

## Regulation der extrinsischen und intrinsischen Hämostaseaktivierung bei akuter myeloischer Leukämie - Abschlussbericht

Hintergrund: Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine aggressive Erkrankung des blutbildenden Systems, in deren Verlauf und Therapie schwerwiegende thromboembolische und hämorrhagische Komplikationen auftreten können. In einem früheren Forschungsprojekt konnten wir nachweisen, dass der auf mononukleären und myeloblastären (AML-) Zellen exprimierte Gewebefaktor (oder „Tissue Factor“, TF) eine wichtige pathophysiologische Rolle in der Genese der AML-assoziierten Gerinnungsstörungen spielt. Frühere Daten aus unserem Labor haben gezeigt, dass das in AML-Zellen gebildete Enzym Myeloperoxidase (MPO) die zelluläre TF-Aktivität negativ reguliert. Ziel dieses Forschungsprojektes ist daher, einen Zusammenhang zwischen mononukleärer MPO-Expression, TF-Aktivität und Gerinnungsaktivierung bei Patienten mit neudiagnostizierter AML im Rahmen einer prospektiven Studie genauer zu charakterisieren.

### Kurzzusammenfassung der bisherigen Ergebnisse:

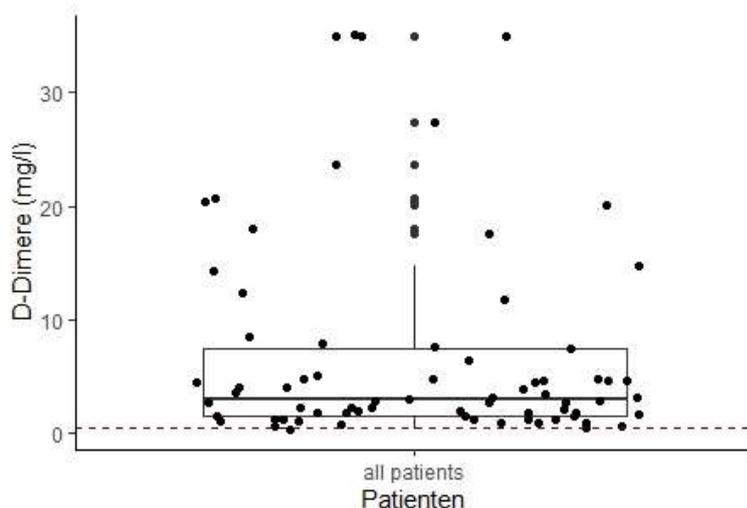
Zwischen 04/2017 und 11/2019 wurden insgesamt 71 Patienten, die im UKE die Diagnose einer neudiagnostizierten AML erhielten und therapiert wurden, eingeschlossen.

Alter, Median (Min – Max)	65 (35 – 88)
Geschlecht, n (%)	71
Männlich	34 (48 %)
Weiblich	37 (52 %)
ELN-Klassifikation, n (%)	71
Favorable risk	15 (21 %)
Intermediate risk	33 (46 %)
Adverse risk	20 (28 %)
Nicht klassifiziert	3 (4 %)
WHO-Klassifikation, n (%)	71
Therapy-related myeloid neoplasm	1 (1 %)
AML with recurrent genetic abnormalities	23 (32 %)
AML with myelodysplasia-related changes	2 (3 %)
AML NOS	41 (58 %)
Acute undifferentiated leukemia	1 (1 %)
Nicht klassifiziert	3 (4 %)
FAB-Klassifikation	71
M0/M1/M2	28 (39 %)

M3	1 (2 %)
M4/M5	20 (28 %)
Sonstige (einschl. nicht verfügbar)	22 (31 %)
Blasten im peripheren Blut in %, Median (Min – Max)	26,5 (0 – 95)
Blasten im peripheren Blut in Mrd./l, Median (Min – Max)	2,44 (0 – 93,6)
Thrombozyten in Mrd./l, Median (Min – Max)	57 (8 – 309)
Fibrinogen nach Clauss in g/l, Median (Min – Max)	3,75 (0,75 – 7,25)
D-Dimere in mg/l FEU, Median (Min – Max)	1,86 (0,51 – 41,94)
LDH in U/l, Median (Min – Max)	400 (159 – 5392)

