

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

betreut am  
Zentrum der Inneren Medizin  
Medizinische Klinik 2 (Hämatologie, Onkologie, Hämostaseologie, Rheumatologie,  
Infektiologie)  
Direktor: Prof. Dr. Hubert Serve

**Untersuchungen zur Inhibition von Autophagie in  
FLT3-ITD-mutierten AML-Zellen**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

vorgelegt von  
Susanna Irene Hock

aus Aschaffenburg

Frankfurt am Main, 2023

Dekan: Prof. Dr. Stefan Zeuzem  
Referent: Prof. Dr. Christian Brandts  
Korreferent/in: Prof. Dr. Manuel Kaulich

Tag der mündlichen Prüfung: 30.08.2023

**Für meine Familie**

## **Inhaltsverzeichnis**

Abbildungsverzeichnis.....	8
Tabellenverzeichnis.....	10
Abkürzungsverzeichnis .....	11
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>15</b>
1.1 Akute myeloische Leukämie.....	15
1.1.1 Definition und Symptomatik.....	15
1.1.2 Genetik und Prognose.....	15
1.1.3 Therapie .....	16
1.2 FLT3-ITD-Mutation.....	17
1.2.1 FLT3-Rezeptor und -Ligand im gesunden Organismus.....	17
1.2.2 FLT3-Mutationen .....	20
1.2.3 Zusammenhang zwischen FLT3-ITD und AML .....	21
1.2.4 Einfluss auf die Prognose und gezielte Therapie .....	22
1.3 Autophagie .....	24
1.3.1 Beschreibung .....	24
1.3.2 Regulation .....	25
1.3.3 Autophagie in Leukämie-Zellen .....	26

1.4	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	27
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>28</b>
2.1	Material und Geräte.....	28
2.2	Methoden .....	40
2.2.1	Zellkultivierung .....	40
2.2.2	Erzeugung und Testung von gentechnisch modifizierten Zellen ....	41
2.2.3	Behandlung von Zellen mit Inhibitoren .....	44
2.2.4	Proteinanalytik.....	46
2.2.5	Durchflusszytometrie .....	48
2.2.6	Statistische Auswertung der Ergebnisse .....	50
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>51</b>
3.1	Die Wachstumsfaktor-unabhängige Proliferation von 32D <sup>FLT3-ITD</sup> -Zellen bewirkt eine Zunahme der basalen Autophagie .....	51
3.2	Wirkung lysosomaler Inhibitoren auf Autophagie und Proliferation von transformierten 32D <sup>FLT3-ITD</sup> - im Vergleich zu wachstumsfaktor-abhängigen 32D <sup>ctrl</sup> - Zellen .....	52
3.2.1	Lysosomale Inhibitoren hemmen bei 32D <sup>FLT3-ITD</sup> die Autophagie potenter als bei 32D <sup>ctrl</sup> .....	53
3.2.2	Die Proliferation FLT3-ITD-positiver Zellen wird durch lysosomale Inhibition nicht verstärkt beeinträchtigt.....	55

3.3	Auswirkungen der pharmakologischen Inhibition sowie des genetischen Verlusts von ULK1 auf Proliferation und Autophagie .....	62
3.3.1	ULK1/2-Inhibitoren zeigen potente antiproliferative Wirkung in FLT3-ITD-positiven AML-Zellen .....	62
3.3.2	ULK1/2-Inhibitoren hemmen Autophagie in FLT3-ITD-positiven AML-Zellen .....	65
3.3.3	Ein ULK1- <i>Knockout</i> hat keine Auswirkungen auf die Proliferation .	67
3.3.4	ULK1-defiziente Zellen betreiben weiterhin Autophagie .....	70
3.4	Lysosomale Inhibition bewirkt Veränderungen im Signalweg von FLT3-ITD .....	73
3.5	Pharmakologische FLT3-Inhibition induziert Autophagie .....	77
3.6	Autophagie-Inhibition ist synergistisch mit FLT3-Inhibition .....	79
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>82</b>
4.1	Zusammenhänge zwischen FLT3-Signaltransduktion und Autophagie....	83
4.2	Autophagie und deren Inhibition in AML-Zellen.....	85
4.3	Auswirkungen der FLT3-ITD-Mutation auf Autophagie und Proliferation .	90
4.4	Neue Strategien in der AML-Therapie.....	92
4.5	Spezifische ULK1/2-Inhibitoren als neue Wirkstoffe bei AML.....	98
4.6	Bedeutung der ULKs .....	102
4.7	Ausblick.....	105

<b>5 Zusammenfassung</b> .....	<b>106</b>
<b>6 Summary</b> .....	<b>107</b>
<b>7 Literaturverzeichnis</b> .....	<b>109</b>
<b>8 Danksagung</b> .....	<b>126</b>
<b>9 Lebenslauf</b> .....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
<b>10 Schriftliche Erklärung</b> .....	<b>127</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Signalwege von Rezeptor-Tyrosinkinasen: .....	19
Abbildung 2: Bestimmung der Selektionsdosis von Blasticidin:.....	42
Abbildung 3: lineare Korrelation zwischen Zellzahl und Lumineszenz durch CellTiter-Glo® .....	45
Abbildung 4: <i>Gating</i> -Schema der Durchflusszytometrie .....	49
Abbildung 5: Dynamik von GFP-LC3B-mCherry während der Autophagie .....	50
Abbildung 6: Autophagie- <i>Flux</i> bei 32D <sup>FLT3-ITD</sup> -Zellen infolge von mIL-3-Entzug ....	51
Abbildung 7: Ausschluss einer DMSO-Toxizität .....	53
Abbildung 8: Lysosomale Inhibitoren hemmen Autophagie potenter und effektiver bei 32D <sup>FLT3-ITD</sup> - als bei 32D <sup>ctrl</sup> -Zellen .....	54
Abbildung 9: Dosis-Wirkungs-Kurven von 32D-Zellen unter Behandlung mit lysosomalen Inhibitoren .....	56
Abbildung 10: Wachstum von 32D-Zellen unter Chloroquin- und Lys05-Behandlung .....	58
Abbildung 11: Wachstum von 32D-Zellen unter ROC-325-Behandlung.....	59
Abbildung 12: Behandlung von 32D <sup>FLT3-ITD</sup> ± mIL-3 mit lysosomalen Inhibitoren...	60
Abbildung 13: FLT3-ITD-mutierte AML-Zellen sind vulnerabel gegenüber hochspezifischen ULK1/2-Inhibitoren .....	63



Abbildung 14: FLT3-ITD-mutierte AML-Zelllinien sind vulnerabel gegenüber ULK1/2-Inhibitoren .....	64
Abbildung 15: FLT3-ITD-mutierte AML-Zellen sind nicht vulnerabel gegenüber Aurora-Kinase-Inhibitor .....	64
Abbildung 16: Behandlung von 32D <sup>FLT3-ITD</sup> - und MV4-11-Zellen mit AC220 und ULK-Inhibitoren .....	66
Abbildung 17: kompetitives Wachstum von MV4-11 mit ULK1-K. o .....	68
Abbildung 18: kompetitives Wachstum von MOLM-14 mit ULK1-K. o.....	69
Abbildung 19: AC220-Behandlung von ULK1-K. o.- und NHT-MV4-11-Zellen .....	70
Abbildung 20: kompetitives Wachstum von MV4-11 mit ULK1-K. o. unter Aminosäuren-Entzug .....	71
Abbildung 21: Behandlung von MV4-11 <sup>ULK1-K. o.</sup> und MV4-11 <sup>NHT-K. o.</sup> mit ULK1/2- Inhibitor .....	72
Abbildung 22: Behandlung von MV4-11 mit lysosomalen Inhibitoren .....	74
Abbildung 23: Behandlung von MOLM-14 mit lysosomalen Inhibitoren .....	75
Abbildung 24: Spezifische Autophagie-Induktion durch FLT3-Inhibitor AC220 .....	78
Abbildung 25: Beeinflussung der Autophagie durch verschiedene Inhibitoren .....	79
Abbildung 26: Synergismus zwischen FLT3-Inhibitor AC220 und lysosomalen Autophagie-Inhibitoren Lys-05 und ROC-325 .....	80
Abbildung 27: Synergismus zwischen FLT3-Inhibitor AC220 und lysosomalen Autophagie-Inhibitoren Lys-05 und ROC-325 und Testung auf Signifikanz .....	81

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verbrauchsmaterial.....	28
Tabelle 2: Geräte.....	28
Tabelle 3: Software .....	30
Tabelle 4: Chemikalien und Kits .....	30
Tabelle 5: Puffer, Lösungen und Kulturmedien .....	34
Tabelle 6: Primär-Antikörper.....	35
Tabelle 7: Sekundär-Antikörper.....	36
Tabelle 8: verwendete Zelllinien .....	36
Tabelle 9: Plasmide.....	37
Tabelle 10: spezifische Inhibitoren .....	38
Tabelle 11: Mittelwerte der IC <sub>50</sub> -Konzentrationen und Signifikanz .....	57
Tabelle 12: Mittelwerte der IC <sub>50</sub> -Werte bei 32D <sup>FLT3-ITD</sup> ± mL-3 und Signifikanz ...	61
Tabelle 13: IC <sub>50</sub> -Werte von Kinase-Inhibitoren.....	65

## Abkürzungsverzeichnis

AML	akute myeloische Leukämie
AMPK	AMP-abhängige Kinase
APS	Ammoniumperoxidsulfat
Aq. dest.	<i>Aqua destillata</i> (destilliertes Wasser)
ATG	<i>autophagy-related protein</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BFP	<i>blue fluorescent protein</i> (blau-fluoreszierendes Protein)
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serum-Albumin
CD	<i>cluster of differentiation</i> (Oberflächenmerkmale auf Zellen)
CLL	chronische lymphatische Leukämie
Chk	<i>Checkpoint kinase</i> (Proteinkinase)
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i> (sich wiederholende DNS-Sequenzen)
ctrl	<i>control</i> (Kontrolle)
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i>
DAPK	<i>death-associated protein kinase</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid

FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)
FCS	fetales Kälberserum
FDA	<i>food and drug administration</i> (US-Arzneimittelbehörde)
FL	FLT3-Ligand
FLT3	<i>Fms like tyrosine kinase 3</i>
FSC	<i>forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	<i>green fluorescent protein</i> (grün-fluoreszierendes Protein)
GSK	Glykogen-Synthase-Kinase
GTP	Guanosintriphosphat
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HDACi	Histon-Deacetylase-Inhibitoren
HMGB1	<i>High-Mobility-Group-Protein B1</i>
HSC	hämatopoetische Stammzelle
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration
ITD	<i>internal tandem duplication</i> (interne Tandemduplikation)
JAK	Januskinase
K. o.	<i>knock-out</i> (Ausschaltung eines Genes)
LC3	<i>Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3</i> (Ubiquitin-ähnliches Protein, Atg8-Homolog)
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LSC	<i>leukemic stem cell</i> (Leukämie-Stammzelle)

MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MES	2-(N-Morpholino-) Ethansulfonsäure
mIL-3	murines Interleukin-3
mTOR	<i>mammalian Target of Rapamycin</i> (Proteinkinase)
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Natriumorthovanadat
NHT	<i>non-human-targeting</i> (nicht-kodierende DNS-Sequenz)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PEI	Polyethylenimin
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP3	Phosphatidylinositoltriphosphat
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (Name für Zellkulturmedium)
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SEM	<i>standard error of the mean</i> (Standardfehler des Mittelwerts)
SSC	<i>side scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
STAT5	<i>signal transducer and activator of transcription 5</i> (Transkriptionsfaktor)

TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween-20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TKD	Tyrosinkinase-Domäne
ULK	<i>unc-51-like kinase</i> (Proteinkinase, ATG-Protein)
v. c.	<i>vehicle control</i> (Lösungsmittel-Kontrolle)
WT	Wildtyp

# 1 Einleitung

## 1.1 Akute myeloische Leukämie

### 1.1.1 Definition und Symptomatik

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine maligne Erkrankung, welche das hämatopoetische System betrifft. Durch Entartung der Knochenmarkstammzellen und Differenzierungsblock der Vorläufer-Zellen kommt es zur Ausschwemmung unreifer Blasten ins periphere Blut.<sup>1</sup> Es resultiert typischerweise der sogenannte *Hiatus leucaemicus*, der die Dominanz von undifferenzierten Myeloblasten (mindestens 20 % anteilig im Knochenmark für die Diagnose nötig<sup>2,3</sup>) und reifen Leukozyten bei fehlenden Zwischenformen der Differenzierung in Blut und Knochenmark, beschreibt.<sup>1</sup>

Daraus folgen die typischen Symptome einer Trizytopenie: Infektanfälligkeit durch Granulozytopenie, Abgeschlagenheit und Dyspnoe infolge der Anämie sowie eine hämorrhagische Diathese als Folge der Thrombozytopenie.<sup>1</sup> Mit einer Inzidenz von 3,7/100 000 Einwohner/Jahr macht die AML 80 % der Leukämien im Erwachsenenalter aus und nimmt mit steigendem Alter zu.<sup>1</sup>

### 1.1.2 Genetik und Prognose

Entscheidend für die Prognose ist neben Eigenschaften des Patienten wie beispielsweise Alter und Komorbiditäten auch die Art der genetischen Mutation.<sup>3,4</sup> Diese lässt sich in neun funktionelle Kategorien einteilen: Transkriptionsfaktor-Fusionen, das NPM1-Gen, Tumorsuppressor-, *Signaling*-, Chromatin-modifizierende und Spliceosom-Komplex-Gene.<sup>3</sup> Bei der molekulargenetischen Untersuchung wird routinemäßig auf Mutationen in den Genen NPM1, CEBPA und RUNX1, welche bei normalem Karyotyp eigene Kategorien der AML mit günstiger Prognose darstellen, getestet.<sup>1-3,5</sup> Außerdem untersucht man auf *Fms-like tyrosine kinase III* (FLT3)-Mutationen, welche sowohl prognostisch als auch therapeutisch<sup>6</sup>

Bedeutung haben und auf TP53 und ASXL1, da diese mit einer schlechten Prognose assoziiert sind.<sup>3,5</sup> Auf zytogenetischer Ebene gehen sogenannte unbalancierte Chromosomenveränderungen, das heißt mit Verlust bzw. Zugewinn von chromosomalem Material, mit sehr viel geringeren Heilungsraten einher als bei normalen Karyotypen.<sup>1,3</sup>

### 1.1.3 Therapie

Die Standardtherapie beginnt mit der Remissionsinduktion, deren Ziel die Verringerung der malignen Zellen um mindestens drei Zehnerpotenzen darstellt.<sup>1,5</sup> Ein typisches Schema ist die 7 + 3-Kombination aus Cytarabin und Daunorubicin.<sup>5</sup> Die folgende Konsolidierungstherapie besteht aus mehreren Zyklen Cytarabin und wird bei intermediärem bis hohem Risiko eines Rezidivs um eine allogene Stammzelltransplantation erweitert, sofern der Patient geeignet ist.<sup>5</sup> Außerdem werden bei bestimmten genetischen Subgruppen meist im Rahmen von Studien zielgerichtete Substanzen miteinbezogen.<sup>3</sup> Bei 60-80 % der Patienten unter 60 Jahren und 40-60 % der Älteren kann so eine komplette Remission erreicht werden.<sup>3</sup> Bei circa 70 % kommt es allerdings innerhalb der folgenden drei Jahre zu einem Rezidiv und das Gesamtüberleben beträgt drei Jahre nach der Diagnose nur knapp 25 %.<sup>1,3</sup> Sehr häufig kommt es zu Nebenwirkungen wie Haarausfall, Infektionen, Erbrechen und Diarrhö, sowie pulmonalen Schädigungen, welche die Genesung verkomplizieren.<sup>1,7</sup> Außerdem kann bei Patienten höheren Alters, insbesondere beim Vorliegen von Komorbiditäten, die hochdosierte Chemotherapie oft nicht angewandt werden, da die Gefahr der Mortalität durch die Behandlung zu hoch ist.<sup>8</sup> Mit niedrig dosierter Cytarabin-Therapie lässt sich dann bei 15-25 % die Remission erreichen, allerdings beträgt die Überlebenszeit im Schnitt nur fünf bis sechs Monate.<sup>3</sup> Im Falle eines Rezidivs muss, sofern der Zustand des Patienten es erlaubt, wieder eine hochdosierte Chemotherapie eingeleitet werden, wobei die Prognose äußerst schlecht ist.<sup>3</sup>



## 1.2 FLT3-ITD-Mutation

### 1.2.1 FLT3-Rezeptor und -Ligand im gesunden Organismus

Das humane FLT3-Gen befindet sich auf dem langen Arm des 13. Chromosoms an der Bande 12 (13q12). Es besteht aus über tausend Kilobasen mit 24 Exons und kodiert für ein Protein aus 993 Aminosäuren, das als Rezeptor entweder als membranständige und N-glykosylierte 160 kDa- oder als zytosolische 130 kDa-Form vorkommt.<sup>9</sup> Dieser FLT3-Rezeptor gehört zur Gruppe der Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) Typ III, wie auch c-KIT, c-FMS, und der PDGF-Rezeptor.<sup>10</sup>

Diese haben alle eine ähnliche Molekularstruktur: eine extrazelluläre Region aus fünf Immunglobulin-ähnlichen Domänen zur Bindung des Liganden, eine einzelne Transmembranhelix, sowie zytoplasmatisch eine juxtamembranäre Domäne (JMD) und eine Tyrosinkinase-Domäne (TKD), die durch eine *kinase insert domain* (KID) unterbrochen wird.<sup>11</sup>

Die Bindung eines Liganden induziert die Dimerisierung der RTK. Ob die inaktive Version wie bei FLT3<sup>12</sup> als Monomer oder bereits als Oligomer vorliegt, ist hierbei bedeutungslos, denn erst der Ligand stabilisiert den Komplex ausreichend.<sup>11</sup> Die Assoziation der extrazellulären Domänen bewirkt durch eine Konformationsänderung die Aktivierung der Tyrosinkinase, die nun benachbarte Tyrosine phosphoryliert.<sup>11,13</sup> Dabei phosphorylieren die beiden Monomere sich gegenseitig und dienen dann als Ort zur Assemblierung und Aktivierung intrazellulärer Proteine<sup>13,14</sup>, die über diverse Adapterproteine oder selbst enthaltende *Src homology 2* (SH2)- oder Phosphotyrosin-Bindungs-Domänen gebunden werden.<sup>11,13</sup> Durch Multivalenz, also der Präsenz mehrerer solcher Domänen in unterschiedlicher Abfolge, entsteht eine gewisse Spezifität der verschiedenen Rezeptoren für einzelne Signalwege, die beispielsweise durch die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) oder die Phospholipase C (PLC)  $\gamma$  vermittelt werden.<sup>11,13</sup> Sogenannter *Crosstalk*

zwischen den einzelnen Signalwegen sorgt für noch mehr Vielfalt.<sup>11</sup> Somit nehmen RTKs in der Signaltransduktion die Rolle eines Knotenpunktes ein, da über sie die Zelle zu unterschiedlichsten Reaktionen stimuliert wird – Differenzierung, Proliferation oder Apoptose.<sup>11,13</sup>

Bei vielen dieser Rezeptoren wird im inaktiven (unphosphorylierten) Zustand die katalytische Domäne der TKD durch die JMD inhibiert.<sup>11</sup> Dies ist bei FLT3 auch der Fall.<sup>15</sup>

Beim Menschen wird FLT3 von *cluster of differentiation* (CD) 34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) exprimiert und bei der Entwicklung zu oligopotenten myeloischen und lymphatischen Progenitoren hochreguliert.<sup>16</sup> Myeloische Progenitoren, welche sich zu Erythrozyten und Megakaryozyten differenzieren können, exprimieren kein FLT3.<sup>16</sup> In den weiteren Entwicklungsstadien der verschiedenen Hämozyten bleibt FLT3 nur auf Granulozyten/Makrophagen-Progenitoren exprimiert.<sup>16</sup> Folglich findet es sich nicht mehr ab dem Stadium der Myelo- und Monoblasten sowie der Pro-B-Zellen.<sup>16</sup> Durch diese Restriktion bekommt unter normalen Umständen die Aktivierung von FLT3 hauptsächlich eine Rolle in der frühen Hämatopoese.<sup>16,17</sup>

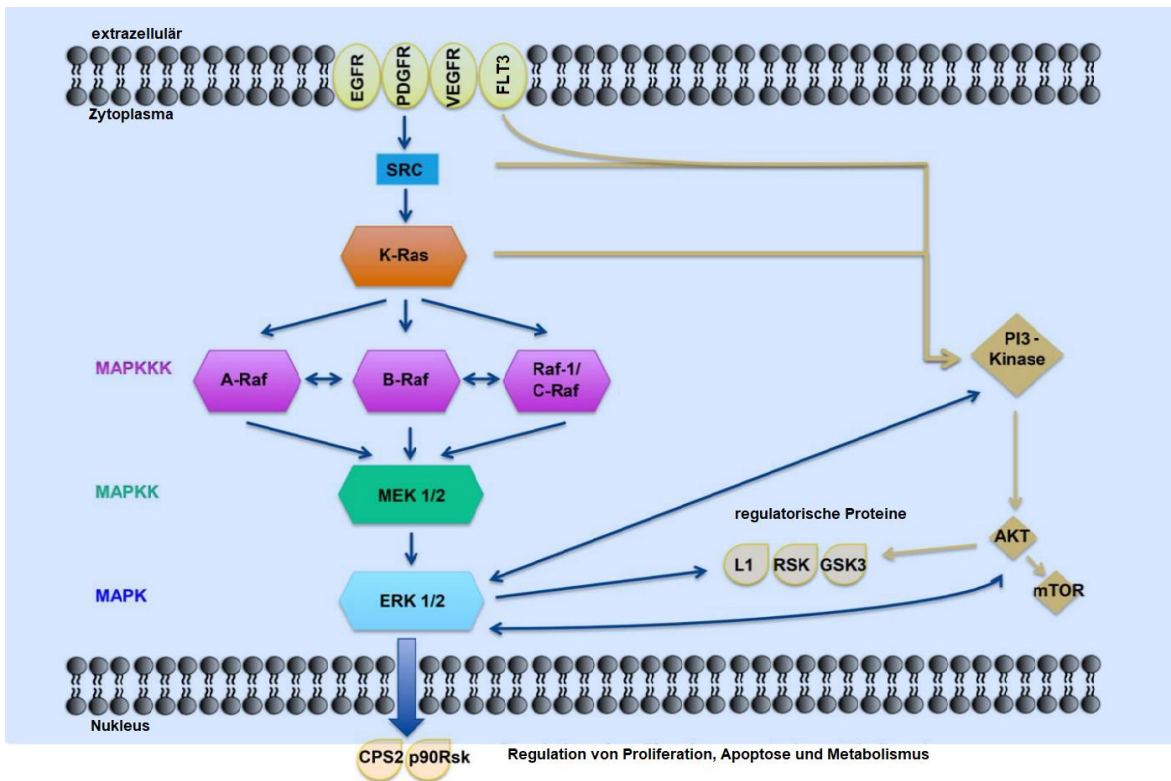
Der zugehörige FLT3-Ligand (FL) wird in die Gruppe der Zytokine eingeordnet und kommt sowohl membrangebunden als auch löslich vor.<sup>18</sup> Produziert wird er von Stromazellen im Knochenmark, T-Zellen und epithelialen Zellen.<sup>18</sup>

Wenn der FLT3-Rezeptor durch Bindung des Liganden FL zur Dimerisierung sowie Autophosphorylierung angeregt wird<sup>19</sup>, werden zwei verschiedene, aber verknüpfte Signalwege aktiviert: der MAPK- und der PI3K/AKT-Weg.<sup>20</sup>

Die phosphorylierten Tyrosine dienen als Andockstelle für Grb-2 welches den *guaninnucleotid exchange factor* (GEF) SOS rekrutiert.<sup>13,21</sup> Dieser aktiviert das G-Protein Ras durch Austausch von GDP gegen GTP.<sup>11,13</sup> Nach

aufeinanderfolgenden Phosphorylierungen von Raf, MEK und schließlich MAPK (ERK1/2), transloziert diese Kinase in den Zellkern und aktiviert Transkriptionsfaktoren.<sup>11,13</sup>

Die PI3K wird ebenfalls durch Assoziation mit der zytoplasmatischen Domäne von FLT3 aktiviert<sup>21</sup> und aktiviert daraufhin die Proteinkinase AKT, deren Ziele unter anderem *mammalian target of Rapamycin* (mTOR) oder die Glykogen-Synthase-Kinase-3 (GSK-3) sind.<sup>22,23</sup>



**Abbildung 1: Signalwege von Rezeptor-Tyrosinkinasen:** Rezeptor-Tyrosinkinasen wie FLT3 aktivieren den PI3K/AKT/mTOR- und den MAPK-Weg. (modifiziert nach Burotto et. al., 2014<sup>22</sup>)

Beide Wege führen zur Genexpression von beispielsweise dem Protoonkogen c-Myc<sup>13,24</sup>, wirken anti-apoptotisch und fördern Proliferation und Wachstum der Zelle.<sup>22</sup>

Allerdings hat dies nur in Verbindung mit anderen Wachstumsfaktoren wie beispielsweise Interleukin-3 (IL-3), *colony-stimulating factor-1* (CSF-1) oder Granulozyten-stimulierende Faktoren (G-CSF, CM-CSF) einen Effekt.<sup>25,26</sup>

Außerdem schützt die Aktivierung von FLT3 die Zellen durch die Hochregulierung des anti-apoptotischen Faktors Mcl-1 vor dem Zelltod.<sup>16</sup> Normalerweise wird einer Hyperstimulation durch intrazelluläre Retention des FL entgegen gewirkt.<sup>27</sup>

### 1.2.2 FLT3-Mutationen

Im Jahre 1996 untersuchten Nakao *et al.* die Expression von FLT3-mRNA in 30 AML-Proben.<sup>28</sup> Von 22 FLT3-Expimierenden zeigten fünf ungewöhnlich lange Fragmente in PCR-Produkten der JMD, woraufhin die Sequenzierung dieser ergab, dass bestimmte Abschnitte dupliziert worden waren.<sup>28</sup> Bei all diesen Mutationen blieb das Leseraster zur Translation erhalten (sogenannter *in frame-shift*), sodass ein Protein produziert werden konnte.<sup>28</sup> Nach der Sequenzierung der genomischen DNS, welche Duplikationen verschiedener Exons bzw. Abschnitte davon zeigte, wurde erstmals die FLT3-ITD-Mutation beschrieben.<sup>28</sup>

Diese Art der Längenmutation liegt in circa 25 % der AML-Fälle vor<sup>29</sup> und befindet sich entweder in der JMD oder in der TKD.<sup>30</sup>

Meistens bewegt sich die Länge der Duplikation im Bereich zwischen 12 und 204 Basenpaaren (bp), wobei auch schon Duplikationen mit nur 3 bp oder über 400 bp beschrieben sind.<sup>29</sup>

Außerdem finden sich bei circa 7 % der AML-Patienten Punktmutationen im Exon 20, die zu verschiedenen Substitutionen von beispielsweise Aspartat-835 oder Isoleucin-836<sup>31,32</sup> führen und hierdurch die Tyrosinkinase-Domäne verändern. Dies wird als FLT3-TKD-Mutation bezeichnet. In beiden Fällen führt die Mutation zum Verlust der Fähigkeit der JMD, die TKD zu inhibieren, wodurch diese konstitutiv aktiv bleibt.<sup>15,31,32</sup>

### 1.2.3 Zusammenhang zwischen FLT3-ITD und AML

Da FLT3 von den meisten AML-Blasten sowohl exprimiert wird<sup>20</sup> als auch zu 25 % von der aktivierenden ITD-Mutation betroffen ist<sup>29</sup>, wurde spekuliert, dass dieses Protein eine Rolle in der malignen Transformation von myeloischen Zellen spielt.

Der Einfluss von konstitutiv aktivem FLT3 wurde an den Wachstumsfaktor (mIL-3)-abhängigen murinen myeloiden Progenitor-Zellen 32D und den multipotenten B-Zell-Vorläufern BA/F3 untersucht. Sowohl eine aktivierende Punktmutation als auch FLT3-ITD führen zu konstitutiver FLT3-Phosphorylierung und mIL-3-unabhängiger Proliferation.<sup>31,33</sup> Bei der Suche nach Signalkaskaden, die diesen Effekt vermitteln, zeigte sich in transduzierten 32D<sup>FLT3-ITD</sup>, BA/F3<sup>FLT3-ITD</sup> und auch in Blasten mit FLT3-ITD aus AML-Proben eine Daueraktivierung der MAPK-Signalwegs und des bei WT-FLT3 nicht exprimierten Transkriptionsfaktors STAT5.<sup>33-35</sup>

Mehrmals wurde schon gezeigt, dass der MAPK- und STAT5-Weg Teil der durch mIL-3-vermittelten Stimulation zur Proliferation und Verhinderung der Apoptose sind.<sup>36,37</sup> Dies lässt vermuten, dass die simultane Aktivität beider Signalwege für das autonome Wachstum myeloischer Blasten ohne mIL-3 verantwortlich ist. Hemmung der MAPK führt zum Zelltod in WT-FLT3-Zellen, während dies bei FLT3-ITD nur die Proliferation supprimiert<sup>37</sup>, wofür die Aktivierung von STAT5 verantwortlich sein könnte. Außerdem zeigt dies die Bedeutung der MAPK-Aktivierung für die Mitogenität von Zellen.<sup>33,35</sup>

Bei 32D<sup>FLT3-ITD</sup> findet sich zusätzlich eine Daueraktivierung des PI3K/AKT-Weges<sup>38</sup>, welcher mit Proliferation und Wachstum assoziiert ist.<sup>23</sup> Außerdem bilden diese Zellen Kolonien in semisolidem Medium (Methylcellulose) ohne mIL-3, was beim WT-FLT3 selbst bei maximaler FL-Dosis nicht der Fall ist.<sup>38</sup> Des Weiteren verhindert die ITD-Mutation Strahlungs-induzierte Apoptose.<sup>38</sup> 32D<sup>WT-FLT3</sup> gehen entweder fast vollständig zugrunde oder werden größtenteils bei Zugabe von FL durch MAPK-Aktivierung gerettet.<sup>38</sup> Hauptsächlich über STAT5 kommt es zu einer erhöhten

Expression der Protoonkogene c-Myc<sup>24</sup>, Pim-1 und Cyclin D3<sup>39</sup>, welche den Zellzyklus auch ohne Zytokin-Stimulation vorantreiben und so unkontrollierte Proliferation und einen Differenzierungsblock vermitteln.<sup>24,39,40</sup> Durch den über den Wnt-Weg herunterregulierten Tumorsuppressor Mxd<sup>24</sup> und die kürzlich entdeckte inaktivierende Phosphorylierung von p21<sup>41</sup> durch FLT3-ITD verlieren diese zusätzlich ihre Funktion, den Zellzyklus anzuhalten und die Proliferation im physiologischen Rahmen zu halten.<sup>24,41</sup> Hämatopoetische Stammzellen (HSCs) verlassen durch das hochregulierte Myc eher das Knochenmark und wandeln sich zu proliferierenden Progenitoren um.<sup>24</sup>

Das onkogene Potenzial von FLT3-ITD offenbarte sich bei der Injektion von 32D<sup>WT-FLT3</sup> sowie 32D<sup>FLT3-ITD</sup> in syngene Mäuse. 32D<sup>FLT3-ITD</sup> führten bei nahezu allen Tieren zu einer Leukämie-ähnlichen Erkrankung mit Hepatosplenomegalie und Infiltration des Knochenmarks durch Blasten.<sup>38</sup> Die meisten starben innerhalb von fünf Wochen nach der Injektion, während bei 32D<sup>WT-FLT3</sup> die Tiere drei Monate lang unauffällig blieben, dann 20 % ein ähnliches Krankheitsbild entwickelten und starben.<sup>38</sup>

#### 1.2.4 Einfluss auf die Prognose und gezielte Therapie

Bei einer AML mit FLT3-Längenmutation hat das Allelverhältnis FLT3 (mutiert)/FLT3 (WT) prognostische Auswirkungen.<sup>3</sup> Es führt zu einer geringeren Remissions- sowie einer erhöhten Rezidiv-Rate. Insgesamt verringert eine ITD-Mutation die 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate von AML-Patienten bei Standardtherapie von 44 auf 32 %.<sup>42</sup>

Neben dieser prognostischen Bedeutung bietet die ITD-Mutation auch einen therapeutischen Ansatzpunkt. Als Tyrosinkinase-Rezeptor lässt sich FLT3 pharmakologisch inhibieren. Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) der ersten Generation (z.B. Midostaurin, Lestaurtinib, Sunitinib oder Sorafenib) inhibieren ein breites Spektrum an Kinasen, sodass außer FLT3 auch andere Signalmoleküle blockiert werden.<sup>43</sup> In Kombination mit der Standard-Chemotherapie wurde die Heilungsrate

verbessert und Midostaurin in die empfohlene Therapie der AML mit FLT3-ITD-Mutation aufgenommen.<sup>3,6,44</sup> Die Folgegeneration (Gilteritinib, Crenolanib und Quizartinib) zeichnet sich durch eine deutlich höhere Potenz und Spezifität für FLT3 aus<sup>45</sup> und soll somit einen stärkeren Effekt bei weniger Nebenwirkungen haben.<sup>43</sup> Derzeit wird beispielweise Quizartinib in klinischen Studien getestet. Im Rahmen der QuANTUM-First-Studie (NCT02668653) wird es in Kombination mit der Standard-Chemotherapie aus Cytarabin und Daunorubicin erprobt. Als Monotherapie zeigte es bereits Wirkung bei primär refraktärer oder rezidivierender FLT3-ITD-positiver AML.<sup>46</sup> Allerdings gibt es auch viele Patienten, bei denen TKI aufgrund von vorbestehenden oder im Verlauf entstehenden Resistenzmechanismen wirkungslos sind.<sup>43,47-49</sup> Um diese Mechanismen zu umgehen, wurde nach synergistischen Wirkstoffen gesucht. Bei einem Screening der ICCB *Known Bioactives Library*, die unter anderem Tyrosinkinase- und Protease-Inhibitoren sowie genregulatorische Agentien beinhaltet, wurde eine verstärkte Wirkung von Quizartinib (AC220) in Kombination mit Mubritinib (TAK-165) auf Leukämie-Zellen gefunden<sup>50</sup>. Hierbei handelt es sich um einen HER2-Inhibitor, der in dieser Anwendung Autophagie inhibiert und Chaperon-vermittelte Apoptose einleitet.<sup>50</sup> Unter anderem diese Entdeckung gab Anlass dazu, die Inhibition der Autophagie als neues pharmakologisches Ziel in Betracht zu ziehen.

