau blieb (Tag 0: 26 %, Tag 5: 20 %, Tag 18: 13 % und Tag 28: 21 %), nahm die verbliebene relative *GLI1*-mRNA-Expression über die Zeit wieder etwas zu (Tag 0: 57 %, Tag 5: 33 %, Tag 18: 66 % und Tag 28: 75 %), erreichte aber nicht die Expressionsstärke der Kontrollzellen. Die Analyse der relativen mRNA-Expression von *BCL2* zeigte ebenfalls eine verminderte Expression infolge des *GLI1/2*-Doppelknockdowns über den gesamten Zeitraum, wobei die Expressionsstärke über die Zeit ebenfalls wieder zunahm (Tag 0: 60 %, Tag 5: 27 %, Tag 18: 60 % und Tag 28: 83 %).

Insgesamt zeigen die ermittelten Genexpressionsdaten, dass der Doppelknockdown von *GLI1* und *GLI2* auch ohne Antibiotika-Selektion in den *in vitro* kultivierten MV4-11/*GLI1/2*-DKD-Zellen über einen längeren Zeitraum weitgehend konsistent war und somit auch von einem langanhaltenden *Knockdown* der Gene in den mit MV4-11/*GLI1/2*-DKD transplantierten NSGTM-Mäusen auszugehen ist. Zudem zeigt das

Experiment, dass der *GLI1/2*-DKD ebenfalls eine verminderte Expression des HH-Signalweg-Zielgens *BCL2* zur Folge hatte, also funktionell war.

3.2 Die kombinierte therapeutische Inhibierung des Hedgehog- und FLT3/PI3K-Signalwegs in der AML

In den bereits mehrfach erwähnten Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Akute Leukämien (Fiedler/Wellbrock) konnte eine signifikante Korrelation zwischen dem Vorhandensein von *FLT3*-Mutationen und einer hohen *GLI2*-Expression bei AML-Patienten gezeigt werden ²⁶⁴, weshalb eine Interaktion zwischen dem FLT3-Signalweg und den Hedgehog-Mediatoren *GLI1/2* vermutet wurde. Zudem wurde für verschiedene Krebsentitäten eine nicht-kanonische, über die PI3K-Achse vermittelte, HH-Signalweiterleitung auf der Ebene von *GLI1*- und/oder *GLI2* nachgewiesen ^{272,273}. Da bekannt ist, dass die Signalweiterleitung von aktiviertem FLT3 über die PI3K/Akt-Kaskade verläuft ^{319,320} und zusätzlich gezeigt werden konnte, dass eine wichtige Verbindung zwischen dem PI3K/Akt- und HH-Signalweg existiert ²⁸¹, sollte untersucht werden, ob auch bei der AML eine nicht-kanonisch über die FLT3/PI3K-Achse aktivierte, *GLI1/2*-vermittelte, HH-Signalweiterleitung vorliegt und welches therapeutische Potenzial eine gemeinsame Inhibierung der beteiligten Signalwege hat. Zu diesem Zweck galt es in der vorliegenden Arbeit, den Effekt einer kombinierten Inhibierung des Hedgehog- und FLT3/PI3K-Signalwegs in *in vitro*-Assays und in einem AML-Xenograft-Mausmodell zu untersuchen. Zudem sollten die Ergebnisse durch den Einsatz von *GLI*-Reporter-Assays verifiziert werden.

3.2.1 Die kombinierte therapeutische Inhibierung des Hedgehog- und FLT3/PI3K-Signalwegs in AML-Zelllinien und in Primärmaterial

Es sollte zunächst untersucht werden, ob die kombinierte therapeutische Inhibierung der *GLI1/2*-, FLT3- und PI3K-Achse anti-leukämische Effekte in funktionellen *in vitro*-Assays mit AML-Zelllinien und Primärmaterial hat.

3.2.1.1 Effekt einer kombinierten Behandlung mit GANT61, Sunitinib und PF-04691502 auf die Proliferation von AML-Zelllinien

Der Effekt einer kombinierten Behandlung der *FLT3*-mutierten AML-Zelllinien MV4-11 und MOLM-13 sowie der *FLT3*-Wildtyp-Zelllinie OCI-AML5 mit dem GLI1/2-Inhibitor GANT61, dem FLT3-Inhibitor Sunitinib und dem PI3K-Inhibitor PF-04691502 auf das Zellwachstum wurde untersucht.

In Vorversuchen (Daten nicht gezeigt) zeigte die Zelllinie MOLM-13, verglichen mit MV4-11, eine höhere Sensitivität bezüglich einer Behandlung mit Sunitinib oder PF-04691502, während die OCI-AML5-Zellen eine geringere Sensitivität bezüglich der Behandlung mit allen drei Substanzen zeigten. Aus diesem Grund wurden die Inhibitor-Konzentrationen so angepasst, dass ein etwa vergleichbares Ansprechen erzielt würde, welches die Beobachtung von Unterschieden zwischen den Behandlungsgruppen zulassen würde (siehe Abschnitt 2.2.1.4.3). Die Zellen wurden in definierter Dichte ausgesät und mit den Inhibitoren behandelt. Die Stimulation erfolgte mit den Einzelsubstanzen, der Kombination aus jeweils zwei Substanzen, der Kombination aus allen drei Inhibitoren sowie DMSO als Lösungsmittelkontrolle. Nach 3-tägiger Inkubation wurden die Zellzahlen mithilfe des Vi-Cell™ XR ermittelt. Das Ergebnis der Proliferations-Assays findet sich in Abbildung 15.

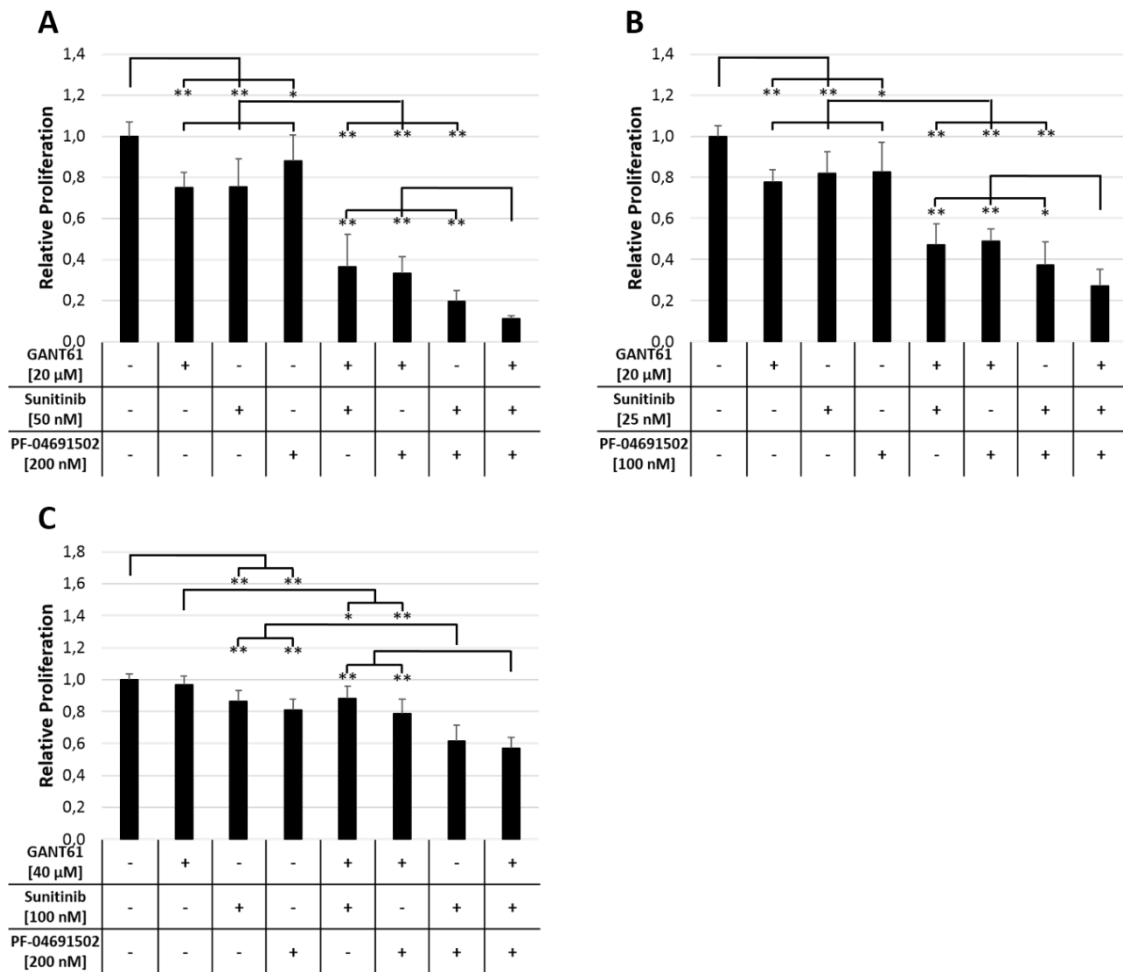


Abbildung 15: Effekt einer kombinierten therapeutischen Inhibierung des Hedgehog- und FLT3/PI3K-Signalwegs auf die Proliferation von AML-Zelllinien. Die *FLT3*-mutierten AML-Zelllinien MV4-11 (A) und MOLM-13 (B) sowie die *FLT3*-Wildtyp-Zelllinie OCI-AML5 (C) wurden in definierter Zelldichte ausgesät und mit den angegebenen Konzentrationen des GLI1/2-Inhibitors GANT61, des FLT3-Inhibitors Sunitinib und des PI3K-Inhibitors PF-04691502 allein (Einzelbehandlung), in Kombinationen von zwei (Doppelbehandlung) oder allen drei Inhibitoren (Dreifachbehandlung) sowie DMSO als Lösungsmittelkontrolle (Kontrolle) behandelt und der Effekt auf die Proliferationskapazität nach 3-tägiger Inkubation mithilfe des Vi-Cell™ XR bestimmt. Dargestellt ist der auf die jeweilige Kontrolle normalisierte Mittelwert $\pm$ Standardabweichung der relativen Proliferation aus mindestens drei unabhängigen Experimenten in Triplikaten. Es wurde eine statistische Analyse der Unterschiede zwischen der Kontrolle und den Einzelbehandlungen, den Einzelbehandlungen und den jeweiligen Doppelbehandlungen sowie den Doppelbehandlungen und der Dreifachbehandlung vorgenommen. Es gilt * $P \leq 0.05$ und ** $P \leq 0.001$ im Welch-Test.

Alle Behandlungen mit den einzelnen Substanzen (Einzelbehandlungen) der MV4-11-Zellen (Abbildung 15 A) führten zu einer Verringerung der relativen Proliferation im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle. 20 µM GANT61 reduzierte die Zahl lebender Zellen auf $75,0 \pm 7,2 \%$, 50 nM Sunitinib reduzierte die Zellzahl auf $75,3 \pm 13,9 \%$ und 200 nM PF-04691502 führte zu einer Reduktion der relativen Proliferation auf $87,9 \pm$

12,9 %. Die Behandlung mit zwei Inhibitoren (Doppelbehandlung) resultierte in einer weiteren Reduktion der Proliferationskapazität verglichen mit den Einzelbehandlungen, während die Behandlung mit allen drei Substanzen (Dreifachbehandlung) eine weitere Verminderung der Proliferationskapazität auf $11,0 \pm 1,7$ % bewirkte. Insgesamt waren alle analysierten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen (Kontrolle vs. Einzelbehandlung, Einzelbehandlung vs. jeweilige Doppelbehandlung, Doppelbehandlung vs. Dreifachbehandlung) statistisch signifikant. Die relative Proliferation der MOLM-13-Zellen (Abbildung 15 B) wurde zu einem mit MV4-11 vergleichbaren Ausmaß vermindert, dies allerdings bei niedrigeren Sunitinib- und PF-04691502-Konzentrationen. Wie bei MV4-11 waren alle Unterschiede zwischen den verglichenen Behandlungen statistisch signifikant. 20 μ M GANT61 reduzierte in der Einzelbehandlung die Zahl lebender Zellen auf $77,6 \pm 6,1$ %, 25 nM Sunitinib verminderte die relative Proliferation der Zellen auf $81,8 \pm 10,7$ % und die Behandlung mit 100 nM PF-04691502 führte zu einer Inhibierung auf $82,5 \pm 14,6$ % relativer Proliferation im Vergleich zu der Kontrolle. Die jeweiligen Doppelbehandlungen führten zu einer weiteren Verminderung der Proliferationskapazität, verglichen mit den Einzelbehandlungen und die Dreifachbehandlung zeigte die höchste Reduktion der Zahl lebender Zellen mit $27,2 \pm 7,9$ % verbliebener relativer Proliferation. Die anti-proliferativen Effekte der therapeutischen GLI1/2-, FLT3- und PI3K-Inhibierung waren in der FLT3-Wildtyp-Zelllinie OCI-AML5 (Abbildung 15 C) weniger stark ausgeprägt und traten lediglich bei höheren Konzentrationen und zu einem geringeren Ausmaß, verglichen mit den FLT3-mutierten Zelllinien MV4-11 und MOLM-13, auf. Zudem waren, im Gegensatz zu MV4-11 und MOLM 13, nicht alle Unterschiede der miteinander verglichenen Gruppen statistisch signifikant. Bei den Einzelbehandlungen führte nur die Behandlung mit Sunitinib bzw. PF-04691502 zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Zellzahl im Vergleich zu der Lösungsmittelkontrolle. 40 μ M GANT61 reduzierte die relative Proliferation nur minimal auf $96,8 \pm 5,3$ %, 100 nM Sunitinib verminderte die Zahl lebender Zellen auf $86,6 \pm 6,8$ % und die Einzelbehandlung mit 200 nM PF-04691502 führte zu einer Inhibierung auf $80,9 \pm 7,0$ %. Bei den Doppelbehandlungen der OCI-AML5-Zellen hatte lediglich die Kombination von Sunitinib + PF-04691502 einen statistisch signifikanten anti-proliferativen Effekt im Vergleich zu den jeweiligen Einzelbehandlungen. Die Behandlung mit allen drei Inhibitoren führte wiederum zu der

stärksten Reduktion der relativen Proliferation mit $56,9 \pm 6,9$ % lebender Zellen. Der Unterschied der Dreifachbehandlung war im Vergleich zu der GANT61 + Sunitinib- und GANT61 + PF-04691502-Doppelbehandlung statistisch signifikant.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in allen drei untersuchten AML-Zelllinien die Dreifachbehandlung mit GANT61, Sunitinib und PF-04691502 stärkere anti-leukämische Effekte bezüglich der Proliferationskapazität der Zellen hatte als die Behandlung mit zwei und besonders einem der Inhibitoren. In den *FLT3*-mutierten Zelllinien MV4-11 und MOLM-13 waren alle analysierten Unterschiede zwischen der Kontrolle und den Einzelbehandlungen, den Einzelbehandlungen und den jeweiligen Doppelbehandlungen sowie den Doppelbehandlungen und der Dreifachbehandlung statistisch signifikant. In der *FLT3*-Wildtyp-Zelllinie OCI-AML5 waren die Effekte weniger stark ausgeprägt. Zudem erfolgte die Wachstumsinhibierung der MV4-11- und MOLM-13-Zellen bei geringeren Inhibitor-Konzentrationen im Vergleich zu OCI-AML5.

3.2.1.2 Effekt einer kombinierten Behandlung mit GANT61, Sunitinib und PF-04691502 auf die Proliferation von primären AML-Blasten

Der Effekt einer kombinierten Behandlung primärer AML-Blasten aus Patientenmaterial mit dem GLI1/2-Inhibitor GANT61, dem *FLT3*-Inhibitor Sunitinib und dem PI3K-Inhibitor PF-04691502 auf das Zellwachstum sollte untersucht werden.

FLT3-mutierte pAMLs ($n = 5$) sowie *FLT3*-Wildtyp-pAMLs ($n = 12$) wurden in definierter Zelldichte ausgesät und mit den Inhibitoren behandelt (siehe Abschnitt 2.2.1.4.3). Die Stimulation erfolgte mit den Einzelsubstanzen (Einzelbehandlung) und der Kombination aus allen drei Inhibitoren (Dreifachbehandlung) sowie DMSO als Lösungsmittelkontrolle (Kontrolle). Es wurden die mittleren, für MV4-11 eingesetzten, Inhibitor-Konzentrationen gewählt. Nach 3-tägiger Inkubation wurden die Zellzahlen mithilfe des Vi-Cell™ XR ermittelt. In Abbildung 16 sind jeweils 3 repräsentative Proliferations-Assays *FLT3*-mutierter (Abbildung 16 A-C) und *FLT3*-Wildtyp-pAMLs (Abbildung 16 D-F) dargestellt.

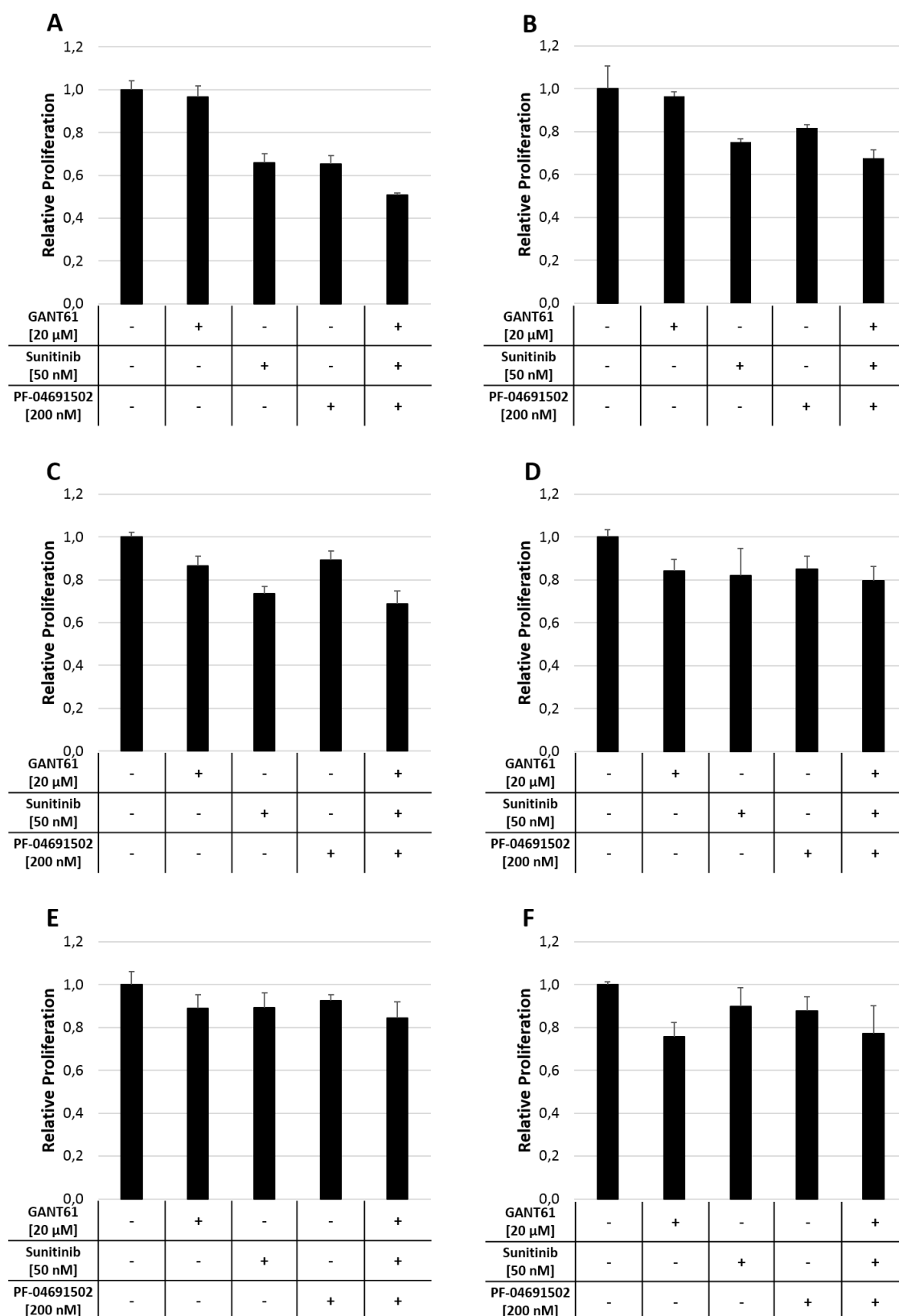


Abbildung 16: Effekt einer kombinierten therapeutischen Inhibierung des Hedgehog- und FLT3/PI3K-Signalwegs auf die Proliferation von primären AML-Blasten. *FLT3*-mutierte (A-C) und *FLT3*-Wildtyp-pAMLs (D-F) wurden in definierter Zelldichte ausgesät und mit den angegebenen Konzentrationen des GLI1/2-Inhibitors GANT61, des FLT3-Inhibitors Sunitinib und des PI3K-Inhibitors PF-04691502 allein und in Kombination aller drei Inhibitoren sowie mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle (Kontrolle) behandelt. Der Effekt auf die Proliferationskapazität nach 3-tägiger Inkubation wurde mithilfe des Vi-Cell™ XR

bestimmt. Dargestellt ist der auf die jeweilige Kontrolle normalisierte Mittelwert $\pm$ Standardabweichung der Triplikate von jeweils drei repräsentativen Assays.

Bei der Beurteilung der anti-proliferativen Effekte der GLI1/2-, FLT3- und PI3K-Inhibierung primärer *FLT3*-mutierter (Abbildung 16 A-C) oder *FLT3*-Wildtyp-Blasten (Abbildung 16 D-F) wurde ein Ansprechen auf die Behandlung bei einer Inhibierung der Proliferation um mindestens 10 % im Vergleich zu der Kontrolle angenommen. Zwar konnte in beiden Gruppen ein vergleichbares grundsätzliches Ansprechen auf mindestens zwei der Einzelsubstanzen beobachtet werden (bei 4 der 5 *FLT3*-mutierten pAMLs, 80 %; bei 9 der 12 *FLT3*-Wildtyp-pAMLs, 75 %), bei allen sensitiven *FLT3*-mutierten Blasten (100 %) konnte jedoch zusätzlich eine – wenn auch in einigen Fällen eher geringe – verstärkte Verminderung der Proliferation durch die kombinierte Behandlung mit GANT61, Sunitinib und PF-04691502 im Vergleich zu den Einzelbehandlungen beobachtet werden. Dies traf lediglich auf 4 der 12 untersuchten *FLT3*-Wildtyp-pAMLs (36 % der sensitiven pAMLs) zu.

Somit konnte die erhöhte Sensitivität *FLT3*-mutierter AML-Zellen bezüglich einer kombinierten Inhibierung des HH- und FLT3/PI3K-Signalwegs in primären AML-Blasten bestätigt werden.

3.2.1.3 Effekt einer kombinierten Behandlung mit GANT61, Sunitinib und PF-04691502 auf die Apoptose-Induktion in AML-Zelllinien

Die Apoptose-Induktion nach einer kombinierten Behandlung der *FLT3*-mutierten AML-Zelllinien MV4-11 und MOLM-13 und der *FLT3*-Wildtyp-Zelllinie OCI-AML5 mit den kleinmolekularen Inhibitoren GANT61, Sunitinib und PF-04691502 wurde untersucht.

Die Zellen wurden in definierter Dichte ausgesät und mit den Inhibitoren behandelt, wobei für OCI-AML5 höhere GANT61- und Sunitinib-Konzentrationen gewählt wurden (siehe Abschnitt 2.2.1.5.2). Die Stimulation erfolgte mit den Einzelsubstanzen (Einzelbehandlung), der Kombination aus jeweils zwei Substanzen (Doppelbehandlung), der Kombination aus allen drei Inhibitoren (Dreifachbehandlung) sowie DMSO als Lösungsmittelkontrolle (Kontrolle). Nach 48-stündiger Inkubation wurde die Induktion

der Apoptose mittels Annexin V/PI-Doppelfärbung am Durchflusszytometer bestimmt. Ein exemplarischer *Dot Plot* für die Zelllinie MV4-11 ist in Abbildung 17 dargestellt. Die Ergebnisse der beiden je Zelllinie durchgeführten Experimente finden sich in Abbildung 18.

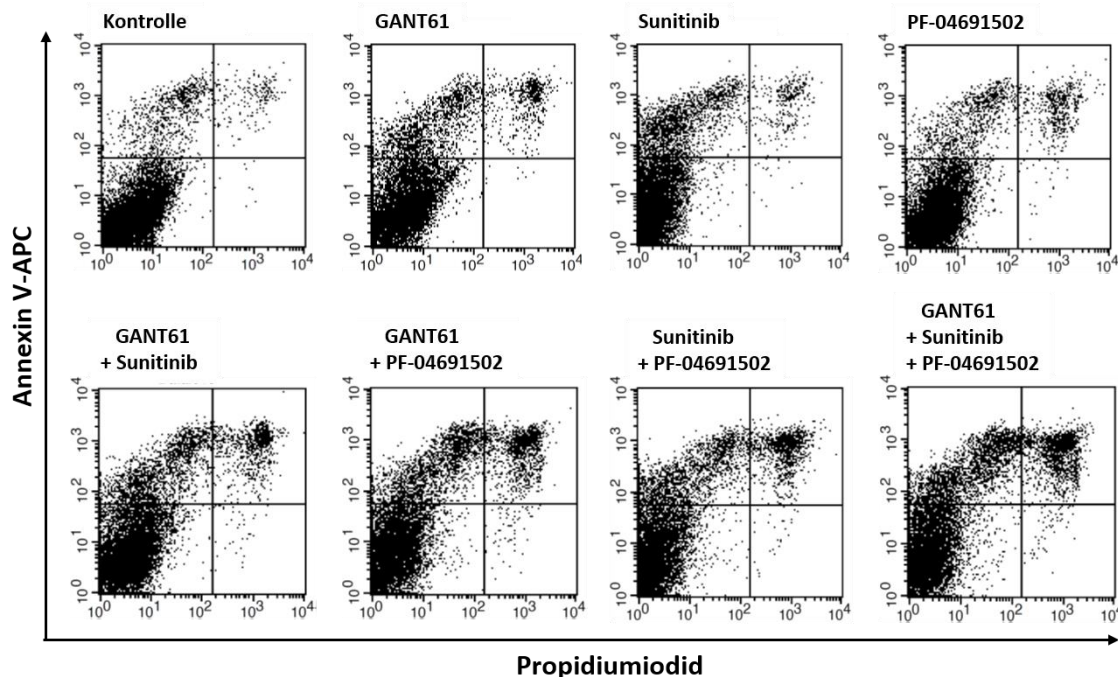


Abbildung 17: Effekt einer kombinierten therapeutischen Inhibierung des Hedgehog- und FLT3/PI3K-Signalwegs auf die Apoptose-Induktion in MV4-11-Zellen. Die *FLT3*-mutierte AML-Zelllinie MV4-11 wurde in definierter Zelldichte ausgesät und mit 20 μ M des GLI1/2-Inhibitors GANT61, 50 nM des FLT3-Inhibitors Sunitinib und 200 nM des PI3K-Inhibitors PF-04691502 allein, in Kombinationen von zwei oder allen drei Inhibitoren sowie DMSO als Lösungsmittelkontrolle (Kontrolle) behandelt und der Effekt auf die Induktion der Apoptose nach 48-stündiger Inkubation mittels Annexin V/PI-Doppelfärbung am Durchflusszytometer bestimmt. Dargestellt ist jeweils ein exemplarischer *Dot Plot* der gemessenen Duplikate.

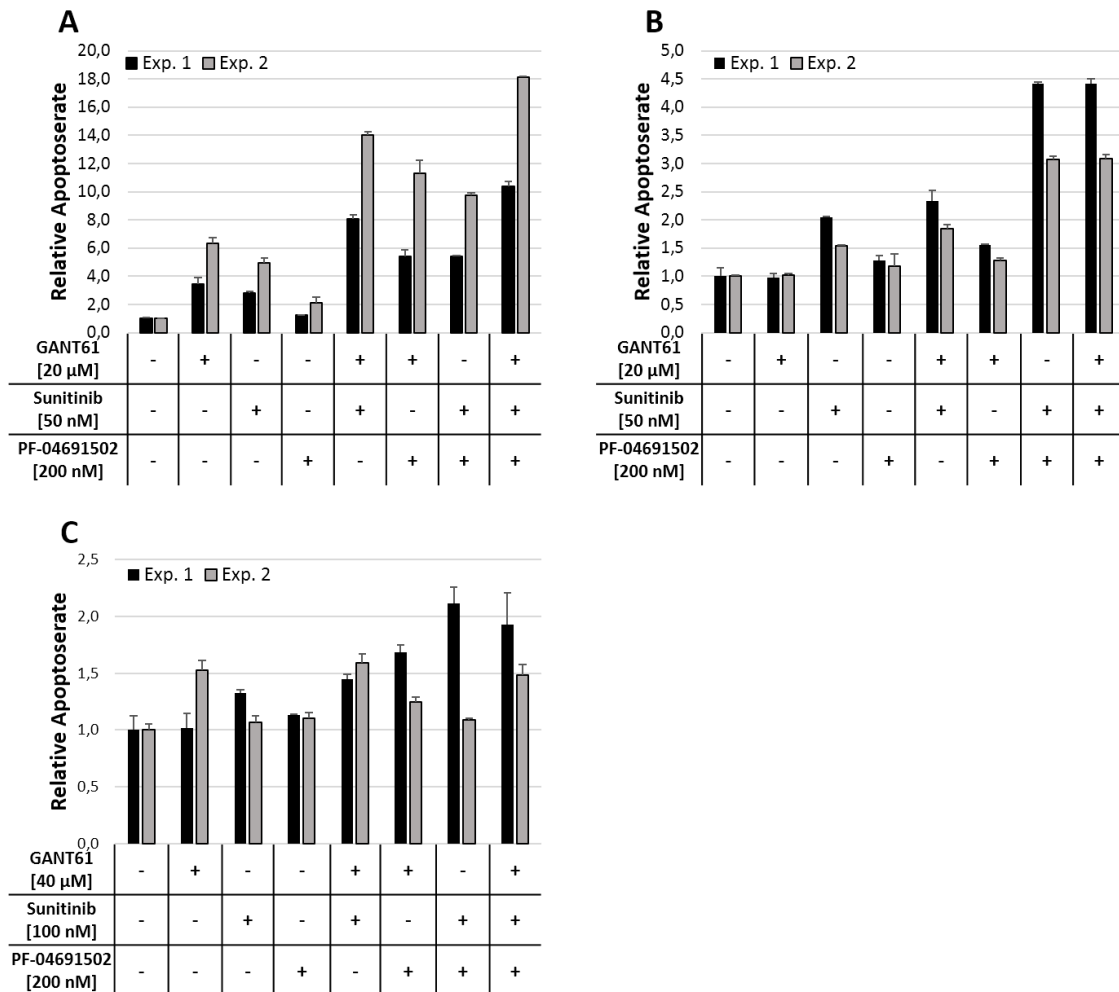


Abbildung 18: Effekt einer kombinierten therapeutischen Inhibierung des Hedgehog- und FLT3/PI3K-Signalwegs auf die Apoptose-Induktion in AML-Zelllinien. Die *FLT3*-mutierten AML-Zelllinien MV4-11 (A) und MOLM-13 (B) sowie die *FLT3*-Wildtyp-Zelllinie OCI-AML5 (C) wurden in definierter Zelldichte ausgesät und mit den angegebenen Konzentrationen des GLI1/2-Inhibitors GANT61, des FLT3-Inhibitors Sunitinib und des PI3K-Inhibitors PF-04691502 allein, in Kombinationen von zwei oder allen drei Inhibitoren sowie DMSO als Lösungsmittelkontrolle (Kontrolle) behandelt und der Effekt auf die Induktion der Apoptose nach 48-stündiger Inkubation mittels Annexin V/PI-Doppelfärbung am Durchflusszytometer bestimmt. Dargestellt ist der auf die jeweilige Kontrolle normalisierte Mittelwert $\pm$ Standardabweichung der relativen Apoptose (Anteil früh- und spätaoptotischer Annexin V⁺ Zellen) beider unabhängiger Experimente je Zelllinie in Duplikaten.

In der Zelllinie MV4-11 (Abbildung 18 A) führte die Einzelbehandlung mit GANT61, Sunitinib oder PF-04691502, im Vergleich zu der Kontrolle, zu einer Induktion der Apoptose. Die jeweilige Doppelbehandlung und besonders die Dreifachbehandlung mit allen drei Substanzen verstärkten diese Effekte noch erheblich, wobei für alle Ansätze die relativen Apoptoseraten im zweiten Experiment größer waren. So führte die Dreifachbehandlung in Experiment 1, verglichen mit der Kontrolle, zu einer $10,4 \pm 0,4$ -fach erhöhten relativen Apoptoserate und in Experiment 2 zu einer $18,1 \pm 0,0$ -fachen

Erhöhung der Apoptose. In der Zelllinie MOLM-13 (Abbildung 18 B) hatten die Behandlungsansätze eine, mit MV4-11 verglichen, weniger stark ausgeprägte Apoptose-Induktion zur Folge. Die Behandlung mit GANT61 führte in beiden Experimenten lediglich in Kombination mit Sunitinib und auch in geringerem Ausmaß mit PF-04691502 zu einer moderaten Erhöhung der Apoptoserate. Die stärksten Effekte erzielte in den MOLM-13-Zellen die Kombination aus Sunitinib + PF-04691502 (Experiment 1: $4,4 \pm 0,0$ relative Apoptoserate, Experiment 2: $3,1 \pm 0,1$ relative Apoptoserate). Die Kombination beider Substanzen mit GANT61 konnte diesen Effekt nicht mehr verstärken. In der Zelllinie OCI-AML5 (Abbildung 18 C) konnte, trotz höherer eingesetzter Inhibitor-Konzentrationen, eine grundsätzlich sehr geringe und in beiden Experimenten nicht reproduzierbare Induktion der Apoptose durch die Inhibitor-Behandlungen beobachtet werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass besonders in der *FLT3*-mutierten Zelllinie MV4-11 durch die kombinierte Behandlung des Hedgehog- und *FLT3*/PI3K-Signalwegs die Apoptose-Induktion verstärkt werden konnte. Dies traf für die *FLT3*-mutierte Zelllinie MOLM-13 nur in geringerem Maß zu, während in der *FLT3*-Wildtyp-Zelllinie OCI-AML5 keine nennenswerte Apoptose durch die Behandlung mit den kleinmolekularen Inhibitoren beobachtet werden konnte.

3.2.1.4 Effekt einer kombinierten Behandlung mit GANT61, Sunitinib und PF-04691502 auf die Koloniebildung von AML-Zelllinien und CD34⁺ Zellen

Es sollte untersucht werden, welchen Einfluss eine kombinierte Behandlung mit den kleinmolekularen Inhibitoren GANT61, Sunitinib und PF-04691502 auf die Koloniebildung der *FLT3*-mutierten AML-Zelllinien MV4-11 und MOLM-13 und der *FLT3*-Wildtyp-Zelllinie OCI-AML5 hat. Als Kontrolle wurde zusätzlich untersucht, welchen Effekt die kombinierte Inhibierung des Hedgehog- und *FLT3*/PI3K-Signalwegs auf die Koloniebildung von CD34⁺ Stamm- und Vorläuferzellen gesunder Spender hat.

Die Zellen wurden in definierter Dichte in semisolidem Methylzellulose-basiertem Medium ausgesät. Für die CD34⁺ Zellen, deren Reinheitsgrad zuvor

durchflusszytometrisch bestimmt wurde (siehe Abschnitt 2.2.1.3.1) und sich auf 93-97 % CD34⁺ Zellen belief, wurde ein Medium mit humanspezifischen Wachstumsfaktorzusätzen verwendet (siehe Abschnitt 2.2.1.6.2). Die Zellen wurden mit 10 μ M GANT61, 25 nM Sunitinib und 500 nM PF-04691502 behandelt. Die Stimulation erfolgte mit den Einzelsubstanzen (Einzelbehandlung), der Kombination aus jeweils zwei Substanzen (Doppelbehandlung), der Kombination aus allen drei Substanzen (Dreifachbehandlung) sowie DMSO als Lösungsmittelkontrolle (Kontrolle). Nach mehrtätiger Inkubation wurden die Kolonien am Umkehrmikroskop ausgezählt. Das Ergebnis der *Colony Formation*-Assays findet sich in Abbildung 19.