**Tabelle 1:** Demographische und klinische Patientendaten. Abkürzungen: ELN = European Leukemia Network, FAB = French-American-British Classification, NOS = not otherwise specified, LDH = Laktatdehydrogenase

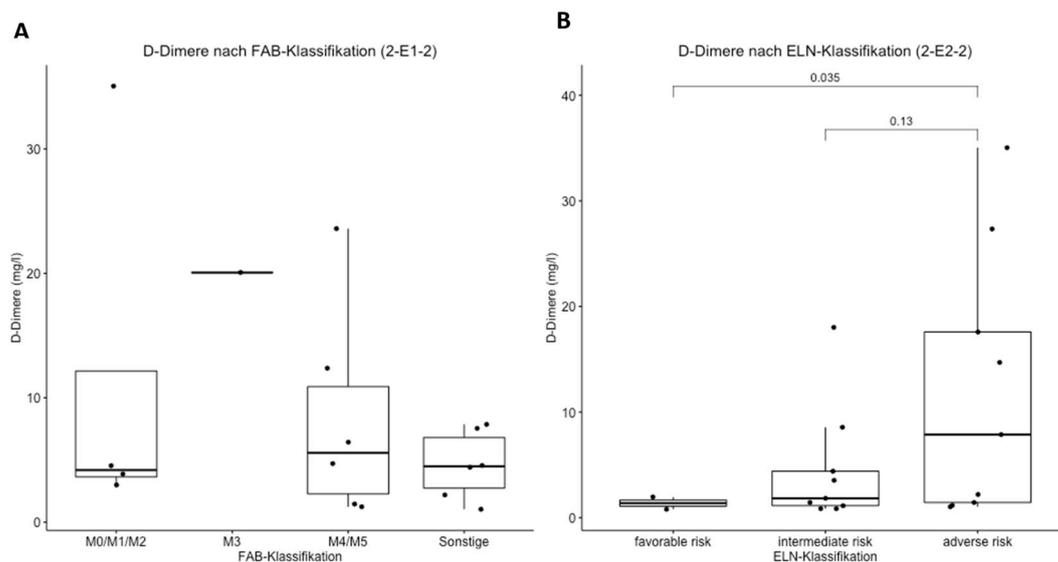
An Krebs erkrankte Patienten weisen häufig eine pathologische Gerinnungsaktivierung auf und sind daher einem erhöhten Risiko für thromboembolische Komplikationen ausgesetzt. D-Dimere entstehen während der Auflösung eines Blutgerinnsels und werden daher als globaler Parameter für eine gesteigerte Hämostaseaktivierung verwendet. Zudem gibt es aus klinischen Studien Hinweise dafür, dass erhöhte D-Dimere mit einer gesteigerten Morbidität und Mortalität bei Tumorpatienten einhergehen können.



**Abbildung 1:** Box Plot der gemessenen D-Dimere bei Aufnahme/vor Therapieeinleitung. Die gestrichelte Linie gibt die obere Grenze des Referenzbereiches an (0,52 mg/l).

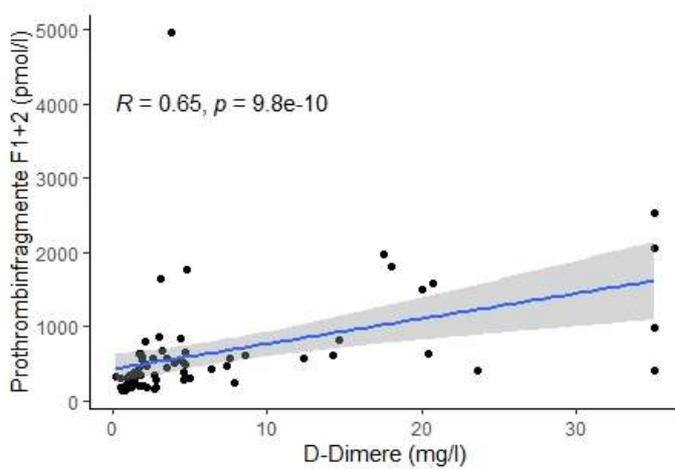
In unserer Studie hatten sämtliche Patienten bei Aufnahme erhöhte D-Dimere ( $\geq 0.52$  mg/l), hinweisend auf eine gesteigerte Hämostaseaktivierung bei diesem Krankheitsbild.