## 1.3 Autophagie

### 1.3.1 Beschreibung

Autophagie ist ein metabolischer Prozess, bei dem zytoplasmatische Bestandteile lysosomal abgebaut und die Produkte recycelt werden können.<sup>51</sup> Konstitutiv wird so die Zelle vor der Akkumulation aggregierter Proteine oder geschädigter Organellen geschützt und als Reaktion auf hypoxischen Stress, Energie- oder Nährstoffmangel versorgt.<sup>52,53</sup>

Klassischerweise läuft die Autophagie über den sogenannten kanonischen Weg in vier Phasen ab, die jeweils an die hierarchische Involvierung vieler Signal- oder Effektorproteine gekoppelt sind.<sup>54</sup> Bei Säugetieren leitet im Rahmen der Initiation die Aktivierung der *unc-51-like kinase 1/2* (ULK1 bzw. ULK2, beide ortholog zum Hefe-Protein Atg1 und funktionell teilweise redundant<sup>55</sup>) mit weiteren *autophagy-related* (ATG)-Proteinen (FIP200, ATG13, ATG101) die Bildung einer Phagophore ein<sup>56</sup>, indem zytosolisches Material von einer Isolationsmembran umschlossen wird.<sup>57</sup> Wichtig für die Nukleation (zweite Phase) ist der PI3K III-Komplex aus VPS34, p150, Beclin1, ATG14 und AMBRA1, sowie die Phosphorylierung einzelner Komponenten durch ULK1/2.<sup>56</sup> Der nächste Schritt, die Elongation, wird durch zwei Ubiquitin-ähnliche Reaktionen vermittelt und endet mit dem Verschluss der Membran zum Autophagosom.<sup>57</sup> Zunächst kommt es zur Bildung eines Komplexes aus ATG12-ATG5-ATG16L, welcher Membranexpansion und weiteren Modifikationen vermittelt.<sup>57</sup> Danach wird das zytosolische Atg8-Homolog *Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3* (LC3)-I mit Phosphatidylethanolamin (PE) konjugiert und durch ATG4-Homologe, den ATG12-Komplex sowie weiterer ATG-Proteine zu LC3-II (lipidiertes LC3) modifiziert, welches in die Membran eines reifen Autophagosomes eingebaut wird. LC3B-II ist somit ein Markerprotein reifer Autophagosomen.<sup>57</sup> Schließlich fusioniert das reife Autophagosom mit einem Lysosom zum Autophagolysosom, in dem die Degradierung des autophagosomalen Inhaltes stattfindet.<sup>56,57</sup>



### 1.3.2 Regulation

Am besten bekannt ist die Regulation durch den *mTOR complex 1* (mTORC1)<sup>58,59</sup>, wovon die Proteinkinase mTOR ULK1/2 phosphoryliert, damit den ULK-Komplex inaktiviert und somit die Autophagie hemmt.<sup>58,59</sup> mTORC1 wird unter anderem stimuliert durch ATP und Aminosäuren und fungiert so als Sensor für intrazelluläre Nährstoffe.<sup>60</sup> Außerdem bewirken Wachstumsfaktoren über den PI3K/AKT-Weg ebenfalls eine Aktivierung von mTORC1.<sup>61</sup> Hypoxie wirkt hingegen als starker mTORC1-Suppressor.<sup>58</sup>

Bei Energie- oder Nährstoffmangel werden mTORC1, ULK1/2 und DAPK von der AMP-abhängigen Kinase (AMPK) direkt phosphoryliert und so Autophagie initiiert.<sup>52,61</sup> Als negatives Feedback phosphoryliert ULK1/2 die AMPK an einer inhibierenden Stelle.<sup>62</sup>

Nach der Initiation der Autophagie wird Beclin1 von ULK1 direkt phosphoryliert,<sup>52</sup> wodurch dieses aus seiner inhibierenden Bindung an Bcl-2 gelöst wird<sup>63</sup> und im Rahmen der Nukleation aktiv wird.<sup>56</sup>

Zusätzlich gibt es aber noch weitere Aktivatoren bzw. Suppressoren, sowie Signalkaskaden, die ohne die genannten Zwischenschritte, z. B. mTORC1-unabhängig, zur Autophagie führen können.<sup>52,64</sup> Durch *death-associated protein kinase* (DAPK)-Aktivierung nach einer DNS-Schädigung kann Beclin1 direkt - also ohne ULK – aktiviert werden.<sup>65</sup> Pathogene oder zytotoxische Substanzen, wie beispielsweise Etoposid oder Arsen-Trioxid, lösen eine Beclin1-unabhängige Autophagie aus<sup>54</sup> und Ammoniak als Auslöser kann ebenfalls ULK1/2 umgehen.<sup>54</sup>

### 1.3.3 Autophagie in Leukämie-Zellen

Durch ihre Schlüsselfunktion als Nährstoff-Lieferant in Stress- bzw. Mangelsituationen wurde die Autophagie als adaptiver Resistenzmechanismus gegenüber zytotoxischen Substanzen in malignen Zellen verdächtigt und auch in mehreren Studien bestätigt.<sup>66-70</sup> Zum Beispiel zeigte sich bei resistenten Zellen der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) als Reaktion auf Chemotherapeutika ein Anstieg des *damage-associated molecular pattern* (DAMP) - Moleküls HMGB1, welches Autophagie induziert. Sowohl gentechnische als auch pharmakologische Inhibition der Autophagie machte die Resistenz reversibel.<sup>71</sup> Bei unter anderem AML führt der Einsatz von Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDACis) ebenfalls zu Autophagie, wobei die Blockierung dieser mit (Hydroxy-)Chloroquin synergistisch Wirkung in Form von vermehrtem Zelltod bei erhöhter Menge an reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) und Akkumulation ubiquitinerter Proteine zeigte.<sup>72</sup> Da Chloroquin bzw. Hydroxychloroquin schon lange als Medikament bei Malaria etabliert ist,<sup>73</sup> konnte es *in vivo* in Kombination zur Chemotherapie getestet werden und zeigte Erfolge bei soliden Tumoren wie dem kolorektalen oder hepatozellulären Karzinom.<sup>66</sup>

Bislang kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass diese Wirkung durch *off-target*-Effekte zustande kommt, da spezifische Autophagie-Inhibitoren erst entwickelt werden und mechanistisch noch nicht vollständig verstanden werden. Da ULK1/2 die zentrale Rolle der Autophagie-Initiation zukommt<sup>55,74</sup> und in statistischen Analysen im Falle einer Überexpression bei diversen Tumoren und myelodysplastischen Störungen mit einer schlechten Prognose korreliert<sup>75</sup>, wurden spezifische Inhibitoren (*small molecules*) entwickelt.<sup>76</sup> Einer der ersten ULK1/2-Inhibitoren war SBI-0206965, der in verschiedenen Zelllinien die durch Nährstoffmangel oder mTOR-Inhibition ausgelöste Autophagie vollständig hemmt und synergistisch pro-apoptotisch wirkt.<sup>76</sup> Ähnlich verhält es sich mit MRT 67307

und MRT 68921, wovon ersterer außer den Proteinkinasen IKK und TBK1 zusätzlich ULK1/2 stark inhibiert und der zweite hochspezifisch für ULK1/2 ist.<sup>77</sup>

## 1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die FLT3-ITD-Mutation kommt bei fast einem Drittel der AML-Patienten vor<sup>29</sup> und ist mit einer schlechten Prognose assoziiert.<sup>1,4,42</sup> Es wurde bisher beschrieben, dass die Mutation zu vermehrter Autophagie in den Blasten führt<sup>27-29</sup> und diese als möglicher Resistenz-Faktor gegenüber Chemotherapeutika verdächtig ist.<sup>52,42</sup> Aufgrund des geringen Ansprechens der AML-Patienten auf die Standardchemotherapie ist die Entwicklung weiterer Medikamente notwendig.<sup>32-36</sup> Als vielversprechenden Angriffspunkt für neue Substanzen kommt die Autophagie in Betracht. Sowohl die Verhinderung der Degradierung des autophagosomalen Inhaltes mittels lysosomaler Inhibitoren als auch die zielgerichtete Hemmung (*targeted therapy*) der Proteinkinasen ULK1/2, welche eine Schlüsselrolle in der Initiation der Autophagie einnehmen<sup>55,58-60,74,75</sup>, kommen hierfür infrage.

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob AML-Zellen mit einer FLT3-ITD-Mutation vulnerabel gegenüber einer Hemmung der Autophagie sind. Hierfür wird in einem genetischen Modell der spezifische Einfluss der FLT3-ITD-Mutation isoliert und die Wirkung lysosomaler Autophagie-Inhibitoren bzgl. Proliferation und Autophagie-Dynamik von FLT3-ITD-positiven und FLT3-ITD-negativen Zellen beschrieben. Es wird ebenfalls untersucht, ob es durch lysosomale Inhibitoren zu einer gestörten FLT3-ITD-Signaltransduktionskaskade kommt.

Weiterhin soll die Abhängigkeit FLT3-ITD-positiver AML-Zellen von der Proteinkinase ULK1 untersucht werden, indem gentechnisch ein ULK1-Verlust erzeugt oder pharmakologisch eine ULK1-Inhibierung durchgeführt wird.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material und Geräte

Tabelle 1: Verbrauchsmaterial

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Durchflusszytometrie-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
konische Zentrifugenröhrchen Falcon™ (15 ml; 50 ml)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Mikroreaktionsgefäße (1,5ml; 2ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipetten <i>Pipetman</i> Gilson™ (10 µl; 20 µl; 200 µl; 1000 µl)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Pipettenspitzen	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Proteingel NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Midi	Invitrogen™, Karlsruhe, Deutschland
Serologische Pipetten	StarLab, Hamburg, Deutschland
Sterilfilter Filtropur (0,45µm)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturplatte (15cm, 10cm, 6-/12-/24- /48-/96-well)	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Zellkultur Mikroplatte, 96 well, PS, F- Boden, weiß	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflaschen (25/75/125 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Tabelle 2: Geräte

<b>Beschreibung</b>	<b>Hersteller</b>
Autoklav	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
CO <sub>2</sub> -Inkubator Heracell™ 150i	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA

Durchflusszytometer BD LSR Fortessa™	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Eisbereiter	Hoshizaki, Gießen, Deutschland
Gefrierbehälter <i>Mr. Frosty</i> ™	Thermo Scientific, Rockford, USA
Gefrierschrank (-20° C)	Liebherr, Biberach, Deutschland
Gefrierschrank (-80° C)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Gelelektrophorese-System XCell SureLock™ Mini	Invitrogen, Thermo Scientific, Rockford, USA
Kryohandschuhe Cryo Gloves®	Tempshield, München, Deutschland
Kühlschrank (4°C)	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Lichtmikroskop	Olympus, Hamburg, Deutschland
Mehrkanalpipette	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Mikrotiterplatten-Lesegerät	Tecan, Männedorf, Schweiz
Odyssey® Fc <i>Imaging System</i>	LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA
Pipetten	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Sicherheitswerkbank Heraeus LaminAir®	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Sicherheitswerkbank Herasafe	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Tecan <i>Microplate Reader</i> Infinite® 200 PRO	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Transferkammer Novex™ Mini-Cell	Invitrogen, Thermo Scientific, Rockford, USA
Vortexer Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA

Waage	Sartorius Laboratory, Göttingen, Deutschland
Zählkammer Neubauer <i>improved</i>	Marienfeld, Lauda- Königshofen, Deutschland
Zentrifuge Hereaus Megafuge 1.0R	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Zentrifuge himac CT15RE	Hitachi, Düsseldorf, Deutschland
Zentrifuge Rotina 35	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Rotanta 460	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

Tabelle 3: Software

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
BD FACSDiva™ <i>Software</i>	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
<i>FlowJo</i> 10.5.2	FlowJo LLC, Ashland, Oregon, USA
<i>GraphPad Prism</i> 7	GraphPad Software, San Diego, USA
<i>i-control</i> ™	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
<i>Image Studio Lite Version</i> 5.2	LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA

Tabelle 4: Chemikalien und Kits

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
2-Propanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Acrylamide 40%	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumperoxidsulfat (APS) 10%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Antioxidant NuPAGE™	Invitrogen, Carlsbad, USA
Bis-Tris-Puffer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Blasticidin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bovines Serum-Albumin (BSA)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
CellTiterGlo® <i>Luminescent Cell Viability Assay</i>	Promega, Madison, USA
cOmplete™ Proteasehemmer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Doppelt destilliertes Wasser	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM)	Gibco™ (Life Technoloies), Paisley, Schottland
Ethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
<i>Fast Green FCF</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Glycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i> (HBSS)	Gibco™ (Life Technoloies), Paisley, Schottland
Hexadimethrin-Bromid (Polybren)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
LDS-Probenpuffer (4x) NuPAGE™	Invitrogen, Carlsbad, USA
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

MES SDS <i>Running Buffer</i> (20X) NuPAGE™	Invitrogen, Carlsbad, USA
Methanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Murines Interleukin-3 (mIL-3)	Peprtech, Rocky Hill, USA
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natrium-Orthovanadat (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
NP-40 Lyse-Puffer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
PageRuler™ <i>Prestained Protein Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Gibco™ (Life Technoloies), Paisley, Schottland
Penicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Polyacrylamidgel NuPAGE™ 4-12 % Bis-Tris (1 mm)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Polyethylenimin (PEI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Puromycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
<i>Reducing Agent</i> (10x) NuPAGE™	Invitrogen, Carlsbad, USA
<i>Restore™ Fluorescent Western Blot Stripping Buffer</i>	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA



Retronektin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
<i>Roswell Park Memorial Institute (RPMI)</i> 1640-Medium	Gibco™ (Life Technoloies), Paisley, Schottland
Steriles Wasser (aq. dest.)	Gibco™ (Life Technoloies), Paisley, Schottland
Streptomycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
SuperSignal™ West Femto Maximum <i>Sensitivity Substrate</i>	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Transfer-Puffer (20X) NuPAGE™	Invitrogen, Carlsbad, USA
Tryptanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin (10x)	PAA Laboratories, Parsching, Österreich
Tween-20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Tabelle 5: Puffer, Lösungen und Kulturmedien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<i>Fast Green</i> Waschlösung	<i>Aqua destillata (aq. dest.)</i> mit 30 % Methanol, 6,7 % Essigsäure
Kryomedium	90 % FCS, 10 % DMSO
Lyse-Puffer	864 µl NP-40 Lyse-Puffer, 80 µl cOmplete™ Proteasehemmer-Cocktail, 10 µl PMSF (20 mg/ ml), 46 µl Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (200 mM)
Nährmedium für adhärente Zellen	500 ml DMEM, 50 ml FCS, 5 ml Penicillin/ Streptomycin, 5 ml L-Glutamin
Nährmedium für Suspensionszellen	500 ml RPMI, 50 ml FCS, 5 ml Penicillin/ Streptomycin, 5 ml L-Glutamin
Polyacrylamid-Sammelgel	1 ml <i>aq. dest.</i> , 480 µl Bis-Tris-Puffer, 170 µl Acrylamid, 13,3 µl APS, 6,7 µl TEMED
Polyacrylamid-Trenngel (8 %)	3,7 ml <i>aq. dest.</i> , 2,1 ml Bis-Tris-Puffer, 1,5 ml Acrylamid, 48,9 µl APS, 17,7 µl TEMED
Tris-gepufferte Salzlösung (TBS) (10x)	<i>aq. dest.</i> mit 20 mM Tris, 137 mM NaCl
Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-20 (TBST)	1800 ml <i>aq. dest.</i> , 200 ml TBS, 2 ml Tween 20
Transfer-Puffer (10-fach)	2 l <i>aq. dest.</i> , 192 mM Glycin, 25 mM Trisbase
Transfer-Puffer	1,4 l <i>aq. dest.</i> , 200 ml 10-facher Transfer-Puffer, 400 ml Methanol, 2 ml Antioxidans

Tabelle 6: Primär-Antikörper

<b>Bezeichnung</b>	<b>Spezies</b>	<b>Bestell- nummer</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-AKT	Kaninchen	9272S Lot: 27	1:1000	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-Beclin-1	Kaninchen	3495	1:1000	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-hFLT3	Kaninchen	Sc-480	1:1000	Santa Cruz, Dallas, USA
Anti-β-Aktin	Maus	A5316	1:20000	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Anti-LC3B	Kaninchen	NB 100- 2220 Lot: DH1	1:1000	Novus, Centennial, USA
Anti-pAKT (S473)	Kaninchen	Sc-101629	1:1000	Santa Cruz, Dallas, USA
Anti-pBeclin-1 (S15)	Kaninchen	84966	1:1000	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-pFLT3 (T589/591)	Kaninchen	3466S Lot: 3004	1:1000	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-ULK1	Kaninchen	8054S	1:1000	Cell Signaling, Danvers, USA

Tabelle 7: Sekundär-Antikörper

Bezeichnung	Spezies	Bestellnummer	Verdünnung	Hersteller
anti-Maus-IgG	Ziege	115-005-003	1:10000	Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, UK
anti-Kaninchen-IgG	Ziege	111-005-045	1:10000	Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, UK

Tabelle 8: verwendete Zelllinien

Name	Beschreibung	Herkunft
32D	mll-3-abhängige murine Myeloblasten	DSMZ
MV4-11	Humane AML-Zellen mit biallelischer FLT3-ITD-Mutation; FAB: M5	DSMZ
MOLM-14	Humane AML-Zellen mit monoallelischer FLT3-ITD-Mutation; FAB: M5	DSMZ
OCI-AML3	Humane AML-Zellen mit WT-FLT3; FAB: M5	DSMZ
THP-1	Humane AML-Zellen mit WT-FLT3; Monozyten; FAB: M5	DSMZ
HEK-293T	Humane embryonale Nierenzellen	DSMZ

32D<sup>FLT3-ITD</sup> und 32D<sup>ctrl</sup>-Zellen (mit FLT3-ITD bzw. dem leeren Vektor transduzierte 32D-Zellen) stammten aus vorherigen Projekten der Arbeitsgruppe. Ebenso gab es diese genetisch modifizierten 32D-Zellen und die Zelllinie MV4-11, bei denen das Konstrukt GFP-LC3B-mCherry als *Flux*-Reporter<sup>78</sup> integriert worden war.

Tabelle 9: Plasmide

<b>Bezeichnung</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Genbank-Nr.</b>
pKLV2.2-h7SK-ULK1_1-hU6-ULK2_1-PGKpuroBFP-W	gRNS gegen ULK1/2, Puromycin-Resistenz, BFP	Ensembl: ENSG0000017769 / ENSG00000083290
pKLV2.2-h7SK-ULK1_2-hU6-ULK2_2-PGKpuroBFP-W	gRNS gegen ULK1/2, Puromycin-Resistenz, BFP	Ensembl: ENSG0000017769 / ENSG00000083290
pKLV2.2-h7SK-ULK1_3-hU6-ULK2_3-PGKpuroBFP-W	gRNS gegen ULK1/2, Puromycin-Resistenz, BFP	Ensembl: ENSG0000017769 / ENSG00000083290
pKLV2.2-h7SK-PLK1_1-hU6-PLK1_2-PGKpuroBFP-W	gRNS gegen PLK1, Puromycin-Resistenz, BFP	Ensembl: ENSG00000166851
pKLV2.2-h7SK-NHT_1-hU6-NHT_2-PGKpuroBFP-W (*)	gRNS gegen NHT, Puromycin-Resistenz, BFP	human non-targeting
pKLV2.2-h7SK-NHT_1-hU6-NHT_2-PGKpuro-W (*)	gRNS gegen NHT, Puromycin-Resistenz	human non-targeting

Die aufgeführten Plasmide wurden von Dr. Manuel Kaulisch, Institut für Biochemie II der Goethe-Universität in Frankfurt am Main, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Tabelle 10: spezifische Inhibitoren

<b>Bezeichnung</b>	<b>Pharmakologische Ziele</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalognummer</b>
AC220 <sup>45</sup>	FLT3	Selleckchem, Houston, USA	S1526
Alisertib <sup>79</sup>	Aurora-Kinase A	MedChemExpress, NJ, USA	HY-10971
AZD 7762 <sup>40</sup>	Checkpoint-Kinase (Chk1/2), ULK1/2	MedChemExpress, NJ, USA	HY-10992
Bafilomycin A1 <sup>80</sup>	lysosomale ATPase	LC Laboratories, Woburn, USA	B-1080
Chloroquinphosphat Resochin® <sup>73,80</sup>	lysosomale Enzyme	Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland	866225
Hesperadin <sup>79</sup>	Aurora-Kinase B, ULK1/2	MedChemExpress, NJ, USA	422513-13-1
Lys05 <sup>81</sup>	Lysosom	Selleckchem, Houston, USA	S3869
MRT 67307 <sup>77</sup>	ULK1/2, IKK, TBK1	MedChemExpress, NJ, USA	HY-13018
MRT 68921 <sup>77</sup>	ULK1/2	MedChemExpress, NJ, USA	HY-100006A
PF-03814735 <sup>79</sup>	Aurora-Kinase A/B, ULK1/2, FLT3	Stefan Laufer, Universität Tübingen	
PF-180 <sup>79</sup>	ULK1/2	Stefan Laufer, Universität Tübingen	
ROC-325 <sup>82</sup>	Lysosom	Selleckchem, Houston, USA	S8527

SBI-0069279 <sup>79</sup>	ULK1/2	Nicholas Cosford, Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute	
SBI-0206965 <sup>76</sup>	ULK1/2	Nicholas Cosford, Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute	
Torin <sup>83</sup>	mTOR	Selleckchem, Houston, USA	S2827

Die ULK1/2-, sowie Aurora-Kinase-Inhibitoren wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Stefan Knapp, Institut für Pharmazeutische Chemie der Goethe-Universität in Frankfurt am Main, zur Verfügung gestellt.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultivierung

Alle Zellen wurden steril und unter konstanten Bedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) im Brutschrank kultiviert und ausschließlich unter einer sterilen Werkbank aus der Kulturflasche bzw. von der -platte entnommen. Suspensionszellen (32D, MV4-11, MOLM-14, und THP-1) erhielten RPMI-Medium mit zusätzlich 10 % FCS und je 1 % Penicillin/Streptomycin und L-Glutamin, während für adhärenente Zellen (HEK-293T) DMEM mit den gleichen Zusätzen verwendet wurde. Dem Medium für die Zelllinie 32D<sup>ctrl</sup> wurde mL-3 als 1 ng/ml hinzugefügt. Alle zwei bzw. drei Tage wurde die Morphologie der Zellen mithilfe eines Lichtmikroskops beurteilt und die Zelldichte korrigiert, so dass die murinen 32D-Zellen im Bereich von 0,2- 2 Mio./ml und die Übrigen bei 0,5- 2 Mio./ml proliferieren konnten. Die adhärenenten HEK-293T-Zellen wurden trypsiniert und stets so ausgesät, dass sie nie mehr als 90% Konfluenz erreichten.

Wenn Zellen, die im Flüssigstickstofftank gelagert worden waren, aufgetaut wurden, wurden sie auf Raumtemperatur (RT) erwärmt, bei 800 rpm 5 min lang zentrifugiert und anschließend in frischem Nährmedium aufgenommen. Für die Kryokonservierung wurden circa 4 Mio. Zellen in 2 ml Kryomedium aufgenommen, in einem *Mr. Frosty*<sup>TM</sup> Gefrierbehälter langsam auf -80 °C heruntergekühlt und schließlich im Flüssigstickstofftank aufbewahrt.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Mischung aus der Zellsuspension und Trypanblau-Lösung auf eine Zählkammer aufgetragen und unter einem Lichtmikroskop ausgezählt. Die Dichte wurde durch folgende Rechnung bestimmt:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{gezählte Anzahl} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^4}{\text{Anzahl ausgezählter Quadrate}}$$



## 2.2.2 Erzeugung und Testung von gentechnisch modifizierten Zellen

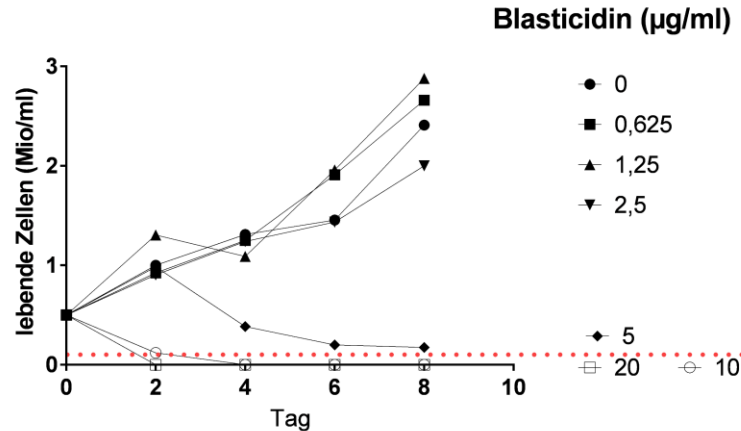
Um die Bedeutung der Proteinkinasen ULK1 und ULK2 zu charakterisieren, sollten per CRISPR/Cas-Technologie Zelllinien mit einem doppelten *Knockout* (K. o.) generiert werden.

### 2.2.2.1 Transfektion

Für die Transfektion wurden HEK-293T-Zellen so ausgesät, dass sie circa 80 % Konfluenz erreichten. Unmittelbar davor wurde ein Medienwechsel vollzogen. In separaten Reaktionsgefäßen wurden Mischungen aus DMEM, einmal mit Plasmid-DNS und den Verpackungsplasmiden psPAX und pMD2.G, sowie einmal mit Polyethylenimin (PEI) vorbereitet. Nach 5 min Inkubation wurden die Lösungen im 1:1-Verhältnis unter kontinuierlicher Vermischung tropfenweise zusammengefügt und weitere 20 min bei RT inkubiert. Danach wurde die Mischung gevortext und auf den Platten mit HEK-293T-Zellen gleichmäßig verteilt. Nach circa 16 h Inkubation der HEK-293T im Brutschrank der Wechsel zu nur 5 % FCS-haltigem Nährmedium.

### 2.2.2.2 Transduktion

Zunächst per Lenti-Virus als Vektor die Genschere Cas9 in das Genom integriert. Hierfür wurden die Zelllinien MV4-11 und MOLM-14 zunächst in Polybren-haltigen Medium (8 µg/ml) in einer Dichte von  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml auf einer 24 well-Platte zu je einem ml/Well ausgesät und 30 min im Brutschrank inkubiert. Dann wurden die Zellen mit dem konzentrierten Virus pLentiCRISPR/Cas9 v2 delta-gRNA Blasti in verschiedenen Titrationsstufen behandelt, zentrifugiert (30 min, 1000 rpm, 32 °C) und inkubiert. Nach 24 h erfolgte ein Medienwechsel, um das zytotoxische Polybren zu entfernen und weitere 48 h später ein Wechsel zu Blasticidin-haltigem Medium (7,5 µg/ml), um transduzierte Zellen zu selektieren. In einem Vorversuch war die benötigte Konzentration des Selektions-Antibiotikums Blasticidin ermittelt worden, um nicht transduzierte und somit auch nicht Blasticidin-resistente Zellen abzutöten.



**Abbildung 2: Bestimmung der Selektionsdosis von Blasticidin:**

MV4-11- und MOLM-14-Zellen wurden für 10 d in Medium mit verschiedenen Dosen von Blasticidin kultiviert und alle 2 d gezählt. Als Konzentration wurde die niedrigste gewählt, die zum vollständigen Abtöten der nicht-resistenten Zellen führte (7,5 µg/ml).

Nach je 5 und 10 Tagen unter Selektion wurden die Zellen gezählt und schließlich die Population als Zelllinie expandiert, bei der eine Transduktions-Effizienz von rund 5 % erzielt worden war. Ziel war es, eine Zelllinie zu kreieren, in der die Cas9 durchschnittlich nur einmal im Genom integriert wird, um unerwünschte Genmanipulationen zu vermeiden. Die darauffolgende Transduktion wurde mit Virus-haltigem Überbestand von HEK-293T aus oben beschriebener Transfektion vollzogen. Hierfür wurden 6 well-Platten mit Retronektin (20 µg/ml) beschichtet und nach Entfernung 2 % BSA-haltiges PBS und Ca<sup>2+</sup>-und Mg<sup>2+</sup>-haltiges HBSS vorgelegt und wieder entfernt. Der Überbestand wurde steril filtriert und der Virus in drei aufeinanderfolgenden Zentrifugationen (30 min, 22 °C, 4000 rpm) mit insgesamt 15 ml pro well am Boden aufkonzentriert. Jedem well wurden 2 Mio. Cas9-exprimierende MV4-11 und MOLM-14 in 3 ml Medium hinzugefügt und 15 min bei 32 °C und 1200 rpm zentrifugiert. Nach 24 h Inkubation folgte ein Medienwechsel und weitere 24 h später die Selektion mit Puromycin (1 µg/ml). Bei jeder Transduktion wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, die bis auf die Zugabe von Virus gleichermaßen behandelt wurde, und bei der Selektion abstarb.

### 2.2.2.3 Verifizierung des *Knockouts*

Die verwendeten Plasmide beinhalteten alle eine Puromycin-Resistenz, wodurch das Überleben der Zellen in Puromycin-haltigem Medium die erfolgreiche Transduktion garantierte. Die Verifizierung der ausgeschalteten Gene sollte durch eine nicht vorhandene Bande im *Western blot* (s. u.) geschehen. Da allerdings kein geeigneter ULK2-Antikörper erhältlich war, musste eine Sequenzierung des Gens erfolgen, die nur eine 30%ige Effizienz des ULK2-K. o. offenbarte, was vermutlich an einer mangelnden Spezifität der RNS für den Genlocus lag. Daher konnten die entstandenen Ergebnisse nur im Rahmen eines ULK1-K.o. gedeutet werden.

### 2.2.2.4 Kompetitives Wachstum

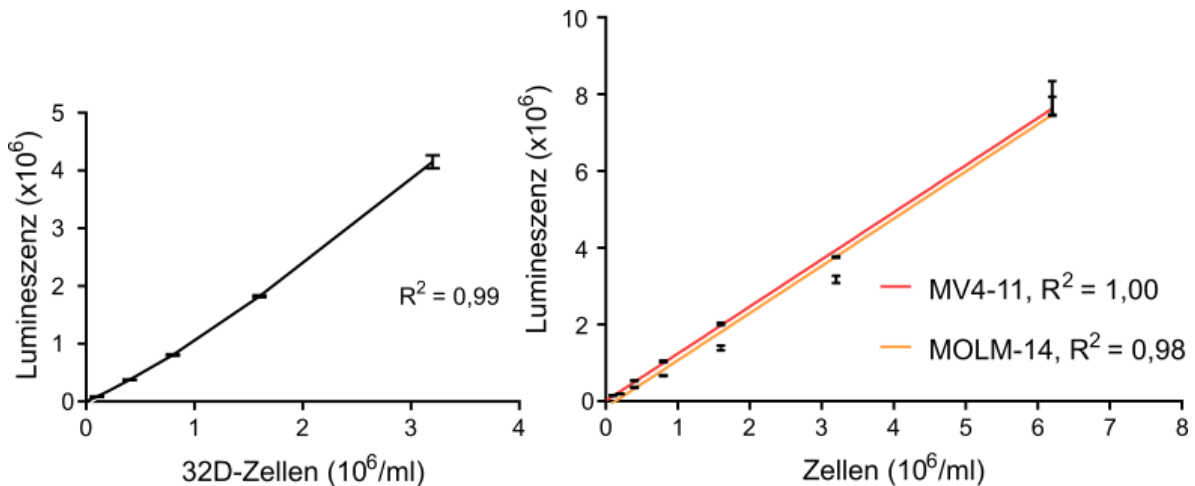
Um den Effekt des CRISPR/Cas-vermittelten Gen-Knockouts auf die Proliferation zu testen, wurden transduzierte Zellen im 1:1-Verhältnis gemischt. Das Experiment begann vier Tage nach der Transduktion, da zu diesem Zeitpunkt die Selektion der transduzierten Zellen nach 48 h in Puromycin- und Blasticidin-haltigem Medium abgeschlossen war. Dies wurde zu Beginn durch die Messung des blau-fluoreszierenden Protein- (BFP-)Signals in der Durchflusszytometrie (s.u.) sichergestellt. Alle Zellen wurden einmal in PBS gewaschen, in warmem Medium resuspendiert, gezählt, und schließlich auf eine Dichte von  $0,5 \times 10^6/\text{ml}$  verdünnt. Nun wurde jede einzelne K. o.-Zelllinie (BFP-positiv) 1:1 mit der NHT-Zelllinie ohne BFP-Expression gemischt. Außerdem wurden als Kontrollen die PLK-1- K. o.- und die NHT- ohne BFP je mit der NHT-Zelllinie mit BFP verwendet. Bei der anschließenden BFP-Messung in der Durchflusszytometrie wurde ein Bereich von 45 - 55 % akzeptiert. Die Zellen wurden zehn Tage lang inkubiert, wobei jeden zweiten Tag das BFP-Signal gemessen wurde und von der Zellsuspension so viel verworfen und neues Medium hinzugegeben wurde, dass die Dichte auf  $0,5 \times 10^6/\text{ml}$  korrigiert wurde. Auf die gleiche Art wurde der Versuch mit Zellen durchgeführt, die schon mehrere Wochen in Selektionsmedium kultiviert worden waren.

## 2.2.3 Behandlung von Zellen mit Inhibitoren

Um die Effekte der verschiedenen Wirkstoffe zu bestimmen, wurden Zellen in Mikrotiterplatten ausgesät, behandelt und für bestimmte Zeiten inkubiert. Zur Vorbereitung auf Experimente wurden die Zellen stets am Tag zuvor zentrifugiert (1000 rpm, 5 min, RT) und in auf 37 °C vorgewärmten Medium aufgenommen.

### 2.2.3.1 Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC<sub>50</sub>)

Zur Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Konzentrationen wurden Platten mit 96 U-förmigen Nöpfchen (*wells*), die jeweils mit 100 µl befüllt wurden, verwendet. Der Rand wurde mit Medium und den verschiedenen Konzentrationen der Inhibitoren befüllt, um die Lumineszenz dessen in der späteren Auswertung von derer der Zellen unterscheiden zu können. Bei 32D-Zellen wurden 5000, bei allen anderen 10000 Zellen pro *well* ausgesät. Die Behandlung mit dem jeweiligen Wirkstoff - verdünnt in Medium – erfolgte in der ersten Reihe mit Zellen auf der Platte und wurde mithilfe einer Mehrkanalpipette in einer siebenstufigen Serienverdünnung entlang der Spalten fortgesetzt. Zwei Spalten wurden mit der Lösungsmittelkontrolle, *vehicle control* (v. c.), behandelt, die analog zu den Inhibitor-Lösungen durch Verdünnung des jeweiligen Lösemittels in Medium hergestellt wurde, um einen möglichen Einfluss dessen auf die Proliferation korrigieren zu können. Nach 48 h (nur bei 32D-Zellen aufgrund der kürzeren Verdopplungszeit) bzw. 72 h Inkubationszeit im Brutschrank wurden die Platten entnommen und pro *well* 25 µl CellTiter-Glo®-Lösung (1:1-Mischung aus Puffer und Substrat) verwendet, um nach gründlichem Mischen die Lumineszenz am Tecan Plate Reader zu messen. Diese korreliert proportional mit dem ATP-Gehalt, welcher als Surrogat-Parameter für die Menge an lebenden Zellen dient, was in einem Vorversuch bestätigt wurde. Hierfür wurden Zellsuspensionen in bestimmten Konzentrationen auf 96 *well-plates* ausgesät, direkt mit der CellTiter-Glo®-Lösung behandelt und gemessen. Als Test wurde das Bestimmtheitsmaß R<sup>2</sup> für die jeweiligen Regressionsgeraden gewählt.