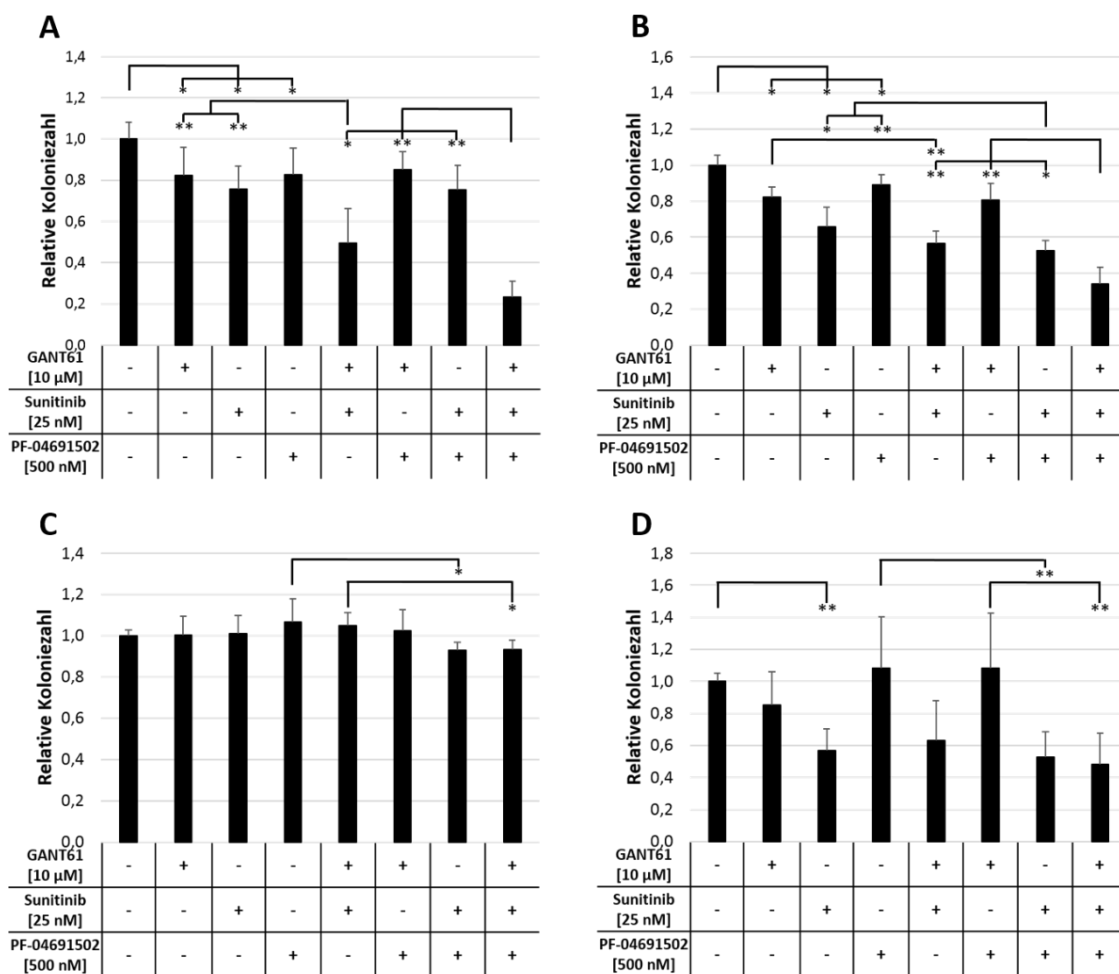


Abbildung 19: Effekt einer kombinierten therapeutischen Inhibierung des Hedgehog- und FLT3/PI3K-Signalwegs auf die Koloniebildung von AML-Zelllinien und CD34⁺ hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen. Die FLT3-mutierten AML-Zelllinien MV4-11 (A) und MOLM-13 (B), die FLT3-Wildtyp-Zelllinie OCI-AML5 (C) sowie CD34⁺ hämatopoetische Stamm und Vorläuferzellen gesunder Spender (D) wurden in definierter Zelldichte in semisolidem Medium ausgesät und mit den angegebenen Konzentrationen des GLI1/2-Inhibitors GANT61, des FLT3-Inhibitors Sunitinib und des PI3K-Inhibitors PF-04691502 allein (Einzelbehandlung), in Kombinationen von zwei (Doppelbehandlung) oder allen drei Inhibitoren (Dreifachbehandlung) sowie DMSO als Lösungsmittelkontrolle (Kontrolle) behandelt und der

Effekt auf die *Colony Formation*-Kapazität analysiert. Nach 5-6 Tagen (AML-Zelllinien) bzw. 10-11 Tagen (CD34⁺ Zellen) wurden die Kolonien mithilfe eines Rasters am Umkehrmikroskop ausgezählt. Dargestellt ist der auf die jeweilige Kontrolle normalisierte Mittelwert $\pm$ Standardabweichung der relativen Koloniezahl aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten in Triplikaten. Es wurde eine statistische Analyse der Unterschiede zwischen der Kontrolle und den Einzelbehandlungen, den Einzelbehandlungen und den jeweiligen Doppelbehandlungen sowie den Doppelbehandlungen und der Dreifachbehandlung vorgenommen. Es gilt * $P \leq 0.05$ und ** $P \leq 0.001$ im Welch-Test.

In den MV4-11-Zellen (Abbildung 19 A) führte die Einzelbehandlung mit allen drei Inhibitoren zu einer, im Vergleich zu der Kontrolle, statistisch signifikant verringerten Koloniebildung. Die GANT61-Behandlung verringerte die relative Koloniezahl auf $82,5 \pm 13,5 \%$, Sunitinib reduzierte die Anzahl der Kolonien auf $75,6 \pm 11,4 \%$ und PF-04691502 verminderte die Koloniebildung auf $82,7 \pm 12,9 \%$, verglichen mit der Kontrolle. Bei den Doppelbehandlungen hatte die Kombination aus GANT61 + Sunitinib eine signifikante Verringerung der Koloniezahl im Vergleich zu der jeweiligen Einzelbehandlung zur Folge ($49,4 \pm 17,0 \%$ verbliebene relative Koloniezahl). Den stärksten Effekt auf die *Colony Formation*-Kapazität der MV4-11-Zellen hatte die Dreifachbehandlung mit einer verbliebenen Koloniezahl von $23,4 \pm 7,5 \%$, wobei alle Unterschiede zwischen der Dreifachbehandlung und den Doppelbehandlungen statistisch signifikant waren. In den MOLM-13-Zellen (Abbildung 19 B) führte die Einzelbehandlung mit GANT61, Sunitinib oder PF-04691502 zu einer, verglichen mit der Kontrolle, signifikanten Verringerung der Koloniezahl auf $82,7 \pm 5,8 \%$, $65,9 \pm 10,7 \%$ bzw. $88,9 \pm 5,6 \%$. Die Doppelbehandlung der Zellen mit Sunitinib + PF-04691502 hatte eine signifikante Verringerung der Koloniebildung im Vergleich zu den jeweiligen Einzelbehandlungen zur Folge. Die Dreifachbehandlung bewirkte die stärksten anti-leukämischen Effekte und reduzierte die Koloniezahl der MOLM-13-Zellen auf $34,1 \pm 9,3 \%$. In der *FLT3*-Wildtyp-Zelllinie OCI-AML5 (Abbildung 19 C) hatten alle Behandlungsansätze lediglich minimale Effekte auf die Koloniebildung. So wurde die maximale Reduktion der Koloniezahl auf $92,9 \pm 3,8 \%$ durch die Sunitinib + PF-04691502-Behandlung erreicht, die Dreifachbehandlung verstärkte den anti-leukämischen Effekt nicht ($93,3 \pm 4,5 \%$ relative Koloniezahl). In den CD34⁺ Zellen hatten weder die Einzelbehandlungen mit GANT61 oder PF-04691502, noch deren Kombination einen signifikanten Effekt auf die Koloniebildung. Die Einzelbehandlung mit Sunitinib hingegen reduzierte die Koloniezahl statistisch signifikant auf $56,8 \pm 13,5 \%$,

verglichen mit der Kontrolle. Interessanterweise konnte keine weitere wesentliche Reduktion der Koloniezahl durch die Kombination von Sunitinib mit GANT61 oder PF-04691502 beobachtet werden.

Zusammengenommen lässt sich sagen, dass in den *FLT3*-mutierten AML-Zelllinien MV4-11 und MOLM-13 die stärkste Inhibierung der Koloniebildung durch die kombinierte Behandlung mit den GIL1/2-, *FLT3*- und PI3K-Inhibitoren erzielt wurde. Die *Colony Formation*-Kapazität der *FLT3*-Wildtyp-Zelllinie OCI-AML5 wurde durch die Behandlung nicht beeinflusst. In den CD34⁺ hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen gesunder Spender hatte lediglich die Sunitinib-Behandlung einen deutlichen Effekt auf die Koloniebildung, der Zusatz von GANT61 oder PF-04691502 hatte keinen verstärkten inhibitorischen Effekt zur Folge.

3.2.2 Effekt einer kombinierten Behandlung mit GANT61, Sunitinib und PF-04691502 auf die Progression einer humanen *FLT3*-mutierten AML im Mausmodell

Um die beobachteten anti-leukämischen *in vitro*-Effekte im Mausmodell zu verifizieren, sollte das therapeutische Potenzial der kombinierten Behandlung mit den kleinmolekularen Inhibitoren GANT61, Sunitinib und PF-04691502 auf die Progression der *FLT3*-mutierten AML-Zelllinie MV4-11 in Mäusen analysiert werden.

Es wurden je 1×10^5 MV4-11-Zellen in die Schwanzvene von 5-7 NSG™-Mäusen pro Gruppe injiziert. Die Therapiegabe wurde einen Tag nach der Transplantation der MV4-11-Zellen begonnen und es ergaben sich folgende Behandlungsgruppen:

1. Lösungsmittelkontrolle bzw. Kontrolle
2. GANT61 (50 mg/kg Körpergewicht)
3. Sunitinib (10 mg/kg Körpergewicht)
4. PF-04691502 (2,5 mg/kg Körpergewicht)
5. GANT61 (50 mg/kg Körpergewicht) + Sunitinib (10 mg/kg Körpergewicht)
+ PF-04691502 (2,5 mg/kg Körpergewicht) bzw. Kombination

Das Überleben der Tiere wurde parallel zu der täglichen Behandlung überwacht und analysiert (siehe Abschnitt 2.2.5.4). Bei Krankheitsanzeichen wurden die Tiere aus dem Experiment genommen und die leukämische Infiltration humaner Blasten in das periphere Blut, das Knochenmark und die Milz der Mäuse mittels Durchflusszytometrie bestätigt, wobei der Grad der Infiltration nicht mit dem Zeitpunkt des Exitus korrelierte (Daten nicht gezeigt) (siehe Abschnitt 2.2.5.2.2 und 2.2.1.3.1). Es stand, wie in den vorangegangenen *in vivo*-Experimenten, das Überleben der Tiere im Vordergrund, die durchflusszytometrische Analyse diente lediglich der Bestätigung des leukämischen Phänotyps zum Zeitpunkt des Exitus. Das Überleben der Mäuse über die Zeit ist in einer Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abbildung 20 dargestellt.

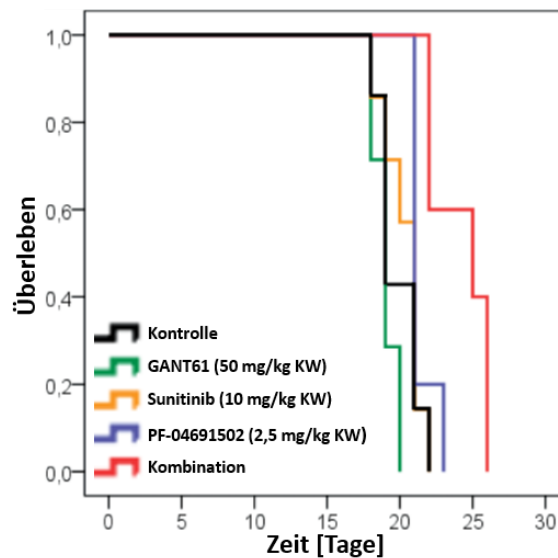


Abbildung 20: Kaplan-Meier-Überlebenskurve für die Therapie einer *FLT3*-mutierten AML mit *GLI1/2*-, *FLT3*- und *PI3K*-Inhibitoren in *NSG*[™]-Mäusen. Jeweils 5-7 *NSG*[™]-Mäusen pro Gruppe wurden je 1×10^5 MV4-11-Zellen transplantiert und die Tiere täglich mit GANT61 (50 mg/kg KW, n = 7, grüne Linie) Sunitinib (10 mg/kg KW, n = 7, orange Linie) oder PF-04691502 (2,5 mg/kg KW, n = 5, blaue Linie) in Einzelbehandlung sowie der Kombination aller drei Substanzen (Kombination, n = 7, rote Linie) oder der Lösungsmittelkontrolle (Kontrolle, n = 7, schwarze Linie) behandelt. Die Progression der AML wurde überwacht und das Überleben der Mäuse mittels Kaplan-Meier-Schätzung und Log-Rank-Test analysiert. Signifikanz wurde bei $P \leq 0.05$ angenommen. KW: Körpergewicht.

Die mit MV4-11 transplantierten *NSG*[™]-Mäuse, die die Kombinationstherapie mit allen drei Inhibitoren erhielten (Abbildung 20, rote Linie), überlebten durchschnittlich $24,2 \pm 2,0$ Tage, während die Kontrollgruppe (Abbildung 20, schwarze Linie) durchschnittlich $19,9 \pm 1,5$ Tage überlebte. Dieser Unterschied im Überleben war statistisch signifikant ($P = 0.004$). Die mit GANT61 (Abbildung 20, grüne Linie), Sunitinib

(Abbildung 20, orange Linie) oder PF-04691502 (Abbildung 20, blaue Linie) behandelten Mäuse überlebten durchschnittlich $19,0 \pm 0,8$ Tage, $20,3 \pm 1,4$ Tage bzw. $21,4 \pm 0,9$ Tage. Die Einzelbehandlungen erbrachten keinen Überlebensvorteil im Vergleich zu der Kontrollgruppe, jedoch war der Unterschied im Überleben zwischen der Kombinationsgruppe und allen drei Einzelbehandlungen statistisch signifikant ($P = 0.001$ für GANT61, $P = 0.004$ für Sunitinib und $P = 0.020$ für PF-04691502).

Somit führte die Dreifachbehandlung mit dem GLI1/2-, FLT3- und PI3K-Inhibitor zu einem signifikant verlängerten Überleben der MV4-11-transplantierten NSG™-Mäuse im Vergleich zu der Kontrollgruppe und auch zu den Einzelbehandlungen.

3.2.3 Effekt einer kombinierten Behandlung mit GANT61, Sunitinib und PF-04691502 auf die GLI1/2-Promotor-Aktivität von GLI1/2-Reporter-AML-Zelllinien

Um zu untersuchen, ob die beobachteten anti-leukämischen *in vitro*-Effekte durch die Behandlung der AML-Zelllinien mit den GLI1/2-, FLT3- und PI3K-Inhibitoren durch die Inhibierung der GLI-Kaskade vermittelt sind, sollte der Effekt der kombinierten Behandlung mit GANT61, Sunitinib und PF-04691502 auf die GLI1/2-Promotor-Aktivität der Zelllinien untersucht werden. Die Arbeiten wurden in Kooperation mit Mitgliedern der Arbeitsgruppe Akute Leukämien (Fiedler/Wellbrock) durchgeführt.

Es wurden stabile GLI1/2-Reporter-AML-Zelllinien durch lentivirale Transduktion mit Viruspartikeln, welche das *Firefly*-Luciferase-Gen unter der Kontrolle von GLI1/2-Transkriptions-Reponse-Elementen und als eine interne Kontrolle das *Renilla*-Luciferase-Gen unter der Kontrolle von CMV-Promotor-Elementen enthielten, hergestellt (siehe Abschnitt 2.2.1.7.1). Diese GLI1/2-Reporter-Zelllinien erlaubten die direkte Überwachung der GLI1/2-Promotor-Aktivität. Die *FLT3*-mutierten GLI1/2-Reporter-AML-Zelllinien MV4-11 und MOLM-13 sowie die *FLT3*-Wildtyp-GLI1/2-Reporter-AML-Zelllinien OCI-AML3, OCI-AML5, IMS-M2 und HL60 wurden in definierter Zelldichte ausgesät und mit $2,5 \mu\text{M}$ GANT61, 100 nM Sunitinib oder 100 nM PF-04691502, der Kombination aus allen drei Substanzen (Dreifachbehandlung) sowie DMSO als Lösungsmittelkontrolle (Kontrolle) behandelt (siehe Abschnitt 2.2.1.7.2). Nach

24-stündiger Inkubation wurden die *Firefly*-Luciferase-vermittelte GLI1/2-Promotor-Aktivität und die *Renilla*-Luciferase-vermittelte CMV-Promotor-Aktivität als interne Normalisierungskontrolle mithilfe eines Mikroplatten-Lesers gemessen. Das Ergebnis der GLI1/2-Promotor-Assays aller untersuchten Zelllinien findet sich in Abbildung 21. Zur besseren Vergleichbarkeit werden hier auch die statistisch nicht signifikanten Unterschiede (*ns*) im Welch-Test angegeben.

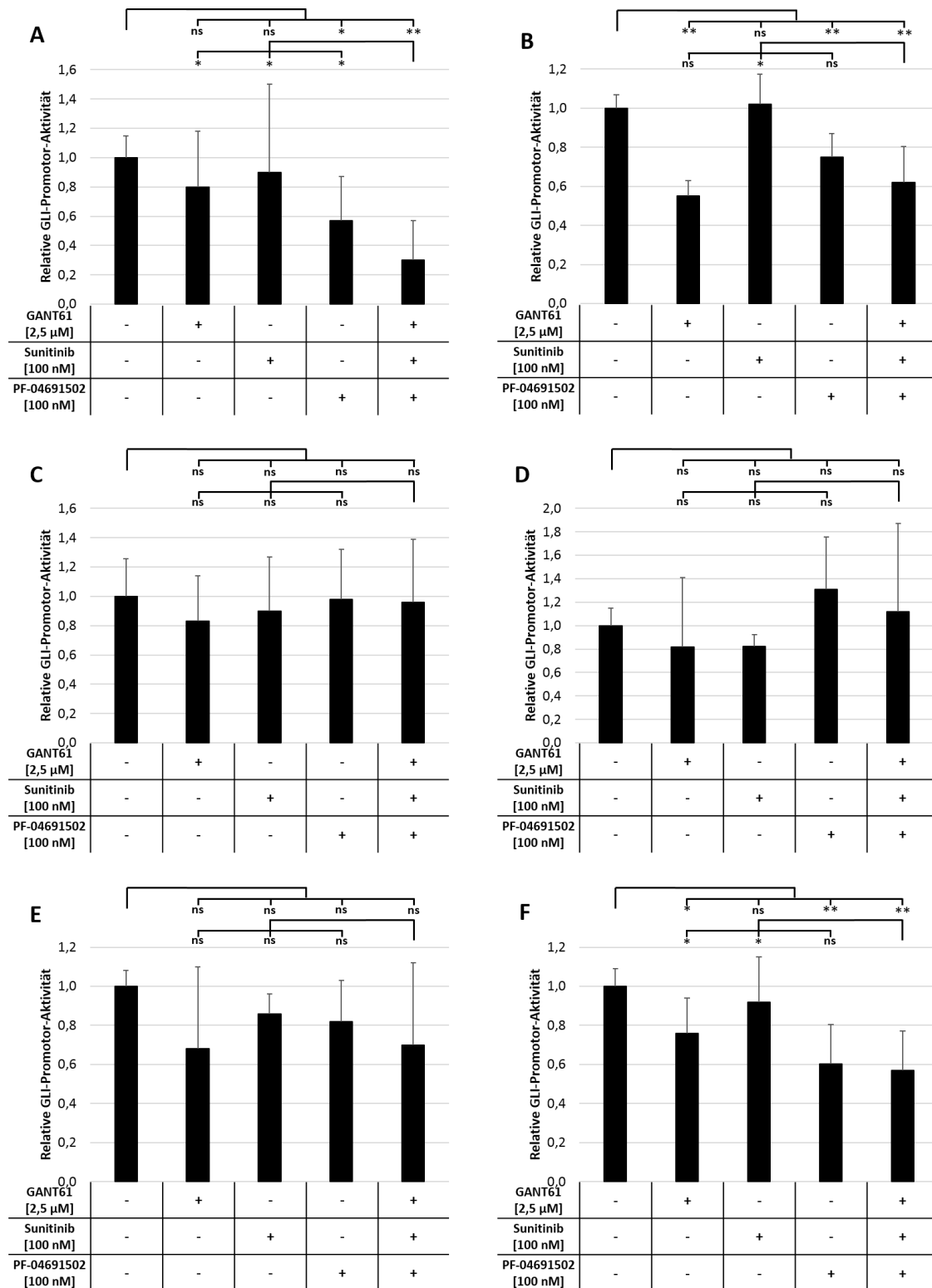


Abbildung 21: Effekt einer kombinierten therapeutischen Inhibierung des Hedgehog- und FLT3/PI3K-Signalwegs auf die GLI1/2-Promotor-Aktivität von GLI1/2-Reporter-AML-Zelllinien. Die stabilen GLI1/2-Reporter-AML-Zelllinien MV4-11 (A), MOLM-13 (B), OCI-AML3 (C), OCI-AML5 (D), IMS-M2 (E) und HL60 (F) wurden in definierter Zelldichte ausgesät und mit 2,5 µM GANT61, 100 nM Sunitinib oder 100 nM PF-04691502, der Kombination aus allen drei Substanzen (Dreifachbehandlung) sowie DMSO als Lösungsmittelkontrolle (Kontrolle) behandelt. Nach 24-stündiger Inkubation wurde die GLI1/2-Promotor-Aktivität mithilfe eines Mikroplatten-Lesers gemessen. Die *Firefly*-Luciferase-vermittelte GLI1/2-Promotor-Aktivität wurde auf die *Renilla*-Luciferase-vermittelte CMV-Promotor-Aktivität normalisiert.

Dargestellt sind die auf die jeweilige Kontrolle normalisierten Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten in Triplikaten. Es wurde eine statistische Analyse der Unterschiede zwischen der Kontrolle und den Einzelbehandlungen sowie der Dreifachbehandlung und zwischen den Einzelbehandlungen und der Dreifachbehandlung vorgenommen. Es gilt *ns* (nicht signifikant) bei $P \geq 0.05$, * $P \leq 0.05$ und ** $P \leq 0.001$ im Welch-Test.

Die tendenziell stärksten Effekte auf den GLI1/2-Promotor konnten in den *FLT3*-mutierten Zelllinien MV4-11 (Abbildung 21 A) und MOLM-13 (Abbildung 21 B) beobachtet werden und die kombinierte Behandlung mit GANT61, Sunitinib und PF-04691502 führte in beiden Zelllinien zu einer statistisch signifikanten Verringerung der Promotor-Aktivität im Vergleich zu der Kontrolle ($31,0 \pm 27,0$ % relative GLI1/2-Promotor-Aktivität für MV4-11 und $62,0 \pm 18,5$ % relative GLI1/2-Promotor-Aktivität für MOLM-13). In den MV4-11-Zellen war diese Reduktion ebenfalls statistisch signifikant verglichen mit den Einzelbehandlungen ($80,4 \pm 38,0$ % für GANT61, $90,3 \pm 60,4$ % für Sunitinib und $57,1 \pm 30,2$ % für PF-04691502), in den MOLM-13-Zellen konnte die Dreifachbehandlung den Effekt von GANT61 ($55,0 \pm 8,0$ %) auf die GLI1/2-Promotor-Aktivität nicht mehr verstärken. In den *FLT3*-Wildtyp-Zelllinien OCI-AML3, OCI-AML5 und IMS-M2 führten weder die Einzelbehandlungen noch die Dreifachbehandlung zu einer signifikant verringerten GLI1/2-Promotor-Aktivität (Abbildung 21 C-E). Der GLI1/2-Promotor der *FLT3*-Wildtyp-Zelllinie HL60 zeigte sich sensitiv bezüglich der Behandlung mit GANT61 oder PF-04691502 (Abbildung 21 F). Durch die Einzelbehandlung mit GANT61 wurde die GLI1/2-Promotor-Aktivität statistisch signifikant auf $76,0 \pm 18,1$ % vermindert und die Einzelbehandlung mit PF-04691502 reduzierte die Promotor-Aktivität, verglichen mit der Kontrolle, statistisch signifikant auf $60,3 \pm 20,3$ %. Dieser starke Effekt des PI3K-Inhibitors konnte durch die Dreifachbehandlung ($57,0 \pm 20,0$ %) nicht wesentlich verstärkt werden.

Insgesamt konnte für die *FLT3*-mutierten AML-Zelllinien MV4-11 und MOLM-13 eine, verglichen mit der Kontrolle, verstärkte Blockade der GLI1/2-Promotor-Aktivität durch die kombinierte Inhibierung des HH- und *FLT3*/PI3K-Signalwegs beobachtet werden. Mit Ausnahme der AML-Zelllinie HL60 zeigten die *FLT3*-Wildtyp-Zelllinien keine reduzierte GLI1/2-Promotor-Aktivität durch die Inhibitor-Behandlungen.

3.3 Analyse einer nicht-kanonischen Hedgehog-Signalweg-Aktivierung in AML-Zelllinien

3.3.1 Dosisabhängiger Effekt einer Behandlung mit GANT61 oder Cyclopamin auf die GLI1/2-Promotor-Aktivität von GLI1/2-Reporter-AML-Zelllinien

Es sollte untersucht werden, ob in der AML kanonische oder nicht-kanonische HH-Signalweiterleitung überwiegt. Hierzu wurde der Effekt einer Behandlung mit dem direkten GLI1- und GLI2-Inhibitor GANT61 im Vergleich zu einer Behandlung mit dem SMO-Inhibitor Cyclopamin auf die GLI1/2-Promotor-Aktivität der AML-Zelllinien analysiert (2.2.1.7.2). Die Arbeiten wurden in Kooperation mit Mitgliedern der Arbeitsgruppe Akute Leukämien (Fiedler/Wellbrock) durchgeführt.

Die stabilen GLI1/2-Reporter-AML-Zelllinien MV4-11, MOLM-13, OCI-AML3, OCI-AML5, IMS-M2 und HL60 wurden in definierter Zelldichte ausplattiert und mit GANT61 in aufsteigenden Konzentrationen (5 μ M, 10 μ M, 25 μ M und 50 μ M) bzw. Cyclopamin in aufsteigenden Konzentrationen (0,1 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M und 5 μ M) sowie dem Lösungsmittel als Kontrolle behandelt. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die *Firefly*-Luciferase-vermittelte GLI1/2-Promotor-Aktivität und die *Renilla*-Luciferase-vermittelte CMV-Promotor-Aktivität als interne Normalisierungskontrolle mithilfe eines Mikroplatten-Lesers gemessen. Das Ergebnis der GLI1/2-Promotor-Assays nach GANT61- bzw. Cyclopamin-Behandlung ist in Abbildung 22 bzw. Abbildung 23 dargestellt.

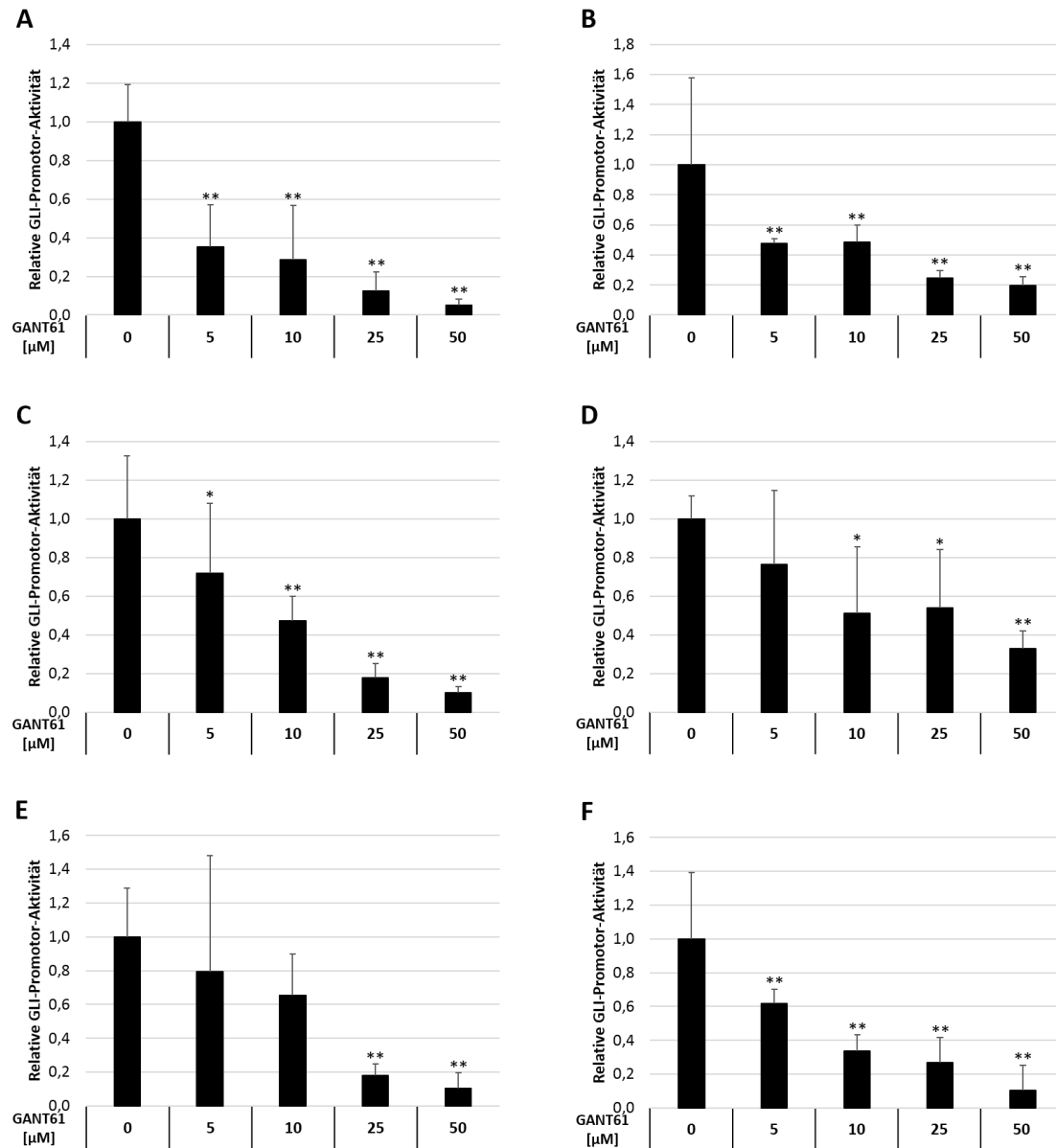


Abbildung 22: Dosisabhängiger Effekt einer therapeutischen Inhibierung von GLI1 und GLI2 auf die GLI1/2-Promotor-Aktivität von GLI1/2-Reporter-AML-Zelllinien. Die stabilen GLI1/2-Reporter-AML-Zelllinien MV4-11 (A), MOLM-13 (B), OCI-AML3 (C), OCI-AML5 (D), IMS-M2 (E) und HL60 (F) wurden in definierter Zelldichte ausgesät und mit dem GLI1- und GLI2-Inhibitor GANT61 in steigenden Konzentrationen sowie dem Lösungsmittel zur Kontrolle behandelt. Nach 24-stündiger Inkubation wurde die GLI1/2-Promotor-Aktivität mithilfe eines Mikroplatten-Lesers gemessen. Die *Firefly*-Luciferase-vermittelte GLI1/2-Promotor-Aktivität wurde auf die *Renilla*-Luciferase-vermittelte CMV-Promotor-Aktivität normalisiert. Dargestellt sind die auf die jeweilige Kontrolle normalisierten Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten in Triplikaten. Es wurde eine statistische Analyse der Unterschiede zwischen der Kontrolle und den verschiedenen GANT61-Konzentrationen vorgenommen. Es gilt * $P \leq 0.05$ und ** $P \leq 0.001$ im Welch-Test.

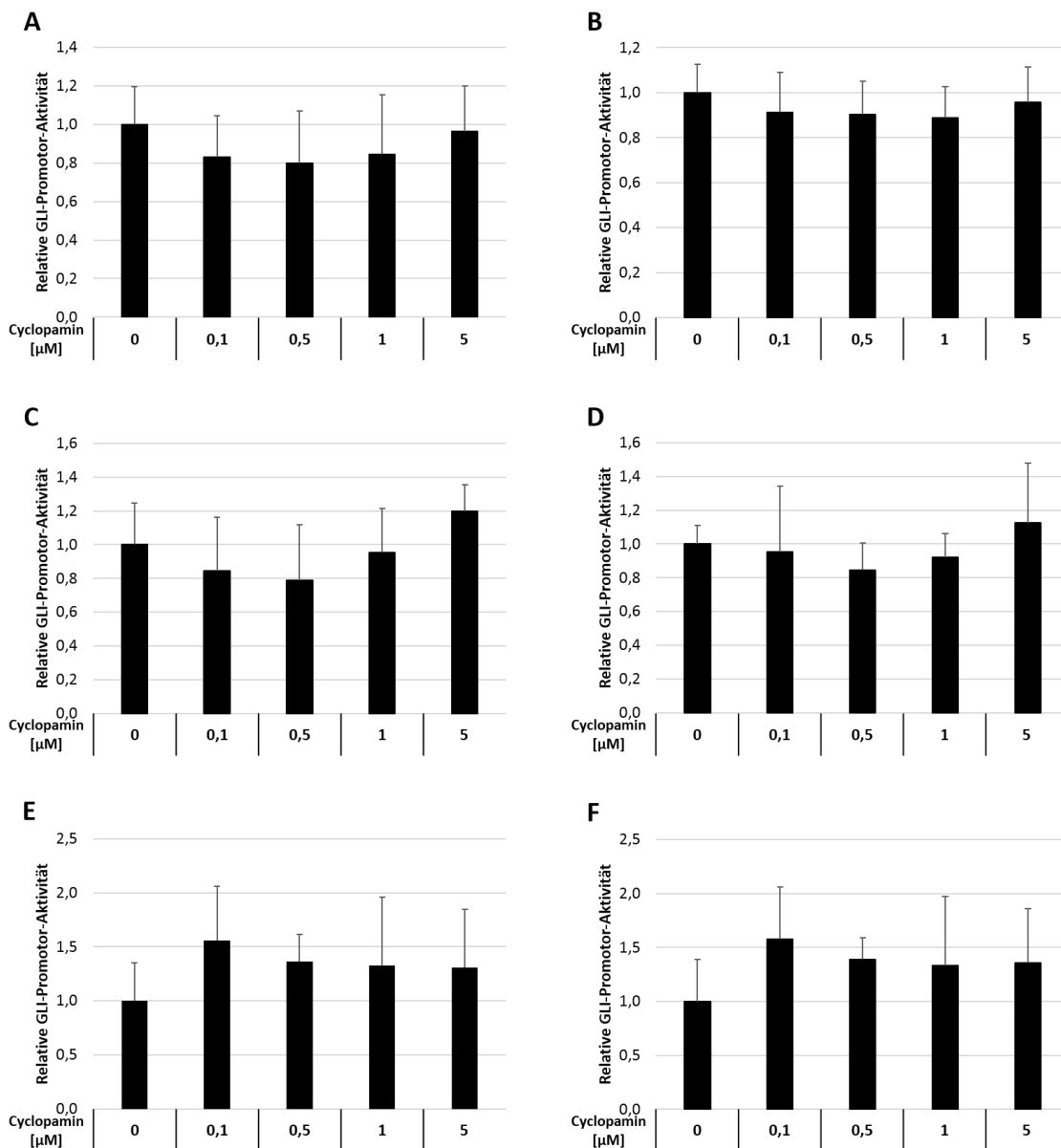


Abbildung 23: Dosisabhängiger Effekt einer therapeutischen Inhibierung von SMO auf die GLI1/2-Promotor-Aktivität von GLI1/2-Reporter-AML-Zelllinien. Die stabilen GLI1/2-Reporter-AML-Zelllinien MV4-11 (A), MOLM-13 (B), OCI-AML3 (C), OCI-AML5 (D), IMS-M2 (E) und HL60 (F) wurden in definierter Zelldichte ausgesät und mit dem SMO-Inhibitor Cyclopamin in steigenden Konzentrationen sowie dem Lösungsmittel zur Kontrolle behandelt. Nach 24-stündiger Inkubation wurde die GLI1/2-Promotor-Aktivität mithilfe eines Mikroplatten-Lesers gemessen. Die *Firefly*-Luciferase-vermittelte GLI1/2-Promotor-Aktivität wurde auf die *Renilla*-Luciferase-vermittelte CMV-Promotor-Aktivität normalisiert. Dargestellt sind die auf die jeweilige Kontrolle normalisierten Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten in Triplikaten.