In einem nächsten Schritt haben wir analysiert, ob sich die Höhe der D-Dimere zwischen den AML-Subtypen unterscheidet. Während die ELN-Klassifikation eine Risikostratifizierung der Leukämieform anhand der genetischen Mutationen vornimmt, werden in der FAB (French-American-British)-Klassifikation AML-Subtypen anhand des zellulären Phänotyps kategorisiert. Dieser berücksichtigt Reifegrad und Ursprungszelltyp der AML-Blasten, wobei auch eine vorhandene zelluläre MPO-Expression mit in die Untergliederung einbezogen wird. Während keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der D-Dimer-Werte zwischen den Subgruppen der FAB- (Abbildung 2A) und WHO-Klassifikation (nicht gezeigt) vorlagen, wiesen Patienten mit „adverse risk“ nach ELN-Klassifikation signifikant höhere D-Dimere auf als Patienten mit „favorable risk“ (Abbildung 2B). Unsere Daten sind vereinbar mit vorherigen Forschungsarbeiten bei vorwiegend soliden Tumoren, welche einen Zusammenhang zwischen erhöhten D-Dimeren und einer schlechteren Prognose bei Tumorkranken nachweisen konnten.



**Abbildung 2:** D-Dimere stratifiziert nach AML-Subgruppen (nach FAB- und ELN-Klassifikation)

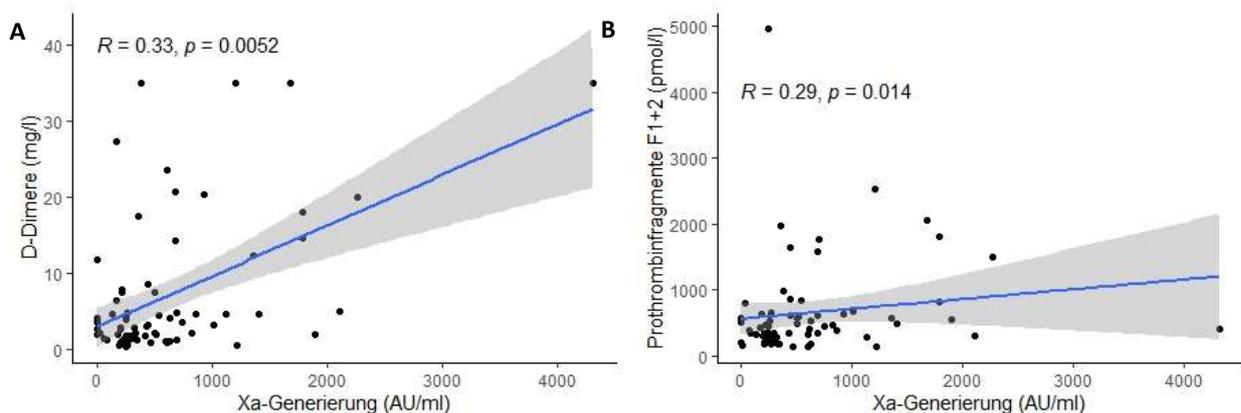
Als weiteren Gerinnungsparameter ermittelten wir bei allen Patienten die Höhe der Prothrombinfragmente F1+2. Diese entstehen bei der Bildung von Thrombin aus Prothrombin und bilden daher den prothrombotischen Part der Gerinnungskaskade ab, während D-Dimere die Auflösung eines Blutgerinnsels im Rahmen der Fibrinolyse reflektieren. Hier zeigte sich eine signifikante Korrelation Assoziation zwischen dem Ausmaß der In-vivo-Thrombingenerierung (gemessen anhand der Prothrombinfragmente F1+2) und dem Ausmaß der (reaktiven) Fibrinolyse (gemessen anhand der D-Dimere) (Abbildung 3). Diese Daten weisen darauf hin, dass in der eingeschlossenen Patientenkohorte sowohl prokoagulatorische als auch fibrinolytische Prozesse bei Erstdiagnose aktiviert sind.