**Abbildung 3: lineare Korrelation zwischen Zellzahl und Lumineszenz durch CellTiter-Glo®**

32D-, MV4-11-, und MOLM-14-Zellen wurden in unterschiedlicher Anzahl in *96 well-plates* ausgesät, mit CellTiter-Glo® vermischt und die Lumineszenz am Tecan Plate Reader gemessen. Nach Subtraktion der Lumineszenz des Mediums wurde die Regressionsgerade mit *GraphPad Prism* erstellt und die Güte anhand von  $R^2$  beurteilt.

Die Lumineszenz, die durch Medium und Inhibitor-Lösung zustande gekommen war (äußere *wells*) wurde von derer der Zellen subtrahiert und die so erhobenen Daten mit der *GraphPad Prism Software* in eine IC<sub>50</sub>-Kurve umgewandelt.

### 2.2.3.2 Wachstumskurven

Als weitere Methode, um die Auswirkungen der lysosomalen Inhibitoren auf die Zellen 32D<sup>ctrl</sup> und 32D<sup>FLT3-ITD</sup> zu untersuchen, wurden diese über eine Woche hinweg mit bestimmten Konzentrationen der Wirkstoffe sowie mit einer Verdünnung des Lösemittels (steriles Wasser oder DMSO) im Medium kultiviert. Um eine Sättigung der Rezeptoren sicherzustellen, wurde dem Medium der 32D<sup>ctrl</sup> mL-3 als 2 ng/ml hinzugefügt, während die 32D<sup>FLT3-ITD</sup> ohne dieses expandiert wurden. Begonnen wurde mit einer Zelldichte von  $0,2 \times 10^6/\text{ml}$  in einer *48 well-Platte* und Triplikaten pro Kondition. 48 h später wurde nach gründlicher Resuspendierung von jedem *well* 10  $\mu\text{l}$  entnommen und die Zelldichte ausgezählt. Nach Kalkulierung der Gesamtzellzahl und Berechnung des nötigen Volumens wurde die Zellsuspension mit frischem (Inhibitor-haltigem-)Kulturmedium auf die ursprüngliche Dichte

verdünnt und auf eine neue Platte überführt. Die Größe der neuen Platte wurde anhand des Volumens gewählt. Weitere 48 h später wurden diese Arbeitsschritte wiederholt, allerdings wurden nun nur noch 10 % der Zellsuspensionen behalten, um zu große Volumina zu vermeiden. Am siebten Tag wurde ein letztes Mal ausgezählt, die absoluten Zellzahlen berechnet und mit *GraphPad Prism* das exponentielle Wachstum dargestellt, sowie Verdopplungszeiten berechnet.

## 2.2.4 Proteinanalytik

### 2.2.4.1 Proteinextraktion und -aufbereitung

Für die Untersuchung von Signalwegen wurde die Zellsuspension aus Versuchen zur Proteinextraktion in kaltem PBS zwei Mal bei 1200 rpm 5 min lang zentrifugiert und jeweils der Überbestand dekantiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in Lyse-Puffer resuspendiert und über Nacht bei -80 °C eingefroren. Nach dem Auftauen der Proben auf Eis wurde 10 min bei 13 200 rpm zentrifugiert und die überstehende Proteinlösung in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Aus dieser wurden 2 µl entnommen, wovon anhand von geeichten BSA-Standards als Referenz die Proteinkonzentration bestimmt wurde: in einer Mikrotiterplatte wurden die BSA-Lösungen in Triplikaten und die Proben nach vorheriger Verdünnung aufgetragen, mit der Lösung aus dem Pierce™ *BCA Protein Assay Reagent-Kit* gemischt und nach 30 min Inkubation bei 37 °C die Absorption bei 562 nm bestimmt. Nach Erstellung der Funktion der BSA-Standards wurden die Proteinkonzentrationen der Proben in Microsoft Excel kalkuliert.

Für die Aufbereitung der Proben für die Gelelektrophorese wurden Mischungen aus 10 % NuPAGE *Reducing Agent* (10x), 25 % NuPAGE LDS *Sample Buffer* (4x) sowie kalkulierten Mengen der Lysate und Lyse-Puffer, um eine Proteinkonzentration von 1 µg/µl zu erhalten, hergestellt und 5 min lang auf 95 °C erhitzt. Alle vorherigen Schritte wurden auf Eis und mit auf 4 °C gekühlten Reagenzien und Gefäßen durchgeführt. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bei -80 °C.

#### 2.2.4.2 SDS-PAGE und *Western Blot*

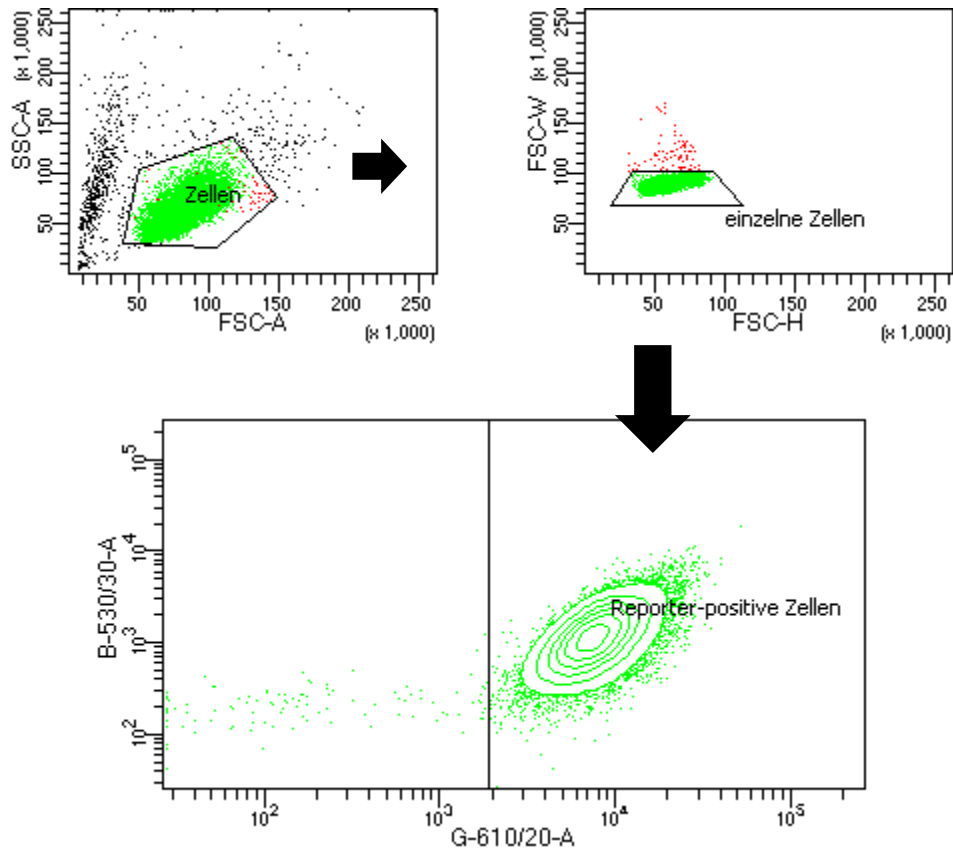
In 4-12%igen SDS-Polyacrylamid-Gel wurden die aufbereiteten Lysate bei konstanten 130 V in MES-Puffer nach ihrer Größe aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine bei 30 V in Transferpuffer auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Auf dieser wurde die gesamte Proteinmenge mit 0,0005%iger *Fast Green FCL*-Lösung angefärbt, durch Waschen in dafür hergestellter *Fast Green* Waschlösung von überschüssiger Färbung befreit und dann bei 700 nm dargestellt. Danach wurde die Membran mit TBST abgewaschen und eine Stunde in 5%iger Milchpulver-Lösung geblockt. Die Inkubation mit primären Antikörpern (i. d. R. 1:1000 in 5 % BSA-haltigem TBST verdünnt) erfolgte stets über Nacht auf einem Orbital-Plattformschüttler im Kühlschrank. Die Antikörper-Lösung wurde am nächsten Tag von der Membran entfernt und zur Wiederverwendung im Kühlschrank aufbewahrt. Die Membranen wurden mit TBST gewaschen und dann im zugehörigen sekundären Antikörper (i. d. R. 1:10000 in 5%iger Milchpulver-Lösung) für eine Stunde bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde wieder gewaschen und mit *SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate* die Proteinbanden im Odyssey® Fc *Imaging System* aufgenommen. Die densitometrische Auswertung wurde mit dem zugehörigen Programm *Image Studio Lite Version 5.2* vorgenommen. Wenn von einem Protein auch die phosphorylierte Form nachgewiesen werden sollte, wurde nach der Detektion dieser die Membran 10 min lang in *Restore™ Fluorescent Western Blot Stripping Buffer* eingelegt, anschließend wieder geblockt und mit dem Antikörper gegen das Gesamtprotein inkubiert. Als Kontrolle für die Beladung des Gels mit gleichen Proteinmengen wurde neben der Membranfärbung auf Gesamtprotein  $\beta$ -Aktin dargestellt.

## 2.2.5 Durchflusszytometrie

Per Durchflusszytometrie wurden in verschiedenen Experimenten Zellen auf ihre Fluoreszenz untersucht. Dieses Verfahren ermöglicht es, physikalische Eigenschaften einzelner Zellen anhand ihres emittierten Streulichtes zu bestimmen. Außerdem können durch die Verwendung verschiedenfarbiger Laser fluoreszierende Stoffe detektiert werden. Die zu analysierenden Zellsuspensionen aus den Experimenten wurden in geeignete Röhrchen überführt, auf Eis gekühlt und jeweils kurz vor der Messung gründlich durchmischt. Zunächst wurden einzelne Zellen anhand ihrer charakteristischen Vorwärts-, *forward scatter (FSC)*, abhängig von der Größe und Seitwärtslichtstreuung, *side scatter (SSC)*, abhängig von der Granularität, von Zellpartikeln oder Konglomeraten getrennt und fokussiert. In dieser Population wurden dann die Fluorochrome mit folgenden Lasern gemessen: BFP – V450/50; GFP – BFP530/30; mCherry – G610/20.

Für Experimente mit dem *Flux*-Reporter GFP/mCherry (s. u.) wurde noch eine Subgruppe mit fluoreszierenden Zellen erstellt.

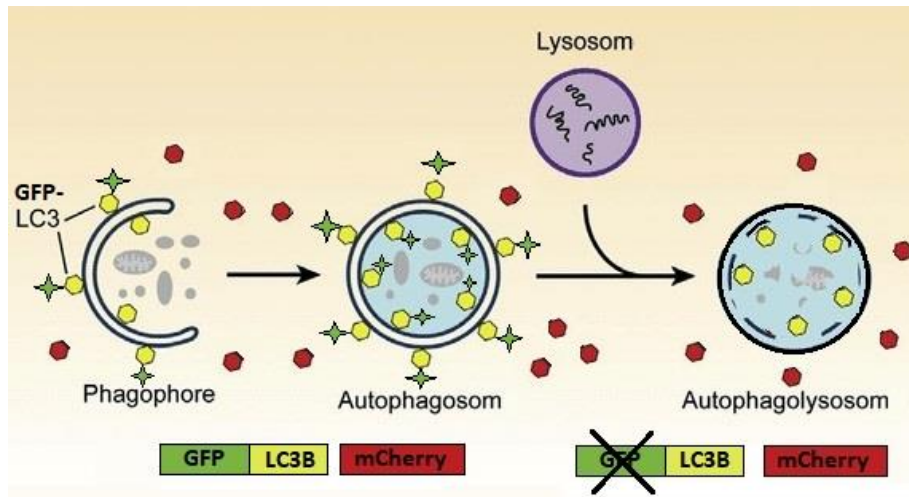




**Abbildung 4: Gating-Schema der Durchflusszytometrie**

Zuerst wurden anhand der Größe (FSC) und Granularität (SSC) einzelne Zellen fokussiert. Aus diesen wurde die Subgruppe der *Flux*-Reporter-positiven Zellen analysiert.

Anhand der Fluoreszenz konnte im kompetitiven Wachstums-Versuch der Anteil an K. o.-Zellen (BFP-positiv) von dem an Kontroll-Zellen abgegrenzt werden. Außerdem erlaubte die Bestimmung der GFP- und mCherry-Mengen eine Aussage über die Autophagie in der Zelle: Wenn Zellen den *Flux*-Reporter GFP-LC3B-mCherry exprimieren, wird der entstehende Protein-Komplex in mCherry und GFP-LC3B enzymatisch aufgespalten, wovon mCherry relativ konstant im Zytosol erhalten bleibt, während GFP an die alternativ gespleißte LC3-Variante, LC3B, gekoppelt ins Autophagosom integriert und abgebaut wird. Der Quotient aus den Signalen GFP/mCherry gibt somit wieder, wie viel GFP noch in der Zelle vorhanden ist und korreliert negativ mit der autophagischen Aktivität.



### Abbildung 5: Dynamik von GFP-LC3B-mCherry während der Autophagie

GFP-LC3B und mCherry werden in gleichen Mengen produziert. GFP-LC3B wird in die Membranen von Autophagosomen integriert, während mCherry stabil im Zytosol verbleibt. Bei der Reifung des Autophagosomes zum Autolysosom wird GFP abgebaut. (von Castillo, Valenzuela et. al., 2016<sup>84</sup> übernommen und nach Hansen, Johansen, 2011<sup>85</sup> modifiziert)

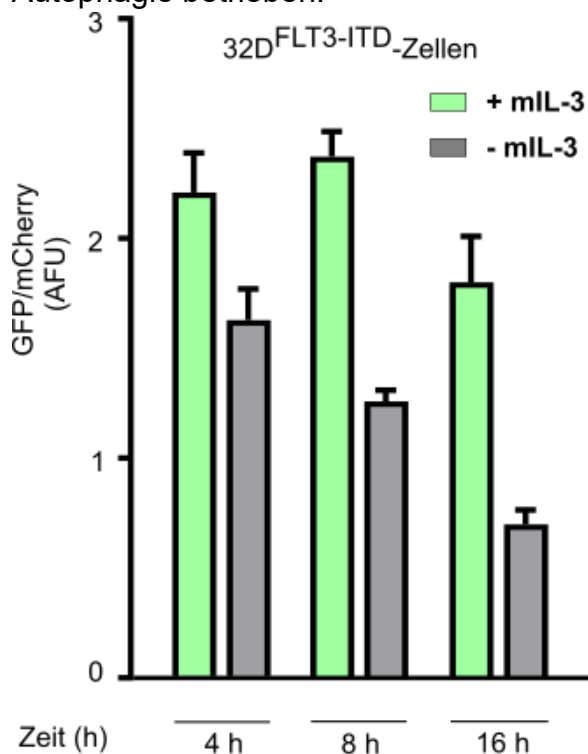
### 2.2.6 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die Testung auf Signifikanz wurde mit dem Welch-Test der *GraphPad Prism Software* durchgeführt, wobei ein p-Wert unter 0,05 als signifikant angesehen wurde. Die Abbildungen zeigen den Mittelwert und den Standard-Fehler (SEM).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Die Wachstumsfaktor-unabhängige Proliferation von $32D^{FLT3-ITD}$ -Zellen bewirkt eine Zunahme der basalen Autophagie

Um die Bedeutung der Autophagie für FLT3-ITD-positive Zellen zu untersuchen, wurden mCherry-GFP-LC3B (*Flux-Reporter*) -exprimierende  $32D^{FLT3-ITD}$ -Zellen nach einem akuten Entzug des Wachstumsfaktors mIL-3 in der Durchflusszytometrie analysiert. Hierdurch proliferieren diese Zellen in Abhängigkeit von FLT3-ITD. Zunächst stellte sich die Frage, ob der Entzug von mIL-3, welchen diese Zellen durch die FLT3-ITD-Mutation nicht mehr zum Überleben benötigen, Auswirkungen auf die Autophagie hat. Es zeigte sich, dass die FLT3-ITD-transformierten, mIL3-unabhängigen Zellen ohne mIL-3 während ihrer weiteren Proliferation zunehmend Autophagie betrieben.



**Abbildung 6: Autophagie-Flux bei  $32D^{FLT3-ITD}$ -Zellen infolge von mIL-3-Entzug**

Die Zellen wurden mit mIL-3-haltigem Medium kultiviert, am Versuchstag abzentrifugiert und jeweils  $\pm$  mIL-3 resuspendiert. Nach 4, 8 und 16 h Inkubationszeit wurden per Durchflusszytometrie die GFP- und mCherry-Emission gemessen. Der Quotient aus GFP-LC3B (autophagosomal lokalisiert) und mCherry (zytosolisch lokalisiert) ist abhängig von der aktuellen Autophagie-Aktivität. Kleinere Messwerte bedeuten mehr Autophagie-Aktivität. Dargestellt ist der Mittelwert aus  $n=3$  biologischen Replikaten  $\pm$  SEM.

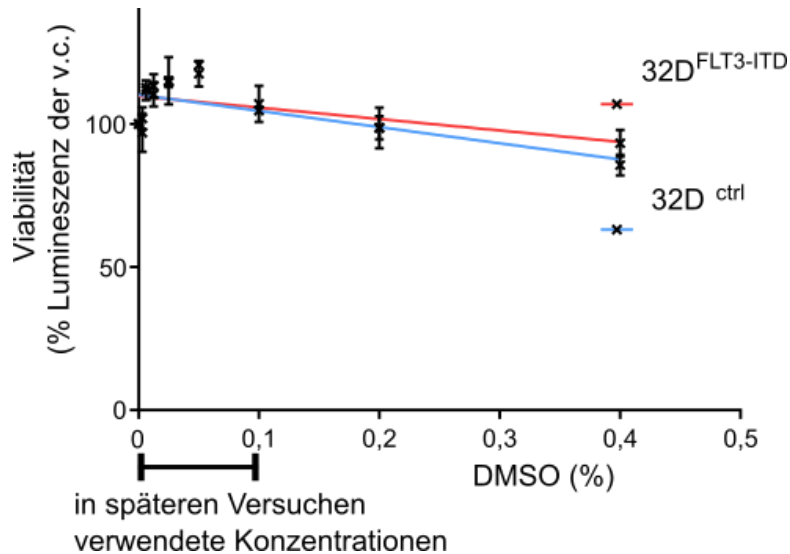
Auf der Basis dieser Erkenntnis stellte sich die Frage, ob FLT3-ITD-positive Zellen so sehr von Autophagie abhängig sind, dass die Inhibition dieser einen besonders sensiblen Angriffspunkt bietet, um die Proliferation zu hemmen.

### **3.2 Wirkung lysosomaler Inhibitoren auf Autophagie und Proliferation von transformierten 32D<sup>FLT3-ITD</sup>- im Vergleich zu wachstumsfaktor-abhängigen 32D<sup>ctrl</sup>-Zellen**

Das vorherige Experiment zeigte, dass das FLT3-ITD-abhängige Wachstum transformierter 32D<sup>FLT3-ITD</sup>-Zellen unter Aktivierung bzw. Zunahme der Autophagie geschieht. Um die funktionellen Konsequenzen dieser Folge der FLT3-ITD-Mutation bzgl. einer Autophagie-Hemmung durch lysosomale Inhibitoren zu charakterisieren, wurden verschiedene Experimente durchgeführt:

Zuerst wurde die Wirkung lysosomaler Inhibitoren bzgl. der Hemmung von Autophagie -in 32D<sup>FLT3-ITD</sup>- und 32D<sup>ctrl</sup>-Zellen gemessen und zwischen diesen beiden Zelllinien verglichen. In einem zweiten Schritt wurde die Potenz lysosomaler Inhibitoren für die Hemmung der Proliferation von 32D<sup>FLT3-ITD</sup> und 32D<sup>ctrl</sup> bestimmt und ebenfalls zwischen diesen beiden Zelllinien verglichen.

Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch eine mögliche Zytotoxizität des Lösemittels DMSO auszuschließen, wurden zunächst verschiedene Konzentrationen bei 32D-Zellen titriert. Keine der in Experimenten verwendeten Konzentrationen hatte Auswirkung auf die Viabilität.



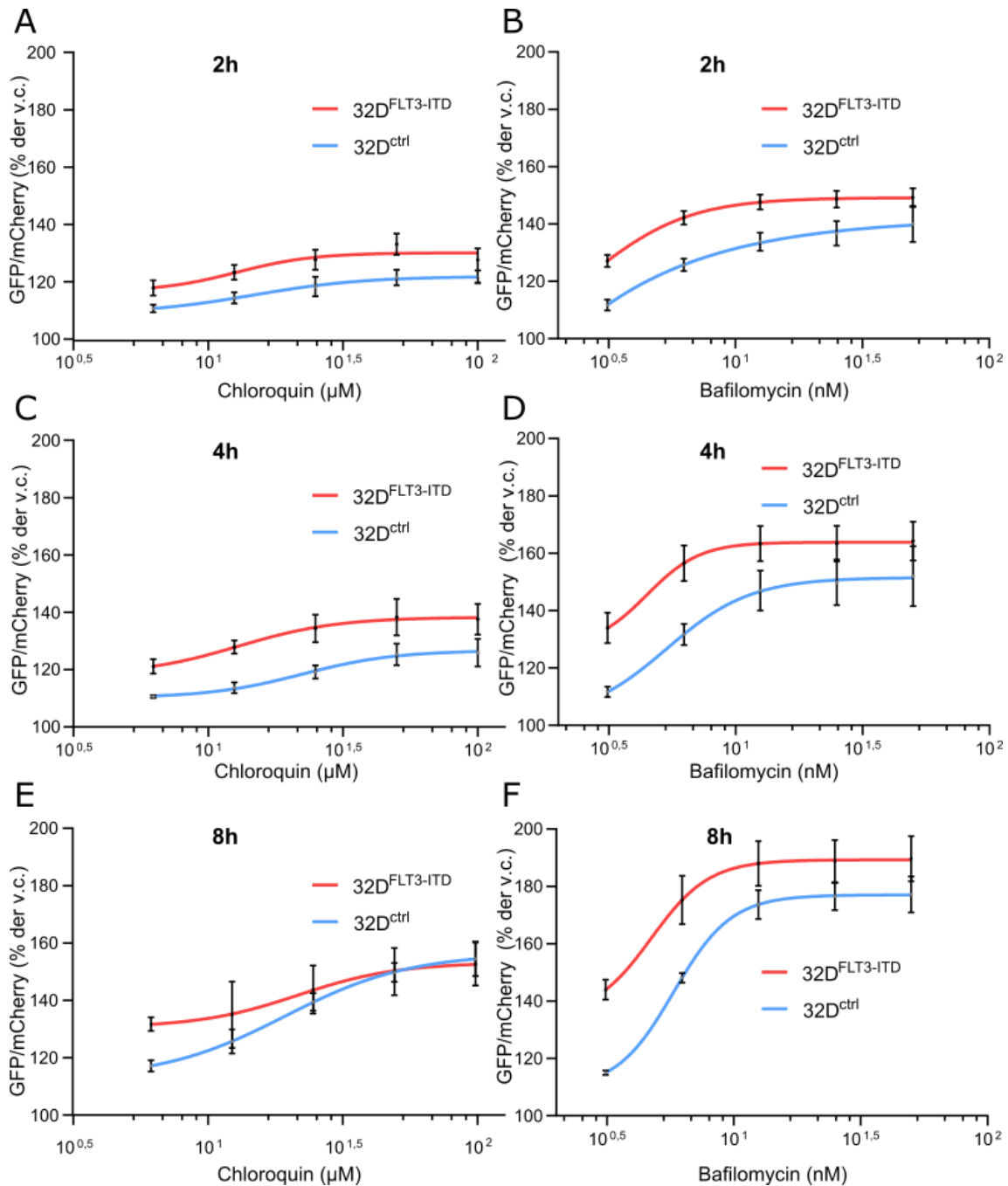
### Abbildung 7: Ausschluss einer DMSO-Toxizität

32D<sup>FLT3-ITD</sup>- und 32D<sup>ctrl</sup>-Zellen wurden 48 h lang in verschiedenen DMSO-Konzentrationen inkubiert. 32D<sup>ctrl</sup>-Zellen wurden mit mL-3 (1 ng/ml) kultiviert, 32D<sup>FLT3-ITD</sup> ohne. Auf die Viabilität der Zellen wurde durch Färbung mit CellTiter-Glo® rückgeschlossen. Dargestellt ist eine lineare Regressionsgerade durch technische Triplikate der Konditionen. Negative Auswirkungen auf die Proliferation haben nur DMSO-Konzentrationen über 0,2 %, welche nicht in späteren Versuchen zur Anwendung kamen.

Um eine mögliche Vulnerabilität gegenüber Autophagie-Inhibition während des FLT3-ITD-abhängigen Wachstums festzustellen, wurden FLT3-ITD-positive 32D-Zellen ohne mL-3 kultiviert.

### 3.2.1 Lysosomale Inhibitoren hemmen bei 32D<sup>FLT3-ITD</sup> die Autophagie potenter als bei 32D<sup>ctrl</sup>

Um zu prüfen, ob die FLT3-ITD-Mutation Zellen empfindlicher für lysosomale Inhibition macht, wurden 32D<sup>FLT3-ITD</sup>- und 32D<sup>ctrl</sup>-Zellen unter verschiedenen Konzentrationen der lysosomalen Inhibitoren Chloroquin und Bafilomycin A1 inkubiert und Dosis-Wirkungs-Kurven bezüglich des Autophagie-*Flux* verglichen. Es zeigte sich, dass diese Inhibitoren die basale Autophagie von 32D<sup>FLT3-ITD</sup>-Zellen stärker hemmen als bei 32D<sup>ctrl</sup>-Zellen.



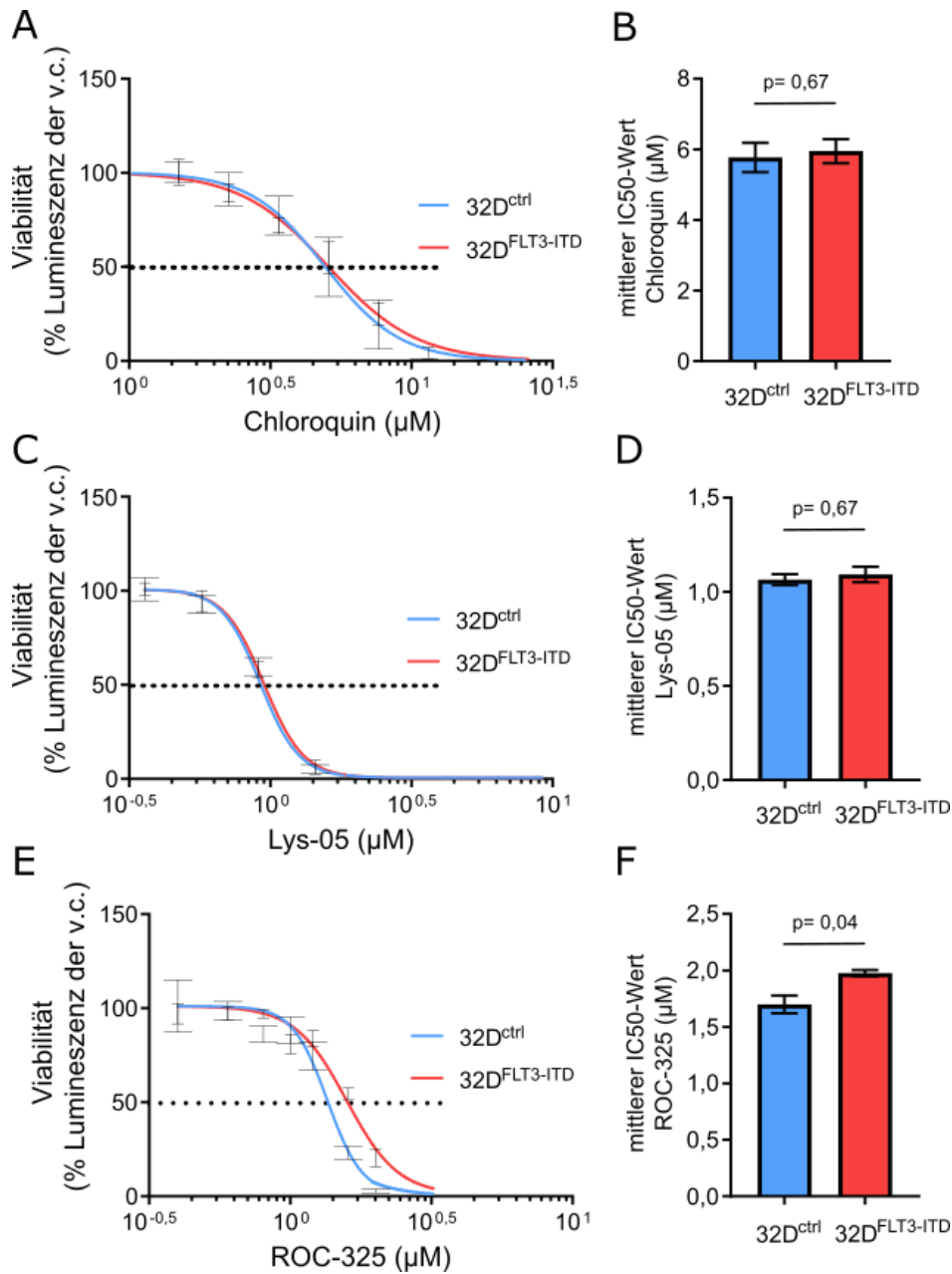
**Abbildung 8: Lysosomale Inhibitoren hemmen Autophagie potenter und effektiver bei 32D<sup>FLT3-ITD</sup>- als bei 32D<sup>ctrl</sup>-Zellen**

Die Zellen wurden mit den verschiedenen Konzentrationen von Chloroquin und Bafilomycin A1 jeweils für 2, 4 und 8 h inkubiert. Per Durchflusszytometrie wurden die Emissionen von GFP und mCherry bestimmt. Die Werte des Quotienten GFP/mCherry wurden auf die Kontrolle v. c. normalisiert. Je höher der Wert auf der y-Achse ist, desto mehr Autophagie wurde gehemmt. Dargestellt sind sigmoidale Dosis-Wirkungs-Kurven anhand von drei biologischen Replikaten (Mittelwert ± SEM).

### 3.2.2 Die Proliferation FLT3-ITD-positiver Zellen wird durch lysosomale Inhibition nicht verstärkt beeinträchtigt

Als nächstes wurde überprüft, ob auch die Proliferation FLT3-ITD-positiver Zellen durch lysosomale Inhibitoren verstärkt gehemmt werden kann. Zusätzlich zu Chloroquin wurden dessen potentere Derivate Lys05 und ROC-325 an 32D<sup>FLT3-ITD</sup>- und 32D<sup>ctrl</sup>-Zellen getestet.

Die Ergebnisse der durchgeführten Wachstums-Assays zeigen jedoch, dass die FLT3-ITD-Mutation zu keiner verstärkten Vulnerabilität gegenüber lysosomaler Inhibition führt. 32D<sup>FLT3-ITD</sup>-Zellen waren gegenüber der Behandlung mit ROC-325 sogar geringfügig resistenter als 32D<sup>ctrl</sup> (Abb. 9 E und F, sowie Abb. 11).



### Abbildung 9: Dosis-Wirkungs-Kurven von 32D-Zellen unter Behandlung mit lysosomalen Inhibitoren

32D-Zellen wurden 48 h mit verschiedenen Konzentrationen von Chloroquin, Lys05 und ROC-325 inkubiert. 32D<sup>ctrl</sup>-Zellen wurden zusätzlich mit mL-3 (1ng/ml) kultiviert. Auf die relative Zellzahl wurde durch Messung des ATP-Gehalts mittels CellTiter-Glo® rückgeschlossen. A, C, E zeigen je eine sigmoidale Standardkurve durch die Mittelwerte von drei biologischen Replikaten (durchgeführt in technischen Triplikaten)  $\pm$  SEM. B, D, F zeigen die Testung der mittleren IC50-Werte aus den drei Replikaten auf Signifikanz mit einem ungepaartem t-Test (\*:  $p < 0,05$  ist signifikant).