In allen getesteten GLI1/2-Reporter-AML-Zelllinien führte die GANT61-Behandlung zu einer, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, dosisabhängigen Reduktion der GLI1/2-Promotor-Aktivität mit zumeist statistisch signifikanten Unterschieden im Vergleich zu der Kontrolle (Abbildung 22). Besonders die *FLT3*-mutierten AML-Zelllinien MV4-11

(Abbildung 22 A) und MOLM-13 (Abbildung 22 B) sowie die Zelllinie HL60 (Abbildung 22 F) zeigten auch schon bei niedrigen GANT61-Konzentrationen eine starke Blockade der GLI-Promotor-Aktivität.

Überraschenderweise führte die Behandlung mit dem SMO-Inhibitor Cyclopamin, welcher den kanonischen HH-Signalweg blockiert, in keiner der GLI1/2-Reporter-AML-Zelllinien zu einer Reduktion der GLI1/2-Promotor-Aktivität (Abbildung 23).

In den untersuchten AML-Zelllinien scheint demnach eine nicht-kanonische HH-Signalweg-Aktivierung vorzuherrschen.

3.3.2 Analyse der GLI1-Proteinexpression nach FLT3-Inhibierung in AML-Zelllinien

Abschließend sollte analysiert werden, welchen Effekt eine FLT3-Inhibierung in der AML auf die Proteinexpression von Zielstrukturen des HH-Signalwegs hat. Als direkter Marker eines aktiven HH-Signalwegs sollte die Proteinexpression von GLI1 nach Sunitinib-Behandlung untersucht werden.

Die *FLT3*-mutierten AML-Zelllinien MV4-11 und MOLM-13 sowie die *FLT3*-Wildtyp-Zelllinie OCI-AML5 wurden in definierter Zelldichte ausgesät und mit dem FLT3-Inhibitor Sunitinib bzw. GANT61 als Kontrolle für eine spezifische GLI1/2-Inhibierung sowie DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt (siehe Abschnitt 2.2.4.1). Nach 3-tägiger Inkubation wurden die Proteine aus den Zellen isoliert und mittels Western Blot-Verfahrens die GLI1-Proteinexpression analysiert. Als interne Ladekontrolle wurde für jede Probe die Proteinexpression des Haushaltgens β -Actin bestimmt. Das Ergebnis eines repräsentativen Western Blots ist in Abbildung 24 dargestellt.

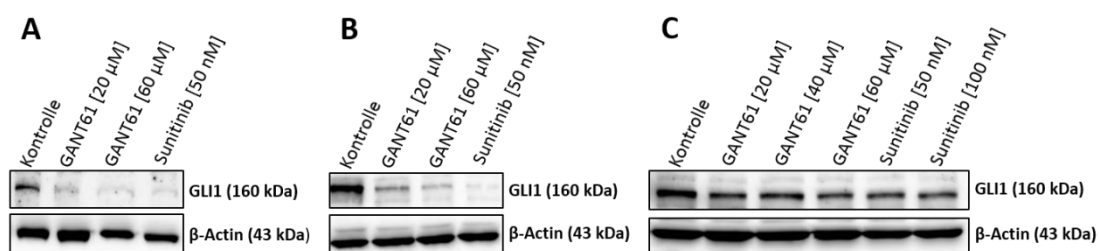


Abbildung 24: GLI1-Proteinexpression nach therapeutischer GLI1/2- und FLT3-Inhibierung in AML-Zelllinien. Die *FLT3*-mutierten AML-Zelllinien MV4-11 (A) und MOLM-13 (B) sowie die *FLT3*-Wildtyp-

Zelllinie OCI-AML5 (C) wurden in definierter Zelldichte ausgesät und mit den angegebenen Konzentrationen des GLI1/2-Inhibitors GANT61 und des FLT3-Inhibitors Sunitinib sowie DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt und der Effekt auf die GLI1-Proteinexpression nach 3-tägiger Inkubation mittels Western Blot-Verfahrens analysiert. Als Ladekontrolle wurde für jede Probe die Proteinexpression des Haushaltsgens β -Actin bestimmt. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot von zwei unabhängigen Experimenten.

In den *FLT3*-mutierten Zelllinien MV4-11 und MOLM-13 führte die Behandlung mit Sunitinib zu einer, verglichen mit der Kontrolle, stark verringerten GLI1-Proteinexpression (Abbildung 24 A und B). Die Behandlung mit GANT61 reduzierte in beiden Zelllinien ebenfalls in starkem Maße die GLI1-Proteinexpression und bestätigte so die spezifische GLI1-Inhibierung. Bei MOLM-13 konnte für die GANT61-Konzentrationen 20 μ M und 60 μ M ein dosisabhängiger Effekt beobachtet werden, während sich bei MV4-11 die Inhibierung der GLI1-Proteinexpression für die getesteten Konzentrationen gleichförmig stark zeigte. In der *FLT3*-Wildtyp-Zelllinie OCI-AML5 (Abbildung 24 C) führte die Behandlung mit Sunitinib bzw. GANT61 zu einer dosisunabhängigen moderaten Verminderung der GLI1-Proteinexpression, welche im Vergleich zu den *FLT3*-mutierten AML-Zelllinien weniger stark ausgeprägt war.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in allen drei Zelllinien eine Verbindung zwischen der FLT3-Inhibierung und einer verminderten GLI1-Proteinexpression, als Marker eines aktiven HH-Signalwegs, nachgewiesen werden konnte. Diese Effekte waren in den *FLT3*-mutierten AML-Zelllinien stärker ausgeprägt als in der *FLT3*-Wildtyp-Zelllinie. Eine nicht-kanonische HH-Signalweg-Aktivierung über die FLT3-Achse konnte demnach auf Proteinebene angezeigt werden.

IV Diskussion

Die Standardtherapie der AML hat sich in den vergangenen Jahrzehnten nicht maßgeblich verändert, sodass die AML nach wie vor mit einer schlechten Prognose für den Patienten einhergeht und neue Therapieansätze dringend erforderlich sind. Hierbei scheint es unerlässlich, neben der breiten Masse der leukämischen Blasten auch die therapieresistenten Leukämienstammzellen zu eliminieren. Der HH-Signalweg mit seinen finalen Mediatoren, den GLI-Proteinen, könnte dabei eine aussichtsreiche Zielstruktur zur Behandlung der AML darstellen.

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Akute Leukämien (Fiedler/Wellbrock) ²⁶⁴ konnte sowohl eine Korrelation erhöhter *GLI2*- bzw. auch *GLI1*-Expression mit einem schlechten Überleben der AML-Patienten, als auch eine Korrelation des negativen Einflusses der *GLI2*-Expression auf das Patientenüberleben mit dem *FLT3*-Mutationsstatus der AML-Patienten identifiziert werden. Darüber hinaus konnten bereits durch funktionelle *in vitro*-Assays mit AML-Zelllinien und Primärmaterial anti-leukämische Effekte einer gezielten therapeutischen Inhibierung von GLI1/2 mit dem kleinmolekularen Inhibitor GANT61 nachgewiesen werden.

Mit dem Ziel vor Augen, eine effektive, neue Therapieoption zur Behandlung der AML zu identifizieren, wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst der inhibitorische Effekt von GANT61 mittels eines gezielten *GLI1*- und/oder *GLI2*-shRNA-*Knockdowns* verifiziert, um anschließend das therapeutische Potenzial einer kombinierten Inhibierung des Hedgehog- und FLT3/PI3K-Signalwegs – insbesondere auch bei der *FLT3*-mutierten AML – sowie eine potenzielle nicht-kanonische GLI-Aktivierung über die FLT3/PI3K-Achse zu untersuchen.

Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Arbeit diskutiert und es wird eine Einschätzung in Hinblick auf die Suche nach neuen Therapieoptionen zur Behandlung der AML vorgenommen.

4.1 Das anti-leukämische Potenzial des gezielten shRNA-*Knockdowns* von *GLI1* und *GLI2* in AML-Zelllinien und im AML-Xenograft-Mausmodell

4.1.1 Der gezielte shRNA-*Knockdown* von *GLI1* bzw. *GLI2* in AML-Zelllinien führt zu verstärkten anti-leukämischen Effekten in funktionellen *in vitro*-Assays

Das anti-leukämische Potenzial des gezielten shRNA-*Knockdowns* von *GLI1* bzw. *GLI2* wurde in den AML-Zelllinien UKE-1, OCI-AML5 und MV4-11 analysiert. In allen drei AML-Zelllinien bewirkte der *Knockdown* von *GLI1* oder *GLI2* eine signifikante und ähnlich stark ausgeprägte Verringerung der Proliferationskapazität, wobei es keine gravierenden Unterschiede in den Effekten des *GLI1*- oder *GLI2*-*Knockdowns* gab. Der HH-Signalweg ist an der Regulation Zellzyklus-relevanter Gene wie beispielsweise den Typ-D-Zyklinen *CCND1* und *CCND2* beteiligt ²¹⁹, welche essentiell für den Übergang der sogenannten *Gap 1*(G₁)-Phase in die Synthese(S)-Phase des Zellzyklus sind ³²¹. Die *GLI1*- bzw. *GLI2*-*Knockdown*-vermittelte Verringerung der Proliferationskapazität der AML-Zellen könnte hier also durch die Verringerung der Expression dieser Zykline und die so verminderte G₁/S-Transition bewirkt worden sein. So konnte beispielsweise auch im Plattenepithelkarzinom der Lunge eine *GLI2*-*Knockdown*-vermittelte Verringerung der *CCND1*-Proteinexpression und eine daraus resultierende starke Inhibierung der Zellproliferation beobachtet werden ³²².

Im Apoptose-Assay führte der *Knockdown* von *GLI1* oder *GLI2* in allen drei AML-Zelllinien zudem zu einer erhöhten Induktion der Apoptose im Vergleich zu den Kontrollzellen, ebenfalls ohne deutliche Unterschiede in den Effekten des *GLI1*- oder *GLI2*-*Knockdowns*. Bei den Zelllinien UKE-1 und OCI-AML5 war der pro-apoptotische Effekt zu beiden analysierten Zeitpunkten – Tag 3 und Tag 7 nach Selektionsbeginn bzw. Transduktion – etwa gleich stark ausgeprägt und meist statistisch signifikant, bei der Zelllinie MV4-11 war der Effekt an Tag 3 sehr stark, dafür an Tag 7 etwas geringer ausgeprägt und die Unterschiede zu den Kontrollzellen nicht mehr signifikant. Dies ist jedoch vermutlich auf natürliche Schwankungen zurückzuführen, da eine lentivirale Transduktion der shRNA einen stabilen *Knockdown* gewährleistet und die MV4-11-Zellen nach wie vor sehr hohe

Transduktionsraten aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Der beobachtete pro-apoptotische Effekt des *GLI1*- bzw. *GLI2*-*Knockdowns* könnte beispielsweise durch eine verminderte Expression des HH-Zielgens *BCL2*²²¹ bewirkt worden sein, welches einen wichtigen anti-apoptotischen Regulator darstellt³²³ (siehe auch Abschnitt 4.1.2).

Der *Knockdown* von *GLI1* oder *GLI2* führte in allen untersuchten AML-Zelllinien des Weiteren zu einer Inhibierung der Koloniebildung, wobei dieser anti-leukämische Effekt bei der Zelllinie UKE-1 nur gering, bei der *FLT3*-mutierten Zelllinie MV4-11 hingegen am stärksten ausgeprägt war und ebenfalls keine deutlichen Unterschiede zwischen dem *Knockdown* von *GLI1* oder *GLI2* zu beobachten waren. Dieser Assay ist von besonderer Bedeutung im Hinblick auf die Identifizierung von therapeutischen Zielstrukturen bei der AML, die einem Rezidiv vorbeugen können, da die Fähigkeit, in semisolidem Medium Kolonien auszubilden, einen Hinweis auf das Leukämie-initiierende Potenzial der Zellen liefert. Mechanistisch könnten die beobachteten Effekte durch eine verminderte Expression von Stammzellgenen wie *BMI1*, *NANOG* oder *SOX2* vermittelt worden sein, die zu den Zielgenen des HH-Signalwegs zählen, wie es beispielsweise in neuronalen Stammzellen oder Krebsentitäten wie dem Melanom, Medulloblastom oder nicht-kleinzelligen Lungenkrebs gezeigt wurde^{222–224,324,325}.

Dass die hier beobachteten anti-leukämischen Effekte tatsächlich auf den *Knockdown* von *GLI1* und *GLI2* zurückzuführen waren, wurde dadurch bestätigt, dass in allen mit *GLI1*- oder *GLI2*-shRNA transduzierten Zellen der erfolgreiche *Knockdown* des jeweiligen Gens auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden konnte.

Um die deutlichen anti-leukämischen Effekte des shRNA-*Knockdowns* zu erzielen, wurde im Vorfeld der Assays eine maximale Anzahl transduzierter Zellen durch eine hohe Ausgangs-Transduktionseffizienz angestrebt. Im Falle der LeGO-Vektor-transduzierten MV4-11-Zellen konnte diese durchflusszytometrisch mit über 97 % transduzierter Zellen bestätigt werden. Bei den Zelllinien UKE-1 und OCI-AML5 war eine durchflusszytometrische Analyse der Transduktionseffizienz nicht möglich, da hier ein Vektor ohne Fluoreszenzprotein-Expression verwendet wurde. Es wurden jedoch, wie auch bei der Zelllinie MV4-11, möglichst hohe Virus-Überstand-Volumina eingesetzt und die Aufrechterhaltung eines hohen Anteils transduzierter Zellen durch die kontinuierliche Antibiotikum-Selektion mittels Puromycin gewährleistet, indem nicht-

transduzierte Zellen abgetötet wurden. Durch das Anstreben einer solch hohen Transduktionseffizienz wurde allerdings das Auftreten lentiviraler Mehrfachintegrationen der Vektor-Kopien in das Genom der AML-Zellen in Kauf genommen, welche theoretisch ab einer Transduktionseffizienz von $\geq 86,5\%$ in der Mehrheit der Zellen auftreten ³²⁶. Durch Mehrfachintegrationen steigt das Risiko einer insertionsbedingten Mutagenese mit der Anzahl integrierter Vektor-Kopien. Um dieses Risiko zu verringern, hätte auch die Option einer niedrigen Anfangs-Transduktionseffizienz mit anschließender Antibiotikum-Selektion gewählt werden können. Da AML-Zellen jedoch auch häufig therapieresistenzvermittelnde Efflux-Transporter der *ATP binding cassette*(ABC)-Superfamilie überexprimieren ³²⁷, die zu einer Antibiotikaresistenz in einem Teil der Zellen führen können ³²⁸, hätten aus einer Zellpopulation mit geringerer Ausgangs-Transduktionseffizienz mittels reiner Antibiotikum-Selektion nur schwerlich Zellpopulationen mit nahezu 100 % transduzierter Zellen generiert werden können.

Da in den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Akute Leukämien (Fiedler/Wellbrock) ²⁶⁴ gezeigt wurde, dass der Effekt von GANT61 bei CD34⁺ hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen gesunder Spender weniger stark ausgeprägt ist und diese Beobachtung auch auf shRNA-Ebene analysiert werden sollte, wurde der Versuch unternommen, aus Leukaphereseprodukten isolierte CD34⁺ Zellen lentiviral mit shRNA im LeGO-Vektor zu transduzieren. Die durchflusszytometrisch ermittelte Transduktionseffizienz war in beiden Versuchsansätzen allerdings zu gering, um aus nachfolgenden Experimenten Rückschlüsse auf den Effekt des *Knockdowns* ziehen zu können. Dass die niedrigen Transduktionseffizienzen nicht auf den verwendeten Virus-Überstand zurückzuführen waren, konnte durch ein Experiment gezeigt werden, in dem mit weniger als einem Drittel Volumen desselben Virus-Überstands in UKE-1-Zellen eine Transduktionseffizienz von über 72 % erzielt werden konnte, wohingegen in den CD34⁺ Zellen lediglich maximale Transduktionseffizienzen von 11 und 16 % erzielt wurden. Auf die Verifizierung der Inhibierungsexperimente mit GANT61 ²⁶⁴ in CD34⁺ Zellen musste folglich verzichtet werden, da auch eine Antibiotikum-Selektion der Zellen nicht möglich war, denn in Abwesenheit von Cytokinen proliferiert diese Zellpopulation *in vitro* nicht und der Zusatz von Cytokinen würde die rasche

Ausdifferenzierung der Zellen und somit den Verlust ihrer Stammzeleigenschaften bewirken³²⁹.

Insgesamt konnte durch die funktionellen *in vitro*-Assays gezeigt werden, dass mittels eines *Knockdowns* der Gene *GLI1* oder *GLI2* in AML-Zellen mit der Proliferation, Apoptose und besonders auch der Fähigkeit zur Koloniebildung wichtige Kerneigenschaften von Krebszellen inhibiert werden können und dass offenbar beide Gene eine Relevanz für die Biologie der AML zu haben scheinen. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit der Literatur, in der ebenfalls anti-leukämische *in vitro*-Effekte durch den genetischen *Knockdown* von *GLI1* in der AML gezeigt wurden^{263,282,330} – zu den Effekten eines *GLI2-Knockdowns* in der AML konnten keine publizierten Analysen gefunden werden. Aus Studien mit weiteren hämatologischen Erkrankungen wie der CLL oder soliden Tumoren wie dem Prostatakarzinom oder Plattenepithelkarzinom der Lunge konnten ebenfalls anti-kanzerogene Effekte infolge eines *GLI1-* aber auch *GLI2-Knockdowns* berichtet werden^{322,331,332}. Durch die shRNA-Assays in der vorliegenden Arbeit konnten insbesondere auch die *in vitro*-Studien in AML-Zelllinien mit dem GLI1/2-Inhibitor GANT61 von Wellbrock *et al.*²⁶⁴ aus den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Akute Leukämien (Fiedler/Wellbrock) verifiziert werden, weshalb davon auszugehen ist, dass GANT61 seine anti-leukämischen Effekte in der AML sowohl über die Blockade von GLI1 als auch von GLI2 vermittelt. Die Inhibierung durch den shRNA-*Knockdown* fand hier allerdings auf einer anderen Ebene – der mRNA-Ebene – als die Inhibierung durch GANT61 – auf der Proteinebene³⁰⁵ – statt. Mechanistisch könnte der *Knockdown* der Gene *GLI1* oder *GLI2* dabei den für die Bildung der GLI1- und GLI2-Aktivator-Formen zur Verfügung stehenden GLIFL-Proteinpool derart minimiert haben, dass dies funktionelle Folgen hatte.

Neben Wellbrock *et al.* haben auch andere Gruppen GANT61 bereits zur *in vitro*-Behandlung der AML eingesetzt und deutliche anti-leukämische Effekte feststellen können. So beobachteten Pan und Kollegen eine GANT61-vermittelte Wachstums-Inhibierung sowie Apoptose-Induktion in AML-Zelllinien²⁸² und auch Long *et al.* identifizierten eine verminderte Proliferation, verstärkte Apoptose sowie eine Inhibierung der Koloniebildung von AML-Zellen infolge einer GANT61-Behandlung²⁶³. Durch Studien in verschiedenen Krebsentitäten wurden bereits Hinweise auf den Mechanismus der anti-kanzerogenen Effekte von GANT61 geliefert, die auf die direkte

Inhibierung der *GLI1/2*-Zielgene zurückzuführen sind ³⁰⁷. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine Behandlung mit GANT61 – einhergehend mit einer Verringerung der D-Zyclin-Expression und verminderter Proliferationskapazität der Krebszellen – einen G_1 -Arrest bewirkt ^{311,312,333,334}, zu einer Apoptose-Induktion durch die Inhibierung der BCL2-Proteinexpression führt ^{309,335} sowie in einer verminderten Expression von Stammzellgenen wie *SOX2* oder *NANOG* resultiert ³⁰⁹.

4.1.2 Der gezielte shRNA-*Knockdown* von *GLI1* und *GLI2* hat anti-leukämische Effekte im *FLT3*-mutierten humanen AML-Mausmodell

Im humanen AML-Mausmodell, in welchem die Progression einer *FLT3*-mutierten AML-Zelllinie in immunsupprimierten NSGTM-Mäusen analysiert wurde, hatte der gezielte shRNA-*Knockdown* von *GLI1* und *GLI2* in den AML-Zellen signifikante anti-leukämische Effekte zur Folge. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen *in vitro*-Assays, in denen der jeweilige Einzel*knockdown* von *GLI1* bzw. *GLI2* analysiert wurde, um den Beitrag der einzelnen Gene zum leukämischen Potenzial der AML-Zellen zu untersuchen, wurde für das AML-Xenograft-Mausmodell ein Doppel*knockdown*-Ansatz beider Gene – *GLI1* und *GLI2* (*GLI1/2*-DKD) – gewählt, da auch GANT61 sowohl *GLI1* als auch *GLI2* inhibieren würde und somit das therapeutische Potenzial dieser doppelten Blockade im Fokus des Interesses stand. Basierend auf den Ergebnissen der Vorversuche zur Wahl der geeigneten *FLT3*-mutierten Zelllinie wurden MV4-11-Zellen eingesetzt, die zu einer zuverlässigen Ausprägung des AML-Phänotyps in einem etwas größeren Zeitrahmen als die der Vergleichszelllinie MOLM-13 führten.

Im Mausmodell zeigte sich, dass die mit MV4-11/*GLI1/2*-DKD-Zellen transplantierten Tiere mit durchschnittlich $37,4 \pm 7,3$ Tagen statistisch signifikant länger überlebten als die mit den Kontrollzellen transplantierten Tiere, die im Durchschnitt $29,8 \pm 4,4$ Tage überlebten. Ein anti-leukämischer Effekt der HH-Signalweg-Inhibierung auf Ebene von *GLI1/2* konnte somit auch *in vivo* verifiziert werden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit einer Studie von Zou und Kollegen zum myelodysplastischen Syndrom (MDS), in welcher ein *Knockdown* von *GLI1* in einer MDS-Zelllinie das Tumorstadium in mit diesen Zellen transplantierten Tieren signifikant im Vergleich zu den Kontrolltieren

reduzierte³³⁶. Das in der vorliegenden Arbeit beobachtete verlängerte Überleben der Mäuse, denen MV4-11/*GLI1/2*-DKD-Zellen transplantiert worden waren, kann hier durch die in den *in vitro*-Assays beobachteten anti-leukämischen Effekte einer *GLI1*- und *GLI2*-Inhibierung erfolgt sein, also durch Einflussnahme auf die Proliferation, die Apoptose und auf Stammzeleigenschaften der Blasten.

Neben der Fähigkeit zur Koloniebildung stellt das Wandern zur und Verbleiben in ihrer Knochenmarknische, das sogenannte *Homing*, eine weitere wichtige Eigenschaft der hämatopoetischen (Leukämie-)Stammzellen dar, die im Falle der LSCs diese vor Chemotherapie und Apoptose schützt und das Auftreten eines späteren Rezidivs bewirken kann³³⁷. Ob der *Knockdown* von *GLI1/2* hier auch Einfluss auf den Prozess des *Homings* hatte, wurde in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht analysiert, da die Tiere erst bei Krankheitsanzeichen und somit bereits in der Phase erfolgreichen *Engraftments* aus dem Experiment genommen wurden. Um den Aspekt des *Homings* zu untersuchen, hätte man die transplantierten Tiere schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt aus dem Experiment nehmen müssen um das Knochenmark auf Unterschiede in der Blasteninfiltration zu untersuchen³³⁸.

Um zu gewährleisten, dass in den transplantierten MV4-11-Zellen hohe *Knockdown*-Effizienzen vorlagen, wurde vor der Transplantation in die Mäuse der Erhalt einer sehr hohen Gesamt-Transduktionseffizienz sowie hoher Anteile doppelt transduzierter Zellen mikroskopisch und durchflusszytometrisch nachgewiesen. Die Analyse der mCherry- und GFP-Fluoreszenz in den CD45⁺ Blasten, welche peripheres Blut, Knochenmark und Milz zum Zeitpunkt des Exitus der Tiere infiltriert hatten, zeigte, dass in einigen der mit MV4-11/*GLI1/2*-DKD transplantierten Tiere nicht-transduzierte Wildtyp-Zellen und/oder *GLI1-Knockdown*-Zellen die übrigen transduzierten AML-Zellen überwuchert hatten. Dies deutet an, dass tendenziell Blasten mit potenziell aktivem *GLI2* verstärkt zur Ausprägung des leukämischen Phänotyps beigetragen haben könnten. Es wäre interessant gewesen, auch die tatsächliche *GLI1*- und *GLI2*-mRNA-Expression in diesen CD45⁺ Blasten zu untersuchen. Da jedoch oftmals nur geringe Gesamt-Zellzahlen aus den Mausorganen gewonnen werden konnten und in diesen sehr variable sowie teilweise nur sehr niedrige Anteile CD45⁺ Zellen vorlagen (Daten nicht gezeigt), konnte hier keine Genexpressionsanalyse durchgeführt werden. Stattdessen wurde eine *in vitro*-Kontrolle zu dem Mausexperiment durchgeführt. Die Konsistenz des *GLI1*- bzw.

GLI2-Knockdowns wurde in MV4-11/*GLI1/2*-DKD-Zellen mittels RT-qPCR über einen Zeitraum von 28 Tagen bestätigt, wobei die *GLI1*-mRNA-Expression über die Zeit wieder etwas zunahm, während die *GLI2*-mRNA-Expression stabil auf einem sehr niedrigen Niveau verblieb. Zusätzlich konnte die langanhaltende Funktionalität des *Knockdowns* durch eine Analyse der mRNA-Expression des HH-Zielgens *BCL2* nachgewiesen werden, dessen mRNA-Expression wie bei *GLI1* jedoch über die Zeit wieder etwas anstieg. Sowohl die Expression von *GLI1* als auch *BCL2* verblieb dabei aber unter dem jeweiligen Expressionslevel in den Kontrollzellen. Eine mögliche Ursache für die mit der Zeit wieder zunehmende Expressionsstärke von *GLI1* könnte das Herauswachsen von Wildtyp-Zellen sowie Zellen mit einem Einfach*knockdown* sein, die mit einem geringeren Selektionsdruck als die Doppel*knockdown*-Zellen einhergehen. Da *GLI1* selbst ein Zielgen von *GLI2* ist ^{228,274,339}, wird durch diesen positiven Rückkopplungsmechanismus die mRNA-Expression von *GLI1* in allen drei vorhandenen Zelltypen – *GLI1/2*-DKD, *GLI2*-KD und *GLI1*-KD – herunterreguliert worden sein, weshalb ein späteres Ausbleiben des *Knockdown*-Effekts bei einem wachsenden Anteil der Zellen für *GLI1* rascher zu detektieren war als für *GLI2*. Die Ergebnisse legen zudem nahe, dass *BCL2* hier durch die *GLI1*-Expression reguliert wurde, denn die Zunahme der Expression beider Gene scheint miteinander zu korrelieren. Zwar haben Regl *et al.* durch eine Studie in humanen Epidermiszellen gezeigt, dass *BCL2* hier hauptsächlich durch *GLI2* reguliert wird ²²¹, Studien in humanen Keratinozyten sowie in Epidermiszellen transgener Mäuse und in humaner CLL haben jedoch gezeigt, dass hier die Gen- bzw. Protein-Expression von *BCL2* durch *GLI1* gesteuert werden kann ^{260,340}. Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass dieser Mechanismus auch in der AML-Zelllinie MV4-11 vorzuliegen scheint. Unter dieser Voraussetzung weist die Tatsache, dass in den weiter oben diskutierten Experimenten zur Analyse der Apoptose-Induktion in den *GLI1*- bzw. *GLI2*-*Knockdown*-AML-Zelllinien auch für den *GLI2*-*Knockdown* eine deutliche Steigerung der Apoptoserate zu verzeichnen war (siehe Abschnitt 4.1.1), darauf hin, dass durch den HH-Signalweg neben *BCL2* noch weitere apoptotische Faktoren reguliert werden. So konnten bereits durch verschiedene Studien mit beispielsweise dem *Fas cell surface death receptor* (Fas-Rezeptor) ³³⁵ und dem Tumorsuppressor p53 ³⁴¹ – beides wichtige Faktoren der Apoptoseregulation ³⁴² – sowie dem anti-apoptotischen

Protein Survivin als direktes Zielgen des HH-Signalwegs³⁴³ weitere Schnittpunkte identifiziert werden, an denen ein aktiver HH-Signalweg die Apoptose inhibiert.

Insgesamt konnten durch den gezielten *GLI1*- und *GLI2*-Knockdown die in den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Akute Leukämien (Fiedler/Wellbrock) ermittelten anti-leukämischen Effekte des *GLI1/2*-Inhibitors GANT61 *in vitro* bestätigt werden und die hohe Relevanz des HH-Signalwegs auf der *GLI1/2*-Ebene für die Pathogenese einer *FLT3*-mutierten AML – wie sie basierend auf den Vorarbeiten von Wellbrock *et al.*²⁶⁴ vermutet wurde – im *in vivo*-Mausmodell verifiziert werden. Auch Lim und Kollegen konnten kürzlich eine erhöhte *GLI2*-Expression in *FLT3*-ITD-mutierten AML-Patienten sowie innerhalb der Gruppe der *FLT3*-ITD-mutierten Patienten eine negative Korrelation der hohen *GLI2*-Expression mit dem Gesamtüberleben identifizieren³⁴⁴, was die Relevanz von *GLI2* sowie einer potenziellen Verbindung zwischen mutiertem *FLT3* und *GLI1/2* in der AML noch unterstreicht.

Wie einleitend in Abschnitt 1.1.3 bereits erwähnt, spielt grundsätzlich eine Dysregulation des HH-Signalwegs eine wichtige Rolle für die Pathogenese verschiedener solider Tumore^{243–246,249–254} aber auch maligner hämatologischer Erkrankungen, bei denen ein überaktiver HH-Signalweg besonders für die Biologie der Krebsstammzellen von Bedeutung zu sein scheint³⁴⁵. So wurde für das Multiple Myelom durch verschiedene Studien eine anormale Liganden-abhängige Aktivierung des HH-Signalwegs durch autokrine oder Stroma-vermittelte Mechanismen in den primitiven Myelom-Krebsstammzellen, aber auch in der weiter differenzierten Population der malignen Plasmazellen gefunden und eine therapeutische Inhibierung des HH-Signalwegs führte zu antikanzerogenen *in vitro*- und *in vivo*-Effekten^{255–257}. Durch Studien in der ALL konnte gezeigt werden, dass in einem Großteil der untersuchten Fälle eine aktive HH-Signaltransduktion vorlag und der Signalweg hier für das Selbsterneuerungspotenzial der LSCs von Bedeutung war, welches durch die Inhibierung des HH-Signalwegs verringert werden konnte^{258,259}. Für die CLL wurde eine positive Korrelation erhöhter Expression der HH-Signalwegkomponenten in primären B-CLL-Proben mit der Progression der Krankheit und einem schlechten Überleben der Patienten gefunden²⁶⁰. Auch bei den myeloiden Leukämien scheint der HH-Signalweg eine entscheidende Rolle zu spielen. In der CML konnte durch verschiedene Arbeiten gezeigt werden, dass ein anormal aktivierter HH-Signalweg essentiell für die Entstehung

der Leukämie sowie für das Überleben und die Selbsterneuerung der ursächlichen LSCs ist und dass eine therapeutische Inhibierung des Signalwegs zu anti-leukämischen *in vitro*- und *in vivo*-Effekten führt ^{234,237,261}. Zudem zeigte sich eine erhöhte Expression von Mitgliedern der HH-Signalkaskade in primären CML-Proben im Vergleich zu mononukleären Zellen oder HSCs gesunder Spender ^{261,346} und es wurde eine positive Korrelation zwischen der Progression der CML ²⁶¹ bzw. Therapieresistenz ^{346,347} und einer erhöhten Expression von Mitgliedern der HH-Familie identifiziert.

Neben den Ergebnissen von Wellbrock *et al.* ²⁶⁴ zeigen auch weitere Analysen in der AML, dass hier der HH-Signalweg eine entscheidende Rolle für die Pathogenese, Biologie und Therapierbarkeit der Erkrankung spielt, wobei sowohl autokrine ²⁶² als auch Stroma-assoziierte ^{264,348} Aktivierungsmechanismen vorgeschlagen werden. In primären AML-Blasten und in AML-Zelllinien wurde die Expression von Komponenten des HH-Signalwegs nachgewiesen ^{262,264,330,349}, wobei erhöhte *GLI1*- und/oder *GLI2*-Expressionslevel ^{262,263,350} sowie ein überaktiver HH-Signalweg ²⁶² besonders in primären CD34⁺ Blasten sowie in CD34⁺ AML-Zelllinien vorzuliegen scheinen. Durch verschiedene Studien wurde zudem gezeigt, dass der HH-Signalweg in der AML mit Therapieresistenz assoziiert ist und dass durch eine therapeutische Inhibierung des HH-Signalwegs therapieresistente Zellen für Chemotherapie sensitiviert werden können (siehe Abschnitt 4.4) ^{262,263,283,284,308,351}.

Die Relevanz dysregulierter Komponenten des HH-Signalwegs – insbesondere der *GLI*-Aktivatoren – für die Pathologie von Krebserkrankungen zeigt sich auch in ihrem Einfluss auf das Patientenüberleben, wie es Wellbrock *et al.* für *GLI1* und/bzw. *GLI2* in der AML gezeigt haben ²⁶⁴. Beim Mammakarzinom beispielsweise korrelierten erhöhte *GLI1*-Proteinlevel mit einer schlechten Prognose und progressiveren Krankheitsstadien ³⁵², im Nierenzellkarzinom wurde neben signifikant erhöhten *GLI1*- und *GLI2*-mRNA- sowie Protein-Leveln im Vergleich zu Kontrollproben eine positive Korrelation erhöhter *GLI1*- bzw. *GLI2*-Expression mit schlechtem Patientenüberleben identifiziert ²⁷² und auch im oralen Plattenepithelkarzinom ³³³ sowie beim Ovarialkarzinom ³⁵³ wurde ein signifikant negativer Einfluss einer hohen *GLI2*-Expression bzw. von nukleär lokalisiertem *GLI1* auf das Überleben der Patienten gefunden. Zahreddine und Kollegen haben auf Basis des öffentlich zugänglichen AML-Datensets des *The Cancer Genome Atlas Research Network*, welches mittels verschiedener Sequenzierungstechniken und DNA-

Methylierungsanalysen 200 *de novo*-AML-Fälle analysiert hat ²⁹, die prognostische Relevanz einer *GLI1*-Genexpression in der AML untersucht ³⁰⁸. Es zeigte sich, dass eine erhöhte *GLI1*-Expression mit einem ungünstigen zytogenetischen Risikoprofil korreliert und ein Trend zu einer Assoziation mit schlechtem Überleben besteht. Auch durch Arbeiten weiterer Gruppen wurde eine Verbindung zwischen anormaler Expression von Komponenten des HH-Signalwegs und verschlechtertem Patientenüberleben hergestellt. So korrelierte in einer Studie an Lymphom-Patienten, die eine allo-HSCT erhalten hatten, eine erhöhte Expression von HH-Mitgliedern in der CD34⁺ Population des peripheren Bluts und Knochenmarks mit der späteren Ausbildung eines therapiassoziierten MDS oder einer AML ³⁵⁴. Ebenso scheinen erhöhte *GLI1*-Expressionslevel positiv mit einem schlechten Remissionsstatus in AML-Patienten sowie einem schlechten Gesamtüberleben von Patienten mit sekundärer AML zu korrelieren ³⁵¹.

Somit stehen die in der vorliegenden Arbeit erlangten Ergebnisse zur Relevanz des HH-Signalwegs und insbesondere von *GLI1* und *GLI2* für die Pathogenese der AML im Einklang mit anderen Studienergebnissen zur AML sowie weiteren Krebsentitäten und die therapeutische Inhibierung von *GLI1/2* erscheint als aussichtsreiche anti-kanzerogene Behandlungsstrategie.