**Abbildung 3:** Assoziation zwischen D-Dimeren und Prothrombinfragmenten F1+2.

Bei Patienten mit AML wird eine gesteigerte TF-Aktivität als (Haupt-)Ursache einer erworbenen Gerinnungsstörung vermutet. TF wird auf hämatopoetischen Zellen (davon insbesondere auf Monozyten) sowie ebenfalls auf Tumorzellen exprimiert. Zusätzlich spielen extrazelluläre, TF-positive Mikrovesikel (MV), die durch Abschnürung oder „Shedding“ aus ihren Ursprungszellen entstehen, eine entscheidende pathophysiologische Rolle in der Genese eines prokoagulatorischen Milieus bei Krebserkrankungen. Wir haben daher die TF-Aktivität (dargestellt als AU/ml, „arbitrary units“) der aus dem Patienten-Vollblut isolierten mononukleären Zellen mittels eines funktionellen Einstufengerinnungstests gemessen. Die MV-assoziierte TF-Aktivität wurde an aus Patientenplasma isolierten MV durch einen chromogenen Faktor Xa-Generierungstest ermittelt (in den Abbildungen als Xa-Generierung bezeichnet).

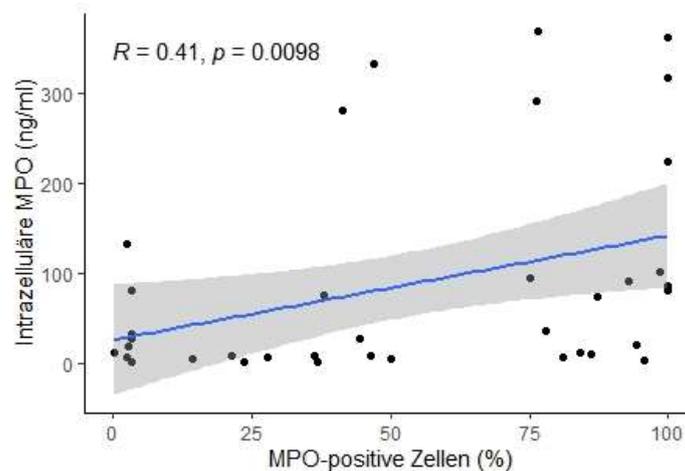
In unseren Analysen wurde keine Korrelation zwischen mononukleärer TF-Aktivität und MV-TF-Aktivität gefunden (Daten nicht gezeigt). Es zeigte sich allerdings ein Zusammenhang zwischen MV-TF-Aktivität (Xa-Generierung) und D-Dimeren sowie Prothrombinfragmenten F1+2 (Abbildung 4).



**Abbildung 4:** Assoziation zwischen MV-TF-Aktivität (dargestellt als Xa-Generierung) und einzelnen Gerinnungsparametern. MV wurden aus plättchenfreiem Plasma (PFP) mittels High-Speed-Zentrifugation (2 x 30 min bei 16,100 x g) isoliert. Die MV-assoziierte TF-Aktivität wurde im Anschluss anhand der umgesetzten, chromogen nachgewiesenen Xa-Generierung ermittelt.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Ausbildung extrazellulär zirkulierender TF-positiver Mikrovesikel mit einer generalisierten Hämostaseaktivierung in dieser Patientenkohorte einhergeht und somit einen möglichen Pathomechanismus zum gesteigerten Auftreten von Thromboembolien und/oder hämorrhagischen Komplikationen bei AML-Patienten darstellt.