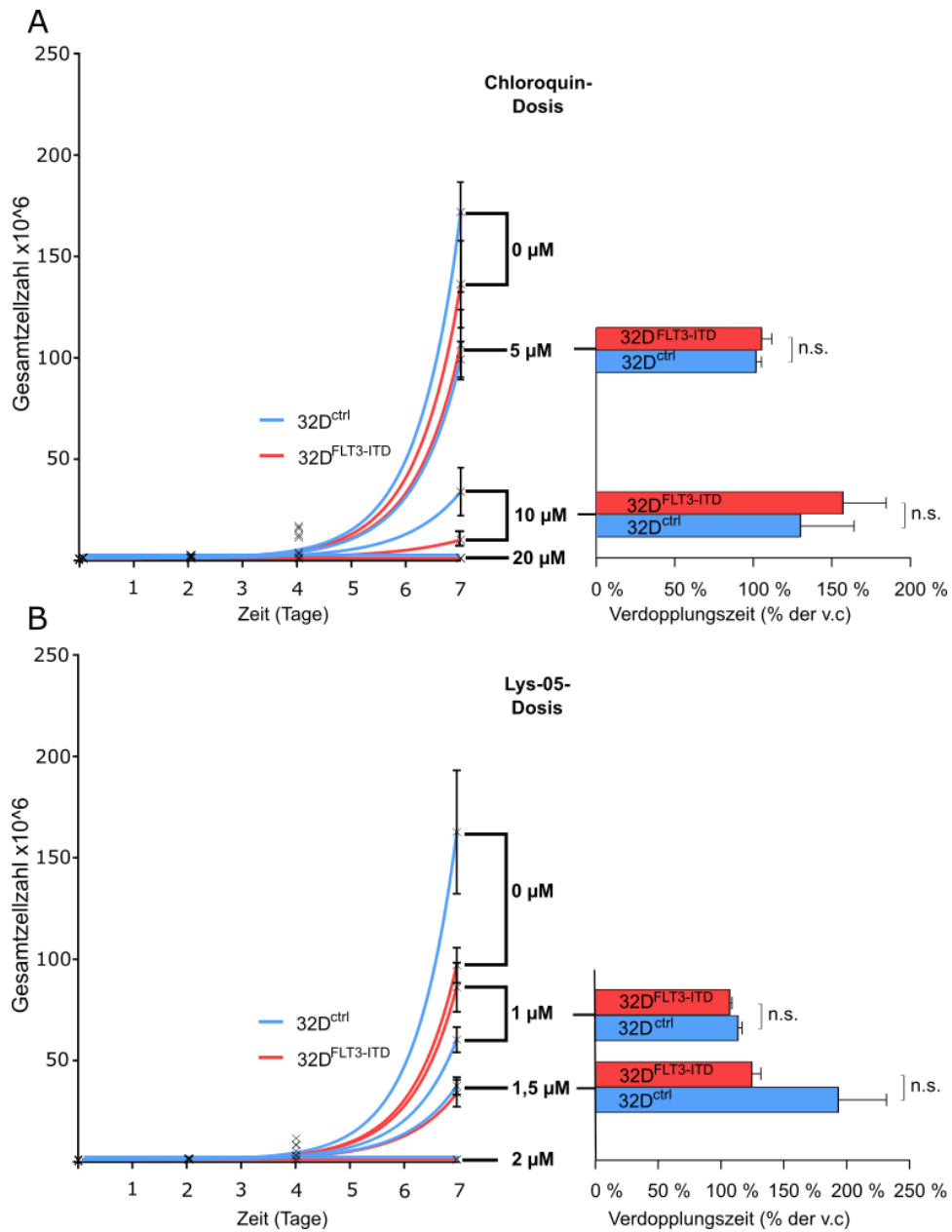


Tabelle 11: Mittelwerte der IC50-Konzentrationen und Signifikanz

<b>Inhibitor</b>	<b>IC50 (32D<sup>ctrl</sup>)</b>	<b>IC50 (32D<sup>FLT3-ITD</sup>)</b>	<b>p-Wert</b>
Chloroquin	5,77 ± 0,42 µM	5,95 ± 0,34 µM	0,67
Lys05	1,07 ± 0,03 µM	1,09 ± 0,04 µM	0,67
ROC-325	1,70 ± 0,08 µM	1,98 ± 0,03 µM	0,04 (*)

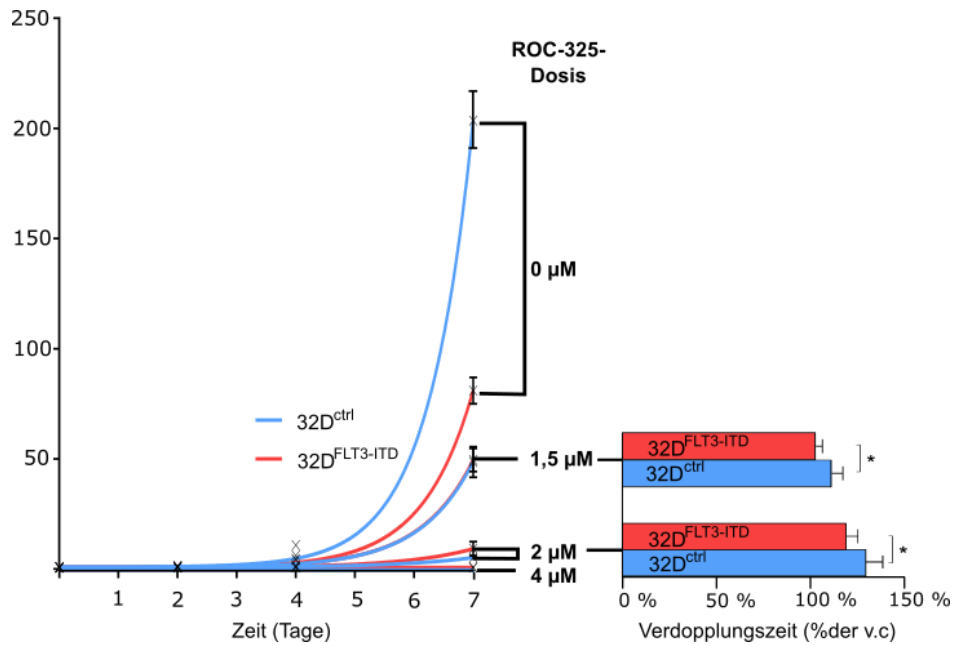
Dargestellt sind mittlere IC50-Werte ± SEM sowie die p-Werte eines ungepaarten t-Tests zwischen IC50-Werten von 32D<sup>ctrl</sup> und 32D<sup>FLT3-ITD</sup>. \*: p < 0,05

Es wurden weitere Experimente durchgeführt, um zu bestätigen, dass die Proliferation FLT3-ITD-positiver 32D-Zellen im Vergleich zum Wachstum parentaler, mIL3-abhängiger, nicht maligner 32D-Zellen tatsächlich nicht vulnerabler gegenüber lysosomaler Inhibition ist. Hierzu wurden die Zellen in Inhibitor-haltigem Medium expandiert und durch manuelle Zellzählung Wachstumskurven ermittelt. Die Auswertung dieser bestätigte die vorherige Beobachtung. Es zeigte sich keine generell erhöhte Vulnerabilität der 32D<sup>FLT3-ITD</sup>-Zellen gegenüber einer pharmakologischen Inhibition der Autophagie mittels lysosomalen Inhibitoren (Abb. 10 und 11).



**Abbildung 10: Wachstum von 32D-Zellen unter Chloroquin- und Lys05-Behandlung**

32D-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Chloroquin (A) und Lys05 (B) expandiert. 32D<sup>ctrl</sup>-Zellen wurden mit mL-3 kultiviert, 32D<sup>FLT3-ITD</sup> ohne. Am 2., 4. und 7. Tag wurden die Zellen gezählt und mit frischem Nährmedium + Inhibitor auf eine optimale Zelldichte verdünnt. Dargestellt sind zugunsten der Übersichtlichkeit jeweils eine Kurve durch den Mittelwert  $\pm$  SEM eines repräsentativen biologischen Replikates mit drei technischen Replikaten. Die Ergebnisse der anderen zwei biologischen Replikate sind bzgl. der Gruppenunterschiede vergleichbar. Testung auf Signifikanz wurde am Mittelwert  $\pm$  SEM der Verlängerung der Verdopplungszeit der Zellen durch die Behandlung aus allen biologischen (n= 3) Replikaten vorgenommen (\*:  $p < 0,05$  ist signifikant).



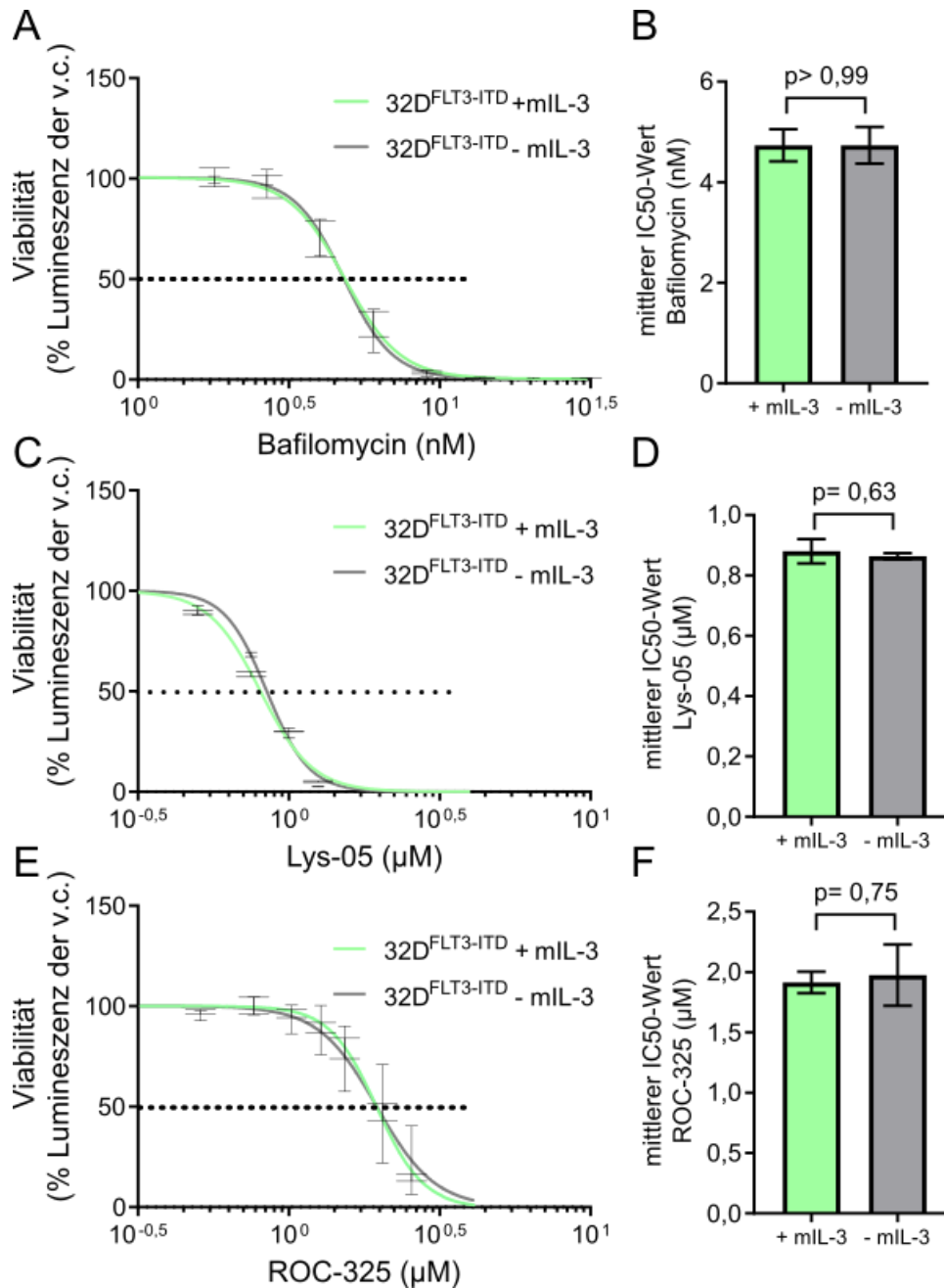
**Abbildung 11: Wachstum von 32D-Zellen unter ROC-325-Behandlung**

32D-Zellen wurden wie in Abb. 10 behandelt und dargestellt.

Abb. 11 zeigt die Resistenz der 32D<sup>FLT3-ITD</sup>-Zellen bei Behandlung mit ROC-325: Die 32D<sup>ctrl</sup> expandierten ohne Behandlung in Medium mit mIL-3 als 2 ng/ml schneller als 32D<sup>FLT3-ITD</sup> ohne mIL-3. Trotz dieses Nachteils entstanden aus der Kondition mit 2 μM ROC-325 nahezu die gleiche Anzahl beider Zelllinien.

Die Bestimmung der Verdopplungszeiten und Signifikanztestung aus je drei Wiederholungen des Versuchs bestätigte die Beobachtung. Bei Chloroquin (A) und Lys05 (B) ergaben sich wiederholt keine Unterschiede.

Um den Einfluss von mIL-3 auf die 32D<sup>FLT3-ITD</sup> bei lysosomaler Inhibition zu charakterisieren, wurde die Bestimmung der IC50-Werte von Lys05, ROC-325 und Bafilomycin A1 wie zuvor durchgeführt. Allerdings wurden nun 32D<sup>FLT3-ITD</sup> ± mIL-3 miteinander verglichen. Wie in Abb. 12 und Tabelle 12 dargestellt, hat der Entzug von mIL-3 (der wie zuvor gezeigt zur Autophagie-Induktion führt), für sich genommen keine erhöhte Vulnerabilität der 32D<sup>FLT3-ITD</sup>-Zellen gegenüber lysosomalen Autophagie-Inhibitoren zur Folge.



**Abbildung 12: Behandlung von 32D<sup>FLT3-ITD</sup> ± mIL-3 mit lysosomalen Inhibitoren**

32D<sup>FLT3-ITD</sup>-Zellen wurden jeweils mit und ohne mIL-3 im Nährmedium 48 h mit verschiedenen Konzentrationen von Bafilomycin A1, Lys05 und ROC-325 inkubiert. Auf die Viabilität der Zellen wurde durch Färbung mit CellTiter-Glo® rückgeschlossen. A, C, E zeigen je eine sigmoidale Standardkurve durch die Mittelwerte von drei biologischen Replikaten (durchgeführt in technischen Triplikaten) ± SEM. B, D, F zeigen die Testung der mittleren IC50-Werte aus den drei Replikaten auf Signifikanz mit einem ungepaartem t-Test (\*: p < 0,05 ist signifikant).

Tabelle 12: Mittelwerte der IC50-Werte bei 32D<sup>FLT3-ITD</sup> ± mL-3 und Signifikanz

<b>Inhibitor</b>	<b>IC50</b> (32D <sup>FLT3-ITD</sup> + mL-3)	<b>IC50</b> (32D <sup>FLT3-ITD</sup> – mL-3)	<b>p-Wert</b>
Bafilomycin A1	4,75 ± 0,32 µM	4,71 ± 0,31 µM	> 0,99
Lys05	0,88 ± 0,03 µM	0,86 ± 0,03 µM	0,63
ROC-325	1,91 ± 0,07 µM	1,91 ± 0,24 µM	0,75

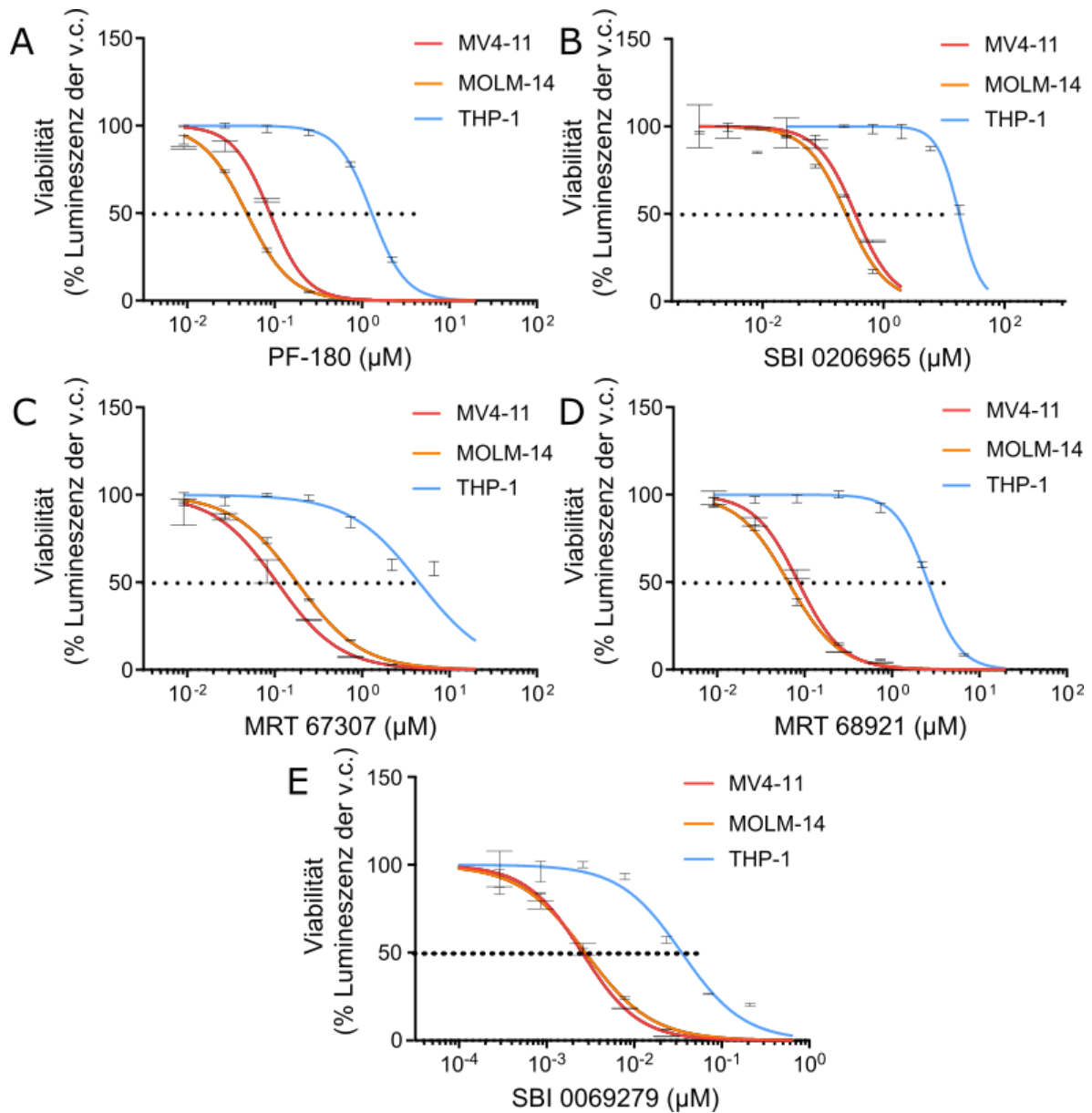
Dargestellt sind mittlere IC50-Werte ± SEM sowie die p-Werte eines ungepaarten t-Tests zwischen IC50-Werten von 32D<sup>FLT3-ITD</sup> ± mL-3.

### **3.3 Auswirkungen der pharmakologischen Inhibition sowie des genetischen Verlusts von ULK1 auf Proliferation und Autophagie**

Um die Vulnerabilität von FLT3-ITD-exprimierenden AML-Zellen gegenüber einer Hemmung der Autophagie durch Unterbrechung der Signalkaskade auf einer früheren Stufe als der lysosomalen Inhibition zu untersuchen, wurde die Proteinkinase ULK als Ziel gewählt. ULK1 (ATG1) ist ein gut untersuchter, zentraler Regulator der Initiation der autophagosomalen Biogenese. Die Funktion der Homologe ULK2–4 ist weniger gut verstanden.

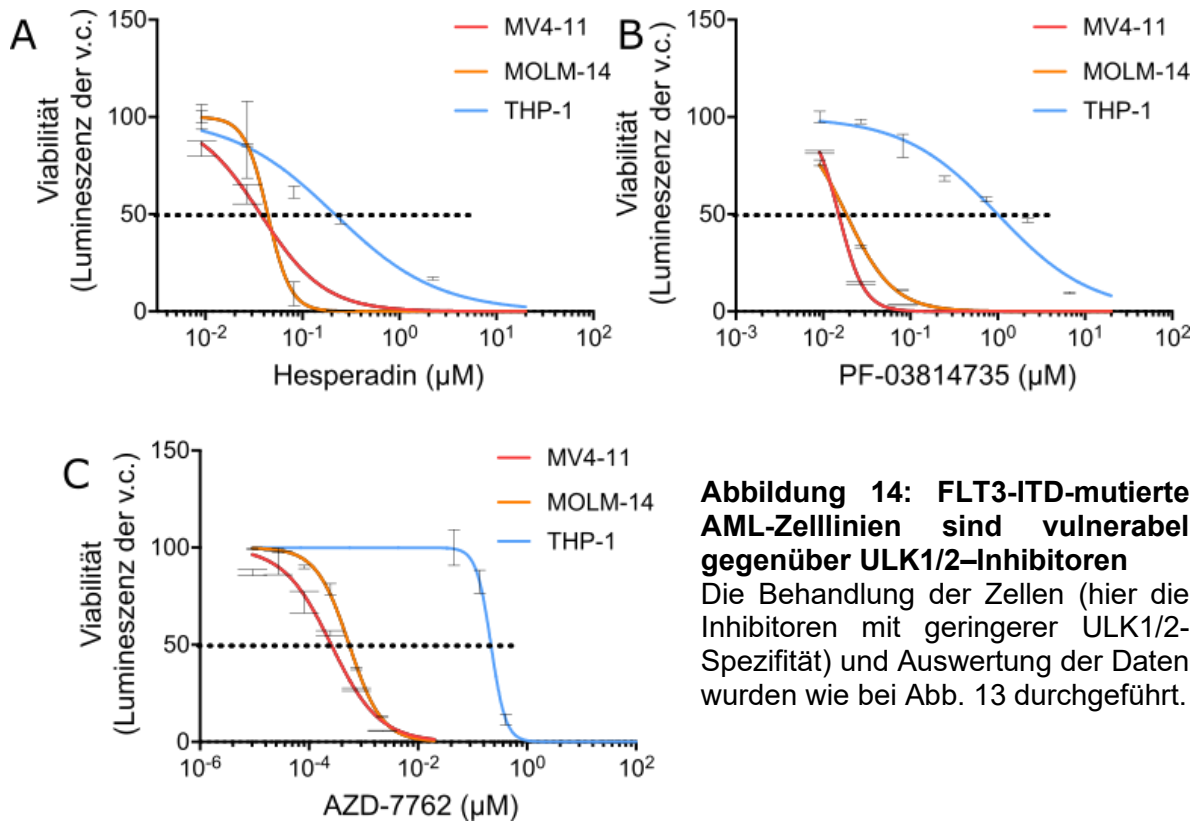
#### **3.3.1 ULK1/2-Inhibitoren zeigen potente antiproliferative Wirkung in FLT3-ITD-positiven AML-Zellen**

Fünf spezifische ULK1/2-, sowie drei Kinase (Chk1/2 und Aurora-Kinase) - Inhibitoren mit zusätzlicher Wirkung auf ULK1 (sowie ULK2) wurden an den FLT3-ITD-positiven humanen MV4-11- und MOLM-14-Zellen getestet und anhand der IC50-Werte Rückschlüsse gezogen. Es zeigte sich eine hohe Potenz. Als Vergleich diente die Zelllinie THP-1, die das WT-FLT3 exprimiert und deutlich höhere IC50-Werte produzierte. Da ULK-Inhibitoren auch eine nicht zu vernachlässigende Affinität für die Aurora A-Kinase haben, wurde der Aurora-Kinase-Inhibitor Alisertib, der keine Wirkung auf ULK1/2 haben soll, hinzugezogen, um zu überprüfen, ob diese verstärkte Empfindlichkeit der FLT3-ITD-positiven Zellen auch tatsächlich auf die Hemmung von ULK1/2 zurückzuführen ist und nicht durch *off-target*-Effekte zustande kommt. Im Gegensatz zu den ULK-Inhibitoren waren bei Alisertib die WT-FLT3-Zellen THP-1 empfindlicher als die FLT3-ITD-positiven, was eine ULK1/2-spezifische antiproliferative Wirkung auf die FLT3-ITD-exprimierenden Zellen nahelegt.



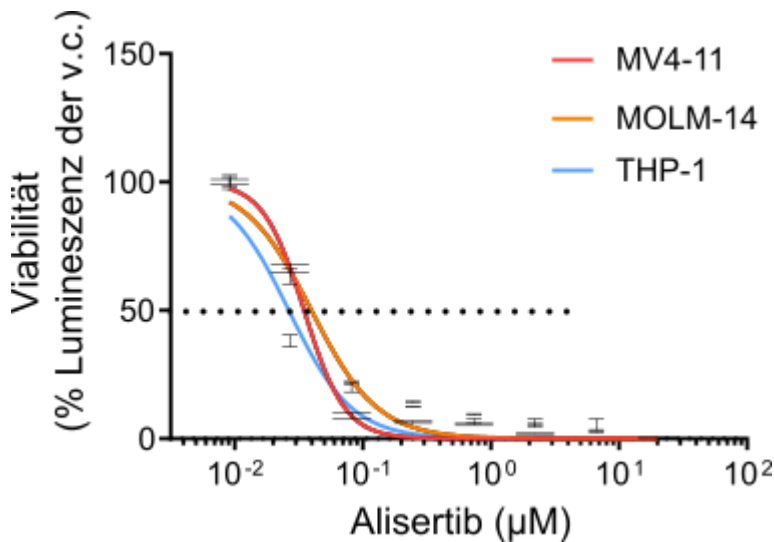
**Abbildung 13: FLT3-ITD-mutierte AML-Zellen sind vulnerabel gegenüber hochspezifischen ULK1/2-Inhibitoren**

Die Zelllinien MV4-11, MOLM-14 und THP-1 wurden mit verschiedenen Konzentrationen der aufgeführten Inhibitoren behandelt und für 72 h inkubiert. Auf die Viabilität der Zellen wurde durch Färbung mit CellTiter-Glo® rückgeschlossen. Dargestellt ist je eine sigmoide Standardkurve durch technische Triplikate  $\pm$  SEM.



**Abbildung 14: FLT3-ITD-mutierte AML-Zelllinien sind vulnerabel gegenüber ULK1/2-Inhibitoren**

Die Behandlung der Zellen (hier die Inhibitoren mit geringerer ULK1/2-Spezifität) und Auswertung der Daten wurden wie bei Abb. 13 durchgeführt.



**Abbildung 15: FLT3-ITD-mutierte AML-Zellen sind nicht vulnerabel gegenüber Aurora-Kinase-Inhibitor**

Die Behandlung der Zellen (hier mit dem Aurora-Kinase-Inhibitor Alisertib) und Auswertung der Daten wurden wie bei Abb. 13 durchgeführt.



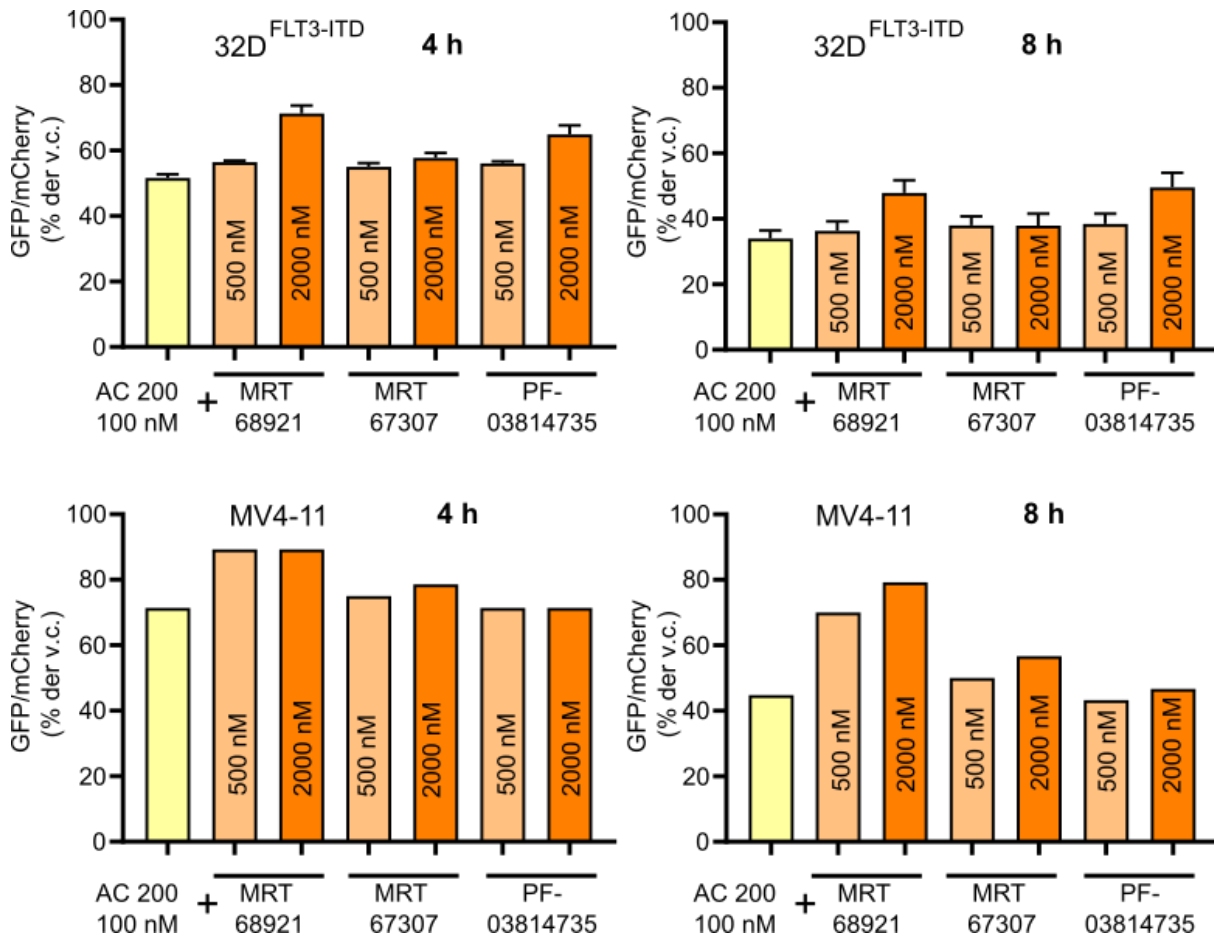
Tabelle 13: IC50-Werte von Kinase-Inhibitoren

Inhibitor	IC50 (µM) MV4-11	IC50 (µM) MOLM-14	IC50 (µM) THP-1	IC50 (THP – 1)	ULK1/2- Spezifität
				IC50 (Ø MV4 – 11, MOLM – 14)	
MRT 67307	0,1067	0,1797	13,22	92,32	Hoch
MRT 68921	0,08515	0,0652	2,575	34,25	Hoch
SBI 0206965	0,3234	0,2395	6,565	23,33	Hoch
SBI 0069279	0,00255	0,00277	0,03491	13,12	Hoch
PF-180	0,08856	0,04812	1,297	18,98	Hoch
AZD-7762	0,0002559	0,0005458	0,2176	542,85	Gering
Hesperadin	0,03709	0,04384	0,2149	5,31	Gering
PF- 03814735	0,01509	0,01842	0,9919	59,20	Gering
Alisertib	0,03372	0,03977	0,02361	0,64	Keine

Dargestellt sind die IC50-Werte aus technischen Triplikaten.

### 3.3.2 ULK1/2-Inhibitoren hemmen Autophagie in FLT3-ITD-positiven AML-Zellen

Um die Wirkung von ULK-Inhibitoren auf die Autophagie zu untersuchen, wurden 32D<sup>FLT3-ITD</sup>- und MV4-11-Zellen mit dem FLT3-Inhibitor AC220 und zusätzlich mit den ULK-Inhibitoren MRT 68921, MRT 67307 und PF-03814735 behandelt. AC220 führt über FLT3-Hemmung zu einer Steigerung der Autophagie, was in Kapitel 3.5 genauer thematisiert werden wird.



**Abbildung 16: Behandlung von 32D<sup>FLT3-ITD</sup>- und MV4-11-Zellen mit AC220 und ULK-Inhibitoren**

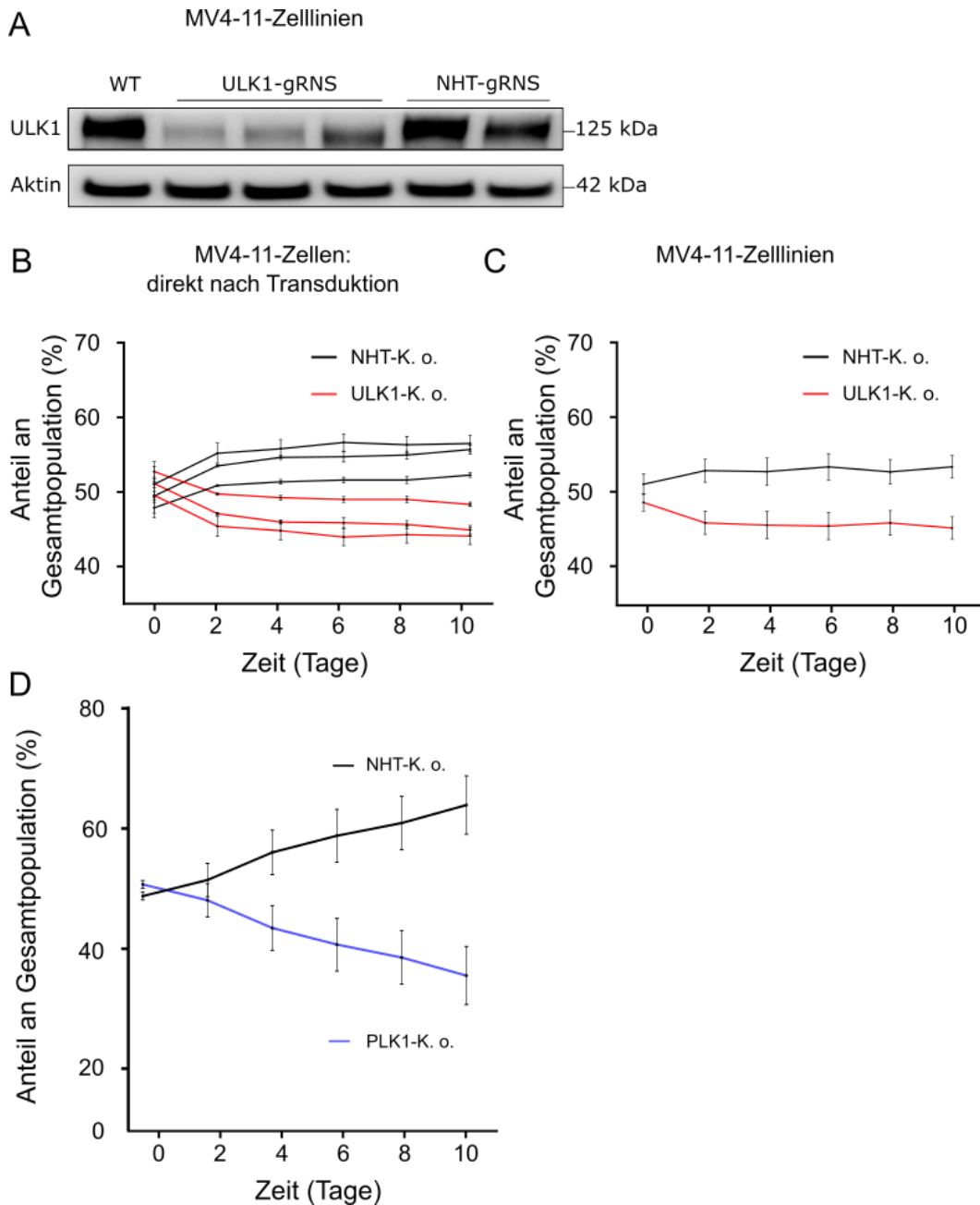
Die Zellen wurden mit dem FLT3-Inhibitor AC220 und zusätzlich mit den ULK-Inhibitoren MRT 68921, MRT 67307 und PF-03814735 in zwei verschiedenen Konzentrationen behandelt und nach 4 h und 8 h Inkubationszeit per Durchflusszytometrie analysiert. Die oberen Balkendiagramme zeigen die GFP/mCherry-Quotienten (Mittelwert aus drei biologischen Replikaten  $\pm$  SEM), normalisiert auf die DMSO-Kontrolle (v. c.), von 32D<sup>FLT3-ITD</sup>. Die unteren Balkendiagramme zeigen die Testung bei MV4-11.

Es zeigte sich zu beiden Zeitpunkten, bei beiden Zelllinien die gleiche Tendenz: FLT3-Inhibition mit AC220 induziert stark Autophagie, was durch die Zugabe eines ULK-Inhibitors dosisabhängig mehr oder weniger vermindert wird.