4.2 Das therapeutische Potenzial der kombinierten Inhibierung des Hedgehog- und FLT3/PI3K- Signalwegs in der AML

Wie bereits einleitend erwähnt (siehe Abschnitt 1.3.4), wurde insbesondere durch Analysen der Signaltransduktions-Netzwerke in verschiedenen Krebsentitäten eine nicht-kanonische Regulierung der HH-Mediatoren *GLI1* und *GLI2* durch diverse onkogene Signalkaskaden identifiziert. Viele dieser Erkenntnisse wurden durch Studien mit Inhibitoren der fraglichen Signalwege gewonnen ^{267,313,331,355}. Neben einem aberrant aktivierten HH-Signalweg gehen, wie bereits in Abschnitt 1.1.4 beschrieben, aktivierende *FLT3*-Mutationen – insbesondere im Falle der häufigeren ITD-Mutation – mit einer sehr schlechten Prognose für den Patienten einher ^{35,40}. Ebenso spielt eine,

oftmals durch den so überaktivierten FLT3-Signalweg induzierte, Aktivität der PI3K/Akt-Kaskade eine entscheidende Rolle für die Pathogenese der AML ³⁵⁶. In einem Großteil der in verschiedenen Studien analysierten AML-Fälle wurde konstitutiv aktivierte PI3K und/oder phosphoryliertes und aktiviertes Akt sowie eine entscheidende Rolle des aktiven PI3K-Signalwegs für das Überleben der Blasten identifiziert ^{319,357,358}. Diese schlägt sich auch in einer schlechten Prognose für die AML-Patienten mit aktiviertem Akt nieder ^{358–360}. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass aktivierende Mutationen in der PI3K oder in Akt bei der AML sehr selten sind ^{361,362} und die aberrante Akt-Aktivierung folglich durch Events *upstream* von PI3K/Akt induziert worden sein muss, also beispielsweise über FLT3. Da die Ergebnisse der Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Akute Leukämien (Fiedler/Wellbrock) ²⁶⁴ auf eine mögliche Verbindung mit pathophysiologischer Relevanz zwischen aktivierenden *FLT3*-Mutationen bei AML-Patienten und dem HH-Signalweg auf der Ebene von *GLI1/2* hindeuten und durch Studien in verschiedenen Krebsentitäten bereits eine nicht-kanonische *GLI1/2*-Aktivierung über die PI3K/Akt-Achse identifiziert wurde ^{272,273}, wurde im nächsten Schritt der vorliegenden Arbeit analysiert, ob bei der AML eine nicht-kanonisch über die FLT3/PI3K-Achse aktivierte, *GLI1/2*-vermittelte, HH-Signalweiterleitung vorliegt und welches therapeutische Potenzial eine gemeinsame Inhibierung der beteiligten Signalwege hat. Nachdem bereits die Spezifität und Wirksamkeit des *GLI1/2*-Inhibitors GANT61 in der AML verifiziert werden konnte, wurde GANT61 nun in Kombination mit dem FLT3-Inhibitor Sunitinib sowie dem PI3K-Inhibitor PF-04691502 zur Behandlung der AML in funktionellen *in vitro*-Assays und in einem AML-Xenograft-Mausmodell eingesetzt und die Ergebnisse anschließend durch den Einsatz eines *GLI1/2*-Reporter-Assays verifiziert.

4.2.1 Die kombinierte therapeutische Inhibierung des Hedgehog- und FLT3/PI3K-Signalwegs führt zu verstärkten anti-leukämischen *in vitro*-Effekten in AML-Zellen, speziell in *FLT3*-mutierten Blasten

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der funktionellen *in vitro*-Assays, dass eine kombinierte therapeutische Inhibierung des Hedgehog- und FLT3/PI3K-Signalwegs zu verstärkten

anti-leukämischen Effekten im Vergleich zu der Behandlung mit nur zwei und besonders einem der Inhibitoren führt – speziell in *FLT3*-mutierten AML-Blasten. In den Proliferations-Assays wurden zwar für alle drei analysierten AML-Zelllinien die stärksten anti-proliferativen Effekte durch die Dreifachbehandlung mit GANT61, Sunitinib und PF-04691502 beobachtet, die Effekte waren in den *FLT3*-mutierten Zelllinien MV4-11 und MOLM-13 jedoch wesentlich stärker ausgeprägt als in der *FLT3*-Wildtyp-Zelllinie OCI-AML5, bei welcher geringere Effekte bei zugleich höheren Inhibitor-Konzentrationen zu verzeichnen waren. Da GANT61 sowie der kleinmolekulare *FLT3*-Inhibitor Sunitinib bereits erfolgreich durch verschiedene Gruppen für die *in vitro*-Behandlung von AML-Zellen eingesetzt wurden, konnten in der vorliegenden Arbeit vergleichbare Konzentrationen zu diesen in der Literatur publizierten Werten gewählt und gegebenenfalls an den Assay und die jeweilige Zelllinie angepasst werden^{105,263,264,282,283,363}. In einer der Studien zur Wirkung von Sunitinib in der AML wurde dabei hinterfragt, ob die beobachteten anti-leukämischen Effekte durch die Sunitinib-Behandlung in MV4-11-Zellen auf eine Inhibierung weiterer RTKs zurückzuführen waren, es konnte jedoch weder eine Expression von PDGFR noch eine Aktivierung von c-KIT in den MV4-11-Zellen identifiziert werden, weshalb hier ein Effekt des Inhibitors auf diese RTKs ausgeschlossen wurde¹⁰⁵. Um eine möglichst umfassende Blockade der PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade zu bewirken, wurde in der vorliegenden Arbeit mit PF-04691502 ein dualer PI3K($\alpha/\beta/\gamma/\delta$)/mTOR-Inhibitor gewählt, welcher von Cheng *et al.* mittels Struktur-basiertem Wirkstoffdesign identifiziert wurde³⁶⁴. PF-04691502 fand bisher offenbar noch keine Anwendung zur experimentellen Behandlung der AML, die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Konzentrationen befinden sich jedoch im Mittelfeld von erfolgreich für die *in vitro*-Behandlung von Krebserkrankungen wie der CLL, dem Non-Hodgkin-Lymphom oder dem Glioblastom eingesetzten Konzentrationsspannen^{318,365,366}. Durch die Proliferations-Assays mit pAMLs, in welchen der Effekt der Stimulation mit den Einzelsubstanzen sowie der Kombination aus allen drei Inhibitoren auf die Proliferationskapazität von *FLT3*-mutierten pAMLs (n = 5) sowie *FLT3*-Wildtyp-pAMLs (n = 12) analysiert wurde, konnte die erhöhte Sensitivität *FLT3*-mutierter AML-Zellen bezüglich einer kombinierten Inhibierung des HH- und *FLT3*/PI3K-Signalwegs bestätigt werden.

Durch die Ergebnisse der Apoptose-Assays wurde zudem ein verstärkter pro-apoptotischer Effekt der Kombinationsbehandlung mit GANT61, Sunitinib und PF-04691502 auf *FLT3*-mutierte AML-Zellen herausgestellt. Während bei den OCI-AML5-Zellen auch bei hohen Inhibitor-Konzentrationen keine nennenswerte Induktion der Apoptose zu verzeichnen war, erfolgte insbesondere in der *FLT3*-mutierten Zelllinie MV4-11 durch die kombinierte Behandlung des Hedgehog- und FLT3/PI3K-Signalwegs ein pro-apoptotischer Effekt. Bei den MOLM-13-Zellen war die Apoptose-Induktion im Vergleich zu MV4-11 geringer ausgeprägt und die pro-apoptotische Wirkung von Sunitinib + PF-04691502 konnte durch die Zugabe von GANT61 nicht mehr gesteigert werden. Die Ergebnisse der Apoptose-Assays können vermuten lassen, dass die potenzielle FLT3/PI3K/GLI1/2-Achse für das Apoptoseverhalten der *FLT3*-Wildtyp-Zelllinie OCI-AML5 keine starke Relevanz hat und auch bei MOLM-13 eine GLI1/2-vermittelte Apoptose-Inhibierung – beispielsweise über eine gesteigerte *BCL2*-Expression – als leukämogener Prozess einen im Vergleich zu MV4-11 weniger hohen Stellenwert hat. Beispiele aus Studien mit den Einzelsubstanzen in verschiedenen Krebsentitäten inklusive der AML liefern Hinweise, durch welche Mechanismen die kombinierte Inhibierung mit GANT61, Sunitinib und PF-04691502 die Proliferationshemmung und Apoptose-Induktion bewirkt haben können. So konnte beispielsweise für alle drei Einzelsubstanzen eine Inhibierung der zellulären Proliferation durch einen G₁-Zellzyklus-Arrest in Verbindung mit verringerter Zyklin-D1-Expression nachgewiesen werden ^{311,365,367}, was eine mögliche Erklärung für die verstärkten anti-proliferativen Effekte der Kombinationsbehandlung liefert und für alle drei Inhibitoren wurden zudem pro-apoptotische Effekte gezeigt, die im Falle von GANT61 und Sunitinib auf eine verminderte *BCL2*- sowie eine erhöhte Fas-Expression zurückzuführen waren ^{335,365,367}. Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse auf eine mögliche Verbindung von FLT3/PI3K und GLI1/2 mit *CCND1* sowie u.a. *BCL2* als finale Zielgene dieser potenziellen FLT3/PI3K/GLI1/2-Achse hin.

Mittels der *Colony Formation*-Assays konnte die stärkere Sensitivität der *FLT3*-mutierten AML-Zellen im Vergleich zu der *FLT3*-Wildtyp-Zelllinie auf die kombinierte GLI1/2- und FLT3/PI3K-Inhibierung auch bezüglich Stammzeleigenschaften bestätigt werden. Während in den Zelllinien MV4-11 und MOLM-13 deutliche Effekte mit einer maximalen Inhibierung der Koloniebildung durch die Dreifachbehandlung mit dem GLI1/2-, FLT3-

und PI3K-Inhibitor erzielt wurden, war bei den OCI-AML5-Zellen keine Verminderung der *Colony Formation*-Kapazität zu verzeichnen. Interessanterweise hatte in den CD34⁺ hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen (HSPCs) gesunder Spender, die als normale Kontrolle zu den leukämischen Blasten eingesetzt wurden, lediglich die Sunitinib-Behandlung einen deutlichen Effekt auf die Koloniebildung, der Zusatz von GANT61 oder PF-04691502 hatte keinen verstärkten inhibitorischen Effekt zur Folge. Da bekannt ist, dass normale hämatopoetische CD34⁺ Zellen FLT3 exprimieren (siehe Abschnitt 1.1.4), überrascht das Ansprechen der Zellen auf die Sunitinib-Behandlung nicht. Auch stehen die Ergebnisse im Einklang mit Studien zur therapeutischen FLT3-Inhibierung in normalen HSPCs, in welchen ein inhibitorischer Effekt der FLT3-Hemmung auf *in vitro*-Eigenschaften dieser Zellpopulation gezeigt wurde ^{47,368}. Obwohl die PI3K-Kaskade grundsätzlich eine wichtige Rolle für die Erhaltung, Proliferation und Differenzierung von HSPCs spielt ³⁶⁹, hatte PF-04691502 hier keinen Effekt auf die *Colony Formation*-Kapazität der CD34⁺ Zellen. Auch andere Gruppen machten vergleichbare Beobachtungen und konnten in ihren Studien geringere Effekte einer therapeutischen Inhibierung von Komponenten der PI3K/Akt/mTOR-Kaskade auf *in vitro*-Eigenschaften von CD34⁺ Zellen im Vergleich zu pAMLs und AML-Zelllinien wie MV4-11 feststellen ^{136,138,370,371}. Pan und Kollegen konnten ebenfalls eine Unempfindlichkeit hämatopoetischer CD34⁺ Zellen gegenüber GANT61 – hier im Proliferations-Assay – zeigen ²⁸². Ursächlich für die offenbare Resistenz dieser Zellpopulation gegenüber der GLI1/2-Inhibierung könnte die im Vergleich zu leukämischen Blasten geringere *GLI1*- und/oder *GLI2*-Expression in den normalen HSPCs sein, wie sie in den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Akute Leukämien (Fiedler/Wellbrock) durch Wellbrock *et al.* sowie in Arbeiten anderer identifiziert wurde ^{264,372}. Die vermutete FLT3/PI3K/GLI1/2-Achse scheint demnach in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen eine untergeordnete Rolle zu spielen, wodurch sich ein mögliches therapeutisches Fenster für die Behandlung FLT3-mutierter AML-Patienten mit einer Kombination aus Inhibitoren der hier analysierten Signalwege eröffnet. Normale HSPCs würden von der Kombinationstherapie weniger stark angegriffen als die leukämischen Blasten, wodurch die Gefahr verstärkter Hämatotoxizität mit Myelosuppression als unerwünschte Nebenwirkung, wie sie unter Sunitinib-Behandlung auftreten kann ^{109,373}, verringert werden könnte.

4.2.2 Die kombinierte therapeutische Inhibierung des Hedgehog- und FLT3/PI3K-Signalwegs führt zu anti-leukämischen Effekten im *FLT3*-mutierten humanen AML-Mausmodell

Im AML-Xenograft-Mausmodell konnten die anti-leukämischen Effekte der kombinierten *GLI1/2*-, FLT3- und PI3K-Inhibierung *in vivo* in NSGTM-Mäusen bestätigt werden. Die Dreifachbehandlung mit GANT61, Sunitinib und PF-04691502 führte zu einem signifikant verlängerten Überleben der mit MV4-11 transplantierten Mäuse im Vergleich zu der Kontrollgruppe und auch zu den Einzelbehandlungen. Die jeweiligen Einzelbehandlungen erbrachten bei den eingesetzten Konzentrationen im Vergleich zu der Kontrollgruppe jedoch keinen Überlebensvorteil.

Die Beobachtung, dass GANT61 in der Einzelbehandlung keinen Effekt auf die Progression der AML in den Mäusen hatte, steht somit zunächst im Widerspruch zu den Ergebnissen der Analyse des *GLI1/2*-shRNA-Knockdowns im AML-Mausmodell (siehe Abschnitte 3.1.6.2.1 und 4.1.2), bei welchem der Doppelknockdown von *GLI1* und *GLI2* in den MV4-11-Zellen einen signifikanten Überlebensvorteil für die transplantierten Tiere lieferte. Neben der Tatsache, dass sich eine Inhibierung auf mRNA-Ebene nicht direkt auf eine Inhibierung auf Proteinebene übertragen lässt, könnte eine Erklärung sein, dass GANT61 als Einzelsubstanz möglicherweise in zu geringer Konzentration eingesetzt wurde, um in der hier analysierten AML-Zelllinie *in vivo* einen anti-leukämischen Effekt zu erzielen. Da GANT61 in der vorliegenden Arbeit erstmalig in einem AML-Xenograft-Mausmodell eingesetzt wurde, existieren keine Vergleichswerte aus der Literatur zu wirksamen GANT61-Konzentrationen bei der AML, sodass die eingesetzte Konzentration von 50 mg/kg Körpergewicht in Anlehnung an *in vivo*-Studien zu anderen Krebsentitäten wie dem Prostatakarzinom³⁰⁴ oder Neuroblastom³¹¹ gewählt wurde. Dass bei der AML eine höhere Konzentration für GANT61 in Einzelbehandlung erforderlich gewesen wäre, kann demnach nicht ausgeschlossen werden. Derzeit existieren keine/kaum Daten zur Pharmakokinetik von GANT61³⁰⁷, sodass nicht bekannt ist, welche Inhibitor-Level in den behandelten Tieren tatsächlich erreicht werden und zu welcher Inhibitor-Stärke diese in den Zielzellen führen. Vergleicht man jedoch die für verschiedene *in vitro*-Assays publizierten IC₅₀-Werte von

GANT61³⁰⁴, Sunitinib¹⁰⁵ und PF-04691502³¹⁸, so wird deutlich, dass GANT61 im μM -Bereich einzusetzen ist, während Sunitinib und PF-04691502 bereits im nM-Bereich eine hohe Wirksamkeit aufweisen. Dies lässt auch auf eine eher geringere Bioverfügbarkeit von GANT61 in *in vivo*-Modellen schließen. Von potenziellen Maßnahmen, um die GANT61-Konzentration in den Mäusen zu steigern – durch Erhöhung der applizierten GANT61-Lösungsmenge, durch häufigere GANT61-Gabe oder durch Erhöhung der Stammlösungs-Konzentration – wurde abgesehen, um Lösungsmitteltoxizität in den Tieren zu vermeiden bzw. weil GANT61 sich im Labor als eine recht schwerlösliche Substanz erwies und somit die Konzentration der Stammlösung nicht erhöht werden konnte. Auch die Einzelbehandlungen mit den anderen beiden Inhibitoren erbrachten keinen Überlebensvorteil für die Mäuse. Diese Tatsache könnte jedoch darauf zurückzuführen sein, dass Sunitinib und PF-04691502 mit den hier eingesetzten 10 mg/kg Körpergewicht bzw. 2,5 mg/kg Körpergewicht im Vergleich zur Literatur zu verschiedenen Krebsentitäten mit Konzentrationsspannen von 1-40 mg/kg Körpergewicht für Sunitinib^{105,374} bzw. 2,5-10 mg/kg Körpergewicht für PF-04691502^{318,375} in nur mittleren bis niedrigen Inhibitor-Konzentrationen eingesetzt wurden.

Obwohl die Behandlung mit den jeweiligen Einzelsubstanzen also keinen Effekt auf die Progression der MV4-11-induzierten AML in den Mäusen hatte, überlebten jedoch die Tiere, die die Kombinationstherapie mit allen drei Inhibitoren erhielten, mit durchschnittlich $24,2 \pm 2,0$ Tagen, im Vergleich zu den Kontrolltieren mit durchschnittlich $19,9 \pm 1,5$ Tagen, signifikant länger. Dieser Unterschied im Überleben von etwa 4 Tagen erscheint zunächst gering, in Anbetracht der Ergebnisse der Vorversuche zur Wahl der geeigneten Zelllinie und zur optimalen zu transplantierenden Zellzahl (siehe Abschnitt 3.1.6.1) wird jedoch deutlich, dass die Zelllinie MV4-11 im Xenograft einen innerhalb der Gruppe äußerst gut reproduzierbaren AML-Phänotyp erzeugt und somit ein Überlebensvorteil von durchschnittlich 4 Tagen einen deutlichen Effekt darstellt, was sich auch in der statistischen Signifikanz dieses Unterschieds niederschlägt. Bemerkenswert ist dabei, dass dieser signifikante Überlebensvorteil durch die Kombinationsbehandlung schon bei den eher geringen eingesetzten Inhibitor-Konzentrationen festzustellen war. Diese Beobachtung erweitert das durch die Ergebnisse des *Colony Formation*-Assays mit den normalen CD34⁺ Zellen (siehe Abschnitte 3.2.1.4 und 4.2.1) vermutete therapeutische Fenster noch, indem in der hier

analysierten Kombinationstherapie der Einsatz auch geringerer Konzentrationen der Einzelsubstanzen aussichtsreiche Therapieerfolge liefern könnte, wodurch die häufig mit hohen eingesetzten Inhibitor-Konzentrationen einhergehenden unerwünschten Nebenwirkungen ³⁷⁶ minimiert werden könnten. Dies unterstreicht das therapeutische Potenzial der Kombinationstherapie der FLT3/PI3K/GLI1/2-Kaskade in *FLT3*-mutierter AML noch.

4.2.3 Die Effekte der kombinierten therapeutischen Inhibierung des Hedgehog- und FLT3/PI3K-Signalwegs in *FLT3*-mutierten AML-Zelllinien werden über die GLI1/2-Kaskade vermittelt

Mithilfe des Einsatzes von GLI1/2-Reporter-AML-Zelllinien konnte gezeigt werden, dass in den *FLT3*-mutierten AML-Zelllinien die zuvor beobachteten anti-leukämischen *in vitro*-Effekte der kombinierten therapeutischen Inhibierung des HH- und FLT3/PI3K-Signalwegs tatsächlich über die GLI1/2-Kaskade vermittelt werden und somit im Umkehrschluss eine nicht-kanonische GLI1/2-Aktivierung über FLT3/PI3K in diesen Zellen vorzuliegen scheint. In den *FLT3*-mutierten Zelllinien MV4-11 und MOLM-13 bewirkte die Kombinationstherapie mit allen drei Inhibitoren eine, im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle und im Falle von MV4-11 auch im Vergleich zu den jeweiligen Einzelbehandlungen, verstärkte Blockade der GLI1/2-Promotor-Aktivität. Bei den MV4-11-Zellen erreichte der Effekt der alleinigen GLI1/2-Blockade keine Signifikanz, was vermutlich auf die recht hohe Standardabweichung zurückzuführen ist. In den MOLM-13-Zellen konnte die starke Wirkung von GANT61 auf den GLI1/2-Promotor durch den Zusatz von Sunitinib oder PF-04691502 nicht mehr gesteigert werden. Die Tatsache jedoch, dass bei beiden *FLT3*-mutierten Zelllinien der PI3K-Inhibitor in Einzelbehandlung eine signifikante Blockade der GLI1/2-Promotor-Aktivität bewirkte, macht deutlich, dass die zuvor beobachteten anti-leukämischen Effekte der Kombinationsbehandlung folglich über eine finale Blockade der GLI1/2-Aktivität über PI3K vermittelt worden sind, was die Existenz der vermuteten FLT3/PI3K/GLI1/2-Kaskade in den *FLT3*-mutierten AML-Zelllinien untermauert.

Mit Ausnahme der AML-Zelllinie HL60 zeigten die hier analysierten *FLT3*-Wildtyp-AML-Zelllinien keine signifikante Reduktion der Aktivität des *GLI1/2*-Promotors durch die Inhibitor-Behandlungen, was noch einmal unterstreicht, dass eine potenziell nicht-kanonische *FLT3*/*PI3K*/*GLI1/2*-Achse in *FLT3*-Wildtyp-AML-Zellen – nunmehr auch für weitere *FLT3*-Wildtyp-Zelllinien neben OCI-AML5 gezeigt – keine offensichtliche Relevanz hat. Nur die HL60-Zellen erwiesen sich als sensitiv bezüglich der *GLI1/2*- und der *PI3K*-Inhibierung. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung liefert das Vorhandensein einer *NRAS*-Mutation in dieser Zelllinie ³⁷⁷, welche in eine aktivierte Signalweiterleitung über *PI3K*/*mTOR* ³⁷⁸ bzw. wie hier vermutet über *PI3K*/*mTOR*/*GLI1/2* und die damit einhergehende Empfindlichkeit der Zellen bezüglich der dualen *PI3K*/*mTOR*- bzw. *GLI1/2*-Inhibierung resultiert. Dies zeigt, dass eine nicht-kanonische HH-Signalweg-Aktivierung in der AML auch über andere Signalkaskaden – also im Falle von HL60 über *NRAS*/*PI3K*/*mTOR*/*GLI1/2* – verlaufen kann. Pan *et al.* konnten ebenfalls eine SMO-unabhängige *GLI1/2*-Aktivierung in HL60-Zellen sowie deren Sensitivität bezüglich einer *mTOR*-Inhibierung – auch im *GLI*-Reporter-Assay – identifizieren ²⁸² und eine nicht-kanonische *GLI1/2*-Aktivierung über *NRAS* oder *KRAS* wurde auch bereits in anderen Krebsentitäten beschrieben ^{270,277}.

4.3 Der Hedgehog-Signalweg wird in AML-Zelllinien nicht-kanonisch aktiviert

Durch die vergleichende Behandlung der *FLT3*-mutierten und *FLT3*-Wildtyp-*GLI1/2*-Reporter-AML-Zelllinien mit GANT61 oder dem SMO-Inhibitor Cyclopamin konnte gezeigt werden, dass in den hier analysierten AML-Zelllinien der HH-Signalweg offenbar SMO-unabhängig und somit nicht-kanonisch aktiviert wird. In allen getesteten *GLI1/2*-Reporter-AML-Zelllinien führte die GANT61-Behandlung zu einer dosisabhängigen Reduktion der *GLI1/2*-Promotor-Aktivität. Im Einklang mit den bisherigen Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, die auf eine besonders stark ausgeprägte Relevanz der *GLI1/2*-Aktivierung in den *FLT3*-mutierten AML-Zelllinien MV4-11 und MOLM-13 sowie in der *NRAS*-mutierten AML-Zelllinie HL60 hindeuteten, zeigten diese Zelllinien auch schon bei niedrigen GANT61-Konzentrationen eine starke Blockade der *GLI1/2*-Promotor-Aktivität. Die Behandlung mit Cyclopamin hingegen hatte in keiner der analysierten

Zelllinien einen Effekt auf die Aktivität des GLI1/2-Promotors. Eine SMO-vermittelte HH-Signalweiterleitung schien hier also eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Trotz dieses überraschend eindeutigen Ergebnisses lässt der Vergleich mit der Literatur darauf schließen, dass grundsätzlich in der AML kanonische und nicht-kanonische HH-Signalweg-Aktivierungen vorliegen können. Pan und Kollegen zeigten, dass eine Cyclopamin-Behandlung in einer der 4 von ihnen analysierten AML-Zelllinien Apoptose induzierte, während durch die GANT61-Behandlung in allen Zelllinien deutliche Effekte erzielt wurden²⁸². Auch in einer weiteren Studie wurde ein Ansprechen auf Cyclopamin nur in einem Teil der analysierten AML-Zelllinien beobachtet²⁶², in der Zelllinie HL60 beispielsweise konnten keine anti-leukämischen Effekte durch den SMO-Inhibitor erzielt werden. Chaudhry *et al.* analysierten AML-Patientenmaterial und wiesen SMO-unabhängige HH-Signalweg-Aktivierung und Resistenz bezüglich des SMO-Inhibitors PF-04449913 in 6 von 8 AML-Zelllinien sowie in 9 von 10 pAMLs nach³³⁰. Diese Beobachtung wurde dadurch verifiziert, dass der *small interfering*(si)RNA-*Knockdown* von SMO in einer PF-04449913-sensitiven AML-Zelllinie in verminderte Proliferation und reduzierte GLI1-Protein-Level resultierte, während der SMO-*Knockdown* in einer PF-04449913-resistenten Zelllinie keinen Effekt auf die Zellproliferation und die GLI1-Proteinexpression hatte. In dieser Zelllinie hatte der direkte *GLI1-Knockdown* jedoch eine anti-proliferative Wirkung, was die grundlegende Relevanz des nicht-kanonisch aktivierten HH-Signalwegs in dieser Zelllinie zeigte.

Kürzlich wurde ein wichtiges Indiz für eine eher untergeordnete Rolle der SMO-abhängigen HH-Signalweg-Aktivierung in AML-Zellen identifiziert. Singh *et al.* zeigten, dass die für den SMO-vermittelten HH-Signalweg essentielle primäre Zilie in AML-Zelllinien nur auf 10-36 % der Zellen und somit in deutlich geringerem Maße exprimiert wird als in normalen humanen Blut- und Knochenmarkproben, in welchen eine primäre Zilie auf nahezu 100 % der Zellen exprimiert wird¹⁹⁶. Eine klassische, kanonische HH-Signalweg-Aktivierung über SMO könnte somit in den Zilien-defizienten AML-Zellen nicht stattfinden. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass in der Studie nur AML-Zelllinien und keine primären Proben analysiert wurden, die Untersuchung der Zilien-Expression auf pAMLs wäre sicherlich aufschlussreich. In Primärmaterial aus anderen Krebsentitäten wie dem Basalzellkarzinom, Melanom, Medulloblastom oder

Pankreaskarzinom konnte bereits eine geringere Zilien-Frequenz auf den malignen Zellen im Vergleich zu gesundem Gewebe nachgewiesen werden ³⁷⁹.

Trotz der offenbaren Relevanz der nicht-kanonischen HH-Signalweg-Aktivierung in der AML wurden in *in vitro*- und auch *in vivo*-Experimenten bereits verschiedene SMO-Inhibitoren recht erfolgreich für die Behandlung der AML eingesetzt ^{284,308,350,380,381} und Lim und Kollegen identifizierten sogar verstärkte anti-leukämische Effekte einer kombinierten Inhibierung *FLT3*-ITD-mutierter AML-Zelllinien inklusive MV4-11 mit einem SMO-Inhibitor (IPI-926 oder LDE-225) oder SMO-siRNA sowie dem *FLT3*-Inhibitor Sorafenib, was auch in Patientenmaterial sowie im Mausmodell bestätigt werden konnte ³⁴⁴. Des Weiteren haben SMO-Inhibitoren auch bereits Einzug in die klinische Erprobung zur Behandlung der AML gefunden – teilweise mit aussichtsreichen Resultaten (s.u., Abschnitt 4.4). Die Ergebnisse der Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Akute Leukämien (Fiedler/Wellbrock) ²⁶⁴ weisen ebenfalls auf die Existenz auch einer kanonischen, HH-Liganden-abhängigen Signalweg-Aktivierung in AML-Patienten hin. So deuteten die Analysen der AML-Patientenproben und -daten auf einen aktiven HH-Signalweg mit pathophysiologischer Relevanz hin (siehe Abschnitt 1.1.3), in den Genexpressionsanalysen konnte jedoch keine mRNA-Expression der HH-Liganden *SHH*, *DHH* oder *IHH* als Indizien einer autokinen Stimulation gefunden werden. Auch in der mononukleären Zellfraktion von analysiertem pAML-Knochenmark konnte keine Expression der HH-Liganden nachgewiesen werden, stattdessen wurde in Zellen des pAML-Knochenmark-Stromas eine Expression des HH-Liganden *DHH* identifiziert. Zudem wurde in Plasma-Proben von AML-Patienten eine signifikante Erhöhung der *DHH*-Level im Vergleich zu gesunden Kontrollen detektiert, was die Relevanz der HH-Liganden-vermittelten Signalweg-Aktivierung bei der AML unterstreicht und auf eine parakrine Stimulation der Blasten durch das sie umgebende Stroma hindeutet.

Obwohl also nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden kann, dass in den in der vorliegenden Arbeit analysierten AML-Zelllinien und pAMLs kanonische und nicht-kanonische HH-Signalweg-Aktivierung koexistierten, zeigte die Analyse der GLI1-Proteinexpression nach Sunitinib-Behandlung der MV4-11-, MOLM-13- und OCI-AML5-Zellen deutlich, dass GLI1 hier – insbesondere in den *FLT3*-mutierten Zelllinien – über die *FLT3*-Kaskade und somit nicht-kanonisch reguliert wird. Während in den OCI-AML5-Zellen eine moderate Reduktion der GLI1-Proteinexpression infolge der therapeutischen

FLT3-Inhibierung zu verzeichnen war, wurde in den Zelllinien MV4-11 und MOLM-13 die GLI1-Expression durch die Sunitinib-Behandlung deutlich reduziert. Dieses Ergebnis wurde durch den Einsatz von GANT61 als Kontrolle für die spezifische GLI1-Inhibierung verifiziert. Da *GLI1* ein wichtiges Zielgen des HH-Signalwegs ist, wird die Proteinexpression von GLI1 auch in Studien anderer als direkter Marker eines aktiven HH-Signalwegs verwendet ^{282,283,330}.

Zusammengenommen zeigen die Inhibitor-Studien in den *vitro*-Assays sowie im *in vivo*-Mausmodell und in den GLI1/2-Reporter-Assays, dass in der AML eine nicht-kanonische FLT3/PI3K/GLI1/2-Achse mit pathophysiologischer Relevanz existiert. Wie oben bereits angedeutet, haben sich auch andere Studien bereits mit der Analyse der einzelnen Verbindungen zwischen *FLT3*-ITD-Mutationen bzw. PI3K oder mTOR mit dem HH-Signalweg in der AML befasst. Lim und Kollegen untersuchten Genexpressionsdatensets aus der AML sowie primäre AML-Proben und fanden bei Patienten mit *FLT3*-ITD eine erhöhte *GLI2*-Expression im Vergleich zu *FLT3*-Wildtyp-Patienten und normalen hämatopoetischen CD34⁺ Zellen ³⁴⁴. Wie in Abschnitt 4.1.2 bereits erwähnt, wurde zudem innerhalb der Gruppe der *FLT3*-ITD-mutierten Patienten eine negative Korrelation der hohen *GLI2*-Expression mit dem Gesamtüberleben identifiziert, was sich mit den Ergebnissen aus den Vorarbeiten von Wellbrock *et al.* deckt ²⁶⁴. Um die funktionelle Rolle der Verbindung zwischen dem aktiven HH-Signalweg und einer *FLT3*-ITD-Mutation in der AML zu untersuchen, analysierte die Gruppe die Auswirkung einer konditionellen *FLT3*-ITD-Expression im hämatopoetischen System von Mäusen, die in einem myeloproliferativen Phänotyp resultierte. Eine zusätzliche, über konstitutiv aktives SMO (SmoM2) vermittelte, HH-Signalweg-Aktivierung im so generierten *FLT3*/ITD-SmoM2-Mausmodell führte zur raschen Ausbildung eines fatalen AML-Phänotyps, wofür verstärkte STAT5-Aktivität sowie erhöhte Proliferation myeloider Vorläuferzellen im Knochenmark verantwortlich gemacht wurden. Des Weiteren führte, wie oben beschrieben, die kombinierte *FLT3*- und SMO-Inhibierung sowohl *in vitro* in *FLT3*-mutierten AML-Zelllinien und Primärmaterial als auch *in vivo* im *FLT3*/ITD-SmoM2-Mausmodell zu einem verringerten Wachstum der Leukämiezellen. Diese Ergebnisse von Lim *et al.* weisen auf die Verbindung einer SMO-induzierten kanonischen HH-Signalweg-Aktivierung in der AML mit der *FLT3*-ITD-Signalweiterleitung auf der Ebene von STAT5 hin und zeigen, dass auch in *FLT3*-ITD-mutierten AML-Zellen inklusive MV4-11

ein kanonischer HH-Signalweg vorliegen kann. Diese Ergebnisse stellen grundsätzlich keinen Widerspruch zu den in der vorliegenden Arbeit erlangten Resultaten dar, da in beiden Arbeiten zumeist unterschiedliche experimentelle Ansätze und Fragestellungen untersucht wurden. Durch die Analyse der Auswirkungen einer konditionellen Expression einer FLT3-ITD und SmoM2 in transgenen Mäusen wurde von Lim und Kollegen ein konstitutiv aktives SMO-Signal generiert, wie es zwar häufig im humanen Basalzellkarzinom oder Medulloblastom vorkommt ^{243–246}, nicht aber in der AML ^{264,330}. Die hohe Effektivität des SMO-Inhibitors IPI-926 in diesem Mausmodell überrascht folglich nicht. Die Relevanz eines kanonisch induzierten HH-Signalwegs wurde in der vorliegenden Arbeit nicht im Detail analysiert, ebenso wurde die Aktivität von STAT5 in keinem der Assays untersucht, sodass durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine grundsätzliche Existenz kanonischer HH-Signalweiterleitung mit Einflussnahme auf den Transkriptionsfaktor STAT5 in der AML folglich nicht ausgeschlossen wird. Einige der Ergebnisse von Lim und Kollegen stehen zudem im Einklang mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit und zeigen, dass durch die FLT3-ITD-Signalweiterleitung auch direkt Einfluss auf die GLI1/2-Transkriptionsfaktoren genommen wird. So resultierte die Expression der FLT3-ITD in den hämatopoetischen Zellen der transgenen Mäuse in erhöhten *GLI2*-Leveln und in den *FLT3*-mutierten AML-Zelllinien bewirkte die Behandlung mit dem FLT3-Inhibitor Sorafenib eine Verringerung der *GLI1*- und *GLI2*-Expression, was die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Aktivität der FLT3-ITD *upstream* von GLI1 auf dem Genexpressionslevel bestätigt.

Ob auch eine Verbindung zwischen der PI3K-Achse und dem HH-Signalweg in der AML vorliegt, ist ebenfalls bereits Gegenstand der aktuellen Forschung ^{282–284}. Pan und Kollegen analysierten in ihren hier schon mehrfach erwähnten Studien zur Relevanz der GLI1/2-Inhibierung in der AML ²⁸² auch den Effekt des mTOR-Inhibitors Rapamycin bei AML-Zelllinien. Sie detektierten eine Verringerung der GLI1- und GLI2-mRNA- und Proteinexpression infolge der mTOR-Inhibierung sowie einen synergistischen anti-leukämischen Effekt einer kombinierten Behandlung mit GANT61 und Rapamycin in den AML-Zelllinien. Als möglicher Wirkmechanismus wurde eine Destabilisierung der GLI1/2-Proteine durch Rapamycin postuliert. Durch diese Arbeit von Pan und Kollegen konnte demnach gezeigt werden, dass auch in den dort eingesetzten *FLT3*-Wildtyp-AML-Zelllinien eine mTOR/GLI1/2-Achse von Relevanz ist. Diese könnte jedoch auch hier auf

eine überaktive PI3K/Akt/mTOR-Kaskade zurückzuführen sein. So wurde beispielsweise neben den *NRAS*-mutierten HL60-Zellen auch die AML-Zelllinie Kasumi-1 eingesetzt, welche eine aktivierende c-KIT-Mutation und verstärkte PI3K/Akt-Signalaktivierung aufweist³⁸².

