

Dr. Jasmin Wellbrock  
Forschungspreis der Hamburger Krebsgesellschaft e.V. 2016  
Kurzfassung der Preisarbeit

***Expression of Hedgehog Pathway Mediator GLI Represents a Negative Prognostic Marker in Human Acute Myeloid Leukemia and Its Inhibition Exerts Antileukemic Effects***

Jasmin Wellbrock, Emily Latuske, Julian Köhler, Katharina Wagner, Hauke Stamm, Eik Vettorazzi, Gabi Vohwinkel, Marianne Klokow, Roswitha Kuhling-Thees, Patrick Ehm, Kristoffer Riecken, Sonja Loges, Felicitas Thol, Claudia Schubert, Michael Amling, Manfred Jücker, Carsten Bokemeyer, Michael Heuser, Jürgen Krauter and Walter Fiedler

Publiziert in *Clinical Cancer Research* 2015;21(10)

**Hintergrund**

Die akute myeloische Leukämie (AML) gehört zu den aggressivsten Leukämien des Erwachsenenalters. Das primäre Ansprechen der Patienten auf Chemotherapeutika ist zwar recht hoch, aber ein Großteil der Patienten erleidet einen Rückfall, welcher häufig tödlich endet. Als Ursache für die hohen Rückfallquoten gelten so genannte Leukämienstammzellen aufgrund ihrer hohen Resistenz gegenüber Chemotherapeutika. Die Leukämienstammzellen, welche als Reservoir für die Masse der Leukämiezellen dienen, residieren in einer speziellen Nische im Knochenmark, die sich aus verschiedenen Stromazellpopulationen zusammensetzt und den Leukämiezellen ein geschütztes Umfeld bietet. Hierbei spielt neben direkten zellulären Interaktionen der Leukämie- mit den Stromazellen auch der Austausch verschiedener löslicher Signalmediatoren eine entscheidende Rolle. Es ist bekannt, dass Signalwege, die für die Biologie gesunder Blutstammzellen in der Knochenmarksnische essentiell sind, auch für das Überleben von Leukämiezellen von Bedeutung sind. Einer dieser Signalwege ist der *Hedgehog*-Signalweg. Beim Menschen gibt es drei *Hedgehog*-Liganden: *Sonic Hedgehog* (SHH), *Desert Hedgehog* (DHH) und *Indian Hedgehog* (IHH). Die drei Liganden können an den Transmembranrezeptor *Patched-1* (PTCH1) binden, woraufhin dieser den Rezeptor *Smoothened* (SMO) aktiviert, welcher wiederum eine Aktivierung der *Glioma-associated* Transkriptionsfaktoren GLI1, GLI2 sowie GLI3 veranlasst. Die GLI-Transkriptionsfaktoren translozieren daraufhin in den Nukleus, wo sie an der Regulation verschiedener Signalwege inkl. Zellwachstum und -teilung beteiligt sind. Das Ziel unserer Studie war zu evaluieren, welche Bedeutung dem *Hedgehog*-Signalweg in der akuten myeloischen Leukämie zukommt.

**Ergebnisse**

Wir untersuchten die Genexpression von Mitgliedern des *Hedgehog*-Signalweges an Proben von 104 Patienten mit neu diagnostizierter AML, die im Rahmen der AMLSG-07-04-Studie mit einem Standardchemotherapie-Protokoll behandelt wurden (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00151242). Hierbei zeigte sich, dass ein Großteil der Patienten über eine aktive *Hedgehog*-Signalkaskade verfügt, da sowohl die Rezeptoren PTCH1 und SMO als auch die GLI-Transkriptionsfaktoren GLI1, GLI2 und GLI3 exprimiert wurden. Interessanterweise konnten wir jedoch keine Expression von *Hedgehog*-Liganden nachweisen. In weiteren Versuchen konnten wir jedoch aufdecken, dass die *Hedgehog*-Signalkaskade in AML-Zellen über eine parakrine Interaktion mit Knochenmarkstromazellen aktiviert werden kann. So verfügten Endothelzellen aus dem Knochenmark von AML-Patienten über eine deutliche Expression von *Desert Hedgehog*, was sich zudem in signifikant erhöhten DHH-Plasmaleveln bei AML-Patienten im Vergleich zu gesunden Spender widerspiegelte.