### 3.3.3 Ein ULK1-*Knockout* hat keine Auswirkungen auf die Proliferation

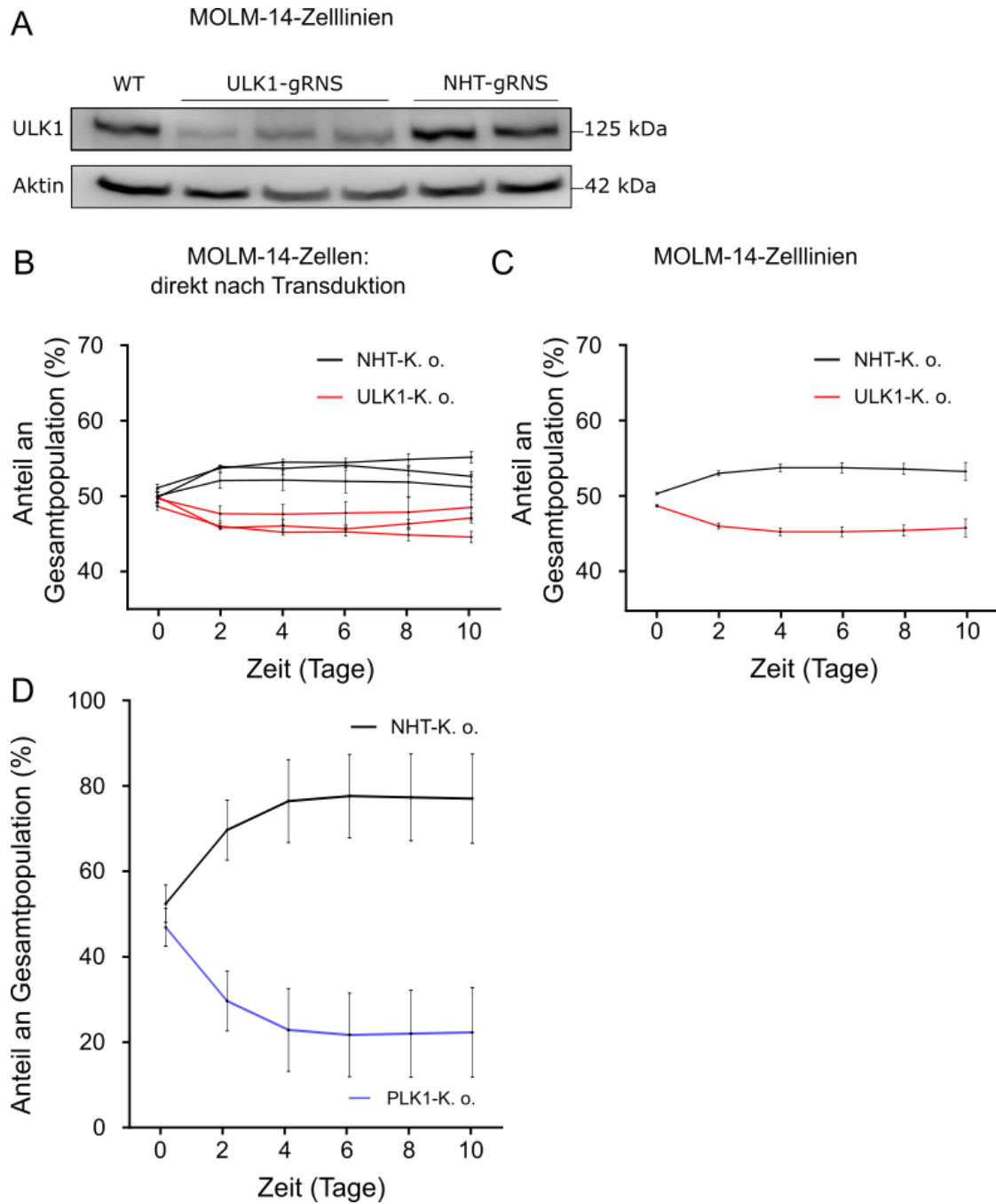
Um die Bedeutung der Proteinkinase ULK1 für die Proliferation und die Autophagie der FLT3-ITD-positiven Zellen weiter zu charakterisieren, wurden von MV4-11 und MOLM-14 CRISPR/Cas-vermittelte ULK1-Knockout-Zelllinien generiert. Es wurden jeweils drei Plasmide verwendet, die verschiedene gRNS für den Genlocus von ULK1 enthielten, sodass auch je drei verschiedene K. o.-Zelllinien entstanden sind, die dann kompetitiv gegen die Zelllinie wuchsen, deren gRNS gegen NHT gerichtet war und somit keine für die Zelle nachteilige Genmutation trug. Als Kontrolle wurde eine PLK-1-K. o.-Zelllinie erzeugt, die deutliche Proliferations-Nachteile haben sollte.

MV4-11- und MOLM-14-Zellen mit einem akuten Verlust von ULK1 zeigten (unmittelbar nach Transduktion und Puromycin-Selektion) einen leichten Proliferationsnachteil (Abb. 17 B und 18 B). Dieser persistierte jedoch nicht. Es konnten stabile Zelllinien generiert werden, die im weiteren Verlauf keinen Proliferationsnachteil mehr gegenüber den NHT-Kontrollzellen zeigten (Abb. 17 C und 18 C). Die PLK1-K. o.-Zellen zeigten wie erwartet einen deutlichen Proliferationsnachteil (Abb. 17 D und 18 D).



**Abbildung 17: kompetitives Wachstum von MV4-11 mit ULK1-K. o**

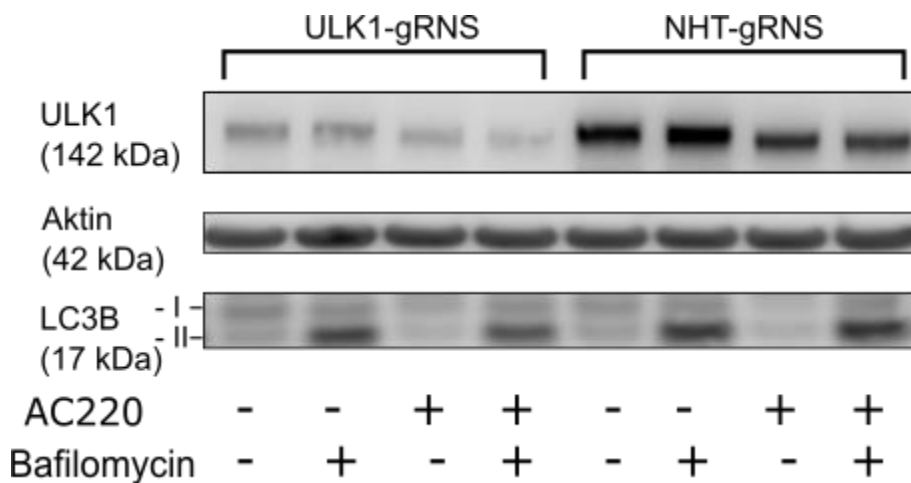
Durch oben beschriebene Transduktion wurden ULK1-K. o.-MV4-11-Zellen generiert. Direkt nach der Transduktion wurde ein Teil der Zellen für das kompetitive Wachstum entnommen, während der Rest expandiert wurde, um den ULK1-K. o. immunhistochemisch zu verifizieren (A). Abb. B zeigt das kompetitive Wachstum zwischen ULK1-K. o.-Zellen (pro gRNS eine rote Kurve) und den NHT-Kontrollen (schwarz). Jede Kurve zeigt die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n=3$  biologischen Replikaten. Zur Überprüfung wurde das kompetitive Wachstum mit stabilen Zelllinien der ersten ULK1-gRNS gleichermaßen durchgeführt (C). Als Bestätigung für die erfolgte Transduktion wurde eine PLK-1-gRNS (blaue Kurve) verwendet, die zu einem deutlichen Wachstumsnachteil führt (D).



**Abbildung 18: kompetitives Wachstum von MOLM-14 mit ULK1-K. o.**  
Durchführung des Experimentes und Darstellung wie in Abb. 17

### 3.3.4 ULK1-defiziente Zellen betreiben weiterhin Autophagie

Um zu überprüfen, ob die Funktion von ULK1 tatsächlich essenziell für die Initiation von Autophagosomen ist, wurden die ULK1-K. o.-MV4-11-Zellen sowie die Kontrolle (NHT-K. o.) für 6 h jeweils in normalem Kulturmedium sowie unter Behandlung mit AC220 im Medium, um Autophagie zu induzieren, inkubiert. Jede dieser Konditionen wurde doppelt angesetzt und jeweils einmal Bafilomycin A1 in hoher Konzentration hinzugefügt, um den Abbau der entstehenden Autophagosomen zu hemmen. Es stellte sich die Frage, ob man im Falle eines ULK1-K. o. bei Bafilomycin-Behandlung eine Akkumulation der LC3B-II-Bande im *Western Blot* sehen würde, da die Konversion von LC3B-I zu -II im kanonischen Weg der Autophagosom-Entstehung als Folge der Aktivierung von ULK1 beschrieben wird. Es zeigte sich nur eine geringfügig verminderte Bafilomycin-abhängige Akkumulation von LC3B-II in ULK1 K. o.-Zellen im Vergleich zu ULK1-WT-Kontrollzellen (Abb. 19).

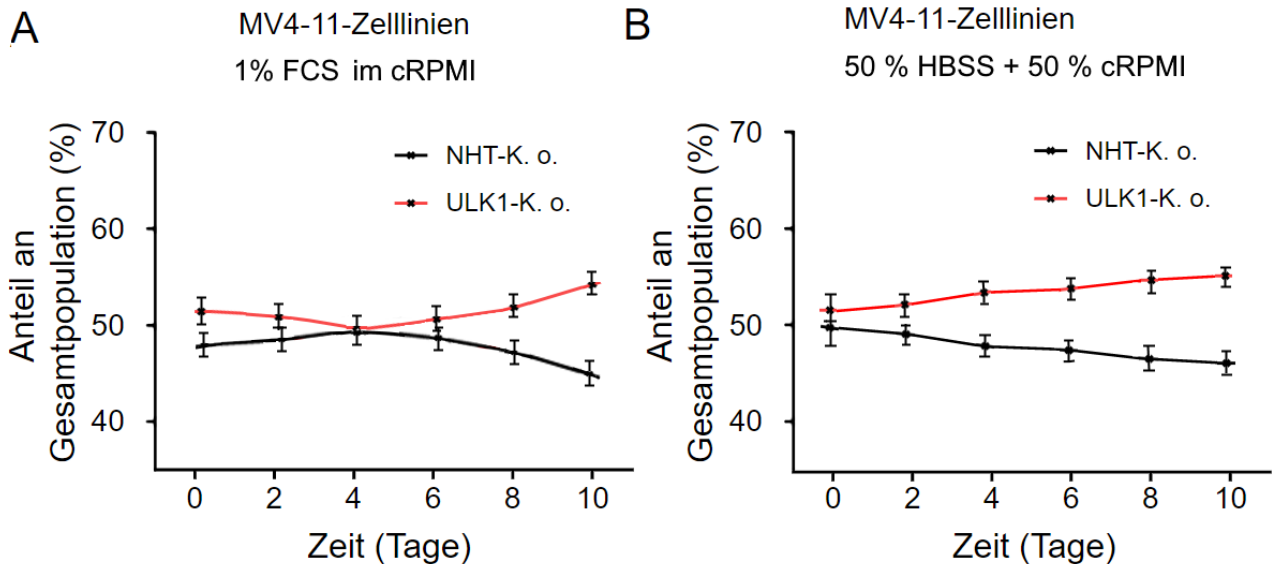


**Abbildung 19: AC220-Behandlung von ULK1-K. o.- und NHT-MV4-11-Zellen**

Die beiden Zelllinien wurden für 6 h  $\pm$  100 nM AC220  $\pm$  50 nM Bafilomycin A1 inkubiert und anschließend Lysate gewonnen. Die Darstellung von Aktin dient als Ladungskontrolle. AC220 ist ein starker Induktor für Autophagie, Bafilomycin A1 hemmt den Abbau von reifen Autophagosomen, welche quantitativ mit der Menge an LC3B-II korrelieren.

Folglich bleibt die Bildung von Autophagosomen auch bei einem Verlust der Proteinkinase ULK1 weitestgehend erhalten.

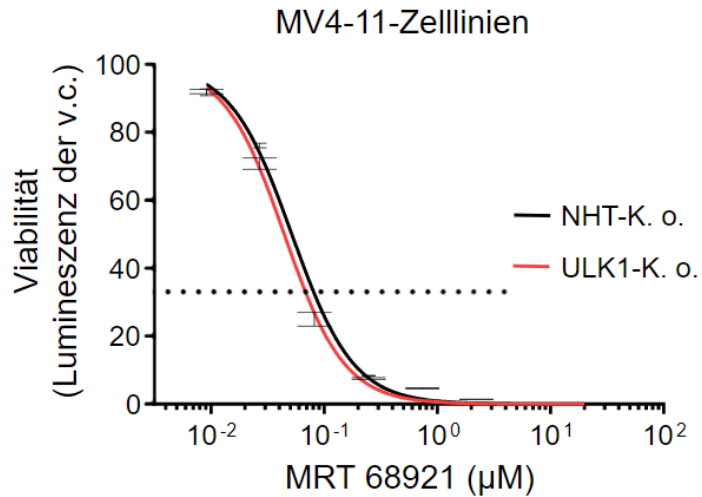
Dies bekräftigte auch ein weiterer Versuch des kompetitiven Wachstums zwischen MV4-11<sup>ULK1-K. o.</sup> und MV4-11<sup>NHT-K. o.</sup> unter Aminosäuren-Entzug, welcher die Induktion von Autophagie für eine ungestörte Proliferation nötig machen sollte. Es zeigte sich auch unter diesen Bedingungen kein Nachteil durch das ULK1-K. o.



**Abbildung 20: kompetitives Wachstum von MV4-11 mit ULK1-K. o. unter Aminosäuren-Entzug**

MV4-11<sup>ULK1-K. o.</sup> (rot) und MV4-11<sup>NHT-K. o.</sup> (schwarz) wurden 1:1 gemischt und unter Nährstoff-Entzug einerseits mit nur einem Prozent FCS im Medium (A) und andererseits durch 1:1 Mischung des Nährmediums mit HBSS (B) kultiviert. Die Kurven zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus n= 2 biologischen Replikaten.

Zuletzt wurde die Potenz des ULK1/2-Inhibitors MRT 68921 vergleichend zwischen MV4-11<sup>ULK1-K. o.</sup> und MV4-11<sup>NHT-K. o.</sup> bestimmt, um Rückschlüsse auf die Redundanz von ULK1 und ULK2 sowie die Spezifität des Inhibitors zu ziehen. Ursprünglich war geplant, durch die Behandlung den erwarteten, aber nicht bestätigten Proliferationsnachteil durch den ULK1-K. o. auszugleichen. Auch hierbei zeigten die ULK1-K. o.-Zellen keinen veränderten Phänotyp.



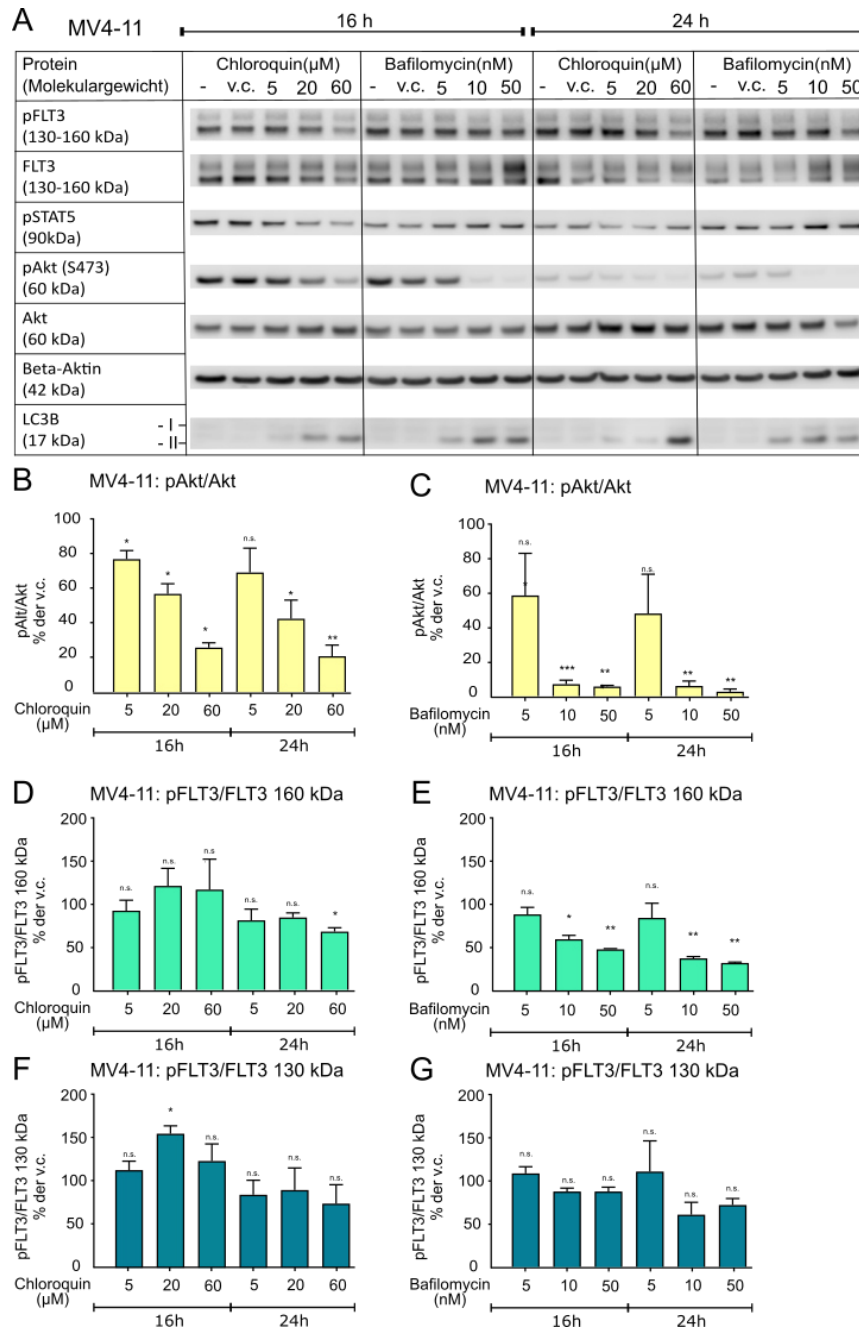
**Abbildung 21: Behandlung von MV4-11<sup>ULK1-K. o.</sup> und MV4-11<sup>NHT-K. o.</sup> mit ULK1/2-Inhibitor**  
 Die Zelllinien wurden mit verschiedenen Konzentrationen des ULK1/2-Inhibitors MRT 68921 behandelt und für 72 h inkubiert. Auf die Viabilität der Zellen wurde durch Färbung mit CellTiter-Glo® rückgeschlossen. Dargestellt ist je eine sigmoidale Standardkurve durch technische Triplikate ± SEM.



### **3.4 Lysosomale Inhibition bewirkt Veränderungen im Signalweg von FLT3-ITD**

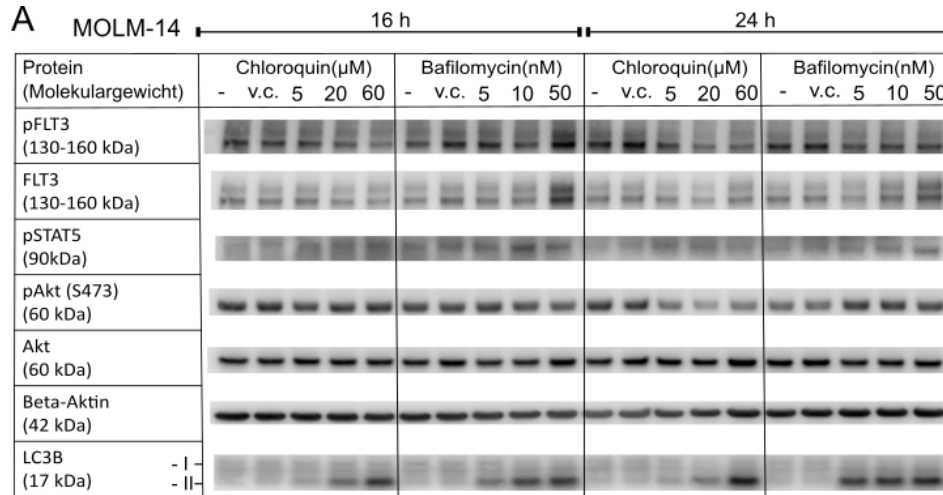
In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Einfluss lysosomaler Inhibition auf die Signaltransduktion von FLT3-ITD untersucht. Hierfür wurden die Zelllinien MV4-11 und MOLM-14 mit Chloroquin und Bafilomycin A1 behandelt.

In einem Vorversuch, der die Inkubationszeiten 4, 8, 16, 24 und 48 h beinhaltete, zeigten sich die stärksten Effekte nach 16 und 24 h, weshalb diese für Folgeversuche verwendet wurden. Die beiden FLT3-ITD-positiven Zelllinien MV4-11 und MOLM-14 wurden mit drei verschiedenen Konzentrationen der lysosomalen Inhibitoren Chloroquin und Bafilomycin A1 für jeweils 16 und 24 h inkubiert. Danach wurden Lysate aus den Zellen gewonnen und immunhistochemisch die Auswirkungen auf die Signalprotein-Kaskade von FLT3-ITD dargestellt. Hierfür wurde das Ausmaß der Phosphorylierung von FLT3 selbst sowie von STAT5 und AKT gewählt. Es zeigte sich, dass bei beiden Zelllinien ähnliche Veränderungen bezüglich der Phosphorylierung von FLT3 und AKT entstanden sind.

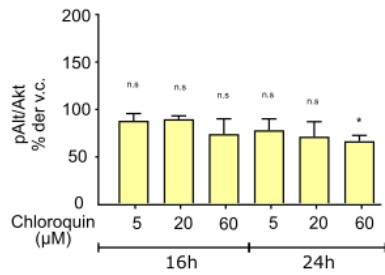


**Abbildung 22: Behandlung von MV4-11 mit lysosomalen Inhibitoren**

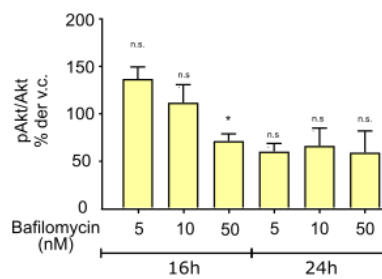
MV4-11-Zellen wurden unter verschiedenen Chloroquin- und Bafilomycin A1-Konzentrationen inkubiert. Nach 16 und 24 h wurden Lysate gewonnen und immunhistochemisch Proteine der Signalkaskade dargestellt. Als Ladungskontrolle diente Aktin. Die Wirkung der Inhibitoren auf die Phosphorylierung von FLT3 und AKT wurde densitometrisch ausgewertet und der prozentuale Anteil bezogen auf die Gesamtmenge des jeweiligen Signalproteins dargestellt (Mittelwert aus drei biologischen Replikaten ± SEM). Die Signifikanz-Testung erfolgte bezüglich der Kontroll-Kondition v. c. mittels ungepaartem t-Test (n. s.: nicht signifikant, \*: p < 0,05; \*\*: p < 0,01, \*\*\*: p < 0,001).



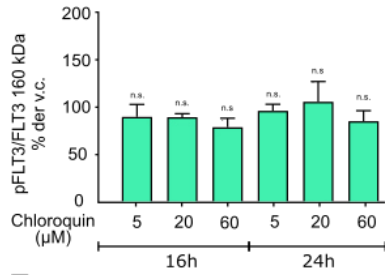
**B** MOLM-14: pAkt/Akt



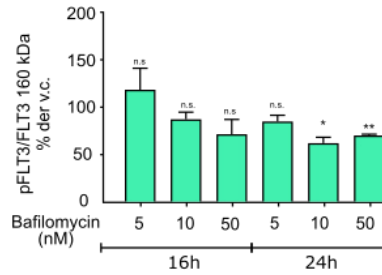
**C** MOLM-14: pAkt/Akt



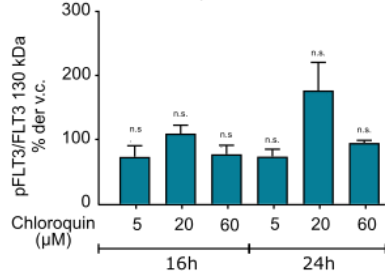
**D** MOLM-14: pFLT3/FLT3 160 kDa



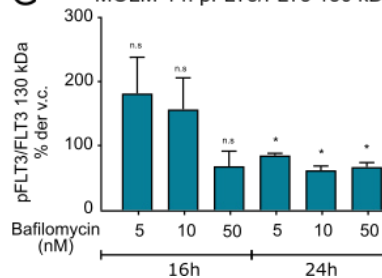
**E** MOLM-14: pFLT3/FLT3 160 kDa



**F** MOLM-14: pFLT3/FLT3 130 kDa



**G** MOLM-14: pFLT3/FLT3 130 kDa



**Abbildung 23: Behandlung von MOLM-14 mit lysosomalen Inhibitoren**

MOLM-14-Zellen wurden wie in Abb. 22 mit Chloroquin und Bafilomycin A1 behandelt und dargestellt.

Es zeigte sich, dass unter lysosomaler Inhibition AKT an S473 vermindert phosphoryliert ist: bei MV4-11 wird die Phosphorylierung von AKT (Abb. 22/23 B und C) durch die beiden höheren Konzentrationen der Inhibitoren deutlich reduziert (p-Werte < 0,01). Bei MOLM-14 war dieser Effekt weniger stark, aber dennoch existent: Eine signifikante Reduktion entstand bei den Konditionen 60 µM Chloroquin nach 24 h und bei 50 nM Bafilomycin A1 nach 16 h, wobei hier die 24 h-Werte die gleiche Tendenz zeigten.

Die weiteren untersuchten Phosphoproteine zeigten kein einheitliches Regulationsmuster. Im Falle von pFLT3 nahm die Phosphorylierung der 160 kDa-Isoform (D und E) bei beiden Zelllinien mit steigenden Dosen der lysosomalen Inhibitoren ab. Besonders deutlich war dies bei hohen Dosen von Bafilomycin A1, während bei Chloroquin nur der Wert bei 60 µM nach 16 h bei MV4-11 signifikant war. Die 130 kDa-Form (F und G) blieb bei MV4-11 weitgehend unbeeinflusst, wohingegen sie bei MOLM-14 bei Behandlung mit Bafilomycin A1 selbst in der niedrigsten Dosis signifikant weniger phosphoryliert war. Weiterhin zeigte die Menge an gesamtem FLT3-Protein unter lysosomaler Inhibition kein konstantes Verhalten. Während die Behandlung mit Bafilomycin A1 zu einer Akkumulation von FLT3 führte, kam es durch die Chloroquin-Behandlung scheinbar zu einer Abnahme von FLT3.

Die jeweils zunehmende Menge an LC3B-II zeigt die Hemmung des lysosomalen Abbaus durch die Inhibitoren.

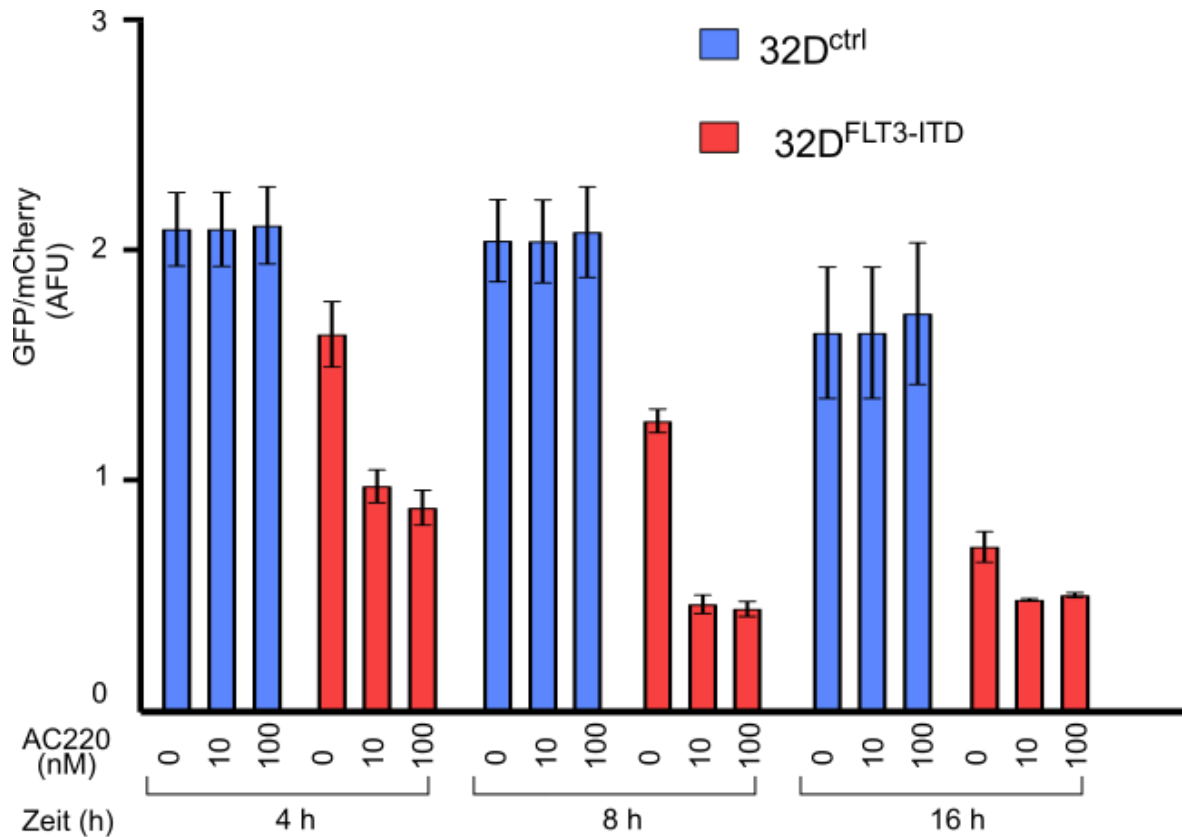
Zusammenfassend zeigt sich deutlich, dass lysosomale Inhibitoren Einfluss auf die FLT3-ITD-Signalkaskade nehmen. Die verminderte Phosphorylierung von AKT an dessen aktivierender Phosphorylierungsstelle S473 zeigt, dass es einen Crosstalk zwischen pharmakologischer Modulation von Autophagie und dem FLT3-ITD-Signalweg gibt. FLT3(-ITD) selbst scheint anhand der vorliegenden Daten jedoch keiner einfach gerichteten Regulation zu unterliegen.

### 3.5 Pharmakologische FLT3-Inhibition induziert Autophagie

Zuletzt sollte der Einfluss von pharmakologischer Hemmung der FLT3-Kinase-Aktivität auf die Autophagie-Aktivität untersucht werden.

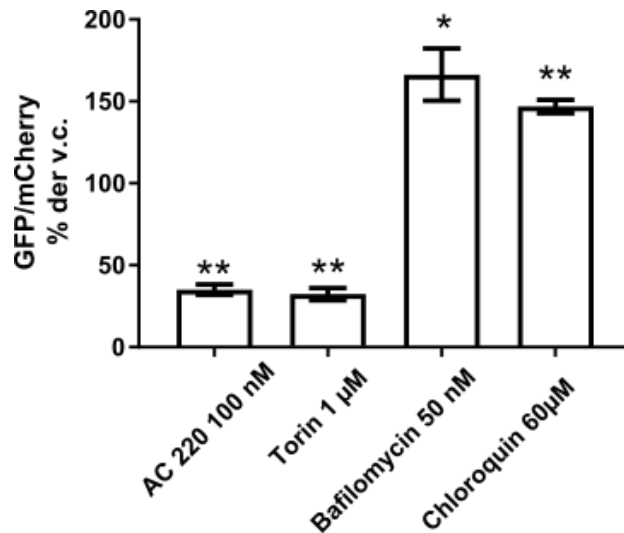
Hierfür wurden zunächst 32D<sup>ctrl</sup>- und 32D<sup>FLT3-ITD</sup>-Zellen mit dem FLT3-Inhibitor AC220 behandelt und nach 4, 8 und 16 h Inkubationszeit per Durchflusszytometrie analysiert. AC220 zählt aufgrund seiner hohen Spezifität für FLT3 zur zweiten Generation der TKI. Es zeigte sich, dass pharmakologische FLT3-ITD-Inhibition zu einer zeitabhängigen Induktion von Autophagie führt. Eine Autophagie-Induktion durch AC220 zeigte sich nur bei den 32D<sup>FLT3-ITD</sup>-Zellen, während die Behandlung von 32D<sup>ctrl</sup>-Zellen mit AC220 zu keiner vermehrten Autophagie-Aktivität führte.

Diese Ergebnisse konnten in einem zweiten, humanen Zellmodell bestätigt werden. FLT3-ITD-positive, GFP-LC3B-mCherry-exprimierende MV4-11-Zellen wurden mit AC220 sowie verschiedenen Kontrollen (mTOR-Inhibitor Torin1, lysosomale Inhibitoren Bafilomycin A1 und Chloroquin) behandelt und die resultierende Autophagie-Aktivität mittels Durchflusszytometrie gemessen. FLT3-ITD-Inhibition mittels AC220 zeigte eine ähnlich potente Autophagie-induzierende Wirkung wie Torin1.



**Abbildung 24: Spezifische Autophagie-Induktion durch FLT3-Inhibitor AC220**

32D<sup>ctrl</sup>- und 32D<sup>FLT3-ITD</sup>-Zellen wurden am Versuchstag abzentrifugiert, ± AC220 resuspendiert und inkubiert. Nach 4, 8 und 16 h wurden per Durchflusszytometrie die GFP- und mCherry-Emission gemessen. Der Quotient aus GFP-LC3B und mCherry (Zytosol) ist abhängig von der aktuellen Autophagie-Aktivität. Kleinere Messwerte bedeuten mehr Autophagie-Aktivität. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei biologischen Replikaten ± SEM.