Sowohl Li *et al.* als auch Liang *et al.* studierten eine Verbindung zwischen GLI1 und der PI3K/Akt-Kaskade in AML-Zellen. Li und Kollegen zeigten erhöhte HH-Signalweg-Aktivierung in radiotherapieresistenten Varianten der Zelllinie HL60 sowie eine Inhibierung von Akt und NF-κB infolge der Behandlung dieser Zellen mit dem SMO-Inhibitor LDE-225, weshalb hier die Existenz einer GLI1/PI3K/Akt/NF-κB-Achse vermutet wurde²⁸⁴. Liang *et al.* untersuchten die Effekte einer GLI1-Überexpression in AML-Zelllinien und wiesen hier erhöhte Akt-Phosphorylierung sowie Therapieresistenz nach. Eine therapeutische Blockade mit dem kleinmolekularen PI3K-Inhibitor LY294002 hatte jedoch keinen Effekt auf die GLI1-Expression²⁸³. In diesen Studien wurde demnach gezeigt, dass GLI1 *upstream* der PI3K-Kaskade liegt, wobei hier zu berücksichtigen ist, dass in beiden Arbeiten durch die Generierung der Radioresistenz bzw. der GLI1-Überexpression in den Zellen die aktive HH-Signaltransduktion artifiziell induziert wurde. Die Diskrepanz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, in welchen bei den *FLT3*-mutierten Zelllinien sowie HL60-Zellen im GLI1/2-Reporter-Assay die direkte Blockade der GLI1/2-Promotor-Aktivität durch den PI3K/mTOR-Inhibitor nachgewiesen wurde, könnte darauf zurückzuführen sein, dass die HH-Signaltransduktion generell sehr komplex und stark kontextabhängig reguliert zu sein scheint³⁸³. So konnte beispielsweise bereits für nicht-kanonische Interaktionspartner des HH-Signalwegs – hier p53 und KRAS – eine reziproke Regulierung mit GLI1 identifiziert werden^{225,276,341} und Riobó *et al.* wiesen ebenfalls die Möglichkeit einer gegenseitigen Regulierung von PI3K/Akt und GLI1 nach²⁸¹. Es ist also nicht auszuschließen, dass in den verschiedenen experimentellen Systemen der Studien von Li *et al.*, Liang *et al.* sowie der vorliegenden Arbeit unterschiedliche PI3K/GLI-Regulierungsschleifen aktiv waren.

Riobó und Kollegen konnten in ihrer Arbeit einen möglichen Mechanismus identifizieren, über welchen Akt die GLI-Proteine reguliert. Sie zeigten, dass Akt das GLI2- (und vermutlich auch GLI3)-*full-length*-Protein stabilisiert, indem es die Aktivität der Serin/Threonin-Kinasen PKA und GSK3β hemmt²⁸¹. Wie einleitend in Abschnitt 1.3.1 beschrieben, wird durch die Phosphorylierung definierter Serinreste in der C-terminalen

Region von GLI2/3FL die Prozessierung zum Repressor GLI3_R (weniger zu GLI2_R) bzw. der zumeist vollständige Abbau von GLI2FL durch das Proteasom induziert. Wird dieser Vorgang inhibiert, liegt in der Zelle mehr GLI2/3FL zur Bildung des Aktivators GLI2_A (und auch GLI3_A) vor, während gleichzeitig weniger Repressor GLI3_R gebildet wird. In Mausmodellen zum Basalzellkarzinom und Medulloblastom wurde bereits ein kanzerogener Effekt verminderter PKA-Aktivität nachgewiesen^{384,385}. Wang *et al.* konnten durch Studien im Ösophaguskarzinom zeigen, dass die Aktivität von mTOR/S6K1 die Phosphorylierung eines spezifischen Serinrestes des GLI1-Proteins bewirkt, was die Aufhebung der GLI1-Blockade durch SUFU und somit eine GLI1-Aktivierung zur Folge hat²⁷⁵. Die Aktivität der in der vorliegenden Arbeit postulierten FLT3-ITD-induzierten PI3K/Akt/mTOR/GLI1/2-Kaskade könnte demnach schlussendlich in einer Stabilisierung von GLI_A-Formen bzw. Aufhebung von Blockaden der Aktivatoren resultieren. Es wurde gezeigt, dass sowohl *GLI1* als auch *GLI2* selbst zu den Zielgenen der GLI1- und GLI2-Aktivatoren sowie des Repressors GLI3_R zählen^{228,229,274,339} und der Verlust der GLI3_R-Funktion in eine SMO- und HH-Liganden-unabhängige HH-Signalweg-Aktivierung resultieren kann³³⁰. Eine verstärkte Aktivität der GLI_A-Formen sowie eine verringerte Funktion des Repressors GLI3_R könnte somit in eine erhöhte Expression der Gene *GLI1* und *GLI2* resultieren, wie sie in den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Akute Leukämien (Fiedler/Wellbrock)²⁶⁴ in *FLT3*-mutierten AML-Patienten identifiziert wurde. Diese potenzielle nicht-kanonische FLT3/PI3K/GLI1/2-Achse in der FLT3-mutierten AML unter Einbeziehung der Literatur sowie der in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse ist schematisch in Abbildung 25 dargestellt.

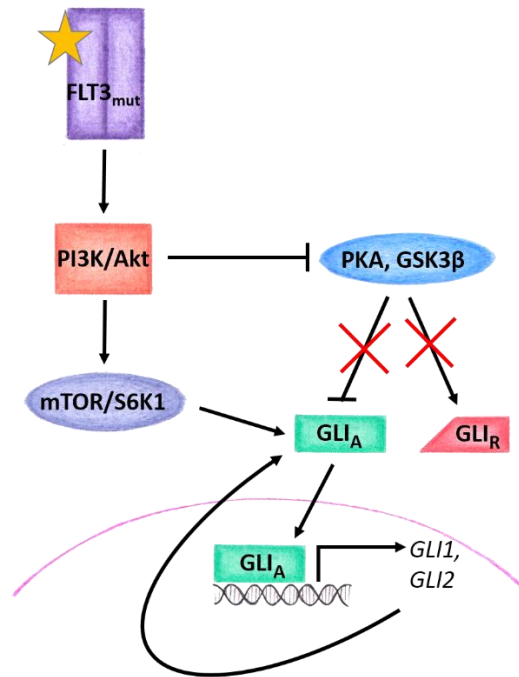


Abbildung 25: Schematische Darstellung einer möglichen nicht-kanonischen HH-Signalweg-Aktivierung in FLT3-mutierter AML über eine FLT3/PI3K/GLI1/2-Kaskade. Die aktivierende Mutation (Stern) in FLT3 (FLT3_{mut}) resultiert in einer verstärkten Aktivität von PI3K/Akt. Akt blockiert die PKA- und GSK3β-abhängige Phosphorylierung der GLI2/3-*full-length*-Proteine, sodass weniger Repressor GLI_R und mehr Aktivator GLI_A gebildet wird. GLI_A induziert im Zellkern die Transkription der Zielgene. Durch einen positiven Rückkopplungsmechanismus werden die Gene *GLI1* und *GLI2* exprimiert und aktiviertes mTOR/S6K1 stabilisieren nachfolgend den Aktivator GLI_A, wodurch das Signal verstärkt und verlängert wird. Quelle: Eigene Darstellung.

4.4 Die Blockierung der FLT3/PI3K/GLI1/2-Achse zur Therapie der AML

Grundsätzlich erscheint die gezielte FLT3-Inhibierung in AML-Patienten als eine attraktive Therapiestrategie. Die Umsetzung dieses Vorhabens gestaltet sich bisher jedoch als schwierig. Wie einleitend in Abschnitt 1.1.5 dargestellt, zeigten die verschiedenen FLT3-Inhibitoren in Monotherapie zur Behandlung der FLT3-mutierten AML zwar klinische Aktivität, die Therapieerfolge waren aber zumeist nur transient, was dem raschen Auftreten von Resistenzmechanismen zuzuschreiben war^{114,119}. Als TKI-Resistenz-vermittelnde Mechanismen konnten die Ausbildung sekundärer FLT3-TKD-Mutationen, beispielsweise D835Y, sowie der protektive Einfluss der Leukämienstammzell-Nische identifiziert werden^{386–388}. Derzeit befindet sich mit Crenolanib (CP-868,596) ein FLT3-Inhibitor in der klinischen Erprobung, durch dessen

Einsatz die Problematik der TKI-Resistenz durch sekundäre FLT3-Mutationen umgangen werden könnte. Bei Crenolanib handelt es sich um einen FLT3-Inhibitor der zweiten Generation mit Pan-Selektivität für FLT3, PDGFR und anderen RTKs, welcher sowohl die inaktive als auch die aktive Kinase-Konformation blockiert und durch dessen Einsatz bisher keine resistenzvermittelnden TKD-Mutationen identifiziert wurden³⁸⁹. Zusätzlich zeigte Crenolanib *in vitro*- und *in vivo*-Aktivität gegen bei Behandlung mit anderen TKIs identifizierte resistenzvermittelnde Mutationen in der AML^{389,390}. In klinischen Studien mit Crenolanib in Monotherapie^{391,392} und insbesondere in Kombination mit Chemotherapie wurden aussichtsreiche Therapieerfolge erzielt. So wurden in Kombination mit der „7 + 3“-Standard-Chemotherapie in neudiagnostizierten AML-Patienten mit FLT3-Mutationen sehr hohe Gesamt-CR/CR_i-Raten von 96 % erreicht und nach 6 Monaten zeigten lediglich 3 der 26 Patienten einen Krankheitsrückfall³⁹³.

Auch andere FLT3-Inhibitoren wurden bereits in klinischen Studien in Kombination mit konventioneller Chemotherapie getestet^{97–100,109,115,116,122}. Wie einleitend in Abschnitt 1.1.5 beschrieben, wurde in der kürzlich publizierten, randomisierten klinischen Studie einer Kombination aus Midostaurin mit Standard-Chemotherapie in AML-Patienten ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben sowie Event-freies Überleben im Vergleich zur Placebo-Behandlung gezeigt¹²² und der FLT3-Inhibitor Sorafenib wurde ebenfalls in zwei randomisierten, Placebo-kontrollierten Studien in Kombination mit Chemotherapie analysiert, mit unterschiedlichen Therapieerfolgen^{115,116}. Auch der in der vorliegenden Arbeit verwendete FLT3-Inhibitor Sunitinib wurde in einer Phase-I/II-Studie in Kombination mit intensiver Chemotherapie zur Behandlung FLT3-mutierter AML eingesetzt. Trotz der generell hohen erreichten Remissionsraten sprachen 20-30 % der Patienten nicht auf die Behandlung an. Dieser Anteil an FLT3-mutierten Patienten, der primär refraktär bezüglich einer Kombination aus Chemotherapie und FLT3-Inhibierung ist, könnte möglicherweise von einer kombinierten Inhibierung von FLT3 und nachfolgenden Komponenten der aktivierten FLT3-Kaskade profitieren. So konnte beispielsweise auch ein verstärkter anti-leukämischer Effekt einer Kombination von Sunitinib mit dem mTOR-Inhibitor RAD001 in primärer AML und Zelllinien mit aktivierten RTKs wie FLT3 nachgewiesen werden³⁶³ und die kombinierte Blockade durch Sunitinib und den MEK-Inhibitor AZD6244

induzierte synergistische inhibitorische Effekte in *FLT3*-mutierten AML-Zelllinien und Primärmaterial ³⁹⁴.

Interessanterweise wiesen Lindblad und Kollegen kürzlich eine aberrante Aktivierung von PI3K/mTOR als einen Resistenzmechanismus nach FLT3-Inhibitor-Behandlung in *FLT3*-ITD-mutierten AML-Zelllinien nach ³⁹⁵. Eine therapeutische PI3K/mTOR-Inhibierung resultierte in anti-leukämische *in vitro*- sowie *in vivo*-Effekte in den TKI-resistenten Zellen. He *et al.* konnten die Effektivität einer kombinierten PI3K- und FLT3-Inhibierung in FLT3-Inhibitor-resistenten *FLT3*-ITD-AML-Zellen feststellen ³⁹⁶ und Weisberg *et al.* zeigten, dass eine kombinierte Inhibierung von FLT3 und Akt in *FLT3*-mutierter AML einem protektiven Einfluss der Leukämienstammzellnische entgegenwirken kann ³⁹⁷. Dies macht deutlich, dass es sinnvoll ist, die aberrant aktivierte FLT3-Kaskade auf mehreren Leveln anzugreifen, um der Ausbildung von Resistenzen durch die verschiedenen Mechanismen vorzubeugen. Diese Feststellung sowie die erlangten Resultate der vorliegenden Arbeit, welche auf die Existenz einer nicht-kanonischen FLT3/PI3K/GLI1/2-Kaskade in der *FLT3*-mutierten AML schließen lassen, zeigen, dass hier eine kombinierte therapeutische Inhibierung von FLT3, PI3K/mTOR und dem HH-Signalweg eine aussichtsreiche Therapiestrategie sein kann. Dies gilt insbesondere auch unter Berücksichtigung der in Abschnitt 4.2.2 diskutierten Ergebnisse der kombinierten FLT3/PI3K/GLI1/2-Inhibierung im *FLT3*-mutierten AML-Xenograft-Mausmodell, in welchem gezeigt werden konnte, dass mit jeweils niedrigen Inhibitor-Konzentrationen in Kombination eine gute Effektivität bei zugleich potenziell geringen Nebenwirkungen erreicht werden kann.

Wie einleitend in Abschnitt 1.1.5 dargestellt, wurden durch den Einsatz der verschiedenen Inhibitoren der PI3K/Akt/mTOR-Achse in klinischen Studien früher Phasen zur Behandlung der AML bisher eher mäßige Therapieerfolge erzielt, wobei die Ergebnisse diverser Studien auch noch ausstehen. Besonders die Resultate zweier derzeit aktiver Studien sind im Hinblick auf die vorliegende Arbeit von Interesse. So wird der bereits für die Behandlung *FLT3*-mutierter AML zugelassene, potente FLT3-Inhibitor Midostaurin in Kombination mit dem mTORC1-Inhibitor RAD001 in einer Phase-I-Studie zur Behandlung von Patienten mit R/R AML oder AML bzw. MDS mit ungünstigem Risikoprofil analysiert (ClinicalTrials.gov: NCT00819546) und der duale PI3K/mTOR-Inhibitor NVP-BE235 wird derzeit in einer Phase-I-Studie zur Behandlung R/R Leukämie

inklusive der AML analysiert (ClinicalTrials.gov: NCT01756118). Zwar werden die Ergebnisse dieser frühen Studien keinen Aufschluss über die Effektivität der Substanzen in *FLT3*-mutierten AML-Patienten liefern, sie könnten jedoch die Einschätzung ermöglichen, ob grundsätzlich der therapeutische Einsatz einer kombinierten Inhibierung von *FLT3*/PI3K/mTOR in der AML umsetzbar ist. Interessanterweise wurde in einer kleinen Phase-Ib-Studie, in welcher die Kombination von RAD001 mit klassischer Induktionschemotherapie in jüngeren AML-Patienten mit Rezidiv getestet wurde, das Erreichen einer CR in 3 der 4 *FLT3*-ITD-mutierten Patienten verzeichnet, was trotz der sehr geringen Populationsgröße auf eine hohe Sensitivität *FLT3*-mutierter AML-Patienten bezüglich einer mTORC1-Inhibierung hindeuten könnte ¹³⁰.

Wie ebenfalls einleitend in Abschnitt 1.3.5 erwähnt, wurden auch bereits einige HH-Inhibitoren in klinischen Studien zur Behandlung verschiedener Krebserkrankungen untersucht, wobei der Fokus hauptsächlich auf SMO-Inhibitoren lag ³⁹⁸. SMO-Inhibitoren wie Vismodegib und Sonidegib zeigten eine hohe Therapieeffizienz bei Krebsarten wie BZK oder MB, die häufig aktivierende Mutationen des HH-Signalwegs aufweisen. Derzeit befindet sich eine Studie zur Evaluierung einer Behandlung der AML mit Vismodegib in Kombination mit den HMAs Ribarivin und Decitabin in der Rekrutierungsphase (ClinicalTrials.gov: NCT02073838). Ein enttäuschendes Ergebnis lieferte eine Phase-II-Studie mit Vismodegib in R/R AML und R/R Hochrisiko-MDS, welche aufgrund ausbleibender Effizienz abgebrochen wurde (ClinicalTrials.gov: NCT01880437), so wie es auch bei einer Studie im R/R B-Zell-Lymphom und in der CLL der Fall war (ClinicalTrials.gov: NCT01944943). Derzeit wird auch Sonidegib in Kombination mit HMAs in Patienten mit myeloiden Erkrankungen inklusive der AML analysiert (ClinicalTrials.gov: NCT02129101). Ergebnisse einer abgeschlossenen Phase-II-Studie zur Behandlung der R/R AML mit Sonidegib wurden zwar bereits auf *ClinicalTrials.gov* publiziert (ClinicalTrials.gov: NCT01826214), eine *Peer-Review*-Interpretation der Ergebnisse steht derzeit noch aus. Den bereits veröffentlichten Studienergebnissen ist jedoch zu entnehmen, dass bei den eingesetzten Dosen über 60 % der Patienten die Behandlung aufgrund einer Krankheitsprogression nicht fortgesetzt haben, was auf keinen offensichtlichen Heilungsnutzen schließen lässt.

Der bisher aussichtsreichste HH-Inhibitor zur Therapie der AML ist der SMO-Inhibitor PF-04449913, der derzeit in verschiedenen klinischen Studien zur Therapie der AML

getestet wird (siehe Abschnitt 1.3.5). So wurde, nach den aussichtsreichen Ergebnissen der ersten kleinen Phase-I-Studie in Patienten mit verschiedenen hämatologischen Erkrankungen inklusive der AML ²⁹⁹, eine Phase-Ib/II-Studie mit PF-04449913 in Kombination mit intensiver oder niedrig dosierter Ara-C-Behandlung (engl.: *low dose Ara-C*, LDAC) oder mit dem HMA Decitabin in der AML und im Hochrisiko-MDS initiiert (ClinicalTrials.gov: NCT01546038). In dem bereits abgeschlossenen Phase-Ib-Teil wichen mit dem Erreichen einer CR/CR_i bei 31 % der Patienten die Ansprechraten nicht signifikant von mittels Standardtherapie in der Vergangenheit erreichten Ansprechraten ab ³⁹⁹. Erste Ergebnisse des randomisierten Phase-II-Teils der noch aktiven Studie, in welcher der Effekt einer alleinigen LDAC-Behandlung im Vergleich zu einer Kombination aus LDAC und PF-04449913 auf das Gesamtüberleben von zuvor unbehandelten AML- oder Hochrisiko-MDS-Patienten analysiert wird, zeigen jedoch, dass durch die Kombination aus dem SMO-Inhibitor mit niedrig dosierter Chemotherapie das Gesamtüberleben der Patienten im Vergleich zu alleiniger LDAC-Therapie verlängert wird ⁴⁰⁰. Bei 22,7 % der Patienten wurde durch die Kombinationstherapie eine CR/CR_i erreicht, in der LDAC-Gruppe hingegen wiesen nur 4,5 % der Patienten eine CR/CR_i auf. Das mittlere Gesamtüberleben der Patienten konnte durch die Kombinationstherapie im Vergleich zu der LDAC-Monotherapie von 4,9 Monaten auf 8,3 Monate für die LDAC + PF-04449913-Gruppe verlängert werden. Diese ermutigenden Ergebnisse unterstreichen das grundsätzliche therapeutische Potenzial der HH-Signalweg-Inhibierung in der AML, eine Einschätzung zu Therapieerfolgen speziell in *FLT3*-mutierten AML-Patienten kann jedoch bisher nicht vorgenommen werden.

Wie es häufig bei Monotherapien zu beobachten ist, wurden auch schon erworbene Resistenzen gegen den SMO-Inhibitor Vismodegib beim BZK und MB festgestellt ^{401–403}. Als Resistenzmechanismen konnten SMO-Mutationen, Verlust von *SUFU* sowie die Amplifikation von *GLI2* identifiziert werden ^{404–407}, was die Relevanz dieses Transkriptionsfaktors für das Fortbestehen des Tumorwachstums hervorhebt. Interessanterweise wurde auch die Heraufregulation der PI3K-Kaskade als ein potenzieller Resistenzmechanismus im MB im Zuge einer Sonidegib-Behandlung in *in vivo*-Modellen identifiziert ⁴⁰⁸, was auf eine klinisch relevante Interaktion beider Signalwege hindeutet. Durch eine Inhibierung der PI3K konnten in SMO-Inhibitor-resistenten MB-Mausmodellen anti-kanzerogene Effekte erzielt werden ⁴⁰⁴ und die

Kombination verschiedener Inhibitoren des PI3K/mTOR-Signalwegs mit Sonidegib verzögerte die Entstehung erworbener Resistenzen in einem MB-Mausmodell ⁴⁰⁸. Die kombinierte therapeutische Inhibierung des PI3K- und HH-Signalwegs wurde bereits in klinischen Studien zur Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenem oder metastasiertem BZK (ClinicalTrials.gov: NCT02303041) bzw. fortgeschrittenen soliden Tumoren (ClinicalTrials.gov: NCT01576666) analysiert, die Ergebnisse stehen aber derzeit noch aus.

Ein weiteres großes Potenzial einer kombinierten FLT3/PI3K/GLI1/2-Blockade in der AML liegt – neben der Minimierung des Risikos einer Ausbildung von Resistenzmechanismen, wie sie in Monotherapien zu beobachten sind – in der Möglichkeit, dadurch auch die Population der LSCs therapeutisch angreifen und eliminieren zu können. Dies scheint eine Voraussetzung für langanhaltende Therapieerfolge bei der AML zu sein, da die therapieresistenten LSCs für die hohe Rezidivrate bei der AML verantwortlich gemacht werden (siehe Abschnitt 1.2). Sowohl aktivierende *FLT3*-Mutationen ^{65,409} als auch eine aktive PI3K-Kaskade ⁴¹⁰ konnten in LSCs nachgewiesen werden. Analysen von Patientenmaterial bezüglich des *FLT3*-Mutationsstatus' zum Zeitpunkt der Diagnosestellung sowie im Rezidiv zeigen, dass die *FLT3*-ITD-Mutation größtenteils zu beiden untersuchten Zeitpunkten detektierbar ist und somit bereits im therapieresistenten Gründungsklon vorliegt ^{70,411–413}. Seltener kommt es zu einem Verlust der Mutation, in einigen Fällen aber auch zu einem Auftreten der Mutation erst im Rezidiv. Ebenso wurde beobachtet, dass Patienten mit *FLT3*-ITD-Mutation zu beiden analysierten Zeitpunkten höhere *FLT3*-ITD-mRNA-Level im Rezidiv zeigen ^{70,411}, was auf das Herauswachsen eines therapieresistenten, FLT3-ITD-abhängigen Zellklons hindeutet. Dieser Prozess könnte dadurch begünstigt werden, dass FLT3-ITD-mutierte Rezeptoren zusätzlich zu ihrer Autoaktivität eine fortbestehende Sensitivität gegenüber FL aufweisen ⁶² und dieser Ligand im Zuge der Chemotherapie verstärkt ausgeschüttet wird ⁷², sodass eine Selektion zugunsten FL-abhängiger Zellklone stattfinden kann. Die FLT3-ITD-Mutation scheint demnach direkt in den Prozess der Chemotherapieresistenz involviert zu sein.

Der HH-Signalweg spielt eine wichtige Rolle in Krebsstammzellen (engl.: *cancer stem cells*, CSCs) verschiedener Entitäten wie dem nicht-kleinzelligen Lungenkrebs, Prostata- und Pankreaskarzinom oder Melanom und stellt eine aussichtsreiche Zielstruktur zur

Eliminierung der CSCs dar^{309,324,325,355,414,415}. Auch in der AML hat der HH-Signalweg eine große Relevanz für die Biologie der LSCs, indem er in den Zellen die Transkription Stammzeleigenschaften-vermittelnder Gene wie beispielsweise *BMI1* oder *NANOG* reguliert^{381,416}. Fukushima *et al.* zeigten, dass eine SMO-Inhibierung durch PF-04449913 *in vitro* in pAMLs die CD34⁺CD38⁻-Population verkleinert und in humanen CD45⁺ Zellen aus dem Knochenmark leukämischer Mäuse eines AML-Xenograft-Mausmodells den Anteil der therapieresistenten G₀-Phase-Zellen verringert³⁵⁰. Zudem wurden AML-Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch die HH-Signalweg-Inhibierung für Chemotherapie sensitiviert. Auch in weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass ein aktiver HH-Signalweg bei der AML mit Chemotherapieresistenz assoziiert ist und eine therapeutische Inhibierung des Signalwegs die therapieresistenten Zellen für Chemotherapie angreifbar macht. So wurde beispielsweise eine statistisch signifikante Erhöhung der GLI1-Expression bei Patienten mit R/R AML im Vergleich zu Patienten mit CR identifiziert²⁸³. Li und Kollegen fanden eine erhöhte SMO- und GLI1-Expression in chemotherapie- bzw. radiotherapieresistenten Varianten der AML-Zelllinie HL60 und durch die Inhibierung des HH-Signalwegs konnten anti-leukämische Effekte erzielt und die Zellen für Radiotherapie sensitiviert werden²⁸⁴. In einer weiteren Studie an Patientenmaterial wurde durch den Nachweis eines hohen Anteils von nukleär lokalisiertem GLI1 in Chemotherapie-refraktärer AML eine Verbindung zwischen aktivierter HH-Signaltransduktion und Chemotherapieresistenz angenommen³⁵¹. Durch eine therapeutische Inhibierung des HH-Signalwegs konnten anti-leukämische Effekte in CD34⁺ AML-Zellen erzielt und diese therapieresistenten Zellen für Chemotherapie sensitiviert werden^{262,263}. Zahreddine *et al.* analysierten Primärmaterial rezidivierter AML-Patienten u.a. nach Chemotherapie mit Ara-C sowie zusätzlich therapieresistente Zelllinien und identifizierten erhöhte GLI1-Level und nachfolgend GLI1-vermittelte Glucoronidierung des Therapeutikums als Mechanismus der Therapieresistenz³⁰⁸. Durch eine genetische oder therapeutische Inhibierung des HH-Signalwegs konnte die Therapieresistenz überwunden werden. Auch in einer Studie in der CML in Xenograft-Mausmodellen konnte durch den Einsatz des SMO-Inhibitors PF-04449913 der Anteil therapieresistenter LSCs in der G₀-Phase verringert und die LSCs interessanterweise für die Behandlung mit einem Tyrosinkinase-Inhibitor sensitiviert werden⁴¹⁷.

Trotz der teilweise recht positiven Ergebnisse, die eine HH-Inhibierung auf dem Level von SMO in der AML bisher erbracht hat, machen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deutlich, dass in der AML eine nicht-kanonische HH-Signalweg-Aktivierung – hier gezeigt über die FLT3/PI3K-Kaskade und insbesondere in *FLT3*-mutierter AML – sowie eine Unempfindlichkeit gegenüber einer SMO-Inhibierung existieren kann. Somit erscheint eine direkte Inhibierung von GLI1 und GLI2 als sinnvollste therapeutische Zielstruktur im HH-Signalweg, da sowohl die kanonische als auch die nicht-kanonische Signalweg-Aktivierung auf dem Level der GLI-Transkriptionsfaktoren zusammenlaufen und eine direkte GLI1/2-Inhibierung alle Aktivierungsmechanismen *upstream* der GLI1/2-Aktivatoren einschließen würde. So konnte auch in *in vivo*-Mausmodellen zu verschiedenen Krebsentitäten gezeigt werden, dass eine direkte GLI1/2-Inhibierung effektiver als eine SMO-Inhibierung ist ^{310,311,314}. Da es unwahrscheinlich erscheint, dass GANT61 in seiner derzeitigen Form tatsächlich klinische Anwendung finden wird (siehe Abschnitt 4.2.2), ist die Weiterentwicklung von GANT61, beispielsweise bezüglich seiner Löslichkeit, oder aber die Entwicklung weiterer potenter GLI-Inhibitoren höchst wünschenswert. Mit Arsentrioxid (ATO) und BET-Inhibitoren existieren derzeit bereits zwei sehr aussichtsreiche Kandidaten für die klinische GLI1/2-Inhibierung in der AML.

ATO ist für die Behandlung der akuten promyelozytischen Leukämie (APL), welche sich durch das maligne Fusionsprotein PML-RARA und eine dadurch gestörte myeloide Differenzierung auszeichnet, zugelassen und führt hier durch direkte Bindung des Fusionsproteins zu dessen Degradation ⁴¹⁸. ATO erwies sich jedoch auch als ein potenter und spezifischer HH-Signalweg-Inhibitor und inhibierte beispielsweise das Tumorwachstum in einem HH-Signalweg-abhängigen MB-Mausmodell ⁴¹⁹. Als Wirkmechanismus konnte die Blockade der GLI2-Akkumulation in der primären Zilie und die so vermittelte Destabilisierung des Transkriptionsfaktors mit nachfolgend verminderten GLI2-Leveln identifiziert werden. Derzeit wird ATO – wenn auch nicht primär in seiner Funktion als HH-Signalweg-Inhibitor – in verschiedenen klinischen Studien zur Behandlung hämatologischer Erkrankungen inklusive der AML analysiert (ClinicalTrials.gov: NCT00195104, NCT03318016, NCT03031249, NCT00482833, NCT02200978 und andere).

Der Chromatin-Reader BRD4 – das prominenteste Mitglied der BET-Familie – spielt grundsätzlich eine wichtige Rolle in der Regulation der Transkription, indem er an

acetylierte Histone bindet und transkriptionelle Komplexe an die Zielgene rekrutiert⁴²⁰. Wie einleitend bereits angedeutet (siehe Abschnitt 1.3.4), wurde in zwei parallelen Studien gezeigt, dass BRD4 die *GLI1/2*-Transkription SMO- und SUFU-unabhängig positiv reguliert, indem es direkt den *GLI1*- bzw. *GLI2*-Promotor bindet^{278,279}. Eine Inhibierung des BET-Proteins konnte das Wachstum HH-Signalweg-abhängiger Tumore *in vitro* sowie *in vivo* verringern. In einer prä-klinischen Studie konnte das therapeutische Potenzial einer BRD4-Inhibierung auch in der AML identifiziert werden⁴²¹ und interessanterweise resultierte die kombinierte therapeutische Inhibierung der *FLT3*-mutierten AML-Zelllinien MV4-11 und MOLM-13 sowie primärer *FLT3*-ITD-mutierter CD34⁺ AML-Zellen mit einem BRD4-Inhibitor sowie einem *FLT3*-Inhibitor in synergistische pro-apoptotische Effekte⁴²². Da bereits in einer ersten klinischen Studie mit dem BRD2/3/4-Inhibitor OTX015 in der AML eine relativ gute Verträglichkeit und ein Ansprechen bei einem Teil der Patienten verzeichnet werden konnte⁴²³, wäre es von großem Interesse, eine kombinierte therapeutische Inhibierung von BRD4 als *GLI1/2*-Inhibitor und *FLT3* in einer klinischen Studie mit *FLT3*-mutierten AML-Patienten zu analysieren.

4.5 Fazit und Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass speziell in *FLT3*-mutierter AML, welche meist mit einer sehr schlechten Prognose assoziiert ist, eine nicht-kanonische *FLT3*/PI3K/*GLI1/2*-Kaskade mit pathophysiologischer Relevanz vorzuliegen scheint und diese Achse eine interessante therapeutische Zielstruktur zur Behandlung der AML darstellt. Für eine klinische Umsetzung der hier analysierten kombinierten *FLT3*/PI3K/*GLI1/2*-Inhibierung wären der TKI Crenolanib sowie ein dualer PI3K/mTOR-Inhibitor und der BET-Inhibitor OTX015 aussichtsreiche Kandidaten. Auch eine zusätzliche Kombination mit Chemotherapie könnte einen großen Therapienutzen erbringen.

Ein möglicher Mechanismus, über welchen mutiertes *FLT3* die *GLI*-Proteine reguliert, könnte über eine PI3K/Akt-induzierte verringerte Aktivität der PKA-vermittelten *GLI*-Prozessierung und somit über die Stabilisierung von *GLI*-Aktivator-Formen sowie die verminderte Bildung von *GLI*-Repressor-Formen verlaufen. Um diesen potenziellen

Mechanismus näher zu untersuchen, wäre es interessant zu analysieren, welchen Einfluss eine Steigerung der PKA-Aktivität auf die FLT3/PI3K/GLI1/2-Achse in der AML hat. Dies wäre beispielsweise durch den Einsatz von Phosphodiesterase-Inhibitoren möglich, welche eine Erhöhung der PKA-Aktivität bewirken und bereits anti-kanzerogene *in vivo*-Aktivität in HH-Signalweg-assoziierten Tumormodellen gezeigt haben ^{384,424}.

V Während dieser Arbeit entstandene Publikationen

Teile dieser Arbeit sind in folgende Publikationen eingeflossen:

- Wellbrock J, Latuske E, Köhler J, et al. Expression of Hedgehog pathway mediator GLI represents a negative prognostic marker in human acute myeloid leukemia and its inhibition exerts anti-leukemic effects. *Clin Cancer Res.* 2015;21(10):2388-2399. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-1059.
- Latuske E-M, Stamm H, Klokow M, et al. Combined inhibition of GLI and FLT3 signaling leads to effective anti-leukemic effects in human acute myeloid leukemia. *Oncotarget.* 2017;8(17):29187-29201. doi:10.18632/oncotarget.16304.