Die Korrelation der Genexpressionsdaten mit den klinischen Daten der AML-Patienten zeigte, dass der Transkriptionsfaktor GLI2 einen negativen prognostischen Faktor für das Ereignis-freie, das Relaps-freie sowie das Gesamtüberleben der AML-Patienten darstellt. Unsere Beobachtungen konnten in einer zweiten, unabhängigen AML-Patienten-Kohorte bestätigt werden, zu der Microarray-basierte Genexpressionsdaten veröffentlicht waren (n=290 AML-Patienten; Verhaak *et al*, *Haematologica* 2009;94(1)). In dieser Kohorte besaß neben GLI2 auch GLI einen negativen prognostischen Effekt auf das Überleben. Interessanterweise zeigte sich in beiden AML-Kohorten eine Korrelation zwischen der Expression von GLI2 und dem Auftreten einer FLT3-Mutation (p<0,001 für die AMLSG- bzw. p=0,003 für die Verhaak-Kohorte), was auf eine besondere Bedeutung der *Hedgehog*-Signalkaskade in der Patientengruppe mit FLT3-Mutation hindeuten könnte.

Um die Konsequenzen einer spezifischen GLI-Hemmung *in vitro* zu untersuchen, wurden verschiedene humane AML-Zelllinien sowie primäre Blasten aus AML-Patienten (n=10) mit GANT61 behandelt, einem kleinmolekularen Inhibitor, der spezifisch die Bindung von GLI1 und GLI2 an die DNA unterbindet. GANT61 führte dosis-abhängig zu einem signifikanten Anstieg der Apoptoserate, einer verminderten Proliferationsrate sowie Kolonienzahl. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass die Hemmung der Kolonienbildung bei den AML-Zellen signifikant stärker ausgeprägt war als bei gesunden CD34<sup>+</sup> hämatopoietischen Progenitorzellen gesunder Spender, was auf ein therapeutisches Fenster für die Inhibierung von GLI bei AML-Patienten hindeuten könnte.

Als Ergänzung zu den GANT61-Versuchen wurde die Expression von GLI1 und GLI2 in den AML-Zelllinien mittels shRNA herunterreguliert, was ebenfalls zu einer verminderten Proliferations- und Colony-Formation-Kapazität sowie einer erhöhten Apoptoserate im Vergleich zu den Kontrollansätzen mit unspezifischer *scrambled* shRNA führte. Unsere Daten konnten darüber hinaus auch *in vivo* bestätigt werden: Mäuse, denen MV4-11-Leukämiezellen mit einem GLI1- und GLI2-Doppel-*Knockdown* transplantiert worden waren, zeigten im Vergleich zu Kontrolltieren (mit *scrambled*-shRNA MV4-11-Zellen transplantiert) ein signifikant verlängertes Überleben (im Mittel 37 vs. 30 Tage, p=0,006).

### **Zusammenfassung**

In unserer Studie konnten wir anhand zwei unabhängiger AML-Patienten-Kohorten nachweisen, dass die *Hedgehog*-Transkriptionsfaktoren GLI negative prognostische Marker in der AML darstellen. Durch die spezifische Hemmung von GLI durch den kleinmolekularen Inhibitor GANT61 oder einen shRNA-vermittelten *Knockdown* konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von GLI anti-leukämische Effekte *in vitro* sowie *in vivo* in einem Mausmodell vermitteln kann. Unsere Daten zeigen, dass die Inhibition von GLI eine aussichtsreiche Zielstruktur für neue Therapieansätze in der AML darstellen könnte. Aufgrund der Korrelation zwischen einer hohen GLI2-Expression und dem Auftreten einer FLT3-Mutation könnte der Ansatz vor allem für AML-Patienten mit FLT3-Mutation von Bedeutung sein.