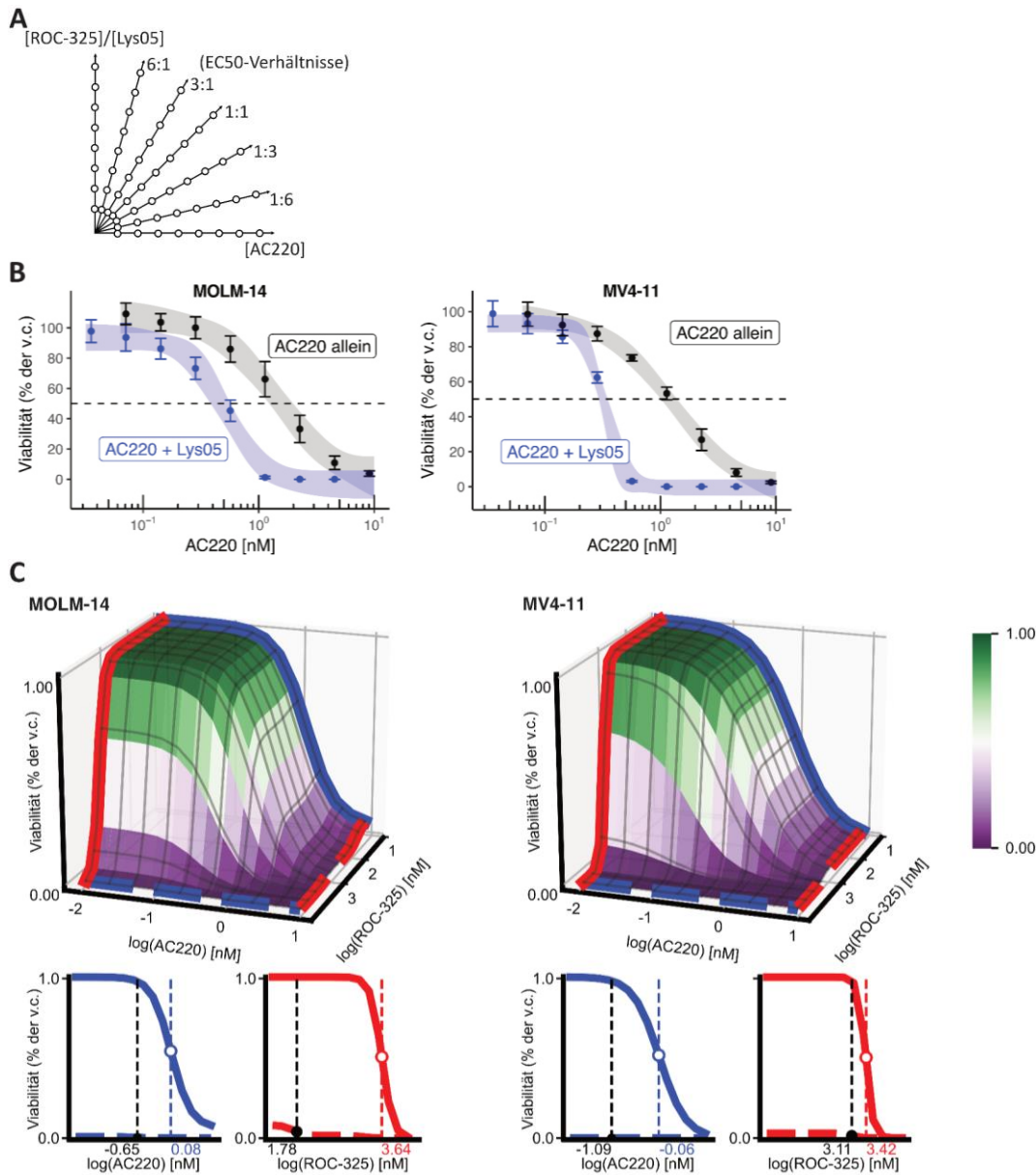


### Abbildung 25: Beeinflussung der Autophagie durch verschiedene Inhibitoren

GFP-LC3B-mCherry-exprimierende MV4-11-Zellen wurden für 8 h mit AC220, Torin, Bafilomycin A1 und Chloroquin behandelt und danach per Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt ist der Quotient von GFP und mCherry normalisiert auf die Kontroll-Kondition v. c. ohne Inhibitor (Mittelwert aus drei Replikaten  $\pm$  SEM). Die Signifikanztestung (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ) erfolgte jeweils bezüglich dieser beiden Bedingungen. Werte  $< 100\%$  bedeuten eine Induktion, Werte  $> 100\%$  bedeuten eine Hemmung der Autophagie.

### 3.6 Autophagie-Inhibition ist synergistisch mit FLT3-Inhibition

In einem letzten Schritt sollte untersucht werden, ob die zusätzliche Hemmung der beobachteten Autophagie-Induktion nach FLT3-Inhibition einen additiven bzw. synergistischen Effekt zur alleinigen FLT3-Inhibition mittels AC220 hat. Hierzu wurden zunächst EC50-Werte der einzelnen Inhibitoren (AC220, Lys-05, ROC-325) für die beiden Zelllinien MOLM-14 und MV4-11 bestimmt. Diese Zelllinien wurden dann mit verschiedenen EC50-Mischverhältnissen zwischen AC220 und jeweils einem der lysosomalen Inhibitoren (Lys-05, ROC-325) in verschiedenen Dosisstärken behandelt. Es zeigte sich ein signifikante, ca. 3-10fache Potenzierung der Wirkung von AC220 durch die Mitbehandlung mit einem lysosomalen Inhibitor.

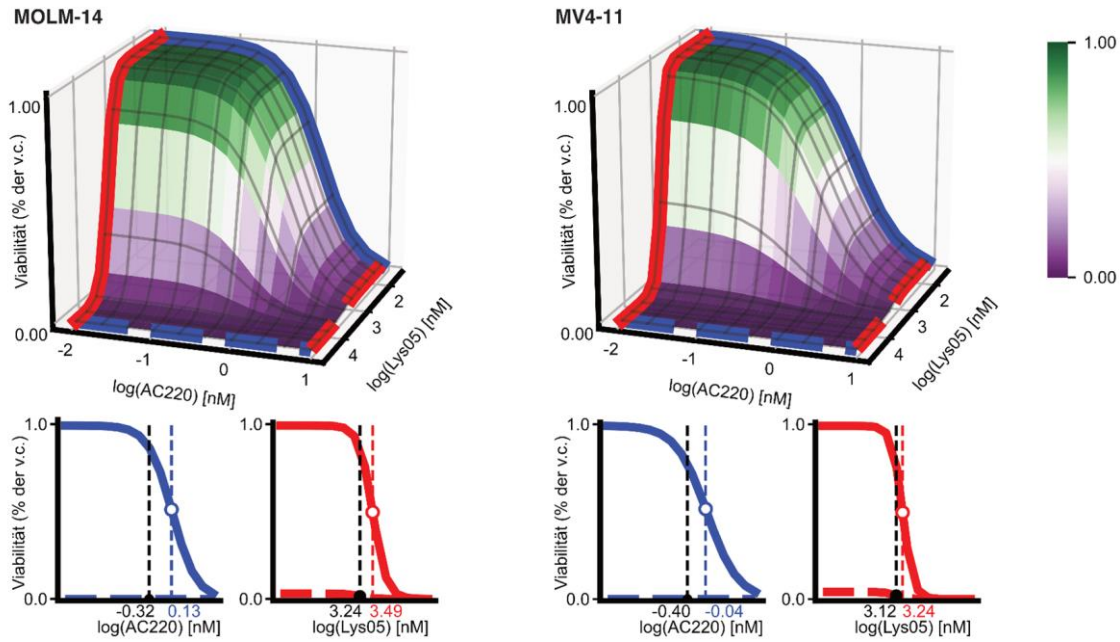


**Abbildung 26: Synergismus zwischen FLT3-Inhibitor AC220 und lysosomalen Autophagie-Inhibitoren Lys-05 und ROC-325**

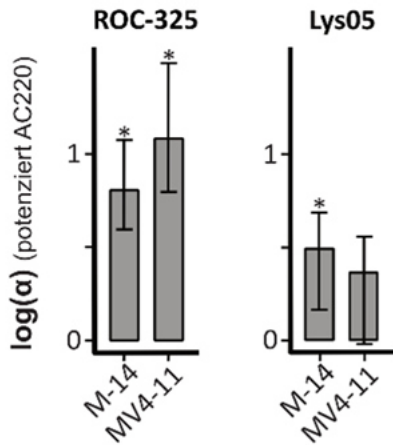
(A) Darstellung des Synergismus von AC220 und Lys-05 bzw. ROC-325 in verschiedenen EC<sub>50</sub>-Verhältnissen als Kombinationsbehandlung. (B) Dosis-Wirkungskurven von MOLM-14- und MV4-11-Zellen nach 72 h Behandlung mit AC220 ± Lys-05 (1:1 EC<sub>50</sub>-Verhältnis). Mittelwert ± SEM; n=3 biologische Replikate. (C) Dosis-Wirkungs-Fläche von MOLM-14- und MV4-11-Zellen nach 72 h Behandlung mit AC220 und ROC-325 in verschiedenen EC<sub>50</sub>-Verhältnissen und Konzentrationen. Unterhalb der Dosis-Wirkungs-Fläche sind die jeweiligen Dosis-Wirkungs-Kurven der alleinigen (durchgezogene blaue und rote Kurve) und in Anwesenheit der maximalen Konzentration des Kombinationspartners (gestrichelte blaue und rote Linie) dargestellt; die gepunktete Linie markiert die EC<sub>50</sub>-Werte jeder Kurve.



**A**



**B**



**Abbildung 27: Synergismus zwischen FLT3-Inhibitor AC220 und lysosomalen Autophagie-Inhibitoren Lys-05 und ROC-325 und Testung auf Signifikanz**

(A) Wie Abb. 26 C, jedoch mit Lys-05 anstelle von ROC-325. (B) Statistische Auswertung der Dosis-Wirkungs-Beziehungen bzgl. pharmakologischen Synergismus.  $\log(\alpha) = 0$  bedeutet einen rein additiven Effekt der Kombinationsbehandlung,  $\log(\alpha) > 0$  zeigt eine synergistische Potenzierung der Wirkung von AC220 durch den Kombinationspartner. Fehlerbalken umfassen nicht-parametrische 95 %-Konfidenzintervalle.

\* markiert signifikanten Synergismus.

## 4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass durch die FLT3-ITD-Mutation bei 32D-Zellen für ihre so erworbene Wachstumsfaktor-unabhängige Proliferation die basale Autophagie ansteigt. Mit lysosomalen Inhibitoren lässt sich die Autophagie der FLT3-ITD-transformierten Zellen stärker hemmen als die der 32D<sup>ctrl</sup>-Zellen. Allerdings exponiert die FLT3-ITD-Mutation unter basalen Bedingungen keine verstärkte Vulnerabilität gegenüber lysosomaler Inhibition bezüglich der Proliferation. ULK1/2-Inhibitoren hingegen hemmen bei FLT3-ITD-positiven AML-Zellen die Proliferation sehr viel potenter als bei WT-FLT3-Zellen und bewirken eine Reduktion der Autophagie. Der alleinige genetische Verlust von ULK1 beeinträchtigt die hier untersuchten FLT3-ITD-positiven AML-Zelllinien MV4-11 und MOLM-14 allerdings weder hinsichtlich der Proliferation noch der Autophagie. Die Hemmung der Autophagie durch lysosomale Inhibitoren bewirkt Veränderungen in der FLT3-ITD-Signalkaskade und die spezifische Inhibition von FLT3 durch AC220 wiederum induziert Autophagie. Die Kombination aus Autophagie-Induktion durch AC220 und -Hemmung durch lysosomale Inhibitoren beeinträchtigt die Proliferation FLT3-ITD-positiver Zellen in synergistischer Wirkungsweise.

## 4.1 Zusammenhänge zwischen FLT3-Signaltransduktion und Autophagie

Ob und in welchem Ausmaß die Signaltransduktion der RTK FLT3 Einfluss auf die Autophagie nimmt, war in letzter Zeit Kernpunkt vieler Forschungsprojekte. Derzeitiger Standpunkt ist, dass viele RTKs bei Aktivierung Autophagie auslösen.<sup>86</sup> Beispiele hierfür sind Axl, ErbB3/ErbB4, TrkA, Ephrin und VEGFR.<sup>86</sup> Auch das Gegenteil ist der Fall: EGFR, Her2 und FGFR1 wirken anti-autophagisch.<sup>86</sup> Andererseits beeinflusst auch die Autophagie die Aktivität von RTKs.<sup>86</sup> Sowohl c-Met als auch EGFR werden bei autophagischer Aktivität phosphoryliert bzw. stabilisiert und somit aktiv. Da dies im Falle von EGFR wiederum die Autophagie hemmt, scheint es ein Feedback im Sinne negativer Rückkoppelung zu sein.<sup>86</sup> Im Falle von FLT3 führt sowohl eine spezifische Hemmung durch AC220 als auch die Inhibition der Proteinkinase mTOR – *downstream* von FLT3 - zu vermehrter Autophagie. Dies impliziert eine anti-autophagische Wirkung von FLT3.

Heydt *et al.* bemühten sich herauszufinden, über welchen Signalweg FLT3-ITD die Autophagie beeinflusst. Die Inhibition der bekannten Effektoren PI3K/AKT, MAPK und STAT5 bewirkten keinen Effekt. Erst die Hemmung des Transkriptionsfaktors ATF4 reduzierte die Autophagie. Im Einklang dazu erwies sich ein ATF4-Inhibitor als wirksames Mittel bei TKI-resistenten FLT3-Mutationen.<sup>87</sup> Außerdem ist ATF4 bereits aus dem Signalweg von eIF2 $\alpha$  bekannt, welcher zum „*fine tuning*“ der Autophagie beisteuert.<sup>88</sup>

In dieser Arbeit reduzierte die Hemmung der Degradierung von Zellbestandteilen durch Autophagie das Verhältnis von phosphoryliertem FLT3 zum Gesamt-FLT3. Fraglich ist, ob dieser Effekt durch eine reduzierte Phosphorylierung zustande kommt oder weil FLT3 physiologisch im Autophagosom abgebaut wird<sup>89</sup> und folglich akkumuliert. Allerdings kommt es auch zu einer verringerten Phosphorylierung der Proteinkinase AKT, welche im Signalweg von FLT3-ITD beeinflusst wird.<sup>38</sup> Natürlich

kann dies durch *off target*-Effekte oder FLT3-unabhängig zustande kommen. Es könnte aber auch bedeuten, dass durch die gehemmte Autophagie der Stoffwechsel der Zellen so sehr beeinträchtigt wird, dass über FLT3-Deaktivierung zumindest teilweise wichtige proliferationsfördernde Signale gebremst werden.

Bislang ist unklar, ob es Signalwege gibt, die zwischen Autophagosomen und dem PI3K/AKT-Weg vermitteln. Dies liegt jedoch nahe, da die Phosphorylierung von AKT viel stärker als die von FLT3 durch die lysosomale Inhibition reduziert wird. Denkbar wäre eine Deaktivierung des PI3K/AKT-Weges infolge eines Substratmangels bei reduzierter Versorgung durch gehemmte Autophagie. Bekannt wurde PI3K/AKT als intrazellulärer Vermittler des anabolen extrazellulären Hormones Insulin, welches bei positiver Energiebilanz Wachstum und Proliferation vermittelt.<sup>23</sup> Folglich wird das anabole Signal durch PI3K/AKT in Mangelsituationen schwächer, was allerdings molekularbiologisch noch nicht vollständig entschlüsselt ist.

Eine Verbindung über *Crosstalk* zwischen verschiedenen anabolen und katabolen Signalwegen wäre auch möglich. AKT wird durch diverse posttranslationale Modifikationen de- bzw. aktiviert<sup>23,90</sup> und hat selbst mehr als 150 Zielmoleküle *downstream*.<sup>91</sup> Beispielsweise interagieren p53 und die Autophagie-Kaskade miteinander.<sup>92</sup> Zytoplasmatisches p53 unterdrückt die Autophagie<sup>93</sup> und Autophagie wiederum hemmt p53.<sup>92</sup> Unter den vielen p53-regulierten Genen befinden sich Untereinheiten der AMPK, PTEN, und TSC2<sup>94</sup>, welche den PI3K/AKT/mTOR-Weg hemmen: AMPK und TSC2 hemmen mTORC1, während die Phosphatase PTEN das PI3K-Produkt PIP3 dephosphoryliert und somit inaktiviert.<sup>23</sup> Dies wäre eine von vielen möglichen Interaktionen zwischen der Autophagie und dem PI3K/AKT-Weg, welche allerdings in AML-Zellen noch nicht spezifisch untersucht wurde. Es bleibt zu entschlüsseln, über welche Mechanismen diese Verknüpfung zustande kommt und wie stark der proliferationsfördernde Effekt durch FLT3-Aktivierung von der Autophagie abhängig ist.

## 4.2 Autophagie und deren Inhibition in AML-Zellen

Autophagie ist ein Stoffwechselprozess, der bei einem Mangel an Energie, Nährstoffen oder Wachstumsfaktoren induziert wird und die Zelle mit notwendigen Substraten versorgt.<sup>52</sup> In dieser Arbeit wurde dies anhand des Wachstumsfaktors mIL-3 gezeigt. Auch bei hypoxischem Stress schützen sich Zellen durch Autophagie vor der Apoptose<sup>53</sup> und können somit geschädigte Organellen beseitigen.<sup>95</sup> Um ihre hohe Proliferationsrate aufrechterhalten zu können, sind besonders maligne Zellen auf die kontinuierliche Versorgung durch gesteigerte Autophagie angewiesen.<sup>92,96</sup> Aktivierende Mutationen des Onkogens Ras zum Beispiel steigern die Autophagie der Tumorzellen enorm und ermöglichen so erst das schnelle Wachstum und die hohe Proliferationsrate.<sup>97</sup> Zudem ist die abnorme Expression von Autophagie-Genen in AML-Blasten mit einer höheren Rezidivrate assoziiert.<sup>98</sup>

Auch nicht maligne HSCs benötigen ein hohes Level an Autophagie, um ihre Multipotenz aufrecht zu erhalten.<sup>99</sup> Das maligne Pendant hierzu sind Leukämie-initiiierende Zellen (*leukemia-initiating cells, LICs*, auch bekannt als *leukemic stem cells, LSCs*), aus welchen die unreifen Leukämie-Blasten hervorgehen<sup>100</sup> und auch für deren Erhaltung wird Autophagie benötigt.<sup>101</sup>

In AML-Blasten unterscheidet sich die Autophagie-Aktivität.<sup>101,102</sup> Sumitomo *et al.* berichteten über mehr Autophagie in Blasten aus dem peripheren Blut als aus dem Knochenmark.<sup>101</sup> Folkerts *et al.* verglichen die Expression von Autophagie-Genen in CD34<sup>+</sup>-AML-Zellen aus eigenen Patientenproben sowie aus Profilen der *BloodSpot*-Datensammlung<sup>103</sup> mit der in nicht malignen CD34<sup>+</sup>-HSCs. Die AML-Zellen zeigten eine sehr viel stärkere Expression von ATG5, ATG7, sowie weiterer Gene, die am ULK1-Komplex oder der LC3-Lipidierung beteiligt sind.<sup>102</sup> Auch hier wurde der *Flux* der Blasten als sehr heterogen eingestuft. Deutlich höher war er in AML-Zellen mit komplexem Karyotyp und bei p53-Mutation, wohingegen Mutationen der Gene FLT3, NPM1, IDH1/2, DNMT3A oder CEPBA keinen Unterschied zu den nicht malignen HSCs zeigten.<sup>102</sup>

Um die Notwendigkeit der Autophagie für die AML-Zellen zu untersuchen, wurde ein *Knockdown* von ATG5 als auch von ATG7 herbeigeführt und bewirkte eine stark verminderte Proliferation der AML-Zellen.<sup>102</sup> Auch *in vivo* führte ein ATG5-*Knockdown* nach Transplantation in immundefiziente Mäuse zu einer wesentlich geringeren Expansion im Organismus verglichen mit den originären humanen AML-Zellen.<sup>102</sup> LICs im Knochenmark waren im Vergleich zu differenzierteren leukämischen Blasten auf ihre Autophagie angewiesen, um oxidativen Stress zu bewältigen.<sup>101</sup> Im peripheren Blut hingegen benötigten alle Leukämie-Zellen unabhängig von ihrer Differenzierung Autophagie.<sup>101</sup> Auch durch LICs initiierte Leukämie konnte im Mausmodell durch induzierbaren ATG5- oder ATG7- K. o. unterdrückt werden.<sup>101</sup>

Insgesamt ist Autophagie folglich wichtig sowohl für das Überleben als auch für die Proliferation von Leukämie-Zellen, weshalb die Inhibition dieser als neue Strategie in der AML-Therapie in Betracht gezogen wird.

Im Sinne eines *drug repurposing*, wobei man bereits zugelassene Medikamente für neue Indikationen verwendet, wurden einige Autophagie-inhibierende Stoffe eingesetzt. Der Vorteil hierbei ist, dass die Medikamente bereits verfügbar sind, die Wirkung bekannt ist und es seltener zum Auftreten unerwarteter Nebenwirkungen kommt.<sup>95</sup>

Als schon lange etabliertes Medikament in der Behandlung der Malaria oder auch der rheumatoiden Arthritis<sup>73</sup> bot sich nach Entdeckung der Autophagie-hemmenden Wirkung Chloroquin bzw. sein Derivat Hydroxychloroquin als potenzielles neues Pharmakon in der Leukämie-Therapie an.<sup>104</sup> Beide sind schwache Basen und reichern sich daher in sauren Kompartimenten wie Lysosomen an.<sup>73</sup> Dort werden sie protoniert und können so nicht mehr die Membran passieren.<sup>73</sup> Folglich entfalten sie ihre Hauptwirkung dort.<sup>80</sup> Durch Anhebung des lysosomalen pH-Wertes vermindern sie die Aktivität der für den Abbau notwendigen Enzyme.<sup>80</sup>

Bis zu einer Dosis von 10  $\mu\text{M}$  soll es zu keinen *off target*-Effekten kommen.<sup>95</sup> Hydroxychloroquin hat sowohl *in vitro*<sup>73</sup> als auch im Mausmodell<sup>95</sup> eine nahezu identische Potenz wie Chloroquin, die Degradierung von Autophagosomen in einem späten Stadium zu hemmen. Hydroxychloroquin wird meistens in Studien bevorzugt<sup>104</sup>, da hier in der klinischen Anwendung sicherer die Dosis eskaliert werden kann.<sup>95</sup> Bei der Testung *in vitro* macht es folglich keinen Unterschied, welchen der beiden man verwendet. Ein weiterer lysosomaler Inhibitor für die Verwendung *in vitro* ist Bafilomycin A1, der die v-ATPase der Lysosomen inhibiert und so die Ansäuerung verhindert.<sup>80</sup>

Einer der Kernpunkte dieser Arbeit war, zu untersuchen, ob die maligne Transformation mit FLT3-ITD in ähnlicher Weise murine 32D-Promyelozyten von gesteigerter Autophagie abhängig macht, wie es für AML-Zellen beschreiben wurde. 32D-Zellen stellen neben der Ba/F3-Zelllinie eines der am häufigsten verwendeten Zellkultur-Modelle dar, um den Einfluss spezieller Gene auf die Myelopoese zu untersuchen.<sup>105</sup> Ein gewisses basales Level an Autophagie schien zunächst wichtig zu sein. Beim Entzug eines Wachstumsfaktors (mIL-3), was als einer der Trigger für Autophagie beschrieben wird<sup>52</sup> stieg die Autophagie in den betroffenen 32D<sup>FLT3-ITD</sup>-Zellen stark an. Allerdings war diese induzierte Autophagie anscheinend irrelevant für die Proliferation der Zellen, da sich keine Unterschiede bei der Hemmung dieser mittels verschiedener lysosomaler Inhibitoren bei 32D<sup>FLT3-ITD</sup>-Zellen  $\pm$  mIL-3 zeigten. Es wurde zwar nicht per Durchflusszytometrie untersucht, ob es zu einer vollständigen Hemmung der Autophagie durch die verwendeten Inhibitoren kam, allerdings kann man anhand von Ergebnissen aus anderen Versuchen besonders bei den höheren Dosierungen davon ausgehen.<sup>106</sup>

Auch die Behandlung sowohl mit etablierten als auch experimentellen Chemotherapeutika zeigt häufig eine Steigerung der Autophagie in AML-Zellen sowie in vielen verschiedenen Tumorzellen, was als wichtiger Resistenzmechanismus verdächtigt wird und das Überleben maligner Zellen

gewährleisten kann.<sup>66</sup> Das in der Standard-Therapie verwendete Cytarabin beispielweise induziert *in vivo* Autophagie in LICs<sup>101</sup> und in AML-Blasten<sup>98</sup> und dessen antileukämische Wirkung lässt sich durch ATG7-Deletion potenzieren.<sup>98,101</sup>

Bei circa 70 % der AML-Patienten kommt es zu einem aberranten mTORC1-Signal<sup>107</sup>, weshalb mTOR-Inhibitoren erprobt werden<sup>84</sup> und *in vitro* die Proliferation von Leukämie-Zellen reduzieren.<sup>107</sup> Wie auch in dieser Arbeit gezeigt wird, resultiert die Hemmung von mTORC1 in gesteigerter Autophagie.<sup>84,106</sup>

Es gibt folglich viele Anzeichen dafür, dass Autophagie-Inhibition eine Verbesserung der Leukämie-Therapie darstellen könnte. Aufgrund dieser Erkenntnis wurde in den letzten Jahren intensiv an der Entwicklung von verschiedenen Inhibitoren gearbeitet und im Rahmen von klinischen Studien schon verschiedene Stoffe erprobt.<sup>104</sup>

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Wichtigkeit der Autophagie für AML-Zellen. Es zeigte sich ein dosisabhängiger zytostatischer bzw. -toxischer Effekt bei Autophagie-Inhibition sowohl auf Ebene von ULK1/2 als auch im letzten Schritt, dem lysosomalem Abbau. Für Chloroquin wurde die dosisabhängige Autophagie-Inhibition sowohl immunhistologisch als auch durchflusszytometrisch bewiesen. Gleichzeitig hat es eine potente zytotoxische Wirkung auf die verschiedenen verwendeten Myeloblasten. Allerdings wurden parenterale 32D-Zellen ebenso stark beeinträchtigt wie FLT3-ITD-transformierte Zellen. Erwähnenswert ist auch, dass für das vollständige Absterben der 32D-Zellen eine Dosis von circa 30 µM ausreichte, bei der die Autophagie nicht vollständig gehemmt wurde, da für die Durchflusszytometrie Dosen bis 100 µM titriert wurden und erst dann den minimalen *Flux* im Experiment bewirkten.

Laut Sumitomo *et al.* ist eine komplette Inhibition der Autophagie nötig, um Leukämie effektiv zu bekämpfen.<sup>101</sup> Nur milde Hemmung könnte sie dagegen durch Selektierung resistenter Zellen noch verschlimmern.<sup>101</sup> Daher sind gezielte und potente Wirkstoffe nötig.



Mit der maximalen verträglichen Dosis von Hydroxychloroquin erreicht man Spitzenspiegel von 10  $\mu\text{M}$  und ein *steady state* von 2-3  $\mu\text{M}$  im Blut.<sup>108</sup> Gastrointestinale Nebenwirkungen korrelieren mit der Konzentration im Blut.<sup>108</sup> Weitere unerwünschte Wirkungen sind Kardiomyopathie, Herzinsuffizienz und bei langer Verwendung Retinopathie.<sup>80</sup>

Es wird vermutet, dass mit dieser limitierten Dosis von (Hydroxy-)Chloroquin bei der Verwendung in klinischen Studien am Menschen keine ausreichende Autophagie-Inhibition erzielt und somit auch nicht der aus der Präklinik erhoffte Erfolg reproduziert werden konnte.<sup>81,82</sup>

Aus diesen Gründen wurden potentere Derivate wie Lys05<sup>81</sup> und ROC-325<sup>82</sup> entwickelt und befinden sich derzeit in der klinischen Erprobung.<sup>104</sup> Das Chloroquin-Derivat Lys05 akkumuliert in Lysosomen und hemmt dort stärker die Ansäuerung.<sup>81</sup> Auch bei der Entwicklung von ROC-325, wobei Hydroxychloroquin als strukturelle Vorlage diente, lag der Fokus auf einer spezifischen Wirkung im Lysosom.<sup>82</sup> Bei diversen Tumoren zeigte ROC-325 eine circa zehnfache antiproliferative und Lysosomen hemmende Potenz derer von Hydroxychloroquin.<sup>82</sup> Besonders AML-Zellen sollen sensibel für ROC-325 sein.<sup>109</sup>

Bei den Experimenten dieser Arbeit war die antiproliferative Wirkung auf 32D-Zellen von Lys05 fünffach und die von ROC-325 circa dreifach im Vergleich zu Chloroquin. Allerdings zeigte sich bei Lys05 ebenso wenig wie bei der Behandlung mit Chloroquin eine höhere Sensibilität der 32D<sup>FLT3-ITD</sup>. Gegen ROC-325 waren die FLT-ITD-transformierten Zellen resistenter als die parenteralen 32D<sup>ctrl</sup>.

### 4.3 Auswirkungen der FLT3-ITD-Mutation auf Autophagie und Proliferation

Kürzlich wurden Versuche unternommen, die zeigen sollten, ob auch bei FLT3-ITD-mutierten AML-Zellen die basale Autophagie-Aktivität beeinflusst wird.

Heydt *et al.* hemmten bei MV4-11, MOLM-14, sowie FLT3-ITD-positiven Patientenproben das FLT3-Signaling durch den Inhibitor AC220 bzw. via shRNA und ließen durch Zusatz von Chloroquin die entstehenden Autophagosomen akkumulieren. Per *Western Blot* und konfokaler Mikroskopie wurde die LC3B-II-Menge bestimmt und als Maßstab für die autophagosomale Aktivität genutzt.<sup>106</sup> Als Resultat zeigte sich weniger LC3B-II-Akkumulation bei gehemmttem FLT3.<sup>87</sup> Bei den Patientenproben wurde die reduzierte Phosphorylierung von STAT5 gewählt, um die FLT3-Inhibition zu beweisen, welche vorhanden war.<sup>87</sup> Im Gegensatz dazu zeigte AC220 bei WT-FLT3-Zellen keine Wirkung.<sup>87</sup> Aufgrund der Beobachtung, dass bei gehemmttem FLT3 bei FLT3-ITD-positiven Zellen deutlich weniger LC3B-II akkumulierte, folgerte die Forschungsgruppe, dass die ITD-Mutation die basale Autophagie steigert.<sup>87</sup>

Dies ist teilweise widersprüchlich zu den Ergebnissen aus dieser Arbeit: Die Hemmung von FLT3 durch AC220 bei AML-Zellen führte zu einem niedrigeren Quotienten aus GFP-LC3B/mCherry in der Durchflusszytometrie, was für einen erhöhten Autophagie-Flux spricht.

Nichtsdestotrotz wird Autophagie durch eine Vielzahl von Mediatoren ausgelöst<sup>51</sup>, nimmt einen Platz als Stressreaktion<sup>52-54,66-70</sup> ein und die Inhibition einer RTK wie FLT3 sollte durchaus eine solche in betroffenen Zellen auslösen. Außerdem würde man bei Betrachtung der bekannten durch FLT3-ITD aktivierten Signalwege<sup>11,20,35,38</sup>, welche über mTORC1 proliferativ und anti-autophagisch wirken<sup>38,58,59</sup>, bei FLT3-Inhibition eine Steigerung der Autophagie vermuten.

Bereits im Jahr 2000 wurde gezeigt, dass das Einbringen der FLT3-ITD-Mutation in die murine Zelllinie 32D diese zu mIL-3-unabhängigem Überleben befähigt. Als Erklärung wurden der aktivierte MAPK- und der zusätzliche STAT5-Signalweg herausgearbeitet.<sup>38</sup>

Über Auswirkungen auf die Autophagie in diesem Modell findet sich bislang keine Datenlage zum Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit. Basal zeigen sich keine Unterschiede. Lediglich scheint die basale Autophagie von 32D<sup>FLT3-ITD</sup> etwas anfälliger gegenüber Inhibition zu sein, was therapeutisch aber durchaus Vorteile bringen würde, wenn es sich mit induzierter Autophagie ebenso verhalten würde.

Laut Heydt *et al.* ist die Proliferation von FLT3-ITD-positiven AML-Zellen im Gegensatz zu FLT3-WT abhängig von der Autophagie.<sup>87</sup> FLT3-Inhibition hat einen zytostatischen statt toxischen Effekt.<sup>87</sup>

Auch diese These konnte nicht bestätigt werden: In den Wachstumskurven zeigte sich kein Proliferationsnachteil von 32D<sup>FLT3-ITD</sup> verglichen mit 32D<sup>ctrl</sup> bei Behandlung mit lysosomalen Inhibitoren.

Bei der Interpretation solcher Experimente muss allerdings immer beachtet werden, dass sich in vielen Modellen die Autophagie-Abhängigkeit erst in Stress-Situationen offenbart<sup>87,97</sup> und dies den Vergleich der einzelnen Arbeiten erschwert.

## 4.4 Neue Strategien in der AML-Therapie

Die Therapie der AML hat sich seit fast 50 Jahren kaum geändert. Nach wie vor wird das 7 + 3-Schema aus Cytarabin und einem Anthrazyclin verwendet.<sup>110</sup> Durch neue Erkenntnisse über die verschiedenen Mutationen sowie die Entwicklung und Aufnahme spezifischer Inhibitoren in das Repertoire im Kampf gegen die Leukämie rückte das Konzept der gezielten Therapie in greifbare Nähe.<sup>110</sup>

Für rund ein Viertel der AML-Patienten kommen aufgrund einer FLT3-Mutation<sup>28</sup> Inhibitoren dieser RTK infrage. Der bislang bedeutendste TKI dieser Art, Midostaurin, gehört zur ersten Generation von FLT3-Inhibitoren und verbessert das Überleben bei einer AML mit FLT3-Mutation. Seit 2017 ist Midostaurin als Zusatz zur Standard-Chemotherapie für die Behandlung der FLT3-mutierten AML bei Patienten unter 60 Jahren zugelassen.<sup>110</sup> Im Rahmen von Studien konnte auch bei den prognostisch sehr ungünstigen Rezidiven durch Midostaurin als Monotherapie die Anzahl der Blasten im peripheren Blut verringert werden.<sup>110</sup>

Sorafenib, ein weiterer Kinase-Inhibitor der ersten Generation, zeigt Wirkung in Verbindung mit der Standard-Therapie bei AML sowohl mit WT- als auch FLT-ITD.<sup>111</sup> Bei rezidivierender oder refraktärer FLT3-mutierter AML sprechen circa 75 % auf Sorafenib mit Azacitidin kombiniert klinisch an.<sup>112</sup> Mit dem Aufkommen verschiedener Arten der FLT3-Mutation ändert sich auch das Ansprechen auf die einzelnen TKI. Zum Beispiel wurden in einer klinischen Studie Patienten mit rezidivierender oder refraktärer FLT3-ITD-AML zunächst mit Sorafenib zusätzlich zur Chemotherapie behandelt. Beim Auftreten von Resistenzen durch sekundäre FLT3-TKD-Mutationen erreichte man durch einen Wechsel zu Sunitinib wieder das Ansprechen auf die Therapie.<sup>113</sup> Lestaurtinib bewirkt ähnlich wie die anderen TKI der ersten Generation eine periphere Blastenreduktion, aber keine Verlängerung des Gesamtüberlebens.<sup>112</sup> Das Ansprechen auf die Therapie korreliert mit der *ex vivo* bewiesenen Inhibition der Phosphorylierung von FLT3 durch den Inhibitor.<sup>112</sup>

FLT3-Inhibitoren der ersten Generation wirken, wenn auch etwas weniger, ebenfalls bei AML ohne FLT3-Mutation,<sup>112,114</sup> da WT-FLT3 von AML-Blasten häufig exprimiert und dann supprimiert wird.<sup>112</sup> Zudem zeichnen sie sich aufgrund ihrer Wirkung auf eine Vielzahl von Proteinkinasen eher als Multikinase-Inhibitoren aus und wirken so auch FLT3-unabhängig gegen abnorme Signalproteine maligner Zellen.<sup>45,110,112</sup>

Bei der Entwicklung der zweiten Generation von FLT3-Inhibitoren lag der Fokus auf der Selektivität für FLT3, um eine höhere Potenz zu erreichen und Resistenzen anzugehen.<sup>115</sup> In aktuellen Studien weisen diese spezifischeren TKI namens Quizartinib (AC220), Gilteritinib und Crenolanib auch eine geringere Toxizität auf.<sup>110</sup> Quizartinib erfüllt die Forderungen an einen FLT3-Inhibitor von höherer Selektivität,<sup>45</sup> ist aber gegen einige FLT3-TKD-Mutationen unwirksam.<sup>112</sup> Nach Erfolgen mit Quizartinib bei rezidivierender/refraktärer AML auch als Monotherapie (NCT00989261) befindet sich der Wirkstoff derzeit in einer Phase III-Studie (NCT02668653) bei neu diagnostizierter AML mit FLT3-ITD in Kombination mit der Standard-Chemotherapie. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Selektivität von AC220 für FLT3, da sich nur eine Wirkung auf FLT3-exprimierende 32D<sup>FLT3-ITD</sup>-Zellen zeigte, nicht aber auf 32D<sup>ctrl</sup>. Bei AML-Zellen ohne FLT3-Abhängigkeit reduziert AC220 erst in hoher Dosis die Viabilität.<sup>45</sup> AC220 hat folglich ein breites therapeutisches Fenster zwischen FLT3-Inhibition und genereller Zytotoxizität.