VI Anhang

Referenzen

1. Virchow R. Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medicin. *Verlag von Meidinger & Sohn Comp.*; Frankfurt a. M., 1856.
2. Shipley JL, Butera JN. Acute myelogenous leukemia. *Exp Hematol.* 2009;37(6):649-658. doi:10.1016/j.exphem.2009.04.002.
3. Löwenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 1999;341(14):1051-1062. doi:10.1056/NEJM199909303411407.
4. De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. "Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update". *Blood Cancer J.* 2016;6(7):e441. doi:10.1038/bcj.2016.50.
5. Deschler B, Lübbert M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer.* 2006;107(9):2099-2107. doi:10.1002/cncr.22233.
6. Acute Myeloid Leukemia - Cancer Stat Facts. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html>. Accessed May 28, 2018.
7. Ehninger G, Link H, Berdel WE. Akute Myeloische Leukämie – Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie, Prognose. 1. Auflage. *Deutscher Ärzte-Verlag*; Köln, 2008. <http://www.onkodin.de/e2/e51675/e52337/>. Accessed September 15, 2017.
8. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut (Hrsg). Berlin, 2016.
9. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ CK (eds). SEER Cancer Statistics Review 1975-2014 National Cancer Institute. 2017;(April). https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/.
10. Aquino VM. Acute myelogenous leukemia. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care.* 2002;32(2):50-58. doi:10.1007/978-0-387-69259-3.
11. Smith MA, McCaffrey RP, Karp JE. The secondary leukemias: challenges and research directions. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88(7):407-418.
12. Czader M, Orazi A. Therapy-related myeloid neoplasms. *Am J Clin Pathol.* 2009;132(3):410-425. doi:10.1309/AJCPD85MCOHHCOMQ.
13. Fircanis S, Merriam P, Khan N, Castillo JJ. The relation between cigarette smoking and risk of acute myeloid leukemia: an updated meta-analysis of epidemiological studies. *Am J Hematol.* 2014;89(8):E125-32. doi:10.1002/ajh.23744.
14. Alter BP. Fanconi anemia and the development of leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2012;27(3-4):214-221. doi:10.1016/j.beha.2014.10.002.
15. Cavani S, Perfumo C, Argusti A, et al. Cytogenetic and molecular study of 32 Down syndrome families: potential leukaemia predisposing role of the most proximal segment of chromosome 21q. *Br J Haematol.* 1998;103(1):213-216. doi:10.1046/j.1365-2141.1998.00924.x.
16. Hayes RB, Yin SN, Dosemeci M, et al. Benzene and the dose-related incidence of hematologic neoplasms in China. *Chinese Academy of Preventive Medicine--*

- National Cancer Institute Benzene Study Group. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89(14):1065-1071. doi:10.1093/jnci/89.14.1065.
17. Corces-Zimmerman MR, Hong W-J, Weissman IL, Medeiros BC, Majeti R. Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(7):2548-2553. doi:10.1073/pnas.1324297111.
 18. Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med.* 2014;371(26):2477-2487. doi:10.1056/NEJMoa1409405.
 19. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med.* 2014;371(26):2488-2498. doi:10.1056/NEJMoa1408617.
 20. Shlush LI, Zandi S, Mitchell A, et al. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature.* 2014;506(7488):328-333. doi:10.1038/nature13038.
 21. Xie M, Lu C, Wang J, et al. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat Med.* 2014;20(12):1472-1478. doi:10.1038/nm.3733.
 22. Welch JS, Ley TJ, Link DC, et al. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell.* 2012;150(2):264-278. doi:10.1016/j.cell.2012.06.023.
 23. Thiede C, Steudel C, Mohr B, et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood.* 2002;99(12):4326-4335.
 24. Fialkow PJ, Janssen JW, Bartram CR. Clonal remissions in acute nonlymphocytic leukemia: evidence for a multistep pathogenesis of the malignancy. *Blood.* 1991;77(7):1415-1417.
 25. Grove CS, Vassiliou GS. Acute myeloid leukaemia: a paradigm for the clonal evolution of cancer? *Dis Model Mech.* 2014;7(8):941-951. doi:10.1242/dmm.015974.
 26. Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971;68(4):820-823. doi:10.1073/pnas.68.4.820.
 27. Gilliland DG. Hematologic malignancies. *Curr Opin Hematol.* 2001;8(4):189-191.
 28. Reilly JT. Pathogenesis of acute myeloid leukaemia and inv(16)(p13;q22): a paradigm for understanding leukaemogenesis? *Br J Haematol.* 2005;128(1):18-34. doi:10.1111/j.1365-2141.2004.05236.x.
 29. Cancer Genome Atlas Research Network, Ley TJ, Miller C, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2013;368(22):2059-2074. doi:10.1056/NEJMoa1301689.
 30. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 2016;374(23):2209-2221. doi:10.1056/NEJMoa1516192.
 31. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med.* 1985;103(4):620-625.
 32. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol.* 1976;33(4):451-458.
 33. Vardiman JW. The World Health Organization (WHO) classification of tumors of

- the hematopoietic and lymphoid tissues: an overview with emphasis on the myeloid neoplasms. *Chem Biol Interact.* 2010;184(1-2):16-20. doi:10.1016/j.cbi.2009.10.009.
34. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016;127(20):2391-2405. doi:10.1182/blood-2016-03-643544.
 35. Döhner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood.* 2017;129(4):424-447. doi:10.1182/blood-2016-08-733196.
 36. Kantarjian H, O'Brien S, Cortes J, et al. Results of intensive chemotherapy in 998 patients age 65 years or older with acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome: predictive prognostic models for outcome. *Cancer.* 2006;106(5):1090-1098. doi:10.1002/cncr.21723.
 37. Shah A, Andersson TM-L, Racht B, Björkholm M, Lambert PC. Survival and cure of acute myeloid leukaemia in England, 1971-2006: a population-based study. *Br J Haematol.* 2013;162(4):509-516. doi:10.1111/bjh.12425.
 38. Hulegårdh E, Nilsson C, Lazarevic V, et al. Characterization and prognostic features of secondary acute myeloid leukemia in a population-based setting: a report from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Am J Hematol.* 2015;90(3):208-214. doi:10.1002/ajh.23908.
 39. Sangle NA, Perkins SL. Core-binding factor acute myeloid leukemia. *Arch Pathol Lab Med.* 2011;135(11):1504-1509. doi:10.5858/arpa.2010-0482-RS.
 40. Bullinger L, Döhner K, Döhner H. Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways. *J Clin Oncol.* 2017;35(9):934-946. doi:10.1200/JCO.2016.71.2208.
 41. Shurin MR, Esche C, Lotze MT. FLT3: receptor and ligand. Biology and potential clinical application. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1998;9(1):37-48. doi:10.1016/S1359-6101(97)00035-X.
 42. Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Care RS, Peake IR, Reilly JT. Genomic structure of human FLT3: implications for mutational analysis. *Br J Haematol.* 2001;113(4):1076-1077. doi:10.1046/j.1365-2141.2001.02821.x.
 43. Verstraete K, Savvides SN. Extracellular assembly and activation principles of oncogenic class III receptor tyrosine kinases. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(11):753-766. doi:10.1038/nrc3371.
 44. Chen Y, Pan Y, Guo Y, et al. Tyrosine kinase inhibitors targeting FLT3 in the treatment of acute myeloid leukemia. *Stem cell Investig.* 2017;4(6):48. doi:10.21037/sci.2017.05.04.
 45. Verstraete K, Vandriessche G, Januar M, et al. Structural insights into the extracellular assembly of the hematopoietic Flt3 signaling complex. *Blood.* 2011;118(1):60-68. doi:10.1182/blood-2011-01-329532.
 46. Rosnet O, Schiff C, Pébusque MJ, et al. Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells. *Blood.* 1993;82(4):1110-1119.
 47. Weisel KC, Yildirim S, Schweikle E, Kanz L, Möhle R. Regulation of FLT3 and its ligand in normal hematopoietic progenitor cells. *Ann Hematol.* 2009;88(3):203-211. doi:10.1007/s00277-008-0605-6.
 48. Parcells BW, Ikeda AK, Simms-Waldrup T, Moore TB, Sakamoto KM. FMS-like tyrosine kinase 3 in normal hematopoiesis and acute myeloid leukemia. *Stem Cells.* 2006;24(5):1174-1184. doi:10.1634/stemcells.2005-0519.

49. Swords R, Freeman C, Giles F. Targeting the FMS-like tyrosine kinase 3 in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2012;26(10):2176-2185. doi:10.1038/leu.2012.114.
50. Stirewalt DL, Radich JP. The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(9):650-665. doi:10.1038/nrc1169.
51. Small D, Levenstein M, Kim E, et al. STK-1, the human homolog of Flk-2/Flt-3, is selectively expressed in CD34+ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(2):459-463. doi:10.1073/pnas.91.2.459.
52. Adolfsson J, Månsson R, Buza-Vidas N, et al. Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell*. 2005;121(2):295-306. doi:10.1016/j.cell.2005.02.013.
53. Mackarechtschian K, Hardin JD, Moore KA, Boast S, Goff SP, Lemischka IR. Targeted disruption of the flk2/flt3 gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. *Immunity*. 1995;3(1):147-161.
54. McKenna HJ, Stocking KL, Miller RE, et al. Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood*. 2000;95(11):3489-3497.
55. Griffith J, Black J, Faerman C, et al. The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Mol Cell*. 2004;13(2):169-178. doi:10.1016/S1097-2765(03)00505-7.
56. Grafone T, Palmisano M, Nicci C, Storti S. An overview on the role of FLT3-tyrosine kinase receptor in acute myeloid leukemia: biology and treatment. *Oncol Rev*. 2012;6(1):e8. doi:10.4081/oncol.2012.e8.
57. Herschbein L, Liesveld JL. Dueling for dual inhibition: Means to enhance effectiveness of PI3K/Akt/mTOR inhibitors in AML. *Blood Rev*. 2018; 32(3):235-248. doi:10.1016/j.blre.2017.11.006.
58. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(7):489-501. doi:10.1038/nrc839.
59. Small D. FLT3 mutations: biology and treatment. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr*. 2006:178-184. doi:10.1182/asheducation-2006.1.178.
60. Birg F, Courcoul M, Rosnet O, et al. Expression of the FMS/KIT-like gene FLT3 in human acute leukemias of the myeloid and lymphoid lineages. *Blood*. 1992;80(10):2584-2593.
61. Carow CE, Levenstein M, Kaufmann SH, et al. Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Flk2) in human leukemias. *Blood*. 1996;87(3):1089-1096.
62. Zheng R, Bailey E, Nguyen B, et al. Further activation of FLT3 mutants by FLT3 ligand. *Oncogene*. 2011;30(38):4004-4014. doi:10.1038/onc.2011.110.
63. Zheng R, Levis M, Piloto O, et al. FLT3 ligand causes autocrine signaling in acute myeloid leukemia cells. *Blood*. 2004;103(1):267-274. doi:10.1182/blood-2003-06-1969.
64. Hirsch P, Zhang Y, Tang R, et al. Genetic hierarchy and temporal variegation in the clonal history of acute myeloid leukaemia. *Nat Commun*. 2016;7:12475. doi:10.1038/ncomms12475.
65. Levis M, Murphy KM, Pham R, et al. Internal tandem duplications of the FLT3 gene are present in leukemia stem cells. *Blood*. 2005;106(2):673-680.

- doi:10.1182/blood-2004-05-1902.
66. Nakao M, Yokota S, Iwai T, et al. Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 1996;10(12):1911-1918.
 67. Levis M, Small D. FLT3: ITD does matter in leukemia. *Leukemia*. 2003;17(9):1738-1752. doi:10.1038/sj.leu.2403099.
 68. Kiyoi H, Ohno R, Ueda R, Saito H, Naoe T. Mechanism of constitutive activation of FLT3 with internal tandem duplication in the juxtamembrane domain. *Oncogene*. 2002;21(16):2555-2563. doi:10.1038/sj.onc.1205332.
 69. Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood*. 2001;97(8):2434-2439. doi:10.1182/blood.V97.8.2434.
 70. Janke H, Pastore F, Schumacher D, et al. Activating FLT3 mutants show distinct gain-of-function phenotypes in vitro and a characteristic signaling pathway profile associated with prognosis in acute myeloid leukemia. *PLoS One*. 2014;9(3):e89560. doi:10.1371/journal.pone.0089560.
 71. Choudhary C, Schwäble J, Brandts C, et al. AML-associated *Flt3* kinase domain mutations show signal transduction differences compared with *Flt3* ITD mutations. *Blood*. 2005;106(1):265-273. doi:10.1182/blood-2004-07-2942.
 72. Pratz KW, Levis M. How I treat FLT3-mutated AML. *Blood*. 2017;129(5):565-571. doi:10.1182/blood-2016-09-693648.
 73. Lim SH, Dubielecka PM, Raghunathan VM. Molecular targeting in acute myeloid leukemia. *J Transl Med*. 2017;15(1):183. doi:10.1186/s12967-017-1281-x.
 74. Schnittger S, Schoch C, Dugas M, et al. Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood*. 2002;100(1):59-66.
 75. Fröhling S, Schlenk RF, Breitnick J, et al. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood*. 2002;100(13):4372-4380. doi:10.1182/blood-2002-05-1440.
 76. Mead AJ, Linch DC, Hills RK, Wheatley K, Burnett AK, Gale RE. FLT3 tyrosine kinase domain mutations are biologically distinct from and have a significantly more favorable prognosis than FLT3 internal tandem duplications in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2007;110(4):1262-1270. doi:10.1182/blood-2006-04-015826.
 77. Yanada M, Matsuo K, Suzuki T, Kiyoi H, Naoe T. Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations for acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Leukemia*. 2005;19(8):1345-1349. doi:10.1038/sj.leu.2403838.
 78. Bailey E, Li L, Duffield AS, Ma HS, Huso DL, Small D. FLT3/D835Y mutation knock-in mice display less aggressive disease compared with FLT3/internal tandem duplication (ITD) mice. *Proc Natl Acad Sci*. 2013;110(52):21113-21118. doi:10.1073/pnas.1310559110.
 79. Li L, Piloto O, Nguyen HB, et al. Knock-in of an internal tandem duplication mutation into murine FLT3 confers myeloproliferative disease in a mouse model. *Blood*. 2008;111(7):3849-3858. doi:10.1182/blood-2007-08-109942.
 80. Kats LM, Reschke M, Taulli R, et al. Proto-oncogenic role of mutant IDH2 in leukemia initiation and maintenance. *Cell Stem Cell*. 2014;14(3):329-341.

- doi:10.1016/j.stem.2013.12.016.
81. Stubbs MC, Kim YM, Krivtsov A V, et al. MLL-AF9 and FLT3 cooperation in acute myelogenous leukemia: development of a model for rapid therapeutic assessment. *Leukemia*. 2008;22(1):66-77. doi:10.1038/sj.leu.2404951.
 82. Kim H, Kojima K, Swindle CS, et al. FLT3-ITD cooperates with inv(16) to promote progression to acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008;111(3):1567-1574. doi:10.1182/blood-2006-06-030312.
 83. Rau R, Magoon D, Greenblatt S, et al. NPMc+ cooperates with Flt3/ITD mutations to cause acute leukemia recapitulating human disease. *Exp Hematol*. 2014;42(2):101-13.e5. doi:10.1016/j.exphem.2013.10.005.
 84. Gallogly MM, Lazarus HM. Midostaurin: an emerging treatment for acute myeloid leukemia patients. *J Blood Med*. 2016;7:73-83. doi:10.2147/JBM.S100283.
 85. Cornelissen JJ, Blaise D. Hematopoietic stem cell transplantation for patients with AML in first complete remission. *Blood*. 2016;127(1):62-70. doi:10.1182/blood-2015-07-604546.
 86. Dombret H, Gardin C. An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia. *Blood*. 2016;127(1):53-61. doi:10.1182/blood-2015-08-604520.
 87. Yanada M, Matsuo K, Emi N, Naoe T. Efficacy of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation depends on cytogenetic risk for acute myeloid leukemia in first disease remission: a metaanalysis. *Cancer*. 2005;103(8):1652-1658. doi:10.1002/cncr.20945.
 88. Koreth J, Schlenk R, Kopecky KJ, et al. Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission: systematic review and meta-analysis of prospective clinical trials. *JAMA*. 2009;301(22):2349-2361. doi:10.1001/jama.2009.813.
 89. Szer J. The prevalent predicament of relapsed acute myeloid leukemia. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr*. 2012;2012:43-48. doi:10.1182/asheducation-2012.1.43.
 90. Faderl S, Verstovsek S, Cortes J, et al. Clofarabine and cytarabine combination as induction therapy for acute myeloid leukemia (AML) in patients 50 years of age or older. *Blood*. 2006;108(1):45-51. doi:10.1182/blood-2005-08-3294.
 91. Burnett AK, Russell NH, Hills RK, et al. A comparison of clofarabine with ara-C, each in combination with daunorubicin as induction treatment in older patients with acute myeloid leukaemia. *Leukemia*. 2017;31(2):310-317. doi:10.1038/leu.2016.225.
 92. Holowiecki J, Grosicki S, Giebel S, et al. Cladribine, but not fludarabine, added to daunorubicin and cytarabine during induction prolongs survival of patients with acute myeloid leukemia: a multicenter, randomized phase III study. *J Clin Oncol*. 2012;30(20):2441-2448. doi:10.1200/JCO.2011.37.1286.
 93. Sallman DA, Lancet JE. What are the most promising new agents in acute myeloid leukemia? *Curr Opin Hematol*. 2017;24(2):99-107. doi:10.1097/MOH.0000000000000319.
 94. Amadori S, Succi S, Stasi R, et al. Sequential combination of gemtuzumab ozogamicin and standard chemotherapy in older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia: results of a randomized phase III trial by the EORTC and GIMEMA consortium (AML-17). *J Clin Oncol*. 2013;31(35):4424-4430. doi:10.1200/JCO.2013.49.0771.

95. U.S. Food and Drug Administration. Press Announcements - FDA approves first treatment for certain types of poor-prognosis acute myeloid leukemia. <https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm569883.htm>. Published 2017. Accessed November 6, 2017.
96. Norsworthy KJ, Ko C, Lee JE, et al. FDA Approval Summary: Mylotarg for Treatment of Patients with Relapsed or Refractory CD33-Positive Acute Myeloid Leukemia. *Oncologist*. April 2018;theoncologist.2017-0604. doi:10.1634/theoncologist.2017-0604.
97. Levis M, Ravandi F, Wang ES, 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):3294-3301. doi:10.1182/blood-2010-08-301796.
98. Al-Kali A, Cortes J, Faderl S, et al. Patterns of molecular response to and relapse after combination of sorafenib, idarubicin, and cytarabine in patients with FLT3 mutant acute myeloid leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2011;11(4):361-366. doi:10.1016/j.clml.2011.06.007.
99. Ravandi F, Cortes JE, Jones D, et al. Phase I/II study of combination therapy with sorafenib, idarubicin, and cytarabine in younger patients with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2010;28(11):1856-1862. doi:10.1200/JCO.2009.25.4888.
100. Stone RM, Fischer T, Paquette R, et al. Phase IB study of the FLT3 kinase inhibitor midostaurin with chemotherapy in younger newly diagnosed adult patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2012;26(9):2061-2068. doi:10.1038/leu.2012.115.
101. Stone RM, Mandrekar S, Sanford BL, et al. The Multi-Kinase Inhibitor Midostaurin (M) Prolongs Survival Compared with Placebo (P) in Combination with Daunorubicin (D)/Cytarabine (C) Induction (ind), High-Dose C Consolidation (consol), and As Maintenance (maint) Therapy in Newly Diagnosed Acute Mye. *57th ASH Annu Meet Expo*. 2015:Abstract 6.
102. Daver N, Cortes J, Ravandi F, et al. Secondary mutations as mediators of resistance to targeted therapy in leukemia. *Blood*. 2015;125(21):3236-3245. doi:10.1182/blood-2014-10-605808.
103. Chow LQM, Eckhardt SG. Sunitinib: from rational design to clinical efficacy. *J Clin Oncol*. 2007;25(7):884-896. doi:10.1200/JCO.2006.06.3602.
104. Mendel DB, Laird AD, Xin X, et al. In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res*. 2003;9(1):327-337.
105. O'Farrell AM, Abrams TJ, Yuen HA, et al. SU11248 is a novel FLT3 tyrosine kinase inhibitor with potent activity in vitro and in vivo. *Blood*. 2003;101(9):3597-3605. doi:10.1182/blood-2002-07-2307.
106. Fiedler W, Serve H, Döhner H, 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):986-993. doi:10.1182/blood-2004-05-1846.
107. O'Farrell A-M, Foran JM, Fiedler W, et al. An innovative phase I clinical study demonstrates inhibition of FLT3 phosphorylation by SU11248 in acute myeloid leukemia patients. *Clin Cancer Res*. 2003;9(15):5465-5476.

108. Kancha RK, Grundler R, Peschel C, Duyster J. Sensitivity toward sorafenib and sunitinib varies between different activating and drug-resistant FLT3-ITD mutations. *Exp Hematol*. 2007;35(10):1522-1526. doi:10.1016/j.exphem.2007.07.008.
109. Fiedler W, Kayser S, Kebenko M, et al. A phase I/II study of sunitinib and intensive chemotherapy in patients over 60 years of age with acute myeloid leukaemia and activating FLT3 mutations. *Br J Haematol*. 2015;169(5):694-700. doi:10.1111/bjh.13353.
110. Hasskarl J. Sorafenib. *Recent Results Cancer Res*. 2010;184:61-70. doi:10.1007/978-3-642-01222-8_5.
111. Pratz KW, Cho E, Levis MJ, et al. A pharmacodynamic study of sorafenib in patients with relapsed and refractory acute leukemias. *Leukemia*. 2010;24(8):1437-1444. doi:10.1038/leu.2010.132.
112. Delmonte J, Kantarjian HM, Andreeff M, et al. Update of a Phase I Study of Sorafenib in Patients with Refractory/Relapsed Acute Myeloid Leukemia or High-Risk Myelodysplastic Syndrome. *Blood*. 2007;110(11).
113. Borthakur G, Kantarjian H, Ravandi F, et al. Phase I study of sorafenib in patients with refractory or relapsed acute leukemias. *Haematologica*. 2011;96(1):62-68. doi:10.3324/haematol.2010.030452.
114. Man CH, Fung TK, Ho C, et al. Sorafenib treatment of FLT3-ITD(+) acute myeloid leukemia: favorable initial outcome and mechanisms of subsequent nonresponsiveness associated with the emergence of a D835 mutation. *Blood*. 2012;119(22):5133-5143. doi:10.1182/blood-2011-06-363960.
115. Serve H, Krug U, Wagner R, et al. Sorafenib in combination with intensive chemotherapy in elderly patients with acute myeloid leukemia: results from a randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Oncol*. 2013;31(25):3110-3118. doi:10.1200/JCO.2012.46.4990.
116. Röhlig C, Serve H, Hüttmann A, et al. Addition of sorafenib versus placebo to standard therapy in patients aged 60 years or younger with newly diagnosed acute myeloid leukaemia (SORAML): a multicentre, phase 2, randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2015;16(16):1691-1699. doi:10.1016/S1470-2045(15)00362-9.
117. Uy GL, Mandrekar SJ, Laumann K, et al. A phase 2 study incorporating sorafenib into the chemotherapy for older adults with FLT3-mutated acute myeloid leukemia: CALGB 11001. *Blood Adv*. 2017;1(5):331-340. doi:10.1182/bloodadvances.2016003053.
118. Weisberg E, Boulton C, Kelly LM, et al. Inhibition of mutant FLT3 receptors in leukemia cells by the small molecule tyrosine kinase inhibitor PKC412. *Cancer Cell*. 2002;1(5):433-443. doi:10.1016/S1535-6108(02)00069-7.
119. Heidel F, Solem FK, Breitenbuecher F, et al. Clinical resistance to the kinase inhibitor PKC412 in acute myeloid leukemia by mutation of Asn-676 in the FLT3 tyrosine kinase domain. *Blood*. 2006;107(1):293-300. doi:10.1182/blood-2005-06-2469.
120. Stone RM, DeAngelo DJ, Klimek V, et al. Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412. *Blood*. 2005;105(1):54-60. doi:10.1182/blood-2004-03-0891.
121. Fischer T, Stone RM, Deangelo DJ, 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. *J Clin Oncol*. 2010;28(28):4339-4345. doi:10.1200/JCO.2010.28.9678.
122. Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *N Engl J Med*. 2017;377(5):454-464. doi:10.1056/NEJMoa1614359.
123. Levis M. Midostaurin approved for FLT3-mutated AML. *Blood*. 2017;129(26):3403-3406. doi:10.1182/blood-2017-05-782292.
124. Récher C, Beyne-Rauzy O, Demur C, et al. Antileukemic activity of rapamycin in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2005;105(6):2527-2534. doi:10.1182/blood-2004-06-2494.
125. Boehm A, Mayerhofer M, Herndlhofer S, et al. Evaluation of in vivo antineoplastic effects of rapamycin in patients with chemotherapy-refractory AML. *Eur J Intern Med*. 2009;20(8):775-778. doi:10.1016/j.ejim.2009.09.007.
126. Rizzieri DA, Feldman E, Dipersio JF, et al. A phase 2 clinical trial of deforolimus (AP23573, MK-8669), a novel mammalian target of rapamycin inhibitor, in patients with relapsed or refractory hematologic malignancies. *Clin Cancer Res*. 2008;14(9):2756-2762. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1372.
127. Yee KWL, Zeng Z, Konopleva M, et al. Phase I/II study of the mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus (RAD001) in patients with relapsed or refractory hematologic malignancies. *Clin Cancer Res*. 2006;12(17):5165-5173. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0764.
128. Callera F, Lopes CO, Rosa ES, Mulin CC. Lack of antileukemic activity of rapamycin in elderly patients with acute myeloid leukemia evolving from a myelodysplastic syndrome. *Leuk Res*. 2008;32(10):1633-1634. doi:10.1016/j.leukres.2008.02.004.
129. Amadori S, Stasi R, Martelli AM, et al. Temsirolimus, an mTOR inhibitor, in combination with lower-dose clofarabine as salvage therapy for older patients with acute myeloid leukaemia: results of a phase II GIMEMA study (AML-1107). *Br J Haematol*. 2012;156(2):205-212. doi:10.1111/j.1365-2141.2011.08940.x.
130. Park S, Chapuis N, Saint Marcoux F, et al. A phase Ib GOELAMS study of the mTOR inhibitor RAD001 in association with chemotherapy for AML patients in first relapse. *Leukemia*. 2013;27(7):1479-1486. doi:10.1038/leu.2013.17.
131. Perl AE, Kasner MT, Tsai DE, et al. A phase I study of the mammalian target of rapamycin inhibitor sirolimus and MEC chemotherapy in relapsed and refractory acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res*. 2009;15(21):6732-6739. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0842.
132. Tamburini J, Chapuis N, Bardet V, et al. Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition activates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt by up-regulating insulin-like growth factor-1 receptor signaling in acute myeloid leukemia: rationale for therapeutic inhibition of both pathways. *Blood*. 2008;111(1):379-382. doi:10.1182/blood-2007-03-080796.
133. Sun S-Y, Rosenberg LM, Wang X, et al. Activation of Akt and eIF4E survival pathways by rapamycin-mediated mammalian target of rapamycin inhibition. *Cancer Res*. 2005;65(16):7052-7058. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0917.
134. Conciatori F, Ciuffreda L, Bazzichetto C, et al. mTOR Cross-Talk in Cancer and Potential for Combination Therapy. *Cancers (Basel)*. 2018;10(1).

- doi:10.3390/cancers10010023.
135. Altman JK, Sassano A, Kaur S, et al. Dual mTORC2/mTORC1 targeting results in potent suppressive effects on acute myeloid leukemia (AML) progenitors. *Clin Cancer Res.* 2011;17(13):4378-4388. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2285.
 136. Willems L, Chapuis N, Puissant A, et al. The dual mTORC1 and mTORC2 inhibitor AZD8055 has anti-tumor activity in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2012;26(6):1195-1202. doi:10.1038/leu.2011.339.
 137. Zeng Z, Shi YX, Tsao T, et al. Targeting of mTORC1/2 by the mTOR kinase inhibitor PP242 induces apoptosis in AML cells under conditions mimicking the bone marrow microenvironment. *Blood.* 2012;120(13):2679-2689. doi:10.1182/blood-2011-11-393934.
 138. Chapuis N, Tamburini J, Green AS, et al. Dual inhibition of PI3K and mTORC1/2 signaling by NVP-BEZ235 as a new therapeutic strategy for acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res.* 2010;16(22):5424-5435. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1102.
 139. Kampa-Schittenhelm KM, Heinrich MC, Akmut F, et al. Cell cycle-dependent activity of the novel dual PI3K-MTORC1/2 inhibitor NVP-BGT226 in acute leukemia. *Mol Cancer.* 2013;12(46):46. doi:10.1186/1476-4598-12-46.
 140. Piddock RE, Bowles KM, Rushworth SA. The Role of PI3K Isoforms in Regulating Bone Marrow Microenvironment Signaling Focusing on Acute Myeloid Leukemia and Multiple Myeloma. *Cancers (Basel).* 2017;9(4). doi:10.3390/cancers9040029.
 141. Sujobert P, Bardet V, Cornillet-Lefebvre P, et al. Essential role for the p110delta isoform in phosphoinositide 3-kinase activation and cell proliferation in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2005;106(3):1063-1066. doi:10.1182/blood-2004-08-3225.
 142. Ragon BK, Kantarjian H, Jabbour E, et al. Buparlisib, a PI3K inhibitor, demonstrates acceptable tolerability and preliminary activity in a phase I trial of patients with advanced leukemias. *Am J Hematol.* 2017;92(1):7-11. doi:10.1002/ajh.24568.
 143. Sampath D, Malik A, Plunkett W, et al. Phase I clinical, pharmacokinetic, and pharmacodynamic study of the Akt-inhibitor triciribine phosphate monohydrate in patients with advanced hematologic malignancies. *Leuk Res.* 2013;37(11):1461-1467. doi:10.1016/j.leukres.2013.07.034.
 144. Konopleva MY, Walter RB, Faderl SH, et al. Preclinical and early clinical evaluation of the oral AKT inhibitor, MK-2206, for the treatment of acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res.* 2014;20(8):2226-2235. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1978.
 145. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature.* 1994;367(6464):645-648. doi:10.1038/367645a0.
 146. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* 1997;3(7):730-737. doi:10.1038/nm0798-822.
 147. Sarry J, Murphy K, Perry R, et al. Human acute myelogenous leukemia stem cells are rare and heterogeneous when assayed in NOD/SCID/IL2R γ -deficient mice. *J Clin Invest.* 2011;121(1):384-395. doi:10.1172/JCI41495.
 148. Thomas D, Majeti R. Biology and relevance of human acute myeloid leukemia

- stem cells. *Blood*. 2017;129(12):1577-1585. doi:10.1182/blood-2016-10-696054.
149. Hanekamp D, Cloos J, Schuurhuis GJ. Leukemic stem cells: identification and clinical application. *Int J Hematol*. 2017;105(5):549-557. doi:10.1007/s12185-017-2221-5.
150. Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood*. 2008;112(13):4793-4807. doi:10.1182/blood-2008-08-077941.
151. Eppert K, Takenaka K, Lechman ER, et al. Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. *Nat Med*. 2011;17(9):1086-1093. doi:10.1038/nm.2415.
152. Horton SJ, Huntly BJP. Recent advances in acute myeloid leukemia stem cell biology. *Haematologica*. 2012;97(7):966-974. doi:10.3324/haematol.2011.054734.
153. Cozzio A, Passegué E, Ayton PM, Karsunky H, Cleary ML, Weissman IL. Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors. *Genes Dev*. 2003;17(24):3029-3035. doi:10.1101/gad.1143403.
154. Goardon N, Marchi E, Atzberger A, et al. Coexistence of LMPP-like and GMP-like leukemia stem cells in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2011;19(1):138-152. doi:10.1016/j.ccr.2010.12.012.
155. Jan M, Snyder TM, Corces-Zimmerman MR, et al. Clonal evolution of preleukemic hematopoietic stem cells precedes human acute myeloid leukemia. *Sci Transl Med*. 2012;4(149):149ra118. doi:10.1126/scitranslmed.3004315.
156. Costello RT, Mallet F, Gaugler B, et al. Human acute myeloid leukemia CD34+/CD38- progenitor cells have decreased sensitivity to chemotherapy and Fas-induced apoptosis, reduced immunogenicity, and impaired dendritic cell transformation capacities. *Cancer Res*. 2000;60(16):4403-4411.
157. Lane SW, Scadden DT, Gilliland DG. The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities. *Blood*. 2009;114(6):1150-1157. doi:10.1182/blood-2009-01-202606.
158. Butler JM, Nolan DJ, Vertes EL, et al. Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010;6(3):251-264. doi:10.1016/j.stem.2010.02.001.
159. Raaijmakers MHGP. Niche contributions to oncogenesis: emerging concepts and implications for the hematopoietic system. *Haematologica*. 2011;96(7):1041-1048. doi:10.3324/haematol.2010.028035.
160. Nilsson SK, Johnston HM, Whitty GA, et al. Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 2005;106(4):1232-1239. doi:10.1182/blood-2004-11-4422.
161. Adams GB, Chabner KT, Alley IR, et al. Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. *Nature*. 2006;439(7076):599-603. doi:10.1038/nature04247.
162. Medyouf H. The microenvironment in human myeloid malignancies: emerging concepts and therapeutic implications. *Blood*. 2017;129(12):1617-1626. doi:10.1182/blood-2016-11-696070.
163. Ishikawa F, Yoshida S, Saito Y, et al. Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. *Nat Biotechnol*. 2007;25(11):1315-1321. doi:10.1038/nbt1350.

164. Kim J-A, Shim J-S, Lee G-Y, et al. Microenvironmental remodeling as a parameter and prognostic factor of heterogeneous leukemogenesis in acute myelogenous leukemia. *Cancer Res.* 2015;75(11):2222-2231. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-3379.
165. Korn C, Méndez-Ferrer S. Myeloid malignancies and the microenvironment. *Blood.* 2017;129(7):811-822. doi:10.1182/blood-2016-09-670224.
166. Shlush LI, Mitchell A, Heisler L, et al. Tracing the origins of relapse in acute myeloid leukaemia to stem cells. *Nature.* 2017;547(7661):104-108. doi:10.1038/nature22993.
167. van Rhenen A, Feller N, Kelder A, et al. High stem cell frequency in acute myeloid leukemia at diagnosis predicts high minimal residual disease and poor survival. *Clin Cancer Res.* 2005;11(18):6520-6527. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0468.
168. Terwijn M, Zeijlemaker W, Kelder A, et al. Leukemic stem cell frequency: a strong biomarker for clinical outcome in acute myeloid leukemia. *PLoS One.* 2014;9(9):e107587. doi:10.1371/journal.pone.0107587.
169. Gentles AJ, Plevritis SK, Majeti R, Alizadeh AA. Association of a leukemic stem cell gene expression signature with clinical outcomes in acute myeloid leukemia. *JAMA.* 2010;304(24):2706-2715. doi:10.1001/jama.2010.1862.
170. Taussig DC, Pearce DJ, Simpson C, et al. Hematopoietic stem cells express multiple myeloid markers: implications for the origin and targeted therapy of acute myeloid leukemia. *Blood.* 2005;106(13):4086-4092. doi:10.1182/blood-2005-03-1072.
171. van Rhenen A, van Dongen GAMS, Kelder A, et al. The novel AML stem cell associated antigen CLL-1 aids in discrimination between normal and leukemic stem cells. *Blood.* 2007;110(7):2659-2666. doi:10.1182/blood-2007-03-083048.
172. Jan M, Chao MP, Cha AC, et al. Prospective separation of normal and leukemic stem cells based on differential expression of TIM3, a human acute myeloid leukemia stem cell marker. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(12):5009-5014. doi:10.1073/pnas.1100551108.
173. Kersten B, Valkering M, Wouters R, et al. CD45RA, a specific marker for leukaemia stem cell sub-populations in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2016;173(2):219-235. doi:10.1111/bjh.13941.
174. Hosen N, Park CY, Tatsumi N, et al. CD96 is a leukemic stem cell-specific marker in human acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(26):11008-11013. doi:10.1073/pnas.0704271104.
175. Takebe N, Harris PJ, Warren RQ, Ivy SP. Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways. *Nat Rev Clin Oncol.* 2011;8(2):97-106. doi:10.1038/nrclinonc.2010.196.
176. Merchant AA, Matsui W. Targeting Hedgehog--a cancer stem cell pathway. *Clin Cancer Res.* 2010;16(12):3130-3140. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2846.
177. Bangs F, Anderson K V. Primary Cilia and Mammalian Hedgehog Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017;9(5):1-22. doi:10.1101/cshperspect.a028175.
178. Ingham PW, Placzek M. Orchestrating ontogenesis: variations on a theme by sonic hedgehog. *Nat Rev Genet.* 2006;7(11):841-850. doi:10.1038/nrg1969.
179. Beachy PA, Karhadkar SS, Berman DM. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature.* 2004;432(7015):324-331. doi:10.1038/nature03100.
180. Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development:

- paradigms and principles. *Genes Dev.* 2001;15(23):3059-3087. doi:10.1101/gad.938601.
181. Briscoe J, Thérond PP. The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(7):416-429. doi:10.1038/nrm3598.
182. Petrova R, Joyner AL. Roles for Hedgehog signaling in adult organ homeostasis and repair. *Development.* 2014;141(18):3445-3457. doi:10.1242/dev.083691.
183. Hallikas O, Palin K, Sinjushina N, et al. Genome-wide prediction of mammalian enhancers based on analysis of transcription-factor binding affinity. *Cell.* 2006;124(1):47-59. doi:10.1016/j.cell.2005.10.042.
184. Jackman M, Ditzel HJ, Gjerstorff MF, et al. *Encyclopedia of Cancer.* (Schwab M, ed.). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011. doi:10.1007/978-3-642-16483-5.
185. Sasaki H, Nishizaki Y, Hui C, Nakafuku M, Kondoh H. Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development.* 1999;126(17):3915-3924.
186. Bai CB, Auerbach W, Lee JS, Stephen D, Joyner AL. Gli2, but not Gli1, is required for initial Shh signaling and ectopic activation of the Shh pathway. *Development.* 2002;129(20):4753-4761.
187. Park HL, Bai C, Platt KA, et al. Mouse Gli1 mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a Gli2 mutation. *Development.* 2000;127(8):1593-1605.
188. Hui C, Angers S. Gli proteins in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2011;27(1):513-537. doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154048.
189. Wang B, Fallon JF, Beachy PA. Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell.* 2000;100(4):423-434. doi:10.1016/S0092-8674(00)80678-9.
190. Arensdorf AM, Marada S, Ogden SK. Smoothed Regulation: A Tale of Two Signals. *Trends Pharmacol Sci.* 2016;37(1):62-72. doi:10.1016/j.tips.2015.09.001.
191. Ruiz i Altaba A, Mas C, Stecca B. The Gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer. *Trends Cell Biol.* 2007;17(9):438-447. doi:10.1016/j.tcb.2007.06.007.
192. Ma Y, Erkner A, Gong R, et al. Hedgehog-mediated patterning of the mammalian embryo requires transporter-like function of dispatched. *Cell.* 2002;111(1):63-75. doi:10.1016/S0092-8674(02)00977-7.
193. Stone DM, Hynes M, Armanini M, et al. The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature.* 1996;384(6605):129-134. doi:10.1038/384129a0.
194. Rohatgi R, Milenkovic L, Scott MP. Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science.* 2007;317(5836):372-376. doi:10.1126/science.1139740.
195. Goetz SC, Anderson K V. The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nat Rev Genet.* 2010;11(5):331-344. doi:10.1038/nrg2774.
196. Singh M, Chaudhry P, Merchant AA. Primary cilia are present on human blood and bone marrow cells and mediate Hedgehog signaling. *Exp Hematol.* 2016;44(12):1181-1187.e2. doi:10.1016/j.exphem.2016.08.009.
197. Pazour GJ, Witman GB. The vertebrate primary cilium is a sensory organelle. *Curr Opin Cell Biol.* 2003;15(1):105-110. doi:10.1016/S0955-0674(02)00012-1.

198. Muhammad H, Rais Y, Miosge N, Ornan EM. The primary cilium as a dual sensor of mechanochemical signals in chondrocytes. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69(13):2101-2107. doi:10.1007/s00018-011-0911-3.
199. Rosenbaum JL, Witman GB. Intraflagellar transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(11):813-825. doi:10.1038/nrm952.
200. Tempé D, Casas M, Karaz S, Blanchet-Tournier M-F, Concordet J-P. Multisite protein kinase A and glycogen synthase kinase 3 β phosphorylation leads to Gli3 ubiquitination by SCF β TrCP. *Mol Cell Biol*. 2006;26(11):4316-4326. doi:10.1128/MCB.02183-05.
201. Wang B, Li Y. Evidence for the direct involvement of β TrCP in Gli3 protein processing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(1):33-38. doi:10.1073/pnas.0509927103.
202. Pan Y, Wang B. A novel protein-processing domain in Gli2 and Gli3 differentially blocks complete protein degradation by the proteasome. *J Biol Chem*. 2007;282(15):10846-10852. doi:10.1074/jbc.M608599200.
203. Pan Y, Bai CB, Joyner AL, Wang B. Sonic hedgehog signaling regulates Gli2 transcriptional activity by suppressing its processing and degradation. *Mol Cell Biol*. 2006;26(9):3365-3377. doi:10.1128/MCB.26.9.3365-3377.2006.
204. Pan Y, Wang C, Wang B. Phosphorylation of Gli2 by protein kinase A is required for Gli2 processing and degradation and the Sonic Hedgehog-regulated mouse development. *Dev Biol*. 2009;326(1):177-189. doi:10.1016/j.ydbio.2008.11.009.
205. Pak E, Segal RA. Hedgehog Signal Transduction: Key Players, Oncogenic Drivers, and Cancer Therapy. *Dev Cell*. 2016;38(4):333-344. doi:10.1016/j.devcel.2016.07.026.
206. Niewiadomski P, Kong JH, Ahrends R, et al. Gli protein activity is controlled by multisite phosphorylation in vertebrate Hedgehog signaling. *Cell Rep*. 2014;6(1):168-181. doi:10.1016/j.celrep.2013.12.003.
207. Cheng SY, Bishop JM. Suppressor of Fused represses Gli-mediated transcription by recruiting the SAP18-mSin3 corepressor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(8):5442-5447. doi:10.1073/pnas.082096999.
208. Kise Y, Morinaka A, Teglund S, Miki H. Sufu recruits GSK3 β for efficient processing of Gli3. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;387(3):569-574. doi:10.1016/j.bbrc.2009.07.087.
209. Cheung HO-L, Zhang X, Ribeiro A, et al. The kinesin protein Kif7 is a critical regulator of Gli transcription factors in mammalian hedgehog signaling. *Sci Signal*. 2009;2(76):ra29. doi:10.1126/scisignal.2000405.
210. Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signalling: Kif7 is not that fishy after all. *Curr Biol*. 2009;19(17):R729-31. doi:10.1016/j.cub.2009.07.060.
211. He M, Subramanian R, Bangs F, et al. The kinesin-4 protein Kif7 regulates mammalian Hedgehog signalling by organizing the cilium tip compartment. *Nat Cell Biol*. 2014;16(7):663-672. doi:10.1038/ncb2988.
212. Humke EW, Dorn K V., Milenkovic L, Scott MP, Rohatgi R. The output of Hedgehog signaling is controlled by the dynamic association between Suppressor of Fused and the Gli proteins. *Genes Dev*. 2010;24(7):670-682. doi:10.1101/gad.1902910.
213. Rohatgi R, Milenkovic L, Corcoran RB, Scott MP. Hedgehog signal transduction by Smoothened: pharmacologic evidence for a 2-step activation process. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(9):3196-3201. doi:10.1073/pnas.0813373106.

214. Haycraft CJ, Banizs B, Aydin-Son Y, Zhang Q, Michaud EJ, Yoder BK. Gli2 and Gli3 localize to cilia and require the intraflagellar transport protein polaris for processing and function. *PLoS Genet.* 2005;1(4):e53. doi:10.1371/journal.pgen.0010053.
215. Chen M, Wilson CW, Li Y, et al. Cilium-independent regulation of Gli protein function by Sufu in Hedgehog signaling is evolutionarily conserved. *Genes Dev.* 2009;23(16):1910-1928. doi:10.1101/gad.1794109.
216. Tukachinsky H, Lopez L V., Salic A. A mechanism for vertebrate Hedgehog signaling: recruitment to cilia and dissociation of SuFu-Gli protein complexes. *J Cell Biol.* 2010;191(2):415-428. doi:10.1083/jcb.201004108.
217. Wigley WC, Fabunmi RP, Lee MG, et al. Dynamic association of proteasomal machinery with the centrosome. *J Cell Biol.* 1999;145(3):481-490. doi:10.1083/jcb.145.3.481.
218. Vokes SA, Ji H, McCuine S, et al. Genomic characterization of Gli-activator targets in sonic hedgehog-mediated neural patterning. *Development.* 2007;134(10):1977-1989. doi:10.1242/dev.001966.
219. Kenney AM, Rowitch DH. Sonic hedgehog promotes G(1) cyclin expression and sustained cell cycle progression in mammalian neuronal precursors. *Mol Cell Biol.* 2000;20(23):9055-9067. doi:10.1128/MCB.20.23.9055-9067.2000.
220. Kenney AM, Cole MD, Rowitch DH. Nmyc upregulation by sonic hedgehog signaling promotes proliferation in developing cerebellar granule neuron precursors. *Development.* 2003;130(1):15-28. doi:10.1242/dev.00182.
221. Regl G, Kasper M, Schnidar H, et al. Activation of the BCL2 promoter in response to Hedgehog/GLI signal transduction is predominantly mediated by GLI2. *Cancer Res.* 2004;64(21):7724-7731. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1085.
222. Leung C, Lingbeek M, Shakhova O, et al. Bmi1 is essential for cerebellar development and is overexpressed in human medulloblastomas. *Nature.* 2004;428(6980):337-341. doi:10.1038/nature02385.
223. Po A, Ferretti E, Miele E, et al. Hedgehog controls neural stem cells through p53-independent regulation of Nanog. *EMBO J.* 2010;29(15):2646-2658. doi:10.1038/emboj.2010.131.
224. Takanaga H, Tsuchida-Straeten N, Nishide K, Watanabe A, Aburatani H, Kondo T. Gli2 is a novel regulator of sox2 expression in telencephalic neuroepithelial cells. *Stem Cells.* 2009;27(1):165-174. doi:10.1634/stemcells.2008-0580.
225. Stecca B, Ruiz I, Altaba A. Context-dependent regulation of the GLI code in cancer by HEDGEHOG and non-HEDGEHOG signals. *J Mol Cell Biol.* 2010;2(2):84-95. doi:10.1093/jmcb/mjp052.
226. Agren M, Kogerman P, Kleman MI, Wessling M, Toftgård R. Expression of the PTCH1 tumor suppressor gene is regulated by alternative promoters and a single functional Gli-binding site. *Gene.* 2004;330:101-114. doi:10.1016/j.gene.2004.01.010.
227. Dai P, Akimaru H, Tanaka Y, Maekawa T, Nakafuku M, Ishii S. Sonic Hedgehog-induced activation of the Gli1 promoter is mediated by GLI3. *J Biol Chem.* 1999;274(12):8143-8152. doi:10.1074/jbc.274.12.8143.
228. Regl G, Neill GW, Eichberger T, et al. Human GLI2 and GLI1 are part of a positive feedback mechanism in Basal Cell Carcinoma. *Oncogene.* 2002;21(36):5529-5539. doi:10.1038/sj.onc.1205748.
229. Hu MC, Mo R, Bhella S, et al. GLI3-dependent transcriptional repression of Gli1,

- Gli2 and kidney patterning genes disrupts renal morphogenesis. *Development*. 2006;133(3):569-578. doi:10.1242/dev.02220.
230. Jagannathan-Bogdan M, Zon LI. Hematopoiesis. *Development*. 2013;140(12):2463-2467. doi:10.1242/dev.083147.
231. Lim Y, Matsui W. Hedgehog signaling in hematopoiesis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2010;20(2):129-139.
232. Dyer M a, Farrington SM, Mohn D, Munday JR, Baron MH. Indian hedgehog activates hematopoiesis and vasculogenesis and can respecify prospective neurectodermal cell fate in the mouse embryo. *Development*. 2001;128(10):1717-1730.
233. Cridland SO, Keys JR, Papathanasiou P, Perkins AC. Indian hedgehog supports definitive erythropoiesis. *Blood Cells Mol Dis*. 2009;43(2):149-155. doi:10.1016/j.bcmd.2009.04.004.
234. Dierks C, Beigi R, Guo G-R, et al. Expansion of Bcr-Abl-positive leukemic stem cells is dependent on Hedgehog pathway activation. *Cancer Cell*. 2008;14(3):238-249. doi:10.1016/j.ccr.2008.08.003.
235. Gao J, Graves S, Koch U, et al. Hedgehog signaling is dispensable for adult hematopoietic stem cell function. *Cell Stem Cell*. 2009;4(6):548-558. doi:10.1016/j.stem.2009.03.015.
236. Hofmann I, Stover EH, Cullen DE, et al. Hedgehog signaling is dispensable for adult murine hematopoietic stem cell function and hematopoiesis. *Cell Stem Cell*. 2009;4(6):559-567. doi:10.1016/j.stem.2009.03.016.
237. Zhao C, Chen A, Jamieson CH, et al. Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia. *Nature*. 2009;458(7239):776-779. doi:10.1038/nature07737.
238. Trowbridge JJ, Scott MP, Bhatia M. Hedgehog modulates cell cycle regulators in stem cells to control hematopoietic regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(38):14134-14139. doi:10.1073/pnas.0604568103.
239. Merchant A, Joseph G, Wang Q, Brennan S, Matsui W. Gli1 regulates the proliferation and differentiation of HSCs and myeloid progenitors. *Blood*. 2010;115(12):2391-2396. doi:10.1182/blood-2009-09-241703.
240. Kinzler KW, Bigner SH, Bigner DD, et al. Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. *Science*. 1987;236(4797):70-73.
241. Gorlin RJ. Nevoid basal cell carcinoma (Gorlin) syndrome. *Genet Med*. 2004;6(6):530-539. doi:10.109701.GIM.0000144188.15902.C4.
242. Johnson RL, Rothman AL, Xie J, et al. Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science*. 1996;272(5268):1668-1671. doi:10.1126/science.272.5268.1668.
243. Reifenger J, Wolter M, Knobbe CB, et al. Somatic mutations in the PTCH, SMOH, SUFUH and TP53 genes in sporadic basal cell carcinomas. *Br J Dermatol*. 2005;152(1):43-51. doi:10.1111/j.1365-2133.2005.06353.x.
244. Raffel C, Jenkins RB, Frederick L, et al. Sporadic medulloblastomas contain PTCH mutations. *Cancer Res*. 1997;57(5):842-845.
245. Taylor MD, Liu L, Raffel C, et al. Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma. *Nat Genet*. 2002;31(3):306-310. doi:10.1038/ng916.
246. Reifenger J, Wolter M, Weber RG, et al. Missense mutations in SMOH in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Cancer Res*. 1998;58(9):1798-1803.

247. Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, et al. Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature*. 2003;425(6960):846-851. doi:10.1038/nature01972.
248. Ma X, Sheng T, Zhang Y, et al. Hedgehog signaling is activated in subsets of esophageal cancers. *Int J cancer*. 2006;118(1):139-148. doi:10.1002/ijc.21295.
249. Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, Wang B, Beachy PA, Baylin SB. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature*. 2003;422(6929):313-317. doi:10.1038/nature01493.
250. Yuan Z, Goetz JA, Singh S, et al. Frequent requirement of hedgehog signaling in non-small cell lung carcinoma. *Oncogene*. 2007;26(7):1046-1055. doi:10.1038/sj.onc.1209860.
251. Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, et al. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature*. 2003;425(6960):851-856. doi:10.1038/nature02009.
252. Yauch RL, Gould SE, Scales SJ, et al. A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature*. 2008;455(7211):406-410. doi:10.1038/nature07275.
253. Tian H, Callahan CA, DuPree KJ, et al. Hedgehog signaling is restricted to the stromal compartment during pancreatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(11):4254-4259. doi:10.1073/pnas.0813203106.
254. Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, et al. Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature*. 2004;431(7009):707-712. doi:10.1038/nature02962.
255. Dierks C, Grbic J, Zirlik K, et al. Essential role of stromally induced hedgehog signaling in B-cell malignancies. *Nat Med*. 2007;13(8):944-951. doi:10.1038/nm1614.
256. Peacock CD, Wang Q, Gesell GS, et al. Hedgehog signaling maintains a tumor stem cell compartment in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(10):4048-4053. doi:10.1073/pnas.0611682104.
257. Liu Z, Xu J, He J, et al. A critical role of autocrine sonic hedgehog signaling in human CD138+ myeloma cell survival and drug resistance. *Blood*. 2014;124(13):2061-2071. doi:10.1182/blood-2014-03-557298.
258. Lin TL, Wang QH, Brown P, et al. Self-renewal of acute lymphocytic leukemia cells is limited by the Hedgehog pathway inhibitors cyclopamine and IPI-926. *PLoS One*. 2010;5(12):e15262. doi:10.1371/journal.pone.0015262.
259. Lang F, Badura S, Ruthardt M, Rieger MA, Ottmann OG. Modulation of Leukemic Stem Cell Self-Renewal and Cell Fate Decisions by Inhibition of Hedgehog Signalling in Human Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). *Blood*. 2012;120(21):2578.
260. Hegde G V., Peterson KJ, Emanuel K, et al. Hedgehog-induced survival of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells in a stromal cell microenvironment: a potential new therapeutic target. *Mol Cancer Res*. 2008;6(12):1928-1936. doi:10.1158/1541-7786.MCR-08-0142.
261. Long B, Zhu H, Zhu C, Liu T, Meng W. Activation of the Hedgehog pathway in chronic myelogenous leukemia patients. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011;30(1):8. doi:10.1186/1756-9966-30-8.
262. Kobune M, Takimoto R, Murase K, et al. Drug resistance is dramatically restored by hedgehog inhibitors in CD34+ leukemic cells. *Cancer Sci*. 2009;100(5):948-955. doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01111.x.

263. Long B, Wang L-X, Zheng F-M, et al. Targeting GLI1 Suppresses Cell Growth and Enhances Chemosensitivity in CD34+ Enriched Acute Myeloid Leukemia Progenitor Cells. *Cell Physiol Biochem*. 2016;38(4):1288-1302. doi:10.1159/000443075.
264. Wellbrock J, Latuske E, Köhler J, et al. Expression of Hedgehog pathway mediator GLI represents a negative prognostic marker in human acute myeloid leukemia and its inhibition exerts anti-leukemic effects. *Clin Cancer Res*. 2015;21(10):2388-2399. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-1059.
265. Löwenberg B, Boogaerts MA, Daenen SM, et al. Value of different modalities of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor applied during or after induction therapy of acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 1997;15(12):3496-3506. doi:10.1200/JCO.1997.15.12.3496.
266. Verhaak RGW, Wouters BJ, Erpelinck CAJ, et al. Prediction of molecular subtypes in acute myeloid leukemia based on gene expression profiling. *Haematologica*. 2009;94(1):131-134. doi:10.3324/haematol.13299.
267. Brechbiel J, Miller-Moslin K, Adjei AA. Crosstalk between hedgehog and other signaling pathways as a basis for combination therapies in cancer. *Cancer Treat Rev*. 2014;40(6):750-759. doi:10.1016/j.ctrv.2014.02.003.
268. Gu D, Xie J. Non-Canonical Hh Signaling in Cancer-Current Understanding and Future Directions. *Cancers (Basel)*. 2015;7(3):1684-1698. doi:10.3390/cancers7030857.
269. Aberger F, Hutterer E, Sternberg C, Del Burgo PJ, Hartmann TN. Acute myeloid leukemia - strategies and challenges for targeting oncogenic Hedgehog/GLI signaling. *Cell Commun Signal*. 2017;15(1):8. doi:10.1186/s12964-017-0163-4.
270. Stecca B, Mas C, Clement V, et al. Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(14):5895-5900. doi:10.1073/pnas.0700776104.
271. Stecca B, Ruiz i Altaba A. A GLI1-p53 inhibitory loop controls neural stem cell and tumour cell numbers. *EMBO J*. 2009;28(6):663-676. doi:10.1038/emboj.2009.16.
272. Zhou J, Zhu G, Huang J, et al. Non-canonical GLI1/2 activation by PI3K/AKT signaling in renal cell carcinoma: A novel potential therapeutic target. *Cancer Lett*. 2016;370(2):313-323. doi:10.1016/j.canlet.2015.11.006.
273. Kebenko M, Drenckhan A, Gros SJ, et al. ErbB2 signaling activates the Hedgehog pathway via PI3K-Akt in human esophageal adenocarcinoma: identification of novel targets for concerted therapy concepts. *Cell Signal*. 2015;27(2):373-381. doi:10.1016/j.cellsig.2014.11.022.
274. Dennler S, André J, Alexaki I, et al. Induction of sonic hedgehog mediators by transforming growth factor-beta: Smad3-dependent activation of Gli2 and Gli1 expression in vitro and in vivo. *Cancer Res*. 2007;67(14):6981-6986. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0491.
275. Wang Y, Ding Q, Yen C, et al. The crosstalk of mTOR/S6K1 and Hedgehog pathways. *Cancer Cell*. 2012;21(3):374-387. doi:10.1016/j.ccr.2011.12.028.
276. Nolan-Stevaux O, Lau J, Truitt ML, et al. GLI1 is regulated through Smoothed-independent mechanisms in neoplastic pancreatic ducts and mediates PDAC cell survival and transformation. *Genes Dev*. 2009;23(1):24-36. doi:10.1101/gad.1753809.
277. Ji Z, Mei FC, Xie J, Cheng X. Oncogenic KRAS activates hedgehog signaling

- pathway in pancreatic cancer cells. *J Biol Chem*. 2007;282(19):14048-14055. doi:10.1074/jbc.M611089200.
278. Tang Y, Gholamin S, Schubert S, et al. Epigenetic targeting of Hedgehog pathway transcriptional output through BET bromodomain inhibition. *Nat Med*. 2014;20(7):732-740. doi:10.1038/nm.3613.
279. Long J, Li B, Rodriguez-Blanco J, et al. The BET bromodomain inhibitor I-BET151 acts downstream of smoothened protein to abrogate the growth of hedgehog protein-driven cancers. *J Biol Chem*. 2014;289(51):35494-35502. doi:10.1074/jbc.M114.595348.
280. Yang H, Hu L, Liu Z, et al. Inhibition of Gli1-mediated prostate cancer cell proliferation by inhibiting the mTOR/S6K1 signaling pathway. *Oncol Lett*. 2017;14(6):7970-7976. doi:10.3892/ol.2017.7254.
281. Riobó NA, Lu K, Ai X, Haines GM, Emerson CP. Phosphoinositide 3-kinase and Akt are essential for Sonic Hedgehog signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(12):4505-4510. doi:10.1073/pnas.0504337103.
282. Pan D, Li Y, Li Z, Wang Y, Wang P, Liang Y. Gli inhibitor GANT61 causes apoptosis in myeloid leukemia cells and acts in synergy with rapamycin. *Leuk Res*. 2012;36(6):742-748. doi:10.1016/j.leukres.2012.02.012.
283. Liang H, Zheng Q-L, Fang P, et al. Targeting the PI3K/AKT pathway via GLI1 inhibition enhanced the drug sensitivity of acute myeloid leukemia cells. *Sci Rep*. 2017;7(April 2016):40361. doi:10.1038/srep40361.
284. Li X, Chen F, Zhu Q, et al. Gli-1/PI3K/AKT/NF- κ B pathway mediates resistance to radiation and is a target for reversion of responses in refractory acute myeloid leukemia cells. *Oncotarget*. April 2016. doi:10.18632/oncotarget.8844.
285. Xin M, Ji X, De La Cruz LK, Thareja S, Wang B. Strategies to target the Hedgehog signaling pathway for cancer therapy. *Med Res Rev*. 2018; 38(3):870-913. doi:10.1002/med.21482.
286. Lee ST, Welch KD, Panter KE, Gardner DR, Garrossian M, Chang C-WT. Cyclopamine: from cyclops lambs to cancer treatment. *J Agric Food Chem*. 2014;62(30):7355-7362. doi:10.1021/jf5005622.
287. Varnat F, Duquet A, Malerba M, et al. Human colon cancer epithelial cells harbour active HEDGEHOG-GLI signalling that is essential for tumour growth, recurrence, metastasis and stem cell survival and expansion. *EMBO Mol Med*. 2009;1(6-7):338-351. doi:10.1002/emmm.200900039.
288. Feldmann G, Dhara S, Fendrich V, et al. Blockade of hedgehog signaling inhibits pancreatic cancer invasion and metastases: a new paradigm for combination therapy in solid cancers. *Cancer Res*. 2007;67(5):2187-2196. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3281.
289. Incardona JP, Gaffield W, Kapur RP, Roelink H. The teratogenic Veratrum alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction. *Development*. 1998;125(18):3553-3562.
290. Taipale J, Chen JK, Cooper MK, et al. Effects of oncogenic mutations in Smoothened and Patched can be reversed by cyclopamine. *Nature*. 2000;406(6799):1005-1009. doi:10.1038/35023008.
291. Lin TL, Matsui W. Hedgehog pathway as a drug target: Smoothened inhibitors in development. *Onco Targets Ther*. 2012;5:47-58. doi:10.2147/OTT.S21957.
292. Rudin CM. Vismodegib. *Clin Cancer Res*. 2012;18(12):3218-3222. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0568.

293. Robarge KD, Brunton SA, Castanedo GM, et al. GDC-0449-a potent inhibitor of the hedgehog pathway. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009;19(19):5576-5581. doi:10.1016/j.bmcl.2009.08.049.
294. Von Hoff DD, LoRusso PM, Rudin CM, et al. Inhibition of the hedgehog pathway in advanced basal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2009;361(12):1164-1172. doi:10.1056/NEJMoa0905360.
295. LoRusso PM, Rudin CM, Reddy JC, et al. Phase I trial of hedgehog pathway inhibitor vismodegib (GDC-0449) in patients with refractory, locally advanced or metastatic solid tumors. *Clin Cancer Res*. 2011;17(8):2502-2511. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2745.
296. Sekulic A, Migden MR, Oro AE, et al. Efficacy and safety of vismodegib in advanced basal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2012;366(23):2171-2179. doi:10.1056/NEJMoa1113713.
297. Casey D, Demko S, Shord S, et al. FDA Approval Summary: Sonidegib for Locally Advanced Basal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2017;23(10):2377-2381. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-2051.
298. Munchhof MJ, Li Q, Shavnya A, et al. Discovery of PF-04449913, a Potent and Orally Bioavailable Inhibitor of Smoothed. *ACS Med Chem Lett*. 2012;3(2):106-111. doi:10.1021/ml2002423.
299. Martinelli G, Oehler VG, Papayannidis C, et al. Treatment with PF-04449913, an oral smoothed antagonist, in patients with myeloid malignancies: a phase 1 safety and pharmacokinetics study. *Lancet Haematol*. 2015;2(8):e339-46. doi:10.1016/S2352-3026(15)00096-4.
300. Schuh AC, Döhner H, Pleyer L, Seymour JF, Fenaux P, Dombret H. Azacitidine in adult patients with acute myeloid leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017;116:159-177. doi:10.1016/j.critrevonc.2017.05.010.
301. Maun HR, Wen X, Lingel A, et al. Hedgehog pathway antagonist 5E1 binds hedgehog at the pseudo-active site. *J Biol Chem*. 2010;285(34):26570-26580. doi:10.1074/jbc.M110.112284.
302. Stanton BZ, Peng LF, Maloof N, et al. A small molecule that binds Hedgehog and blocks its signaling in human cells. *Nat Chem Biol*. 2009;5(3):154-156. doi:10.1038/nchembio.142.
303. O'Toole SA, Machalek DA, Shearer RF, et al. Hedgehog overexpression is associated with stromal interactions and predicts for poor outcome in breast cancer. *Cancer Res*. 2011;71(11):4002-4014. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-3738.
304. Lauth M, Bergström A, Shimokawa T, Toftgård R. Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(20):8455-8460. doi:10.1073/pnas.0609699104.
305. Agyeman A, Jha BK, Mazumdar T, Houghton JA. Mode and specificity of binding of the small molecule GANT61 to GLI determines inhibition of GLI-DNA binding. *Oncotarget*. 2014;5(12):4492-4503. doi:10.18632/oncotarget.2046.
306. Pavletich NP, Pabo CO. Crystal structure of a five-finger GLI-DNA complex: new perspectives on zinc fingers. *Science*. 1993;261(5129):1701-1707. doi:10.1126/science.8378770.
307. Gonnissen A, Isebaert S, Haustermans K. Targeting the Hedgehog signaling pathway in cancer: beyond Smoothed. *Oncotarget*. 2015;6(16):13899-13913. doi:10.18632/oncotarget.4224.

308. Zahreddine HA, Culjkovic-Kraljacic B, Assouline S, et al. The sonic hedgehog factor GLI1 imparts drug resistance through inducible glucuronidation. *Nature*. 2014;511(7507):90-93. doi:10.1038/nature13283.
309. Fu J, Rodova M, Roy SK, et al. GANT-61 inhibits pancreatic cancer stem cell growth in vitro and in NOD/SCID/IL2R gamma null mice xenograft. *Cancer Lett*. 2013;330(1):22-32. doi:10.1016/j.canlet.2012.11.018.
310. Benvenuto M, Masuelli L, De Smaele E, et al. In vitro and in vivo inhibition of breast cancer cell growth by targeting the Hedgehog/GLI pathway with SMO (GDC-0449) or GLI (GANT-61) inhibitors. *Oncotarget*. 2016;7(8):9250-9270. doi:10.18632/oncotarget.7062.
311. Wickström M, Dyberg C, Shimokawa T, et al. Targeting the hedgehog signal transduction pathway at the level of GLI inhibits neuroblastoma cell growth in vitro and in vivo. *Int J cancer*. 2013;132(7):1516-1524. doi:10.1002/ijc.27820.
312. Srivastava RK, Kaylani SZ, Edrees N, et al. GLI inhibitor GANT-61 diminishes embryonal and alveolar rhabdomyosarcoma growth by inhibiting Shh/AKT-mTOR axis. *Oncotarget*. 2014;5(23):12151-12165. doi:10.18632/oncotarget.2569.
313. Graab U, Hahn H, Fulda S. Identification of a novel synthetic lethality of combined inhibition of hedgehog and PI3K signaling in rhabdomyosarcoma. *Oncotarget*. 2015;6(11):8722-8735. doi:10.18632/oncotarget.2726.
314. Gonnissen A, Isebaert S, McKee CM, Dok R, Haustermans K, Muschel RJ. The hedgehog inhibitor GANT61 sensitizes prostate cancer cells to ionizing radiation both in vitro and in vivo. *Oncotarget*. 2016;7(51):84286-84298. doi:10.18632/oncotarget.12483.
315. Desch P, Asslaber D, Kern D, et al. Inhibition of GLI, but not Smoothened, induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Oncogene*. 2010;29(35):4885-4895. doi:10.1038/onc.2010.243.
316. Fiedler W, Henke RP, Ergün S, et al. Derivation of a new hematopoietic cell line with endothelial features from a patient with transformed myeloproliferative syndrome: a case report. *Cancer*. 2000;88(2):344-351.
317. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(9):e45. doi:10.1093/nar/29.9.e45.
318. Yuan J, Mehta PP, Yin M-J, et al. PF-04691502, a potent and selective oral inhibitor of PI3K and mTOR kinases with antitumor activity. *Mol Cancer Ther*. 2011;10(11):2189-2199. doi:10.1158/1535-7163.MCT-11-0185.
319. Xu Q, Simpson S, Scialla TJ, Bagg A, Carroll M. Survival of acute myeloid leukemia cells requires PI3 kinase activation. *Blood*. 2003;102(3):972-980. doi:10.1182/blood-2002-11-3429.
320. Takahashi S. Downstream molecular pathways of FLT3 in the pathogenesis of acute myeloid leukemia: biology and therapeutic implications. *J Hematol Oncol*. 2011;4(1):13. doi:10.1186/1756-8722-4-13.
321. Qie S, Diehl JA. Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment. *J Mol Med (Berl)*. 2016;94(12):1313-1326. doi:10.1007/s00109-016-1475-3.
322. Huang L, Walter V, Hayes DN, Onaitis M. Hedgehog-GLI signaling inhibition suppresses tumor growth in squamous lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2014;20(6):1566-1575. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-2195.
323. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch.

- Nat Rev Cancer*. 2002;2(9):647-656. doi:10.1038/nrc883.
324. Santini R, Pietrobono S, Pandolfi S, et al. SOX2 regulates self-renewal and tumorigenicity of human melanoma-initiating cells. *Oncogene*. 2014;33(38):4697-4708. doi:10.1038/onc.2014.71.
325. Bora-Singhal N, Perumal D, Nguyen J, Chellappan S. Gli1-Mediated Regulation of Sox2 Facilitates Self-Renewal of Stem-Like Cells and Confers Resistance to EGFR Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. *Neoplasia*. 2015;17(7):538-551. doi:10.1016/j.neo.2015.07.001.
326. Fehse B, Kustikova OS, Bubenheim M, Baum C. Pois(s)on--it's a question of dose... *Gene Ther*. 2004;11(11):879-881. doi:10.1038/sj.gt.3302270.
327. Salvia AM, Cuvillo F, Coluzzi S, et al. Expression of some ATP-binding cassette transporters in acute myeloid leukemia. *Hematol Rep*. 2017;9(4):7406. doi:10.4081/hr.2017.7406.
328. Theile D, Staffen B, Weiss J. ATP-binding cassette transporters as pitfalls in selection of transgenic cells. *Anal Biochem*. 2010;399(2):246-250. doi:10.1016/j.ab.2009.12.014.
329. Flores-Guzmán P, Gutiérrez-Rodríguez M, Mayani H. In vitro proliferation, expansion, and differentiation of a CD34+ cell-enriched hematopoietic cell population from human umbilical cord blood in response to recombinant cytokines. *Arch Med Res*. 2002;33(2):107-114.
330. Chaudhry P, Singh M, Triche TJ, Guzman M, Merchant AA. GLI3 repressor determines Hedgehog pathway activation and is required for response to SMO antagonist glasdegib in AML. *Blood*. 2017;129(26):3465-3475. doi:10.1182/blood-2016-05-718585.
331. Kern D, Regl G, Hofbauer SW, et al. Hedgehog/GLI and PI3K signaling in the initiation and maintenance of chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene*. 2015;34(42):5341-5351. doi:10.1038/onc.2014.450.
332. Thiagarajan S, Bhatia N, Reagan-Shaw S, et al. Role of GLI2 transcription factor in growth and tumorigenicity of prostate cells. *Cancer Res*. 2007;67(22):10642-10646. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2015.
333. Yan M, Wang L, Zuo H, et al. HH/GLI signalling as a new therapeutic target for patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2011;47(6):504-509. doi:10.1016/j.oraloncology.2011.03.027.
334. Lin Z, Sheng H, You C, et al. Inhibition of the CyclinD1 promoter in response to sonic hedgehog signaling pathway transduction is mediated by Gli1. *Exp Ther Med*. 2017;13(1):307-314. doi:10.3892/etm.2016.3969.
335. Mazumdar T, DeVecchio J, Shi T, Jones J, Agyeman A, Houghton JA. Hedgehog signaling drives cellular survival in human colon carcinoma cells. *Cancer Res*. 2011;71(3):1092-1102. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2315.
336. Zou J, Zhou Z, Wan L, et al. Targeting the Sonic Hedgehog-Gli1 Pathway as a Potential New Therapeutic Strategy for Myelodysplastic Syndromes. *PLoS One*. 2015;10(8):e0136843. doi:10.1371/journal.pone.0136843.
337. Hira VV V, Van Noorden CJF, Carraway HE, Maciejewski JP, Molenaar RJ. Novel therapeutic strategies to target leukemic cells that hijack compartmentalized continuous hematopoietic stem cell niches. *Biochim Biophys Acta*. 2017;1868(1):183-198. doi:10.1016/j.bbcan.2017.03.010.
338. Ninomiya M, Abe A, Katsumi A, et al. Homing, proliferation and survival sites of human leukemia cells in vivo in immunodeficient mice. *Leukemia*.

- 2007;21(1):136-142. doi:10.1038/sj.leu.2404432.
339. Ikram MS, Neill GW, Regl G, et al. GLI2 is expressed in normal human epidermis and BCC and induces GLI1 expression by binding to its promoter. *J Invest Dermatol.* 2004;122(6):1503-1509. doi:10.1111/j.0022-202X.2004.22612.x.
340. Bigelow RLH, Chari NS, Uden AB, et al. Transcriptional regulation of bcl-2 mediated by the sonic hedgehog signaling pathway through gli-1. *J Biol Chem.* 2004;279(2):1197-1205. doi:10.1074/jbc.M310589200.
341. Abe Y, Oda-Sato E, Tobiume K, et al. Hedgehog signaling overrides p53-mediated tumor suppression by activating Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(12):4838-4843. doi:10.1073/pnas.0712216105.
342. Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res Int.* 2014;2014:150845. doi:10.1155/2014/150845.
343. Vlčková K, Ondrušová L, Vachtenheim J, et al. Survivin, a novel target of the Hedgehog/GLI signaling pathway in human tumor cells. *Cell Death Dis.* 2016;7:e2048. doi:10.1038/cddis.2015.389.
344. Lim Y, Gondek L, Li L, et al. Integration of Hedgehog and mutant FLT3 signaling in myeloid leukemia. *Sci Transl Med.* 2015;7(291):291ra96. doi:10.1126/scitranslmed.aaa5731.
345. Cochrane CR, Szczepny A, Watkins DN, Cain JE. Hedgehog Signaling in the Maintenance of Cancer Stem Cells. *Cancers (Basel).* 2015;7(3):1554-1585. doi:10.3390/cancers7030851.
346. Turner KA, Rothe K, Woolfson A, Jiang X. Drug-Insensitive CML Stem/Progenitor Cells Highly Express Key Regulators of the Hedgehog Pathway and Inhibition of the Hedgehog Pathway Enhances Their Response to TKI Treatment. *Blood.* 2016;128(22):4236.
347. Queiroz KCS, Ruela-de-Sousa RR, Fuhler GM, et al. Hedgehog signaling maintains chemoresistance in myeloid leukemic cells. *Oncogene.* 2010;29(48):6314-6322. doi:10.1038/onc.2010.375.
348. Kobune M, Iyama S, Kikuchi S, et al. Stromal cells expressing hedgehog-interacting protein regulate the proliferation of myeloid neoplasms. *Blood Cancer J.* 2012;2(9):e87. doi:10.1038/bcj.2012.36.
349. Bai L-Y, Chiu C-F, Lin C-W, et al. Differential expression of Sonic hedgehog and Gli1 in hematological malignancies. *Leukemia.* 2008;22(1):226-228. doi:10.1038/sj.leu.2404978.
350. Fukushima N, Minami Y, Kakiuchi S, et al. Small-molecule Hedgehog inhibitor attenuates the leukemia-initiation potential of acute myeloid leukemia cells. *Cancer Sci.* 2016;107(10):1422-1429. doi:10.1111/cas.13019.
351. Campbell V, Tholouli E, Quigley MT, et al. Evidence That Activated Hedgehog Signaling Predicts for Poor Clinical Outcome in Acute Myeloid Leukemia. *Blood.* 2012;120(21):1441.
352. ten Haaf A, Bektas N, von Sereniy S, et al. Expression of the glioma-associated oncogene homolog (GLI) 1 in human breast cancer is associated with unfavourable overall survival. *BMC Cancer.* 2009;9:298. doi:10.1186/1471-2407-9-298.
353. Ciucci A, De Stefano I, Vellone VG, et al. Expression of the glioma-associated oncogene homolog 1 (gli1) in advanced serous ovarian cancer is associated with unfavorable overall survival. *PLoS One.* 2013;8(3):e60145.