Gilteritinib ist ein dualer FLT3- und AXL-Inhibitor,<sup>112</sup> der sich ebenfalls derzeit in einer Phase III-Studie bei rezidivierender/refraktärer AML (ADMIRAL-Studie, NCT02421939) sowie in einer Interventionsstudie im Vergleich mit Midostaurin bei neu diagnostizierter AML (NCT03836209) befindet. Im November 2018 erfolgte die Zulassung durch die FDA als Monotherapie der rezidivierenden/refraktären FLT3-mutierten AML.<sup>116</sup> Über die Hemmung der RTK AXL verlängert Gilteritinib bei Versagen der Standard-Therapie und bei Quizartinib-Resistenz bei bestimmten Mutationen das Gesamtüberleben.<sup>116</sup> Für Crenolanib ist die Studienlage noch nicht so weit fortgeschritten.<sup>110</sup>

Trotz aller bislang erzielten Erfolge mit FLT3-Inhibitoren ist das Ansprechen nur von kurzer Dauer.<sup>112</sup> Gründe, weshalb TKI nur teilweise erfolgreich sind, könnten sein, dass sie LSCs, geschützt im Knochenmark,<sup>117</sup> nicht ausreichend angreifen<sup>118</sup> oder durch sekundäre Mutationen Resistenzen entstehen.<sup>112,115</sup> Solche Resistenzen gegen TKI entstehen einerseits *on target* durch eine Veränderung der Struktur des Rezeptors.<sup>115</sup> Andererseits kommen alternative z. B. *gain of function*- Mutationen im Ras/MAPK-Signalweg, meistens von KRAS oder NRAS, vor.<sup>115</sup> Laut Guo *et al.* werden Tumore durch aberrantes Ras-Signaling Autophagie-abhängig, was wiederum als Ansatzpunkt zur Bekämpfung der Resistenzen genutzt werden kann.<sup>97</sup>

Zusammenfassend zeigte die alleinige Verwendung weder von Autophagie- noch von FLT3-Inhibitoren sich sowohl in dieser Arbeit als auch in anderen Publikationen als nicht ausreichend in der Behandlung der FLT3-ITD-positiven AML.<sup>112,115,116</sup> Allerdings ist die Vorstellung einer Monotherapie bei einer so komplexen Krankheit wie Leukämie aufgrund der Heterogenität einzelner Subklone auch utopisch.<sup>112,114</sup> Selbst hochpotente Wirkstoffe wie Imatinib sind in der Blastenkrise der CML, die klinisch der AML ähnlicher ist als die chronische Phase, erst mit weiteren Substanzen zielführend.<sup>114</sup> Auch bei der Promyelozyten-Leukämie bewirkt nur die Kombination aus All-trans-Retinsäure mit Arsentrioxid die Langzeit-Remission.<sup>114</sup>

Wie bereits erörtert wird als Resistenzmechanismus maligner Zellen gegen Chemotherapeutika<sup>119</sup> und allgemeinen Überlebensvorteil eine gesteigerte Autophagie vermutet.<sup>52,53,95</sup> Auch im Falle des FLT3-Inhibitors AC220 (Quizartinib) und des mTOR-Inhibitors Torin<sup>84</sup> zeigte sich in dieser Arbeit eine Zunahme der Autophagie in behandelten Zellen. Wenn diese induzierte Autophagie tatsächlich die malignen Zellen vor der Apoptose schützen sollte, könnte man sich eine synergistische Wirkung von der Inhibition dieser erhoffen. Bei einigen Tumorarten wird schon länger ein Autophagie-inhibierender Wirkstoff zur Autophagie-induzierenden Chemotherapie kombiniert, um durch diesen Synergismus das Ansprechen auf die Chemotherapie zu erhöhen.<sup>50,120,121</sup>

Bereits 2010 wurde *in vitro* bei Kolonkarzinom-Zellen eine induzierte Autophagie durch das Chemotherapeutikum der Wahl hierfür, 5-Fluorouracil, entdeckt und mit Chloroquin unterdrückt.<sup>120</sup> Dies potenzierte die zytotoxische Wirkung.<sup>120</sup> Der Wirkstoff TAK-165, welcher als HER2-Inhibitor Mubritinib aus der Brustkrebs-Therapie bekannt ist, zeigte HER2-unabhängig Potenz, auch Autophagie zu hemmen.<sup>50</sup> Synergistisch mit AC220 zeigte er bei gynäkologischen Tumoren und AML-Zellen zytotoxische Wirkung bei malignen Zellen.<sup>50</sup>

In einem Myc-induzierten B-Zell-Lymphom-Modell inhibierte Chloroquin die durch das Alkylans Cyclophosphamid ausgelöste Autophagie und verstärkte die Apoptose infolge der Chemotherapie in ähnlicher Weise wie ein *ATG5-Knockdown*.<sup>95</sup> Die Potenz der Autophagie-Hemmung korrelierte mit der gesteigerten Apoptose-Rate.<sup>95</sup> Als weitere positive Feststellung zeigte sich im Tierversuch keine erhöhte Toxizität durch das Chloroquin zusätzlich zum Alkylans Cyclophosphamid.<sup>95</sup>

Das Überleben von LSCs in der Knochenmark-Nische, geschützt von Stromazellen wird als einer der Resistenzfaktoren vermutet.<sup>117</sup> Im Modell bewirken Stromazellen ein geringeres Ansprechen von FLT3-ITD-positiven AML-Zellen auf Midostaurin und Quizartinib.<sup>117</sup> Bei einem Screening nach Inhibitoren, die in dieser Umgebung in Kombination mit Midostaurin FLT3-mutierte AML-Zellen angreifen sollten, wurden Multikinase- und Januskinase (JAK)-Inhibitoren gefunden.<sup>117</sup>

Auch im Mausmodell führte die Kombination zum einem erhöhten Gesamtüberleben bei Injektion von FLT3-ITD-tranformierten Ba/F3-Zellen.<sup>117</sup> Immunhistochemisch zeigte sich auch der potenzierte Effekt der Kombinationen in Form einer geringeren Phosphorylierung von AKT und pSTAT5,<sup>117</sup> welche beide am FLT3-ITD-*Signaling* beteiligt sind.<sup>35</sup> Auf diese Weise lässt sich auch der Synergismus von PI3K-Inhibitoren und Midostaurin erklären, was ebenfalls eine Option bei FLT3-mutierten Blasten darstellt.<sup>122</sup>

In einem AML-Zellmodell zeigte sich die durch Histon-Deacetylase-Inhibitoren (in diesem Fall Valproinsäure und Vorinostat, welche auch bei Leukämien als Zytostatika Anwendung finden können<sup>3</sup>) induzierte Autophagie als Viabilität-erhaltender Mechanismus.<sup>72</sup> Die kombinierte Behandlung mit Chloroquin reduzierte die Autophagie auf die Aktivität unbehandelter Zellen, bewirkte in synergistischer Weise vermehrt Apoptose und wurde in AML-Zellen aus Patienten-Proben bestätigt.<sup>72</sup> Es zeigte sich eine Akkumulation von ROS sowie ubiquitinierten Proteinen, welche bei ungestört ablaufender Autophagie wohl durch lysosomale Degradierung verhindert bzw. recycelt werden und dann der Zelle von Nutzen sind.<sup>72</sup> Um die Wirkung von Chloroquin der Autophagie-Hemmung zuordnen zu können, wurde ein siRNA-vermittelter *Knockdown* von Autophagie-Genen genutzt, welcher den gleichen Synergismus mit den Chemotherapeutika hatte.<sup>72</sup>

Bei AML-Zellen speziell mit FLT3-ITD-Mutation zeigten Wu et al 2019 ähnliche Effekte mit dem Psychopharmakon Penfluridol, welches zuvor zusätzlich onkostatische und Autophagie-inhibierende Wirkung gezeigt hatte.<sup>47</sup> Auch hier resultierte die Kombination mit Chloroquin in stark erhöhter Apoptose der Leukämie-Zellen.<sup>47</sup> Als Mechanismus wurde hier herausgearbeitet, dass Penfluridol zu einer Deaktivierung von MAPK und AKT sowie zu erhöhten ROS-Level führt<sup>47</sup>, was beides in vermehrter Autophagie resultiert.<sup>47,51</sup>

Experimentell werden auch mTOR-Inhibitoren aufgrund der Wirkung von mTORC1/2 im Sinne von Proliferation und Überleben maligner Zellen<sup>104,107</sup> in Betracht gezogen. Die Hemmung von mTORC1/2 führt wahrscheinlich über die Phosphorylierung einer inaktivierenden Stelle von ULK1 zur Autophagie.<sup>59</sup> Bei AML-Blasten aus Patienten-Proben bewirkten mTORC1-Inhibitoren *in vitro* Autophagie und Chloroquin war, ebenso wie siRNA gegen ULK1, synergistisch.<sup>119</sup> Auch durch Daunorubicin wird Autophagie in AML- sowie LSC- Zelllinien über den AMPK-Weg induziert und durch -Hemmung mit ULK-Inhibitoren oder Hydroxychloroquin die Wirkung potenziert.<sup>123</sup>



Insgesamt zeigt sich (Hydroxy-)Chloroquin als ein „*chemosensitizer*“ und dies sehr wahrscheinlich aufgrund seiner Autophagie-Hemmung.<sup>124</sup> Auch in dieser Arbeit konnte die zytostatische Wirkung des FLT3-Inhibitors AC220 durch Chloroquin potenziert werden. In weiteren Experimenten wurde sowohl per Durchflusszytometrie als auch immunhistochemisch die Autophagie-Hemmung durch Chloroquin bewiesen. Auch das Chloroquin-Derivat ROC-325 behält diese Wirkweise bei. Ein Synergismus zeigte ROC-325 in Kombination mit dem Pyrimidin-Analogon Azacitidin in der Behandlung von AML-Zelllinien und primären Blasten sowohl *in vitro* als auch im Mausmodell.<sup>109</sup>

In den meisten Publikationen wurden AML-Blasten generell untersucht. Unterschiede aufgrund der einzelnen Mutationen wurden bisher nicht speziell herausgearbeitet. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben Anlass, die FLT3-ITD-Mutation als vulnerabel gegenüber einer Kombinations-Therapie aus Autophagie-Induktor und -Inhibitor einzuordnen. Zunächst lassen sich bei mL-3-Entzug - und bei Behandlung mit AC220 bei 32D<sup>FLT3-ITD</sup> umso mehr - höhere Autophagie-Level erzielen als bei 32D<sup>ctrl</sup>, was zeigt, dass die FLT3-ITD-transformierten Zellen bei steigendem Zellstress immer mehr Autophagie induzieren, um diesen zu kompensieren. Außerdem scheint die Autophagie von 32D<sup>FLT3-ITD</sup> sich effektiver durch lysosomale Inhibition reduzieren zu lassen. Mit einem Autophagie-Induktor wie AC220, der spezifisch auf FLT3-positive Zellen wirkt und einem Inhibitor, welcher auch vorrangig diesen Zelltyp in der Autophagie beeinträchtigt, könnte sich eine Möglichkeit bieten, die FLT3-ITD-AML gezielt zu bekämpfen. Tatsächlich zeigte sich ein Synergismus zwischen AC220 und Chloroquin bei der Behandlung von 32D<sup>FLT3-ITD</sup>-Zellen.

Optimal wäre ein Inhibitor speziell für den FLT3-ITD-mutierten Rezeptor. Da dieser allerdings nur kleine Abweichungen vom FLT3-Rezeptor aufweist,<sup>15,28</sup> scheint dies kein realistisches Ziel in der nächsten Zeit zu sein.

## 4.5 Spezifische ULK1/2-Inhibitoren als neue Wirkstoffe bei AML

Im vorherigen Kapitel wurde schon erwähnt, dass anstelle von lysosomalen Inhibitoren wie Chloroquin auch siRNA gegen ULK1 mit mTOR-Inhibitoren<sup>76,119</sup> sowie ULK-Inhibitoren mit Daunorubicin<sup>123</sup> synergistisch sind. Die spezifische ULK1/2-Inhibition ist besonders interessant bei malignen Zellen, welche stark auf Autophagie angewiesen sind, da dieser Proteinkinase eine zentrale Rolle in der Initiation zugewiesen wird.<sup>54,56,58</sup>

In dieser Arbeit wurden mehrere spezifische ULK1/2-Inhibitoren getestet und erzielten bei den FLT3-ITD-positiven Zelllinien MV4-11 und MOLM-14 eine ein bis zwei Zehnerpotenzen niedrigere IC50 als bei den deutlich weniger anfälligen FLT3-ITD-negativen THP-1.

Auch Hwang et al. berichteten von MRT 68921 und SBI-0206965 eine starke Apoptose-Induktion über die Aktivierung von Caspasen bei FLT3-ITD-positiven Zelllinien (MV4-11 und MOLM-13) und -Patienten-Proben, während WT-FLT3-AML- (HL60 und U937) sowie normale CD34<sup>+</sup>-HSCs deutlich weniger beeinträchtigt waren.<sup>125</sup> Ergänzend führte die Transduktion mit FLT3-ITD bei U937-Zellen zu einer Sensibilisierung für ULK1/2-Inhibitoren.<sup>125</sup> Als mögliche Erklärung zeigten sie eine höhere ULK1-Expression in den FLT3-ITD-Zellen und durch die ULK1/2-Inhibitoren eine Degradierung von FLT3 sowie Inaktivierung der bekannten FLT3-ITD-Signalwege ERK, AKT und STAT5.<sup>125</sup> Lungenkrebszellen mit Mutationen im Protoonkogen Ras, welches auch bei FLT3-ITD hochreguliert wird und die Zellen Autophagie-abhängig macht,<sup>97</sup> konnten durch ULK1/2-Inhibitoren für Nährstoff-Entzug sensibilisiert werden.<sup>126</sup>

Die ersten Kristallstrukturen der ULKs im Komplex mit Inhibitoren wurden 2015 von Lazarus et al. publiziert. Neben den üblichen Motiven einer Kinase haben ULK1, 2 und 4 ein sehr ähnliches Insert, welches auch weitere Kinasen wie z. B. der Gruppe der JAK besitzen.<sup>127</sup>

Die verwendeten Inhibitoren binden an der ATP-Bindungsstelle,<sup>40,79</sup> die auch sehr ähnlich bei diversen Kinasen ist.<sup>128</sup> Daher ist es nicht verwunderlich, dass ULK-Inhibitoren *off targets* haben.<sup>77</sup>

Die Selektivität von SBI-0206965 ist mit der des klinisch verwendeten Imatinib vergleichbar.<sup>76</sup> (Egan, 2015) Seine *off targets* sind vorwiegend Tyrosinkinase wie FAK, FLT3, Src, Abl, JAK3, Subformen der PKA, PKC, CAMK und die MAPK,<sup>126</sup> wovon bei kompletter ULK1-Inhibition bei 18 dieser Kinasen die Aktivität um mindestens 75 % gemindert wird.<sup>126</sup> Für FAK und FLT3 sind *in vitro* sogar die IC50-Konzentrationen für ULK1-Inhibition gleichermaßen inhibierend.<sup>76</sup> Für ULK2, Src und JAK3 besitzt SBI-0206965 10-20 % der Potenz.<sup>76</sup>

Für MRT68921 und MRT67307<sup>77</sup> wurden u. A. Chk1, JAK2, TBK1, IKK und die AMPK als *off targets* beschrieben.<sup>126</sup> In einer Dosierung von 1 µM reduziert MRT68921 deren Kinaseaktivität um mindestens 80 %, ist aber auch 15- bzw. 30-fach potenter für ULK1 bzw. ULK2.<sup>77</sup> Es ist möglich, dass MRT68921 nicht nur über ULK1/2-Hemmung seine Wirkung entfaltet, da es in dieser Arbeit bei MV4-11<sup>ULK1-K. o.</sup> und MV4-11<sup>NHT-K. o.</sup> gleichermaßen potent war. Eine ULK1/2-Redundanz könnte aber auch verantwortlich sein.

Kürzlich wurde mit der Aurora A-Kinase ein weiteres *off target* von ULK1/2-Inhibitoren entdeckt.<sup>79</sup> Bei der vergleichenden Testung der ULK1/2-Inhibitoren zwischen FLT3-ITD-positiven sowie -negativen AML-Zellen wurde auch der Aurora A-Kinase-Inhibitor verwendet. Dieser zeigte gleichermaßen Wirkung in allen verwendeten Zelllinien. Somit kann man ausschließen, dass die Vulnerabilität der FLT3-ITD-positiven Zellen gegenüber ULK1/2-Inhibitoren durch dieses *off target* zustande kommt.

Bei den Inhibitoren mit geringerer ULK1/2-Spezifität gibt es *off targets*, die auch von therapeutischem Nutzen sein könnten. PF-03814735 inhibiert laut Hersteller zusätzlich FLT3 und zeigte eine starke Beeinträchtigung besonders bei FLT3-ITD-Zellen.

Bei dem Chk-Inhibitor AZD7762 ist ULK1/2 eher ein *off target* mit potenziellem Nutzen.<sup>40</sup> Als schlüssigste Erklärung, warum AZD7762 trotz eher geringer ULK1/2-Selektivität und sehr viel höherer für Checkpoint-Kinasen so stark auf FLT3-ITD-positive Zellen wirkt, kommen die Veränderungen durch die bei FLT3-ITD hochregulierten Protoonkogene Pim-1, c-Myc und Cyclin D3 infrage.<sup>24,129</sup> Diese vermitteln unkontrollierte Progression im normalerweise streng regulierten Zellzyklus, indem *checkpoints* übergangen werden, die diesen bei zu reparierenden DNS-Schäden anhalten würden.<sup>40</sup> Auch p27, welches eine Funktion beim Arretieren an einem *checkpoint* hat, wird bei FLT3-ITD weniger exprimiert sowie inaktivierend phosphoryliert und degradiert.<sup>41</sup> Solche Verluste von *checkpoints* sind von anderen entarteten Zellen bekannt<sup>4</sup> und meistens am Übergang von der G1- in die S-Phase, wodurch die Zellen stärker auf die anderen *checkpoints* angewiesen sind, um ihre DNS intakt zu halten<sup>40</sup>. Somit entstehen durch Chk-Inhibitoren in FLT3-ITD-positiven Zellen wahrscheinlich vermehrt starke DNS-Schäden, die die Proliferation behindern.<sup>40</sup> Für die FLT3-WT-Zellen THP-1 konnte in der aktuellen Literatur kein Anhalt für eine Vulnerabilität gegenüber Chk-Inhibitoren gefunden werden.

Die Wirkung der ULK1/2-Inhibitoren auf die Autophagie der behandelten AML-Zellen, ist derzeit noch umstritten. Die Signalwege betrachtend wäre eine Autophagie-Hemmung zu erwarten und auch in den meisten Arbeiten zeigte sich eine Reduktion der durch diverse Chemotherapeutika oder Nährstoff-Entzug induzierten Autophagie bei Tumorzellen.<sup>76,77,123,126</sup> Beispielsweise MRT67307 und MRT68921 sind effektive ULK1/2-Inhibitoren und hemmen durch Nährstoff-Entzug induzierte Autophagie in murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs).<sup>77</sup>

Allerdings gibt es wenig Erkenntnisse über die alleinige Wirkung von ULK1/2-Inhibitoren auf die basale Autophagie. Petherick *et al.* detektierten in MEFs nach Behandlung mit MRT67307 und MRT68921 minimal vermehrt LC3-II, was erst bei Nährstoff-Entzug Signifikanz aufwies.<sup>77</sup> Zudem weisen viele entartete Zellen auch eine abnorme Autophagie-Regulation auf.<sup>51,125</sup> Bei Hwang *et al.* folgte der Behandlung mit ULK1/2-Inhibitoren eine erhöhte LC3B-Konversion sowie mehr LC3-*Puncta* in der konfokalen Mikroskopie,<sup>125</sup> was beides die Bildung von Autophagosomen impliziert.<sup>106</sup> Währenddessen akkumulierte der Autophagie-Surrogatmarker p62,<sup>125</sup> was für eine Blockade in der Degradierung der Autophagosomen spricht.<sup>106</sup> Gleiches wurde auch bei MRT67307 und MRT68921 beobachtet.<sup>77</sup> Es wurde also sowohl Autophagie induziert als auch im späten Stadium gehemmt. Die Arbeitsgruppe vermutete hinter der Induktion eine protektive Funktion, da durch Zugabe des Autophagie-Inhibitors 3-MA die Apoptose-Rate anstieg.<sup>125</sup>

*Off targets* können auch zu widersprüchlichen Ergebnissen führen. Durch die Inhibition der Aurora A-Kinase kommt es bei einer niedrigen Dosis zur Autophagie-Induktion.<sup>79</sup> Höher dosiert überwiegt die ULK1/2-Inhibition und die Autophagie wird gehemmt.<sup>79</sup>

Die in dieser Arbeit getesteten ULK1/2-Inhibitoren MRT 68921, MRT 67307 und PF-03814735 hemmen durch AC220 induzierte Autophagie. Für MRT 68921 und MRT 67307 wurde die Möglichkeit der Autophagie-Hemmung durch *off targets* wie AMPK und TBK1 durch das Einbringen eines resistenten ULK1 in MEFs, was die durch die Inhibitoren reduzierte Fähigkeit zur Autophagie wiederherstellte, ausgeschlossen.<sup>77</sup>

Insgesamt sprechen die Daten für eine spezifische Autophagie-Inhibition als Wirkungsmechanismus der verwendeten ULK1/2-Inhibitoren.

## 4.6 Bedeutung der ULKs

Aufgrund der hochpotenten Beeinträchtigung von AML-Zellen durch spezifische ULK1/2-Inhibitoren wurde erwartet, dass auch ein genetischer ULK1/2-*Knockout* negative Folgen für die Zellen haben würde. Der ursprünglich geplante Doppel-*Knockout* von ULK1 und ULK2 gelang in dieser Arbeit aufgrund mangelnder Spezifität der gRNS für ULK2 nicht, weshalb nur Aussagen über den alleinigen ULK1-K. o.-Phänotyp getroffen werden können.

Es konnte weder eine Beeinträchtigung der Autophagie noch ein Proliferationsnachteil entdeckt werden. Selbst bei Kultivierung in Aminosäuren-reduzierten Nährmedium vermehrten sich die ULK1-K. o.-Zellen mindestens genauso schnell wie die Kontroll-Zelllinie.

Es gibt fünf Atg1-homologe Proteine in Säugetieren: ULK1-4 und STK36. ULK1 und ULK2 sind sich in ihrer Kinase-Domäne am ähnlichsten<sup>55,79,127</sup> und in einigen Zelltypen funktionell redundant<sup>55,130</sup>, wofür auch die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen. Allerdings weist der aktuelle Stand der Forschung einige Kontroversen auf.

ULK1-3 sind an der Autophagie beteiligt, aber nur ULK1 und ULK2 scheinen essenziell für die Initiation bei Energiemangel zu sein.<sup>131-133</sup> Sowohl ULK1 als auch ULK2 werden von mTORC1 inhibiert und beide aktivieren über die Phosphorylierung von ATG13, FIP200<sup>132,133</sup> und Beclin-1 den PI3K III-Komplex<sup>76</sup> im kanonischen Weg der Autophagie.<sup>54,75</sup> Die Affinität für diese Substrate ist bei ULK1 geringfügig höher als bei ULK2.<sup>133</sup> Auch die inaktivierende Phosphorylierung der MAPK als negatives Feedback wird von beiden geleistet.<sup>62</sup>

Bei MEFs reduzierten sowohl ein ULK1-K. o. als auch ein ULK2-Knockdown das Aufkommen von Autophagosomen infolge einer Rapamycin-Behandlung<sup>133</sup> sowie die p62-Degradierung, die hier als Surrogatmarker für die Autophagie diente.<sup>106</sup>

Einzelne ULK1/ULK2-*Knockdowns* führten bei HeLa-Zellen jeweils zu circa gleichermaßen weniger Autophagosomen in der konfokalen Mikroskopie.<sup>106,133</sup> Bei ULK1/2-Doppel-K. o. konnte in dieser Zelllinie gar kein LC3B-II mehr detektiert werden, während der Autophagie-Marker p62 akkumulierte<sup>106,134</sup>, was wiederholt die zusätzliche Funktion von ULK1/2 im späteren Stadium der Autophagie zeigte.<sup>77,125</sup>

In den Zelllinien MV4-11 und MOLM-14 zeigte der ULK1-K. o. weder unter normalen Wachstumsbedingungen noch bei Autophagie-Induktion mit AC220 oder Nährstoff-Entzug Veränderungen in der Konversion von LC3B, was ebenfalls für die Redundanz spricht.

Ausnahmen existieren bei HEK293-Zellen, deren ULK2 keine vergleichbare Funktion besitzt<sup>135</sup> oder der B-Zelllinie DT40, die wiederum selbst bei ULK1/2-Doppel-K. o keine Beeinträchtigung der Autophagie zeigt.<sup>136</sup>

Bei Mäusen beeinträchtigt alleinige ULK1- oder ULK2-Defizienz weder das Überleben noch die Fertilität.<sup>131,137</sup> Autophagie ist möglich, allerdings mit einer verspäteten Mitophagie in Retikulozyten.<sup>131</sup> Im Vergleich hierzu sind ATG5- oder ATG7-K. o.-Mäuse nicht mehr zu Autophagie befähigt.<sup>131</sup> ULK1/2-Doppel-K. o.-Mäuse sterben neonatal<sup>64</sup> bzw. kurz nach der Geburt.<sup>134</sup>

Fest steht, dass sowohl ULK1 als auch ULK2 Autophagie induzieren können. Ob für das volle Potenzial beide funktionieren müssen, scheint abhängig von der Zelllinie und den experimentellen Gegebenheiten zu sein.<sup>55</sup>

Autophagie ist generell ein sehr dynamischer Prozess, der hauptsächlich durch schnelle und reversible posttranslationale Modifikationen den aktuellen Bedürfnissen der Zelle angepasst wird.<sup>58</sup> Als direktes Zielmolekül der Proteinkinasen AMPK und mTORC1<sup>59</sup>, die je nach Verfügbarkeit von Energie, Nährstoffen etc. aktivierende bzw. inhibierende Stellen phosphorylieren, nimmt ULK1/2 die Rolle einer Schaltstelle zwischen Autophagie-Initiation bzw. -Reduktion ein.<sup>56,58,59,138</sup>

*Fine tuning* findet durch die PKC $\alpha$  statt, die bei Verfügbarkeit von Nährstoffen aktiv ist, ULK1 phosphoryliert und hierdurch die Fusion von Autophagosom und Lysosom vermindert.<sup>134</sup> Somit hat ULK1 eine duale Funktion für die Autophagie sowohl zu Beginn als auch im späten Stadium,<sup>134</sup> was die bei Hwang *et al.* gleichzeitige Autophagie-Induktion sowie -Hemmung im späten Stadium durch ULK1/2-Inhibitoren<sup>77,125</sup> zumindest teilweise erklären kann. Außerdem leitet ULK1/2 die Degradierung von Stress-Granula auch ohne Autophagie ein.<sup>134</sup>

Auch umstritten ist die generelle Notwendigkeit von ULK1/2 für das Ablaufen der Autophagie.<sup>76</sup> ULK1/2 ist nötig für die Induktion infolge von Aminosäuren-Mangel, aber nicht bei Glukose-Mangel bzw. inhibiertem Glukose-Stoffwechsel.<sup>60</sup> Diese ULK-unabhängige Autophagie-Induktion bei Nährstoffmangel erfolgt via AMPK-DAPK-Beclin-1.<sup>65</sup> Auch die Stimulation durch Ammoniak kann ULK1/2-unabhängig erfolgen.<sup>64</sup>

Zuletzt stellt sich zum wiederholten Mal die Frage, ob die Hemmung der Autophagie - nun durch ULK1/2-Inhibitoren - die Viabilität bzw. Proliferation von malignen Zellen verringern kann. Ziemlich sicher ist eine Beeinträchtigung der durch spezifische Wirkstoffe wie mTORC1-Inhibitoren<sup>76,119</sup>, Daunorubicin<sup>123</sup> oder AC220<sup>50</sup> induzierten Autophagie durch ULK1/2-Inhibitoren.

Zusammenfassend bleibt die Proteinkinase ULK1/2 trotz aller offenen Fragen eine vielversprechende Zielstruktur für die Entwicklung neuer Medikamente gegen Leukämien, bei der die Existenz von redundanten Formen bedacht werden muss.<sup>125</sup>



## 4.7 Ausblick

Ein Hauptziel in der Entwicklung neuer Therapien der AML sollte die Identifizierung von Angriffspunkten sein, über welche so selektiv wie möglich und mit hoher Potenz maligne Zellen geschädigt werden können.<sup>128,139</sup> *Ex vivo*-Testung auf Resistenzen bzw. Ansprechen auf TKI, würde den Zeitverzug bis zur geeigneten Therapie verkürzen.<sup>112</sup> Bei 30 % der AML mit WT-FLT3 ist AC220 auch wirksam<sup>140</sup>, wofür ein prädiktiver Biomarker vor Therapie-Beginn wünschenswert wäre.<sup>140</sup> Für das Konzept der individualisierten Therapie wäre die Bestimmung der Expression von Autophagie-Genen aussichtsreich, um eine gezielte, risikoadaptierte Behandlung einzuleiten.<sup>139,141</sup>

Die Autophagie-Inhibition ist eine vielversprechende Strategie für die Behandlung der FLT3-ITD<sup>+</sup>-AML, könnte sich aber auch für andere Subtypen bewähren. Vermutlich wird die Heterogenität dieser Krankheit eine *one fits all*-Therapie verhindern und die Kombination aus mehreren Chemotherapeutika weiterhin nötig machen. Erfolgsversprechend ist der Synergismus der Autophagie-Hemmung mit FLT3-Inhibitoren wie AC220.

Für den maximalen Benefit der FLT3-Inhibition ist eine anhaltende und vollständige Suppression der Kinase-Aktivität nötig.<sup>45</sup> Hierfür ist AC220 aufgrund seiner hohen Selektivität, Potenz und günstigen Pharmakokinetik aktuell am besten geeignet.<sup>45</sup> Man muss beachten, dass Potenz und Selektivität je nach verwendetem Modell unterschiedlich sein können.<sup>45</sup> Von den FLT3-Inhibitoren weist Sunitinib die stärkste FLT3-Affinität auf.<sup>45</sup> Der potenteste Inhibitor *in vivo* ist aber Quizartinib (AC220).<sup>45</sup> Sunitinib ist - wahrscheinlich aufgrund seiner *off targets* - achtmal potenter bei MV4-11.<sup>45</sup> Auch bei ULK1/2-Inhibitoren geht hohe Selektivität für ULK1/2 nicht automatisch mit hoher Potenz einher. Daher ist eine sorgfältige Erprobung nötig und *off target*-Effekte nicht zwangsläufig als negativ einzustufen. Es wird sich zeigen, ob die spezifische Inhibition eines Zielmoleküls oder eine eher breite Strategie erfolgsbringend sein wird.

## 5 Zusammenfassung

Aktivierende Mutationen der *Fms-like tyrosine kinase* (FLT3) treten bei 25 % der Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) auf und begünstigen die unkontrollierte Proliferation maligner Blasten. Autophagie ist ein intrazellulärer Prozess, durch den zytoplasmatische Bestandteile lysosomal abgebaut werden und fungiert als intrazellulärer Homöostase-Mechanismus unter Stress-Bedingungen.

Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob FLT3-ITD<sup>+</sup>-AML-Zellen vulnerabel gegenüber Autophagie-Hemmung sind.

Hierzu wurde zunächst untersucht, wie sich FLT3-ITD-Signaling und Autophagie unter basalen Wachstumsbedingungen gegenseitig beeinflussen. In einem genetischen Modell zeigte sich, dass FLT3-ITD-transformierte wachstumsfaktorunabhängige Zellen während ihrer fortgesetzten Proliferation vermehrt Autophagie betreiben. Lysosomale Autophagie-Inhibitoren zeigten jedoch unter diesen Bedingungen keine erhöhte Wirksamkeit gegenüber FLT3-ITD-positiven Zellen. Humane FLT3-ITD-positive AML-Zellen zeigten nach genetischer Deletion von ULK1 ebenfalls nur transiente und milde Proliferationsdefizite. Unter basalen Wachstumsbedingungen zeigte sich also keine erhöhte Vulnerabilität FLT3-ITD-exprimierender Zellen gegenüber Autophagie-Inhibition.

Daraufhin wurde die Bedeutung von Autophagie während pharmakologischer Hemmung von FLT3 untersucht. FLT3-Inhibition mittels AC220, einem FLT3-spezifischer Tyrosinkinase-Inhibitor, induzierte bzw. steigerte die autophagische Aktivität ähnlich stark wie eine direkte mTOR-Inhibition. Dies ließ sich im Zellmodell therapeutisch ausnutzen: eine Kombinationsbehandlung mit AC220 und einem lysosomalen Autophagie-Inhibitor zeigte eine synergistische antiproliferative Wirkung. Dies stellt möglicherweise einen neuen rationalen Kombinationsbehandlungsansatz für die Therapie FLT3-ITD-positiver AML-Patienten dar.