- doi:10.1371/journal.pone.0060145.
354. Li L, Li M, Sun C, et al. Altered hematopoietic cell gene expression precedes development of therapy-related myelodysplasia/acute myeloid leukemia and identifies patients at risk. *Cancer Cell*. 2011;20(5):591-605. doi:10.1016/j.ccr.2011.09.011.
 355. Sharma N, Nanta R, Sharma J, et al. PI3K/AKT/mTOR and sonic hedgehog pathways cooperate together to inhibit human pancreatic cancer stem cell characteristics and tumor growth. *Oncotarget*. 2015;6(31):32039-32060. doi:10.18632/oncotarget.5055.
 356. Brandts CH, Sargin B, Rode M, et al. Constitutive activation of Akt by Flt3 internal tandem duplications is necessary for increased survival, proliferation, and myeloid transformation. *Cancer Res*. 2005;65(21):9643-9650. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0422.
 357. Kubota Y, Ohnishi H, Kitanaka A, Ishida T, Tanaka T. Constitutive activation of PI3K is involved in the spontaneous proliferation of primary acute myeloid leukemia cells: direct evidence of PI3K activation. *Leukemia*. 2004;18(8):1438-1440. doi:10.1038/sj.leu.2403402.
 358. Min YH, Eom JI, Cheong JW, et al. Constitutive phosphorylation of Akt/PKB protein in acute myeloid leukemia: its significance as a prognostic variable. *Leukemia*. 2003;17(5):995-997. doi:10.1038/sj.leu.2402874.
 359. Gallay N, Dos Santos C, Cuzin L, et al. The level of AKT phosphorylation on threonine 308 but not on serine 473 is associated with high-risk cytogenetics and predicts poor overall survival in acute myeloid leukaemia. *Leukemia*. 2009;23(6):1029-1038. doi:10.1038/leu.2008.395.
 360. Kornblau SM, Womble M, Qiu YH, et al. Simultaneous activation of multiple signal transduction pathways confers poor prognosis in acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2006;108(7):2358-2365. doi:10.1182/blood-2006-02-003475.
 361. Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*. 2013;502(7471):333-339. doi:10.1038/nature12634.
 362. Fransecky L, Mochmann LH, Baldus CD. Outlook on PI3K/AKT/mTOR inhibition in acute leukemia. *Mol Cell Ther*. 2015;3(1):2. doi:10.1186/s40591-015-0040-8.
 363. Ikezoe T, Nishioka C, Tasaka T, et al. The antitumor effects of sunitinib (formerly SU11248) against a variety of human hematologic malignancies: enhancement of growth inhibition via inhibition of mammalian target of rapamycin signaling. *Mol Cancer Ther*. 2006;5(10):2522-2530. doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0071.
 364. Cheng H, Bagrodia S, Bailey S, et al. Discovery of the highly potent PI3K / mTOR dual inhibitor PF-04691502 through structure based drug design. *Med Chem Commun*. 2010;(1):139-144. doi:10.1039/c0md00072h.
 365. Chen D, Mao C, Zhou Y, Su Y, Liu S, Qi W-Q. PF-04691502, a dual PI3K/mTOR inhibitor has potent pre-clinical activity by inducing apoptosis and G1 cell cycle arrest in aggressive B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Int J Oncol*. 2016;48(1):253-260. doi:10.3892/ijo.2015.3231.
 366. Blunt MD, Carter MJ, Larrayoz M, et al. The PI3K/mTOR inhibitor PF-04691502 induces apoptosis and inhibits microenvironmental signaling in CLL and the Eμ-TCL1 mouse model. *Blood*. 2015;125(26):4032-4041. doi:10.1182/blood-2014-11-610329.
 367. Teng C-LJ, Yu C-TR, Hwang W-L, et al. Effector mechanisms of sunitinib-induced

- G1 cell cycle arrest, differentiation, and apoptosis in human acute myeloid leukaemia HL60 and KG-1 cells. *Ann Hematol.* 2013;92(3):301-313. doi:10.1007/s00277-012-1627-7.
368. Weisel KC, Yildirim S, Schweikle E, Kanz L, Möhle R. Effect of FLT3 inhibition on normal hematopoietic progenitor cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1106:190-196. doi:10.1196/annals.1392.020.
369. Polak R, Buitenhuis M. The PI3K/PKB signaling module as key regulator of hematopoiesis: implications for therapeutic strategies in leukemia. *Blood.* 2012;119(4):911-923. doi:10.1182/blood-2011-07-366203.
370. Papa V, Tazzari PL, Chiarini F, et al. Proapoptotic activity and chemosensitizing effect of the novel Akt inhibitor perifosine in acute myelogenous leukemia cells. *Leukemia.* 2008;22(1):147-160. doi:10.1038/sj.leu.2404980.
371. Tabellini G, Tazzari PL, Bortol R, et al. Novel 2'-substituted, 3'-deoxy-phosphatidyl-myo-inositol analogues reduce drug resistance in human leukaemia cell lines with an activated phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Br J Haematol.* 2004;126(4):574-582. doi:10.1111/j.1365-2141.2004.05073.x.
372. Bagger FO, Rapin N, Theilgaard-Mönch K, et al. HemaExplorer: a Web server for easy and fast visualization of gene expression in normal and malignant hematopoiesis. *Blood.* 2012;119(26):6394-6395. doi:10.1182/blood-2012-05-427310.
373. Funakoshi T, Latif A, Galsky MD. Risk of hematologic toxicities in cancer patients treated with sunitinib: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev.* 2013;39(7):818-830. doi:10.1016/j.ctrv.2013.01.004.
374. Zhang L, Smith KM, Chong AL, et al. In vivo antitumor and antimetastatic activity of sunitinib in preclinical neuroblastoma mouse model. *Neoplasia.* 2009;11(5):426-435. doi:10.1593/neo.09166.
375. Fang DD, Zhang CC, Gu Y, et al. Antitumor Efficacy of the Dual PI3K/mTOR Inhibitor PF-04691502 in a Human Xenograft Tumor Model Derived from Colorectal Cancer Stem Cells Harboring a PIK3CA Mutation. *PLoS One.* 2013;8(6):e67258. doi:10.1371/journal.pone.0067258.
376. König H, Levis M. Targeting FLT3 to treat leukemia. *Expert Opin Ther Targets.* 2015;19(1):37-54. doi:10.1517/14728222.2014.960843.
377. Ikediobi ON, Davies H, Bignell G, et al. Mutation analysis of 24 known cancer genes in the NCI-60 cell line set. *Mol Cancer Ther.* 2006;5(11):2606-2612. doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0433.
378. Mendoza MC, Er EE, Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci.* 2011;36(6):320-328. doi:10.1016/j.tibs.2011.03.006.
379. Hassounah NB, Bunch TA, McDermott KM. Molecular pathways: the role of primary cilia in cancer progression and therapeutics with a focus on Hedgehog signaling. *Clin Cancer Res.* 2012;18(9):2429-2435. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0755.
380. Su Y-C, Li S-C, Wu Y-C, Wang L-M, Chao KSC, Liao H-F. Resveratrol downregulates interleukin-6-stimulated sonic hedgehog signaling in human acute myeloid leukemia. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:547430. doi:10.1155/2013/547430.
381. Kakiuchi S, Minami Y, Miyata Y, et al. NANOG Expression as a Responsive Biomarker during Treatment with Hedgehog Signal Inhibitor in Acute Myeloid

- Leukemia. *Int J Mol Sci.* 2017;18(3):1-9. doi:10.3390/ijms18030486.
382. Larizza L, Magnani I, Beghini A. The Kasumi-1 cell line: a t(8;21)-kit mutant model for acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2005;46(2):247-255. doi:10.1080/10428190400007565.
383. Khan AA, Harrison CN, McLornan DP. Targeting of the Hedgehog pathway in myeloid malignancies: still a worthy chase? *Br J Haematol.* 2015;170(3):323-335. doi:10.1111/bjh.13426.
384. He X, Zhang L, Chen Y, et al. The G protein α subunit G α s is a tumor suppressor in Sonic hedgehog-driven medulloblastoma. *Nat Med.* 2014;20(9):1035-1042. doi:10.1038/nm.3666.
385. Iglesias-Bartolome R, Torres D, Marone R, et al. Inactivation of a G α (s)-PKA tumour suppressor pathway in skin stem cells initiates basal-cell carcinogenesis. *Nat Cell Biol.* 2015;17(6):793-803. doi:10.1038/ncb3164.
386. Alvarado Y, Kantarjian HM, Luthra R, et al. Treatment with FLT3 inhibitor in patients with FLT3-mutated acute myeloid leukemia is associated with development of secondary FLT3-tyrosine kinase domain mutations. *Cancer.* 2014;120(14):2142-2149. doi:10.1002/cncr.28705.
387. Parmar A, Marz S, Rushton S, et al. Stromal niche cells protect early leukemic FLT3-ITD+ progenitor cells against first-generation FLT3 tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Res.* 2011;71(13):4696-4706. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-4136.
388. Leung a YH, Man C-H, Kwong Y-L. FLT3 inhibition: a moving and evolving target in acute myeloid leukaemia. *Leukemia.* 2013;27(2):260-268. doi:10.1038/leu.2012.195.
389. Smith CC, Lasater EA, Lin KC, et al. Crenolanib is a selective type I pan-FLT3 inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(14):5319-5324. doi:10.1073/pnas.1320661111.
390. Zimmerman EI, Turner DC, Buaboonnang J, et al. Crenolanib is active against models of drug-resistant FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia. *Blood.* 2013;122(22):3607-3615. doi:10.1182/blood-2013-07-513044.
391. Randhawa JK, Kantarjian HM, Borthakur G, 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):389.
392. Jorge E. Cortes, Hagop M. Kantarjian, Tapan M. Kadia, Gautam Borthakur, Marina Konopleva, Guillermo Garcia-Manero, Naval Guastad Daver, Naveen Pemmaraju, Elias Jabbour, Zeev Estrov, Abhijit Ramachandran, Jamil Paradela, Blake Pond, Farhad Ravandi, Madhuri and RC. Crenolanib besylate, a type I pan-FLT3 inhibitor, to demonstrate clinical activity in multiply relapsed FLT3-ITD and D835 AML. *J Clin Oncol.* 2016;34(15_suppl):7008-7008. doi:10.1200/JCO.2016.34.15_suppl.7008.
393. Wang ES, Stone RM, Tallman MS, Walter RB, Eckardt JR, Collins R. Crenolanib, a Type I FLT3 TKI, Can be Safely Combined with Cytarabine and Anthracycline Induction Chemotherapy and Results in High Response Rates in Patients with Newly Diagnosed FLT3 Mutant Acute Myeloid Leukemia (AML). *Blood.* 2016;128(22):1071.
394. Nishioka C, Ikezoe T, Yang J, et al. Blockade of MEK/ERK signaling enhances sunitinib-induced growth inhibition and apoptosis of leukemia cells possessing activating mutations of the FLT3 gene. *Leuk Res.* 2008;32(6):865-872.

- doi:10.1016/j.leukres.2007.09.017.
395. Lindblad O, Cordero E, Puissant A, et al. Aberrant activation of the PI3K/mTOR pathway promotes resistance to sorafenib in AML. *Oncogene*. 2016;35(39):5119-5131. doi:10.1038/onc.2016.41.
396. He Y, Sun L, Xu Y, et al. Combined inhibition of PI3K δ and FLT3 signaling exerts synergistic antitumor activity and overcomes acquired drug resistance in FLT3-activated acute myeloid leukemia. *Cancer Lett*. 2018;420:49-59. doi:10.1016/j.canlet.2018.01.071.
397. Weisberg E, Liu Q, Zhang X, et al. Selective Akt inhibitors synergize with tyrosine kinase inhibitors and effectively override stroma-associated cytoprotection of mutant FLT3-positive AML cells. *PLoS One*. 2013;8(2):e56473. doi:10.1371/journal.pone.0056473.
398. Xie J, Bartels CM, Barton SW, Gu D. Targeting hedgehog signaling in cancer: research and clinical developments. *Onco Targets Ther*. 2013;6:1425-1435. doi:10.2147/OTT.S34678.
399. Savona MR, Pollyea DA, Stock W, et al. Phase Ib Study of Glasdegib, A Hedgehog Pathway Inhibitor, in Combination With Standard Chemotherapy in Patients With AML or High-Risk MDS. *Clin Cancer Res*. 2018;(713):clincanres.2824.2017. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-2824.
400. Cortes JE, Heidel FH, Heuser M, et al. A Phase 2 Randomized Study of Low Dose Ara-C with or without Glasdegib (PF-04449913) in Untreated Patients with Acute Myeloid Leukemia or High-Risk Myelodysplastic Syndrome. *Blood*. 2016;128(22):99.
401. Chang ALS, Oro AE. Initial assessment of tumor regrowth after vismodegib in advanced Basal cell carcinoma. *Arch Dermatol*. 2012;148(11):1324-1325. doi:10.1001/archdermatol.2012.2354.
402. Brinkhuizen T, Reinders MG, van Geel M, et al. Acquired resistance to the Hedgehog pathway inhibitor vismodegib due to smoothened mutations in treatment of locally advanced basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol*. 2014;71(5):1005-1008. doi:10.1016/j.jaad.2014.08.001.
403. Rudin CM, Hann CL, Laterra J, et al. Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449. *N Engl J Med*. 2009;361(12):1173-1178. doi:10.1056/NEJMoa0902903.
404. Dijkgraaf GJP, Alicke B, Weinmann L, et al. Small molecule inhibition of GDC-0449 refractory smoothened mutants and downstream mechanisms of drug resistance. *Cancer Res*. 2011;71(2):435-444. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2876.
405. Pricl S, Cortelazzi B, Dal Col V, et al. Smoothened (SMO) receptor mutations dictate resistance to vismodegib in basal cell carcinoma. *Mol Oncol*. 2015;9(2):389-397. doi:10.1016/j.molonc.2014.09.003.
406. Sharpe HJ, Pau G, Dijkgraaf GJ, et al. Genomic analysis of smoothened inhibitor resistance in basal cell carcinoma. *Cancer Cell*. 2015;27(3):327-341. doi:10.1016/j.ccell.2015.02.001.
407. Yauch RL, Dijkgraaf GJP, Alicke B, et al. Smoothened mutation confers resistance to a Hedgehog pathway inhibitor in medulloblastoma. *Science*. 2009;326(5952):572-574. doi:10.1126/science.1179386.
408. Buonamici S, Williams J, Morrissey M, et al. Interfering with resistance to smoothened antagonists by inhibition of the PI3K pathway in medulloblastoma.

- Sci Transl Med.* 2010;2(51):51ra70. doi:10.1126/scitranslmed.3001599.
409. Al-Mawali A, Gillis D, Lewis I. Immunoprofiling of leukemic stem cells CD34+/CD38-/CD123+ delineate FLT3/ITD-positive clones. *J Hematol Oncol.* 2016;9(1):61. doi:10.1186/s13045-016-0292-z.
410. Bardet V, Tamburini J, Ifrah N, et al. Single cell analysis of phosphoinositide 3-kinase/Akt and ERK activation in acute myeloid leukemia by flow cytometry. *Haematologica.* 2006;91(6):757-764. doi:10.1182/blood-2013-02-474437.
411. Shih L, Huang C, Wu J, et al. Internal tandem duplication of FLT3 in relapsed acute myeloid leukemia: a comparative analysis of bone marrow samples from 108 adult patients at diagnosis and relapse. *Blood.* 2002;100(7):2387-2392. doi:10.1182/blood-2002-01-0195.
412. McCormick SR, McCormick MJ, Grutkoski PS, et al. FLT3 mutations at diagnosis and relapse in acute myeloid leukemia: cytogenetic and pathologic correlations, including cuplike blast morphology. *Arch Pathol Lab Med.* 2010;134(8):1143-1151. doi:10.1043/2009-0292-OA.1.
413. Cloos J, Goemans BF, Hess CJ, et al. Stability and prognostic influence of FLT3 mutations in paired initial and relapsed AML samples. *Leukemia.* 2006;20(7):1217-1220. doi:10.1038/sj.leu.2404246.
414. Nanta R, Kumar D, Meeker D, et al. NVP-LDE-225 (Erismodegib) inhibits epithelial-mesenchymal transition and human prostate cancer stem cell growth in NOD/SCID IL2R γ null mice by regulating Bmi-1 and microRNA-128. *Oncogenesis.* 2013;2(4):e42. doi:10.1038/oncsis.2013.5.
415. Kurebayashi J, Koike Y, Ohta Y, et al. Anti-cancer stem cell activity of a hedgehog inhibitor GANT61 in estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Cancer Sci.* 2017;108(5):918-930. doi:10.1111/cas.13205.
416. Lessard J, Sauvageau G. Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature.* 2003;423(6937):255-260. doi:10.1038/nature01572.
417. Sadarangani A, Pineda G, Lennon KM, et al. GLI2 inhibition abrogates human leukemia stem cell dormancy. *J Transl Med.* 2015;13:98. doi:10.1186/s12967-015-0453-9.
418. McCulloch D, Brown C, Iland H. Retinoic acid and arsenic trioxide in the treatment of acute promyelocytic leukemia: current perspectives. *Onco Targets Ther.* 2017;10:1585-1601. doi:10.2147/OTT.S100513.
419. Kim J, Lee JJ, Kim J, Gardner D, Beachy PA. Arsenic antagonizes the Hedgehog pathway by preventing ciliary accumulation and reducing stability of the Gli2 transcriptional effector. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(30):13432-13437. doi:10.1073/pnas.1006822107.
420. Musselman CA, Lalonde M-E, Côté J, Kutateladze TG. Perceiving the epigenetic landscape through histone readers. *Nat Struct Mol Biol.* 2012;19(12):1218-1227. doi:10.1038/nsmb.2436.
421. Zuber J, Shi J, Wang E, et al. RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia. *Nature.* 2011;478(7370):524-528. doi:10.1038/nature10334.
422. Fiskus W, Sharma S, Qi J, et al. BET protein antagonist JQ1 is synergistically lethal with FLT3 tyrosine kinase inhibitor (TKI) and overcomes resistance to FLT3-TKI in AML cells expressing FLT-ITD. *Mol Cancer Ther.* 2014;13(10):2315-2327. doi:10.1158/1535-7163.MCT-14-0258.

-
423. Berthon C, Raffoux E, Thomas X, et al. Bromodomain inhibitor OTX015 in patients with acute leukaemia: a dose-escalation, phase 1 study. *Lancet Haematol.* 2016;3(4):e186-95. doi:10.1016/S2352-3026(15)00247-1.
 424. Ge X, Milenkovic L, Suyama K, et al. Phosphodiesterase 4D acts downstream of Neuropilin to control Hedgehog signal transduction and the growth of medulloblastoma. *Elife.* 2015;4:1-20. doi:10.7554/eLife.07068.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µM	mikromolar
µm	Mikrometer
ABC	<i>ATP binding cassette</i>
ad	auffüllen auf
Akt	Proteinkinase B
ALL	akute lymphatische Leukämie
allo-	allogen
AML	akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
APL	akute promyelozytische Leukämie
Ara-C	Cytarabin
AS	Aminosäuren
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATO	Arsentrioxid
ATP	Adenosintriphosphat
auto-	autolog
BAD	<i>BCL2 antagonist of cell death</i>
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BET	<i>bromodomain and extra terminal domain</i>
BMI1	<i>B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1</i>
bp	Basenpaare
BRD4	<i>bromodomain-containing protein 4</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
BZK	Basalzellkarzinom
bzw.	beziehungsweise
C	Cystein
-C	mCherry
CaCl ₂	Calciumchlorid
CCND1/2	<i>Cyclin D1/2</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDK1	<i>cyclin-dependent kinase 1</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
CEBPA	<i>CCAAT/enhancer-binding protein alpha</i>
CK1	Caseinkinase 1

c-KIT	<i>stem cell factor receptor</i>
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CLL-1	<i>C-type lectin-like molecule-1</i>
cm	Zentimeter
CML	chronische myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalie-Virus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
-COOH, C-	Carboxy-
CR	<i>complete remission</i> , komplette Remission
CR _i	CR mit unvollständiger hämatologischer Erholung
CSC	<i>cancer stem cell</i> , Krebsstammzelle
CSF1R	<i>colony-stimulating factor 1 receptor</i>
D	Aspartat
D. melanogaster	<i>Drosophila melanogaster</i>
d.h.	das heißt
del	Deletion
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DHH	<i>Desert Hedgehog</i>
DKD	Doppelknockdown
DMEM	Dubecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNMT3A	<i>DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTT	Dithiothreitol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFS	Event-freies Überleben
ELN	<i>European LeukemiaNet</i>
engl.	englisch
ErbB2	<i>erb-b2 receptor tyrosine kinase 2</i>
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
Exp.	Experiment
FAB	<i>French-American-British</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i> , Durchflusszytometrie
FBS	<i>fetal bovine serum</i> , fötales Kälberserum
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

FL	FLT3-Ligand
FL	<i>full-length</i>
FLK2	<i>fetal liver tyrosine kinase 2</i>
FLT3	<i>fms-like tyrosine kinase 3</i>
for	<i>forward</i>
FOXO3	<i>forkhead box O3</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Gramm; g-Kraft, Fallbeschleunigung
G	<i>Gap</i>
GANT	GLI-Antagonist
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	<i>granulozyte-colony stimulating factor</i>
GFP, -G	<i>green fluorescent protein</i>
GLI	<i>glioma-associated oncogene homologue</i>
GLI _A	Aktivator-Form von GLI
GLI _R	Repressor-Form von GLI
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GO	Gemtuzumab-Ozogamizin
GSK3 β	<i>glycogen synthase kinase-3β</i>
H	Histidin
h	human
HBS	<i>HEPES buffered saline</i>
HCl	Salzsäure
HEK 293T	<i>Human Embryonic Kidney 293T</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HH	Hedgehog
HMA	hypomethylierende Agenzien
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
HS	<i>horse serum</i>
HSC	<i>hematopoietic stem cell</i> , hämatopoetische Stammzelle
HSCT	<i>hematopoietic stem cell transplantation</i> , hämatopoetische Stammzelltransplantation
HSPC	<i>hematopoietic stem/progenitor cell</i> , hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzelle
Hygro	Hygromycin
IDH1/2	Isozitat-Dehydrogenase 1/2
IFT	intraflagellarer Transport
Ig	Immunglobulin
IHH	<i>Indian Hedgehog</i>
IL	Interleukin

Il2rg	Interleukin-2-Rezeptor- γ
IMDM	Iscoe's Modified Dulbecco's Medium
inv	Inversion
ITD	interne Tandemduplikation
JM	Juxtamembran-Domäne
K/NRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homologue/neuroblastoma RAS viral oncogene homologue</i>
kb	Kilobase
KD	<i>Knockdown</i>
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
KI	Kinase-Insertionsdomäne
KIF7	<i>kinesin family member 7</i>
KW	Körpergewicht
L	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>
LDAC	<i>low dose Ara-C</i>
LeGO	<i>Lentiviral Gene Ontology</i>
log	logarithmisch
LSC	<i>leukemic stem cell</i> , Leukämiestammzelle
M	molar
m ²	Quadratmeter
mA	Milliampere
MB	Medulloblastom
MDS	myelodysplastisches Syndrom
mg	Milligramm
min	Minute(n)
mL	Milliliter
mM	millimolar
mol	Mol
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NaCl	Natriumchlorid
NF- κ B	<i>nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
ng	Nanogramm
-NH ₂	Amino-Terminus
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NKX2.2	<i>NK2 homeobox 2</i>
nm	Nanometer

NOD/scid	<i>non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency</i>
NPM1	<i>nucleophosmin 1</i>
ns	nicht signifikant
NSG	NOD.Cg-Prkdc ^{scid} Il2rg ^{tm1Wjl} /SzJ, NOD scid gamma
P	Phosphorylierungsereignis
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pAML	primäre AML
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphatpuffer
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDGFR α/β	<i>platelet-derived growth factor receptor α/β</i>
pH	<i>potentia hydrogenii</i> , Konzentration des Wasserstoffs
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PS	Phosphatidylserin
PTCH1	<i>patched 1</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
Puro	Puromycin
R/R	rezidiert/refraktär
RAF	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RET	<i>rearranged during transfection</i>
rev	<i>reverse</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPMI	Rooswell Park Memorial Institut Medium 1640
RT	Raumtemperatur
RTKIII	Rezeptor-Tyrosinkinase der Klasse III
RT-qPCR	<i>Reverse Transcription quantitative Real-Time PCR</i>
S	Synthese
s.u.	siehe unten
S6K1	<i>ribosomal protein S6 kinase 1</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
sec	Sekunde(n)
SEER	<i>Surveillance Epidemiology and End Results Program</i>
SHH	<i>Sonic Hedgehog</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i> , kurze interferierende RNA

SMO	<i>smoothened</i>
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>
SOX2	<i>sex determining region Y (SRY)-box 2</i>
SSC	<i>side scatter</i>
STAT5	<i>signal transducer and activator transcription factor 5</i>
STK-1	<i>stem cell tyrosine kinase</i>
SUFU	<i>supressor of fused</i>
SYK	<i>spleen tyrosine kinase</i>
t	Translokation
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBX2	<i>T-box 2</i>
TCA	<i>trichloroacetic acid</i> , Trichloressigsäure
TET2	<i>tet methylcytosine dioxygenase 2</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
TIM-3	<i>T cell Ig mucin-3</i>
TKD	Tyrosinkinase-Domäne
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TP53	<i>tumor protein p53</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRM	<i>treatment-related morbidity and mortality</i>
u.a.	unter anderem
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
UV	Ultraviolett
V	Volt
V/V	Volumen pro Volumen
VEGFR	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>
vs.	<i>versus</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>
Y	Tyrosin
Zeo	Zeocin
α -MEM	α -Minimum Essential Medium
β -TrCP	<i>beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung von FLT3 mit normaler und aberranter Signalweiterleitung.	21
Abbildung 2: Schematische Darstellung der charakteristischen Domänen und Motive der GLI-Proteine.	37
Abbildung 3: Schematische Darstellung des kanonischen HH-Signalwegs mit seinen Schlüsselkomponenten.....	39
Abbildung 4: Qualitative Titration eines lentiviralen Virus-Überstandes in CD34 ⁺ hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen gesunder Spender und in UKE-1-Zellen.	94
Abbildung 5: Relative <i>GLI1</i> - und <i>GLI2</i> -mRNA-Expression der mit <i>GLI1</i> - bzw. <i>GLI2</i> -shRNA transduzierten AML-Zelllinien.	95
Abbildung 6: Effekt eines <i>GLI1</i> - oder <i>GLI2</i> -shRNA- <i>Knockdowns</i> auf die Proliferation von AML-Zelllinien.....	96
Abbildung 7: Effekt eines <i>GLI1</i> - oder <i>GLI2</i> -shRNA- <i>Knockdowns</i> auf die Apoptose-Induktion in AML-Zelllinien.	97
Abbildung 8: Effekt eines <i>GLI1</i> - oder <i>GLI2</i> -shRNA- <i>Knockdowns</i> auf die Kolonie-bildung von AML-Zelllinien.	99
Abbildung 9: Überlebensdauer von NSG TM -Mäusen nach Transplantation von <i>FLT3</i> -mutierten AML-Zelllinien in unterschiedlichen Zellzahlen.	101
Abbildung 10: Mikroskopischer Vergleich der mCherry- und GFP-Fluoreszenz in mit <i>Scrambled</i> -shRNA bzw. <i>GLI1</i> - und <i>GLI2</i> -shRNA doppelt transduzierten MV4-11-Zellen.....	103
Abbildung 11: Durchflusszytometrische Analyse der Transduktionseffizienz in MV4-11/Kontrolle und MV4-11/ <i>GLI1/2</i> -DKD.....	104
Abbildung 12: Kaplan-Meier-Überlebenskurve der mit MV4-11/Kontrolle oder MV4-11/ <i>GLI1/2</i> -DKD transplantierten NSG TM -Mäuse.....	105
Abbildung 13: Verteilung der Anteile humaner Wildtyp-, mCherry ⁺ , GFP ⁺ und mCherry ⁺ /GFP ⁺ Blasten in Organen der mit MV4-11/Kontrolle oder MV4-11/ <i>GLI1/2</i> -DKD transplantierten NSG TM -Mäuse beim Auftreten des leukämischen Phänotyps.	106
Abbildung 14: Relative <i>GLI1</i> -, <i>GLI2</i> - und <i>BCL2</i> -mRNA-Expression der mit <i>GLI1</i> - und <i>GLI2</i> -shRNA transduzierten MV4-11-Zellen über einen Zeitraum von 28 Tagen.....	108
Abbildung 15: Effekt einer kombinierten therapeutischen Inhibierung des Hedgehog- und FLT3/PI3K-Signalwegs auf die Proliferation von AML-Zelllinien.	111
Abbildung 16: Effekt einer kombinierten therapeutischen Inhibierung des	

Hedgehog- und FLT3/PI3K-Signalwegs auf die Proliferation von primären AML-Blasten.	114
Abbildung 17: Effekt einer kombinierten therapeutischen Inhibierung des Hedgehog- und FLT3/PI3K-Signalwegs auf die Apoptose-Induktion in MV4-11-Zellen.....	116
Abbildung 18: Effekt einer kombinierten therapeutischen Inhibierung des Hedgehog- und FLT3/PI3K-Signalwegs auf die Apoptose-Induktion in AML-Zelllinien.	117
Abbildung 19: Effekt einer kombinierten therapeutischen Inhibierung des Hedgehog- und FLT3/PI3K-Signalwegs auf die Koloniebildung von AML-Zelllinien und CD34 ⁺ hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen.	119
Abbildung 20: Kaplan-Meier-Überlebenskurve für die Therapie einer <i>FLT3</i> -mutierten AML mit GLI-, FLT3- und PI3K-Inhibitoren in NSG TM -Mäusen.	122
Abbildung 21: Effekt einer kombinierten therapeutischen Inhibierung des Hedgehog- und FLT3/PI3K-Signalwegs auf die GLI1/2-Promotor-Aktivität von GLI1/2-Reporter-AML-Zelllinien.....	125
Abbildung 22: Dosisabhängiger Effekt einer therapeutischen Inhibierung von GLI1 und GLI2 auf die GLI-Promotor-Aktivität von GLI1/2-Reporter-AML-Zelllinien.	128
Abbildung 23: Dosisabhängiger Effekt einer therapeutischen Inhibierung von SMO auf die GLI-Promotor-Aktivität von GLI1/2-Reporter-AML-Zelllinien.....	129
Abbildung 24: GLI1-Proteinexpression nach therapeutischer GLI- und FLT3-Inhibierung in AML-Zelllinien.	130
Abbildung 25: Schematische Darstellung einer möglichen nicht-kanonischen HH-Signalweg-Aktivierung in FLT3-mutierter AML über eine FLT3/PI3K/GLI1/2-Kaskade.	157

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der AML und verwandter Neoplasien	17
Tabelle 2: <i>ELN</i> -Risikostratifikation der AML.	18
Tabelle 3: Verwendete Geräte.	51
Tabelle 4: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Zusätze.	53
Tabelle 5: Verwendete Kits und Enzyme.	54
Tabelle 6: Verwendete Medien für die Bakterien- und Zellkultur.	55
Tabelle 7: Verwendete DNA- und Protein-Größenstandards.	58
Tabelle 8: Verwendete shRNAs.	58
Tabelle 9: Verwendete Vektoren und Verpackungsplasmide.	59
Tabelle 10: In der RT-qPCR, Klonierung und Sequenzierung verwendete Primer.	59
Tabelle 11: In der RT-qPCR verwendete cDNA-Standards.	60
Tabelle 12: In der Durchflusszytometrie und im Western Blot verwendete Antikörper.	60
Tabelle 13: Verwendete Software.	62
Tabelle 14: Verwendete AML-Zelllinien und ihre Kultivierungsmedien.	64
Tabelle 15: RT-qPCR-Bedingungen.	80
Tabelle 16: Klonierungs-PCR-Bedingungen.	81
Tabelle 17: Kolonie-PCR-Bedingungen.	84
Tabelle 18: Transduktionseffizienzen an Tag 4 nach Transduktion in mit <i>Scrambled</i> - shRNA, <i>GLI1</i> -shRNA oder <i>GLI2</i> -shRNA transduzierten MV4-11-Zellen in zwei unabhängigen Experimenten.	93

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei einigen Menschen bedanken, die mich bei meiner Promotion unterstützt haben.

Allen voran gilt mein Dank Prof. Dr. Walter Fiedler und PD Dr. Jasmin Wellbrock für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe Akute Leukämien und die Möglichkeit, an diesem spannenden Projekt zu arbeiten. Vielen Dank, dass ihr es mir ermöglicht habt, trotz verschiedenster Umstände – vom kranken Hund bis hin zur Schwangerschaft und anschließendem Balanceakt zwischen Kleinkind und Arbeit – erfolgreich an meinem Projekt weiterzuarbeiten. Jasmin, vielen Dank für diese wirklich außergewöhnliche Betreuung! Ich konnte wirklich immer auf dein offenes Ohr und deine menschliche und fachliche Unterstützung zählen. Unter dem hoffnungsvollen Motto „Das wird schon!“ hast du mir das ein oder andere Mal wieder neuen Mut gemacht und hattest für jedes Problem eine Lösung parat. Danke!

Prof. Dr. Julia Kehr danke ich sehr für ihre Bereitschaft, die Zweitbetreuung und Begutachtung meiner Dissertation zu übernehmen.

Ein großer Dank geht an die aktuellen und ehemaligen Mitglieder der Arbeitsgruppe Akute Leukämien, die mich während meiner Promotion begleitet haben. Danke für die fachliche wie tatkräftige Unterstützung und die tolle Arbeitsatmosphäre im Labor! Mein besonderer Dank gilt dabei Julian Köhler für seine Vorarbeiten mit GANT61 und Marianne Klokow, Gabi Vohwinkel, Jana Muschhammer, den BTA-Praktikantinnen Jenny Pamperin und Marleen Bathke sowie Dr. Hauke Stamm, ohne deren Hilfe mir die Umsetzung einiger Experimente nicht möglich gewesen wäre. Hauke, dir als meinem Mitdoktoranden gilt mein ganz besonderer Dank, denn du warst mir nicht nur in vielen praktischen Fragen eine große Hilfe, sondern darüber hinaus über die ganze Zeit hinweg ein wertvoller Begleiter und „Leidensgenosse“. Danke für die willkommenen kleinen Ablenkungen mit den lustigen, ehrlichen und erfrischenden Gesprächen im Büro!

Mein weiterer Dank gilt den aktuellen und ehemaligen Kollegen und Mitarbeitern der gesamten II. Med. und der KMT, die für ein so freundliches und hilfsbereites Umfeld gesorgt haben. Dr. Kerstin Cornils danke ich sehr für ihre Aushilfe mit Vektoren und

Enzymen und besonders für ihre Hilfe bei Klonierungsfragen. Ferner möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Manfred Jücker und speziell bei Patrick Ehm bedanken, ohne dessen Hilfe ich noch immer an den Western Blots verzweifeln würde. Den Mitarbeitern und besonders den Patienten der Leukämiestation C5A sowie dem Institut für Transfusionsmedizin des UKE danke ich für die Bereitstellung des Primärmaterials. Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei dem Team der Tierhaltung für die Unterstützung bei der Sorge um „meine“ Mäuse danken. Außerdem möchte ich mich bei dem *Eppendorfer Krebs- und Leukämiehilfe e.V.* sowie der *Carsten Bender-Leukämie-Stiftung* für die finanzielle Unterstützung meines Projekts bedanken.

Auch meinen Freunden und meiner Familie gilt ein riesengroßer Dank! Dr. Leah Eissing, Dr. Christine Jacobsen und Rosalie McDonough danke ich sehr für das Korrekturlesen. Und ich danke all meinen Freunden und Geschwistern, bei denen ich ins „Schreibexil“ gehen durfte: meiner besten Freundin Lisa und ihrer WG sowie ihren Eltern Marlies und Christian Kuhlitz, meinen Schwestern Hanh und Ann-Marijke – ohne euch würde ich noch immer schreiben. Meinen Eltern danke ich für ihren Glauben in mich und ihre Unterstützung in allen Bereichen.

Ole und Juri – meiner größten und meiner kleinsten Liebe – euch danke ich, dass ihr mich nie mit einem schlechten Gewissen, sondern nur wohlisch am Schreibtisch zurückgelassen habt und zusammen die schönsten Dinge erlebt habt! Ole, danke für deine bedingungslose Unterstützung und die Möglichkeit, mich ab und zu ins „Schreibexil“ begeben zu können. Juri, danke, dass du ein so liebes und waches Kind bist und mich dennoch nachts (meist) gut hast schlafen lassen.

Dankeschön!

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich diese Dissertation selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe.

Diese Arbeit ist nicht bereits in derselben oder einer ähnlichen Fassung an einer anderen Fakultät oder einem anderen Fachbereich zur Erlangung der Doktorwürde eingereicht worden.

Ort, Datum, Unterschrift