## 6 Summary

*Mutations of Fms-like tyrosine kinase (FLT3) account for 25 % of cases of acute myeloid leukemia (AML) and lead to uncontrolled proliferation of malignant blasts. AML patients are often unfit to receive intensive chemotherapy needed to convalesce. When diagnosing AML testing for mutations such as the most frequent FLT3-internal tandem duplication (FLT3-ITD) is routine. It disrupts the autoinhibitory domain resulting in constitutive activation of the receptor itself, upregulation of MAPK and PI3K/AKT pathway and aberrant activation of STAT5. Besides a poor prognosis FLT3-ITD-AML provides pharmacologic opportunities like FLT3 inhibitors and/or inhibition of autophagy which describes a degradative process that recycles dispensable bulk to useable substrates in situations of stress such as nutrient deprivation or exposition to toxic agents as chemotherapeutics to maintain viability.*

*This thesis aims at elucidating whether FLT3-ITD<sup>+</sup> AML provides a vulnerability to the inhibition of autophagy. Using a genetic model, the impact of FLT3-ITD on the autophagic flux and the response to lysosomal inhibitors was characterized. Furthermore, the relevance of the protein kinase ULK1 was investigated by generating a genetic knockout as well as testing ULK1/2-inhibitors on AML-cells.*

*FLT3-ITD-signaling turned out to be influenced by the autophagic dynamics and vice versa. Suppression of autophagy by lysosomal inhibitors, Chloroquine and Bafilomycin A1, reduced the proportion of phosphorylated, thus activated, FLT3 as well as AKT, downstream of FLT3-ITD. In turn, specific inhibition of FLT3 by AC220 increased the autophagic flux, determined on the decreased GFP/mCherry ratio measured by flow cytometry. As autophagy presents a dynamic process that is rapidly adapting to changes within the cellular metabolism these interactions seem to be crosstalk between main pathways to maintain homeostasis. Transformation with FLT3-ITD confers growth factor independent proliferation to the murine myeloblasts 32D. Upon deprivation of the cytokine mIL-3 32D<sup>FLT3-ITD</sup> displayed increased autophagy, providing a rationale for inhibiting autophagy to impair FLT3-*

*ITD-mediated proliferation. However, although 32D<sup>FLT3-ITD</sup> were more effectively restrained from degrading autophagosomes following treatment with lysosomal inhibitors, Chloroquine and its derivatives Lys05 and ROC-325 diminished the proliferation of 32D<sup>FLT3-ITD</sup> no more than 32D<sup>ctrl</sup>. Neither the additional deprivation of mIL-3 augmented the potency. Nevertheless, malignancies often reveal their dependency to autophagy once they are exposed to severe stress conditions like cytotoxic substances and to date not a single compound was found to be effective alone against AML.*

*Given the fact of ULK1/2 being de- or activated through phosphorylation by mTORC1 during abundance of nutrients or by AMPK because of starvation, this protein kinase takes on a pivotal role in the regulation of autophagy. Activating phosphorylation of ATG13, FIP200 and Beclin-1 by ULK1/2 is necessary for the initiation of building an autophagosome in the canonical way. Thus, ULK1/2 offers a promising target for small molecules aiming at the inhibition of autophagy. Several highly selective ULK1/2-inhibitors turned out to potently impair proliferation of AML-cells harboring FLT3-ITD while those with WT-FLT3 were less vulnerable. In order to relate this observation to the specific inhibition of ULK1/2 the Aurora kinase A-inhibitor Alisertib was implemented to rule out this major off target. Indeed, this inhibitor without affinity for ULK1/2 displayed no greater impact on FLT3-ITD<sup>+</sup> cells. However, a CRISPR/Cas-mediated genetic knockout of ULK1 neither impaired the proliferation nor the ability of autophagy, underlining the widely observed redundancy of ULK1 and ULK2 in many different mammalian cells. Lastly the FLT3-inhibitor AC220 was proven to be highly selective for FLT3 and to induce autophagy in FLT3-expressing cells. Finally, AC220 synergized with chloroquine to impair preferably FLT3-ITD<sup>+</sup> cells' viability.*

*Therefore, simultaneous induction and inhibition of autophagy provides a novel strategy for treating AML. The compounds still have to be optimized to specifically target malignant blasts while sparing normal hematopoietic cells.*

## 7 Literaturverzeichnis

1. Herold G, ed. *Innere Medizin 2018: Eine vorlesungsorientierte Darstellung: unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung : mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis*. Köln: Gerd Herold; 2018.
2. 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.
3. 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.
4. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2015;373(12):1136-1152. doi:10.1056/NEJMra1406184.
5. Heuser M, Ofran Y, Boissel N, et al. Acute myeloid leukaemia in adult patients: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2020;31(6):697-712. doi:10.1016/j.annonc.2020.02.018.
6. 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.
7. Braess J, Amler S, Kreuzer K-A, et al. Sequential high-dose cytarabine and mitoxantrone (S-HAM) versus standard double induction in acute myeloid leukemia—a phase 3 study. *Leukemia*. 2018;32(12):2558. doi:10.1038/s41375-018-0268-9.
8. Ferrara F, Barosi G, Venditti A, et al. Consensus-based definition of unfit to intensive and non-intensive chemotherapy in acute myeloid leukemia: a project of SIE, SIES and GITMO group on a new tool for therapy decision making. *Leukemia*. 2013;27(5):997-999. doi:10.1038/leu.2012.303.

9. Agnes F, Shamon B, Dina C, Rosnet O, Birnbaum D, Galibert F. Genomic structure of the downstream part of the human FLT3 gene: exon/intron structure conservation among genes encoding receptor tyrosine kinases (RTK) of subclass III. *Gene*. 1994;145(2):283-288.
10. 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.
11. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell*. 2010;141(7):1117-1134. doi:10.1016/j.cell.2010.06.011.
12. Rosnet O, Schiff C, Pebusque MJ, et al. Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells. *Blood*. 1993;82(4):1110-1119.
13. Deutzmann R. Rezeptortyrosinkinasen. In: Rassow J, Hauser K, Deutzmann R, Netzker R, eds. *Duale Reihe Biochemie*. 4. Auflage. Georg Thieme Verlag; 2016.
14. Margolis B, Li N, Koch A, et al. The tyrosine phosphorylated carboxyterminus of the EGF receptor is a binding site for GAP and PLC-gamma. *EMBO J*. 1990;9(13):4375-4380.
15. Griffith J, Black J, Faerman C, et al. The Structural Basis for Autoinhibition of FLT3 by the Juxtamembrane Domain. *Molecular Cell*. 2004;13(2):169-178. doi:10.1016/S1097-2765(03)00505-7.
16. Kikushige Y, Yoshimoto G, Miyamoto T, et al. Human Flt3 Is Expressed at the Hematopoietic Stem Cell and the Granulocyte/Macrophage Progenitor Stages to Maintain Cell Survival. *The Journal of Immunology*. 2008;180(11):7358-7367. doi:10.4049/jimmunol.180.11.7358.
17. Adolfsson J, Mansson 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.

18. Hannum C, Culpepper J, Campbell D, et al. Ligand for FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase regulates growth of haematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs. *Nature*. 1994;368(6472):643. doi:10.1038/368643a0.
19. Lyman SD, Jacobsen SEW. c-kit Ligand and Flt3 Ligand: Stem/Progenitor Cell Factors With Overlapping Yet Distinct Activities. *Blood*. 1998;91(4):1101-1134. <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/91/4/1101.full.pdf>.
20. Parcels BW, Ikeda AK, Simms-Waldrip 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.
21. Zhang S, Broxmeyer HE. Flt3 ligand induces tyrosine phosphorylation of gab1 and gab2 and their association with shp-2, grb2, and PI3 kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000;277(1):195-199. doi:10.1006/bbrc.2000.3662.
22. Burotto M, Chiou VL, Lee J-M, Kohn EC. The MAPK pathway across different malignancies: A new perspective. *Cancer*. 2014;120(22):3446-3456. doi:10.1002/cncr.28864.
23. Deutzmann R. Hormone. In: Rassow J, Hauser K, Deutzmann R, Netzker R, eds. *Duale Reihe Biochemie*. 4. Auflage. Georg Thieme Verlag; 2016.
24. Basit F, Andersson M, Hultquist A. The Myc/Max/Mxd Network Is a Target of Mutated Flt3 Signaling in Hematopoietic Stem Cells in Flt3-ITD-Induced Myeloproliferative Disease. *Stem Cells Int*. 2018;2018:3286949. doi:10.1155/2018/3286949.
25. Ebihara Y, Tsuji K, Lyman SD, et al. Synergistic action of Flt3 and gp130 signalings in human hematopoiesis. *Blood*. 1997;90(11):4363-4368.
26. Metcalf D. Hematopoietic cytokines. *Blood*. 2008;111(2):485-491. doi:10.1182/blood-2007-03-079681.

27. Wodnar-Filipowicz A. Flt3 ligand: role in control of hematopoietic and immune functions of the bone marrow. *News Physiol Sci*. 2003;18:247-251.
28. 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.
29. 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: Presented in part at the 42nd annual meeting of the American Society of Hematology, December 1-5, 2000, San Francisco, CA (abstract 3569). *Blood*. 2002;100(1):59-66. doi:10.1182/blood.V100.1.59.
30. Kayser S, Schlenk RF, Londono MC, et al. Insertion of FLT3 internal tandem duplication in the tyrosine kinase domain-1 is associated with resistance to chemotherapy and inferior outcome. *Blood*. 2009;114(12):2386-2392. doi:10.1182/blood-2009-03-209999.
31. 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.
32. Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Care RS, Peake IR, Reilly JT. Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*. 2001;113(4):983-988.
33. Fenski, Flesch, Serve, et al. Constitutive activation of FLT3 in acute myeloid leukaemia and its consequences for growth of 32D cells. *British Journal of Haematology*. 2000;108(2):322-330. doi:10.1046/j.1365-2141.2000.01831.x.
34. Quentmeier H, Reinhardt J, Zaborski M, Drexler HG. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia cell lines. *Leukemia*. 2003;17(1):120. doi:10.1038/sj.leu.2402740.



35. Hayakawa F, Towatari M, Kiyoi H, et al. Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. *Oncogene*. 2000;19(5):624-631. doi:10.1038/sj.onc.1203354.
36. Mui AL, Wakao H, Kinoshita T, Kitamura T, Miyajima A. Suppression of interleukin-3-induced gene expression by a C-terminal truncated Stat5: role of Stat5 in proliferation. *EMBO J*. 1996;15(10):2425-2433.
37. Perkins GR, Marshall CJ, Collins MK. The role of MAP kinase kinase in interleukin-3 stimulation of proliferation. *Blood*. 1996;87(9):3669-3675.
38. Mizuki M, Fenski R, Halfter H, et al. Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. *Blood*. 2000;96(12):3907-3914.  
<http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/96/12/3907.full.pdf>.
39. Li L, Piloto O, Kim K-T, et al. FLT3/ITD expression increases expansion, survival and entry into cell cycle of human haematopoietic stem/progenitor cells. *British Journal of Haematology*. 2007;137(1):64-75. doi:10.1111/j.1365-2141.2007.06525.x.
40. Zabludoff SD, Deng C, Grondine MR, et al. AZD7762, a novel checkpoint kinase inhibitor, drives checkpoint abrogation and potentiates DNA-targeted therapies. *Mol Cancer Ther*. 2008;7(9):2955-2966. doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-0492.
41. Peschel I, Podmirseg SR, Taschler M, et al. FLT3 and FLT3-ITD phosphorylate and inactivate the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 in acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2017;102(8):1378-1389. doi:10.3324/haematol.2016.160101.
42. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, et al. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood*. 2001;98(6):1752-1759. doi:10.1182/blood.V98.6.1752.

43. Daver N, Schlenk RF, Russell NH, Levis MJ. Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence. *Leukemia*. 2019;33(2):299. doi:10.1038/s41375-018-0357-9.
44. Stone RM, Dohner H, Ehninger G, et al. CALGB 10603 (RATIFY): A randomized phase III study of induction (daunorubicin/cytarabine) and consolidation (high-dose cytarabine) chemotherapy combined with midostaurin or placebo in treatment-naive patients with FLT3 mutated AML. *JCO*. 2011;29(15\_suppl):TPS199-TPS199. doi:10.1200/jco.2011.29.15\_suppl.tps199.
45. Zarrinkar PP, Gunawardane RN, Cramer MD, et al. AC220 is a uniquely potent and selective inhibitor of FLT3 for the treatment of acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2009;114(14):2984-2992. doi:10.1182/blood-2009-05-222034.
46. Cortes JE, Khaled S, Martinelli G, et al. Quizartinib versus salvage chemotherapy in relapsed or refractory FLT3-ITD acute myeloid leukaemia (QuANTUM-R): a multicentre, randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2019;20(7):984-997. doi:10.1016/S1470-2045(19)30150-0.
47. Wu M, Li C, Zhu X. FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol*. 2018;11. doi:10.1186/s13045-018-0675-4.
48. Wander SA, Levis MJ, Fathi AT. The evolving role of FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia: quizartinib and beyond. *Ther Adv Hematol*. 2014;5(3):65-77. doi:10.1177/2040620714532123.
49. Larrosa-Garcia M, Baer MR. FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia: Current status and future directions. *Mol Cancer Ther*. 2017;16(6):991-1001. doi:10.1158/1535-7163.MCT-16-0876.
50. Ouchida AT, Li Y, Geng J, et al. Synergistic effect of a novel autophagy inhibitor and Quizartinib enhances cancer cell death. *Cell Death Dis*. 2018;9(2). doi:10.1038/s41419-017-0170-9.

51. Boya P, Reggiori F, Codogno P. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nature Cell Biology*. 2013;15(7):713. doi:10.1038/ncb2788.
52. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 2008;132(1):27-42. doi:10.1016/j.cell.2007.12.018.
53. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. 2008;451(7182):1069. doi:10.1038/nature06639.
54. Codogno P, Mehrpour M, Proikas-Cezanne T. Canonical and non-canonical autophagy: variations on a common theme of self-eating? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2012;13(1):7. doi:10.1038/nrm3249.
55. Lee E-J, Tournier C. The requirement of uncoordinated 51-like kinase 1 (ULK1) and ULK2 in the regulation of autophagy. *Autophagy*. 2011;7(7):689-695. doi:10.4161/auto.7.7.15450.
56. Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011;27:107-132. doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154005.
57. Longatti A, Tooze SA. Vesicular trafficking and autophagosome formation. *Cell Death and Differentiation*. 2009;16(7):956. doi:10.1038/cdd.2009.39.
58. Alers S, Löffler AS, Wesselborg S, Stork B. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the Regulation of Autophagy: Cross Talk, Shortcuts, and Feedbacks. *Mol Cell Biol*. 2012;32(1):2-11. doi:10.1128/MCB.06159-11.
59. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan K-L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature Cell Biology*. 2011;13(2):132-141. doi:10.1038/ncb2152.
60. McAlpine F, Williamson LE, Tooze SA, Chan EY. Regulation of nutrient-sensitive autophagy by uncoordinated 51-like kinases 1 and 2. *Autophagy*. 2013;9(3):361-373. doi:10.4161/auto.23066.

61. Mathew R, White E. Autophagy in Tumorigenesis and Energy Metabolism: Friend by Day, Foe by Night. *Curr Opin Genet Dev.* 2011;21(1):113-119. doi:10.1016/j.gde.2010.12.008.
62. Löffler AS, Alers S, Dieterle AM, et al. Ulk1-mediated phosphorylation of AMPK constitutes a negative regulatory feedback loop. *Autophagy.* 2011;7(7):696-706. doi:10.4161/auto.7.7.15451.
63. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in Mammalian Autophagy Research. *Cell.* 2010;140(3):313-326. doi:10.1016/j.cell.2010.01.028.
64. Cheong H, Lindsten T, Wu J, Lu C, Thompson CB. Ammonia-induced autophagy is independent of ULK1/ULK2 kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(27):11121-11126. doi:10.1073/pnas.1107969108.
65. Shiloh R, Gilad Y, Ber Y, et al. Non-canonical activation of DAPK2 by AMPK constitutes a new pathway linking metabolic stress to autophagy. *Nat Commun.* 2018;9(1):1759. doi:10.1038/s41467-018-03907-4.
66. Sui X, Chen R, Wang Z, et al. Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death Dis.* 2013;4(10):e838-. doi:10.1038/cddis.2013.350.
67. Thorburn A, Thamm DH, Gustafson DL. Autophagy and Cancer Therapy. *Mol Pharmacol.* 2014;85(6):830-838. doi:10.1124/mol.114.091850.
68. Rubinsztein DC, Codogno P, Levine B. Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2012;11(9):709. doi:10.1038/nrd3802.
69. Li J-L, Han S-L, Fan X. Modulating autophagy: a strategy for cancer therapy. *Chin J Cancer.* 2011;30(10):655-668. doi:10.5732/cjc.011.10185.
70. Katayama M, Kawaguchi T, Berger MS, Pieper RO. DNA damaging agent-induced autophagy produces a cytoprotective adenosine triphosphate surge in malignant

- glioma cells. *Cell Death and Differentiation*. 2007;14(3):548.  
doi:10.1038/sj.cdd.4402030.
71. Liu L, Yang M, Kang R, et al. DAMP-mediated autophagy contributes to drug resistance. *Autophagy*. 2011;7(1):112-114. doi:10.4161/auto.7.1.14005.
72. Torgersen ML, Engedal N, Bøe S-O, Hokland P, Simonsen A. Targeting autophagy potentiates the apoptotic effect of histone deacetylase inhibitors in t(8;21) AML cells. *Blood*. 2013;122(14):2467-2476. doi:10.1182/blood-2013-05-500629.
73. O'Neill PM, Bray PG, Hawley SR, Ward SA, Park B. 4-Aminoquinolines—Past, present, and future; A chemical perspective. *Pharmacology & Therapeutics*. 1998;77(1):29-58. doi:10.1016/S0163-7258(97)00084-3.
74. Alers S, Löffler AS, Wesselborg S, Stork B. The incredible ULKs. *Cell Commun Signal*. 2012;10(1):1-14. doi:10.1186/1478-811X-10-7.
75. Wang B, Kundu M. Canonical and Noncanonical Functions of ULK/Atg1. *Curr Opin Cell Biol*. 2017;45:47-54. doi:10.1016/j.ceb.2017.02.011.
76. Egan DF, Chun MG, Vamos M, et al. Small molecule inhibition of the autophagy kinase ULK1 and identification of ULK1 substrates. *Mol Cell*. 2015;59(2):285-297. doi:10.1016/j.molcel.2015.05.031.
77. Petherick KJ, Conway OJL, Mpamhanga C, et al. Pharmacological inhibition of ULK1 kinase blocks mammalian target of rapamycin (mTOR)-dependent autophagy. *Journal of Biological Chemistry*. 2015;290(18):11376-11383. doi:10.1074/jbc.C114.627778.
78. Kaizuka T, Morishita H, Hama Y, et al. An Autophagic Flux Probe that Releases an Internal Control. *Molecular Cell*. 2016;64(4):835-849. doi:10.1016/j.molcel.2016.09.037.
79. Chaikuad A, Koschade SE, Stolz A, et al. Conservation of structure, function and inhibitor binding in UNC-51-like kinase 1 and 2 (ULK1/2). *Biochem J*. 2019;476(5):875-887. doi:10.1042/BCJ20190038.

80. Bonam SR, Wang F, Muller S. Lysosomes as a therapeutic target. *Nat Rev Drug Discov*. 2019;18(12):923-948. doi:10.1038/s41573-019-0036-1.
81. McAfee Q, Zhang Z, Samanta A, et al. Autophagy inhibitor Lys05 has single-agent antitumor activity and reproduces the phenotype of a genetic autophagy deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(21):8253-8258. doi:10.1073/pnas.1118193109.
82. Jones TM, Espitia C, Wang W, Nawrocki ST, Carew JS. Moving beyond hydroxychloroquine: the novel lysosomal autophagy inhibitor ROC-325 shows significant potential in preclinical studies. *Cancer Commun (Lond)*. 2019;39(1):72. doi:10.1186/s40880-019-0418-0.
83. Thoreen CC, Kang SA, Chang JW, et al. An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *J Biol Chem*. 2009;284(12):8023-8032. doi:10.1074/jbc.M900301200.
84. Castillo K, Valenzuela V, Oñate M, Hetz C. A Molecular Reporter for Monitoring Autophagic Flux in Nervous System In Vivo. *Methods in Enzymology*. 2017;588:109-131. doi:10.1016/bs.mie.2016.09.077.
85. Hansen TE, Johansen T. Following autophagy step by step. *BMC Biology*. 2011;9(1):39. doi:10.1186/1741-7007-9-39.
86. Fraser J, Cabodevilla AG, Simpson J, Gammoh N. Interplay of autophagy, receptor tyrosine kinase signalling and endocytic trafficking. *Essays In Biochemistry*. 2017;61(6):597-607. doi:10.1042/EBC20170091.
87. Heydt Q, Larrue C, Saland E, et al. Oncogenic FLT3-ITD supports autophagy via ATF4 in acute myeloid leukemia. *Oncogene*. 2018;37(6):787-797. doi:10.1038/onc.2017.376.
88. B'chir W, Maurin A-C, Carraro V, et al. The eIF2 $\alpha$ /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(16):7683-7699. doi:10.1093/nar/gkt563.

89. Larrue C, Saland E, Boutzen H, et al. Proteasome inhibitors induce FLT3-ITD degradation through autophagy in AML cells. *Blood*. 2016;127(7):882-892. doi:10.1182/blood-2015-05-646497.
90. Yudushkin I. Control of Akt activity and substrate phosphorylation in cells. *IUBMB Life*. 2020;72(6):1115-1125. doi:10.1002/iub.2264.
91. Amaravadi RK, Lippincott-Schwartz J, Yin X-M, et al. Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. *Clin Cancer Res*. 2011;17(4):654-666. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2634.
92. White E. The role for autophagy in cancer. *J Clin Invest*. 2015;125(1):42-46. doi:10.1172/JCI73941.
93. Tasdemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, et al. Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nature Cell Biology*. 2008;10(6):676-687. doi:10.1038/ncb1730.
94. Feng Z, Hu W, Stanchina E de, et al. The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. *Cancer Res*. 2007;67(7):3043-3053. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4149.
95. Amaravadi RK, Yu D, Lum JJ, et al. Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *J Clin Invest*. 2007;117(2):326-336. doi:10.1172/JCI28833.
96. Bishop E, Bradshaw TD. Autophagy modulation: a prudent approach in cancer treatment? *Cancer Chemother Pharmacol*. 2018;82(6):913-922. doi:10.1007/s00280-018-3669-6.
97. Guo JY, Chen H-Y, Mathew R, et al. Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Dev*. 2011;25(5):460-470. doi:10.1101/gad.2016311.

98. Piya S, Kornblau SM, Ruvolo VR, et al. Atg7 suppression enhances chemotherapeutic agent sensitivity and overcomes stroma-mediated chemoresistance in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2016;128(9):1260-1269. doi:10.1182/blood-2016-01-692244.
99. Gomez-Puerto MC, Folkerts H, Wierenga ATJ, et al. Autophagy Proteins ATG5 and ATG7 Are Essential for the Maintenance of Human CD34(+) Hematopoietic Stem-Progenitor Cells. *STEM CELLS*. 2016;34(6):1651-1663. doi:10.1002/stem.2347.
100. 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/nm0797-730.
101. Sumitomo Y, Koya J, Nakazaki K, et al. Cytoprotective autophagy maintains leukemia-initiating cells in murine myeloid leukemia. *Blood*. 2016;128(12):1614-1624. doi:10.1182/blood-2015-12-684696.
102. Folkerts H, Hilgendorf S, Wierenga ATJ, et al. Inhibition of autophagy as a treatment strategy for p53 wild-type acute myeloid leukemia. *Cell Death Dis*. 2017;8(7):e2927. doi:10.1038/cddis.2017.317.
103. Bagger FO, Sasivarevic D, Sohi SH, et al. BloodSpot: a database of gene expression profiles and transcriptional programs for healthy and malignant haematopoiesis. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(D1):D917-24. doi:10.1093/nar/gkv1101.
104. Sehgal AR, Konig H, Johnson DE, et al. You eat what you are: autophagy inhibition as a therapeutic strategy in leukemia. *Leukemia*. 2015;29(3):517-525. doi:10.1038/leu.2014.349.
105. Zjablovskaja P, Danek P, Kardosova M, Alberich-Jorda M. Proliferation and Differentiation of Murine Myeloid Precursor 32D/G-CSF-R Cells. *J Vis Exp*. 2018;(132). doi:10.3791/57033.
106. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*. 2016;12(1):1-222. doi:10.1080/15548627.2015.1100356.



107. Park S, Chapuis N, Tamburini J, et al. Role of the PI3K/AKT and mTOR signaling pathways in acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2010;95(5):819-828. doi:10.3324/haematol.2009.013797.
108. Munster T, Gibbs JP, Shen D, et al. Hydroxychloroquine concentration-response relationships in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2002;46(6):1460-1469. doi:10.1002/art.10307.
109. Nawrocki ST, Han Y, Visconte V, et al. The novel autophagy inhibitor ROC-325 augments the antileukemic activity of azacitidine. *Leukemia*. 2019;33(12):2971-2974. doi:10.1038/s41375-019-0529-2.
110. Illangeswaran RSS, Das S, Paul DZ, Mathews V, Balasubramanian P. A personalized approach to acute myeloid leukemia therapy: current options. *Pharmgenomics Pers Med*. 2019;12:167-179. doi:10.2147/PGPM.S168267.
111. Xuan L, Wang Y, Huang F, et al. Sorafenib maintenance in patients with FLT3-ITD acute myeloid leukaemia undergoing allogeneic haematopoietic stem-cell transplantation: an open-label, multicentre, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2020;21(9):1201-1212. doi:10.1016/S1470-2045(20)30455-1.
112. Staudt D, Murray HC, McLachlan T, et al. Targeting Oncogenic Signaling in Mutant FLT3 Acute Myeloid Leukemia: The Path to Least Resistance. *Int J Mol Sci*. 2018;19(10). doi:10.3390/ijms19103198.
113. Baker SD, Zimmerman EI, Wang Y-D, et al. Emergence of polyclonal FLT3 tyrosine kinase domain mutations during sequential therapy with sorafenib and sunitinib in FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*. 2013;19(20):5758-5768. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1323.
114. Estey E, Levine RL, Löwenberg B. Current challenges in clinical development of "targeted therapies": the case of acute myeloid leukemia. *Blood*. 2015;125(16):2461-2466. doi:10.1182/blood-2015-01-561373.

115. Tarver TC, Hill JE, Rahmat L, et al. Gilteritinib is a clinically active FLT3 inhibitor with broad activity against FLT3 kinase domain mutations. *Blood Adv.* 2020;4(3):514-524. doi:10.1182/bloodadvances.2019000919.
116. Short NJ, Kantarjian H, Ravandi F, Daver N. Emerging treatment paradigms with FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia. *Ther Adv Hematol.* 2019; 10:2040620719827310. doi:10.1177/2040620719827310.
117. Weisberg E, Liu Q, Nelson E, et al. Using combination therapy to override stromal-mediated chemoresistance in mutant FLT3-positive AML: synergism between FLT3 inhibitors, dasatinib/multi-targeted inhibitors and JAK inhibitors. *Leukemia.* 2012;26(10):2233-2244. doi:10.1038/leu.2012.96.
118. Carter JL, Hege K, Yang J, et al. Targeting multiple signaling pathways: the new approach to acute myeloid leukemia therapy. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5(1):288. doi:10.1038/s41392-020-00361-x.
119. Altman JK, Szilard A, Goussetis DJ, et al. Autophagy is a survival mechanism of acute myelogenous leukemia precursors during dual mTORC2/mTORC1 targeting. *Clin Cancer Res.* 2014;20(9):2400-2409. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-3218.
120. Sasaki K, Tsuno NH, Sunami E, et al. Chloroquine potentiates the anti-cancer effect of 5-fluorouracil on colon cancer cells. *BMC Cancer.* 2010; 10:370. doi:10.1186/1471-2407-10-370.
121. 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). doi:10.1371/journal.pone.0056473.
122. Weisberg E, Banerji L, Wright RD, et al. Potentiation of antileukemic therapies by the dual PI3K/PDK-1 inhibitor, BAG956: effects on BCR-ABL- and mutant FLT3-expressing cells. *Blood.* 2008;111(7):3723-3734. doi:10.1182/blood-2007-09-114454.

123. Qiu L, Zhou G, Cao S. Targeted inhibition of ULK1 enhances daunorubicin sensitivity in acute myeloid leukemia. *Life Sciences*. 2020;243:117234. doi:10.1016/j.lfs.2019.117234.
124. Solomon VR, Lee H. Chloroquine and its analogs: a new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. *European Journal of Pharmacology*. 2009;625(1-3):220-233. doi:10.1016/j.ejphar.2009.06.063.
125. Hwang DY, Eom J-I, Jang JE, et al. ULK1 inhibition as a targeted therapeutic strategy for FLT3-ITD-mutated acute myeloid leukemia. *J Exp Clin Cancer Res*. 2020;39(1):85. doi:10.1186/s13046-020-01580-4.
126. Martin KR, Celano SL, Solitro AR, et al. A Potent and Selective ULK1 Inhibitor Suppresses Autophagy and Sensitizes Cancer Cells to Nutrient Stress. *iScience*. 2018;8:74-84. doi:10.1016/j.isci.2018.09.012.
127. Lazarus MB, Novotny CJ, Shokat KM. Structure of the Human Autophagy Initiating Kinase ULK1 in Complex with Potent Inhibitors. *ACS Chem Biol*. 2014;10(1):257-261. doi:10.1021/cb500835z.
128. McArthur K, D'Cruz AA, Segal D, et al. Defining a therapeutic window for kinase inhibitors in leukemia to avoid neutropenia. *Oncotarget*. 2017;8(35):57948-57963. doi:10.18632/oncotarget.19678.
129. Li L, Piloto O, Kim K-T, et al. FLT3/ITD expression increases expansion, survival and entry into cell cycle of human haematopoietic stem/progenitor cells. *British Journal of Haematology*. 2007;137(1):64-75. doi:10.1111/j.1365-2141.2007.06525.x.
130. Joo JH, Wang B, Frankel E, et al. The Noncanonical Role of ULK/ATG1 in ER-to-Golgi Trafficking Is Essential for Cellular Homeostasis. *Mol Cell*. 2016;62(4):491-506. doi:10.1016/j.molcel.2016.04.020.
131. Kundu M, Lindsten T, Yang C-Y, et al. Ulk1 plays a critical role in the autophagic clearance of mitochondria and ribosomes during reticulocyte maturation. *Blood*. 2008;112(4):1493-1502. doi:10.1182/blood-2008-02-137398.

132. Chang Y-Y, Neufeld TP. An Atg1/Atg13 complex with multiple roles in TOR-mediated autophagy regulation. *Mol Biol Cell*. 2009;20(7):2004-2014. doi:10.1091/mbc.E08-12-1250.
133. Jung CH, Jun CB, Ro S-H, et al. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell*. 2009;20(7):1992-2003. doi:10.1091/mbc.E08-12-1249.
134. Wang C, Wang H, Zhang D, et al. Phosphorylation of ULK1 affects autophagosome fusion and links chaperone-mediated autophagy to macroautophagy. *Nat Commun*. 2018;9(1):3492. doi:10.1038/s41467-018-05449-1.
135. Chan EYW, Kir S, Tooze SA. siRNA screening of the kinome identifies ULK1 as a multidomain modulator of autophagy. *J Biol Chem*. 2007;282(35):25464-25474. doi:10.1074/jbc.M703663200.
136. Alers S, Löffler AS, Paasch F, et al. Atg13 and FIP200 act independently of Ulk1 and Ulk2 in autophagy induction. *Autophagy*. 2011;7(12):1423-1433. doi:10.4161/auto.7.12.18027.
137. Cheong H, Wu J, Gonzales LK, Guttentag SH, Thompson CB, Lindsten T. Analysis of a lung defect in autophagy-deficient mouse strains. *Autophagy*. 2014;10(1):45-56. doi:10.4161/auto.26505.
138. Codogno P, Meijer AJ. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ*. 2005;12 Suppl 2(2):1509-1518. doi:10.1038/sj.cdd.4401751.
139. Amaravadi RK, Thompson CB. The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. *Clin Cancer Res*. 2007;13(24):7271-7279. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1595.
140. Zhou F, Ge Z, Chen B. Quizartinib (AC220): a promising option for acute myeloid leukemia. *Drug Des Devel Ther*. 2019;13:1117-1125. doi:10.2147/DDDT.S198950.

141. Liang PQ, Miao M, Liu ZG, et al. Expression of autophagy genes in acute myeloid leukemia: associations with clinical characteristics and prognosis. *Neoplasma*. 2018;65(5):807-814. doi:10.4149/neo\_2018\_171028N691.

## 8 Danksagung

Mein Dank gilt der großartigen Arbeitsgruppe um meinen Doktorvater Prof. Dr. Christian Brandts und insbesondere ihm selbst. Für das Stellen dieser spannenden Fragestellung und die umfassende Expertise auf diesem Gebiet, sowie meine Annahme als Doktorandin und damit die Möglichkeit, ein Teil dieses Teams zu werden, bin ich höchst zu Dank verpflichtet.

Ebenso viel Dank gebührt Herrn Dr. Sebastian Koschade, der mir mit unermüdlicher Geduld jede einzelne Methode meiner Arbeit beigebracht hat und zu wirklich jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand. In frustranen Momenten als auch in anspruchsvollen und anstrengenden Zeiten konnte ich mich immer auf einen Rat und motivierende Worte verlassen und nehme viele meiner hierdurch erworbenen Fähigkeiten tagtäglich mit in meine jetzige Tätigkeit als Ärztin.

Eine weitere wichtige Kollegin und Freundin ist Lea Hermann, die mich nicht nur an langen Tagen vor dem Verhungertod gerettet hat, sondern auch jederzeit für Diskussionen und fachliche sowie mentale Unterstützung bereit stand. Lea ist eine unglaublich inspirierende Person und an Genialität und Hingabe für die Wissenschaft höchstens von Sebastian Koschade zu übertreffen. Mit großer Erwartung blicke ich in die Zukunft dieser beiden so besonderen Menschen.

Außerdem bedanken möchte ich mich bei Shabnam Shaid, Fatima Baker, Laura Meyer, Astrid Eichler, Marlyn Thölken, Olesya Vakhrusheva, The Duy Nguyen, Verena Stolp, Marcel Seibert und eigentlich aller Mitglieder der AG Brandts und AG Serve, die diese Zeit so besonders gemacht haben.

Zuletzt kommt ein großer Anteil meines Dankes meinen Freunden und meiner Familie zu, die mich während meiner gesamten Studienzeit ertragen haben.

## **9 Schriftliche Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel:

### **Untersuchungen zur Inhibition von Autophagie in**

#### **FLT3-ITD-mutierten AML-Zellen**

am Zentrum der Inneren Medizin, in der Klinik für Hämatologie und Onkologie unter Betreuung und Anleitung von Herrn Prof. Dr. Christian Brandts mit Unterstützung durch Dr. med. Sebastian Koschade ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Koschade SE, Klann K, Shaid S, Vick B, Stratmann JA, Thölken M, Meyer LM, Nguyen TD, Campe J, Moser LM, Hock S, Baker F, Meyer CT, Wempe F, Serve H, Ullrich E, Jeremias I, Münch C, Brandts CH. Translatome proteomics identifies autophagy as a resistance mechanism to on-target FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2022 Oct;36(10):2396-2407.

---

(Ort, Datum)

---

(Unterschrift)