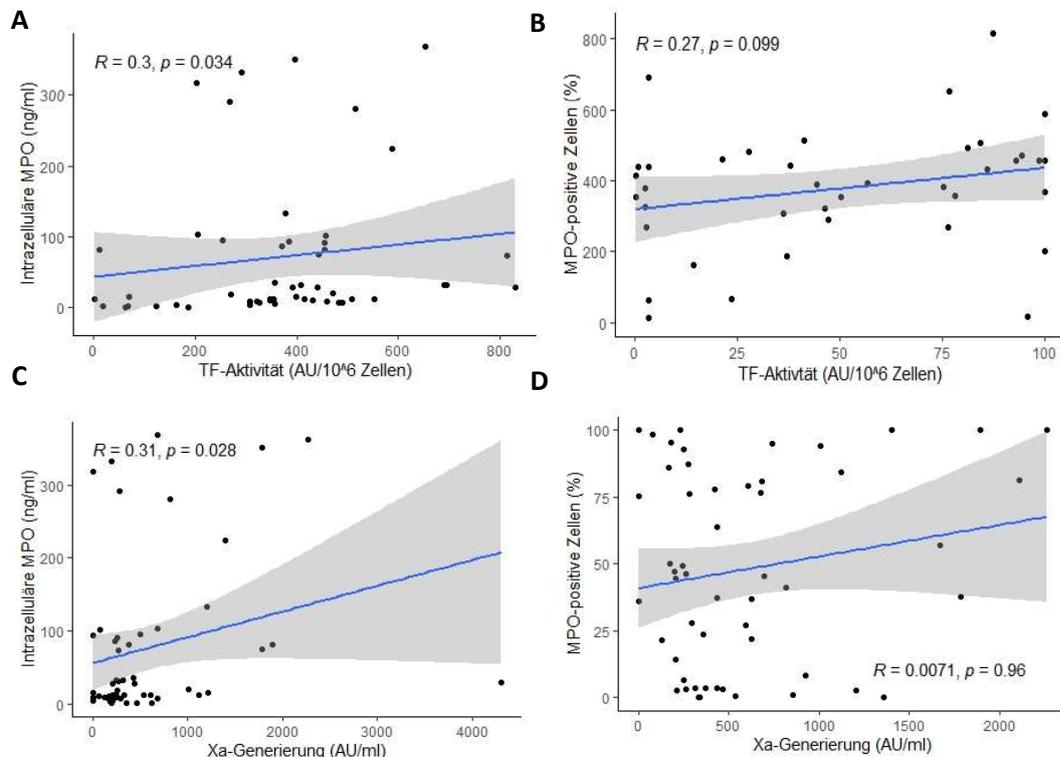
Die Mechanismen, durch welche aktiver TF insbesondere bei pathologischer Gerinnungsaktivierung reguliert wird, sind nicht vollständig geklärt und werden kontrovers diskutiert. Publierte Vorarbeiten aus unserem Labor konnten zeigen, dass MPO einen negativ-regulierenden Effekt auf prokoagulatorischen, funktionell aktiven TF ausübt. Das lysosomale Enzym MPO wird in neutrophilen Granulozyten und in einem etwas geringeren Ausmaß in Monozyten gebildet sowie in AML-Blasten exprimiert. Wir vermuten, dass diese MPO-vermittelte Hemmung von aktiviertem TF Folge einer Modulierung von negativ geladenen Phospholipiden auf der Oberfläche TF-exprimierender Zellen ist. Wir haben daher in einem ersten Schritt den intrazellulären MPO-Gehalt aus lysierten mononukleären Zellen mittels ELISA gemessen und diesen mit der durchflusszytometrisch ermittelten MPO-Expression von permeabilisierten AML-Zellen verglichen. Beide Nachweismethoden korrelieren hinsichtlich ihrer MPO-Detektion (Abbildung 5).



**Abbildung 5:** Assoziation zwischen durchflusszytometrisch ermittelten MPO-positiven Zellen (%) und intrazellulärem MPO-Gehalt (mittels ELISA).

Im Anschluss daran haben wir auf einen Zusammenhang zwischen zellulärer MPO-Expression und TF-abhängiger Gerinnungsaktivierung (anhand mononukleärer TF-Aktivität und MV-TF-Aktivität) getestet. Dabei zeigte sich, dass ein diskreter Zusammenhang zwischen Höhe der mononukleären TF-Aktivität und zellulärer MPO-Expression vorliegt (Abbildung 6A, B).

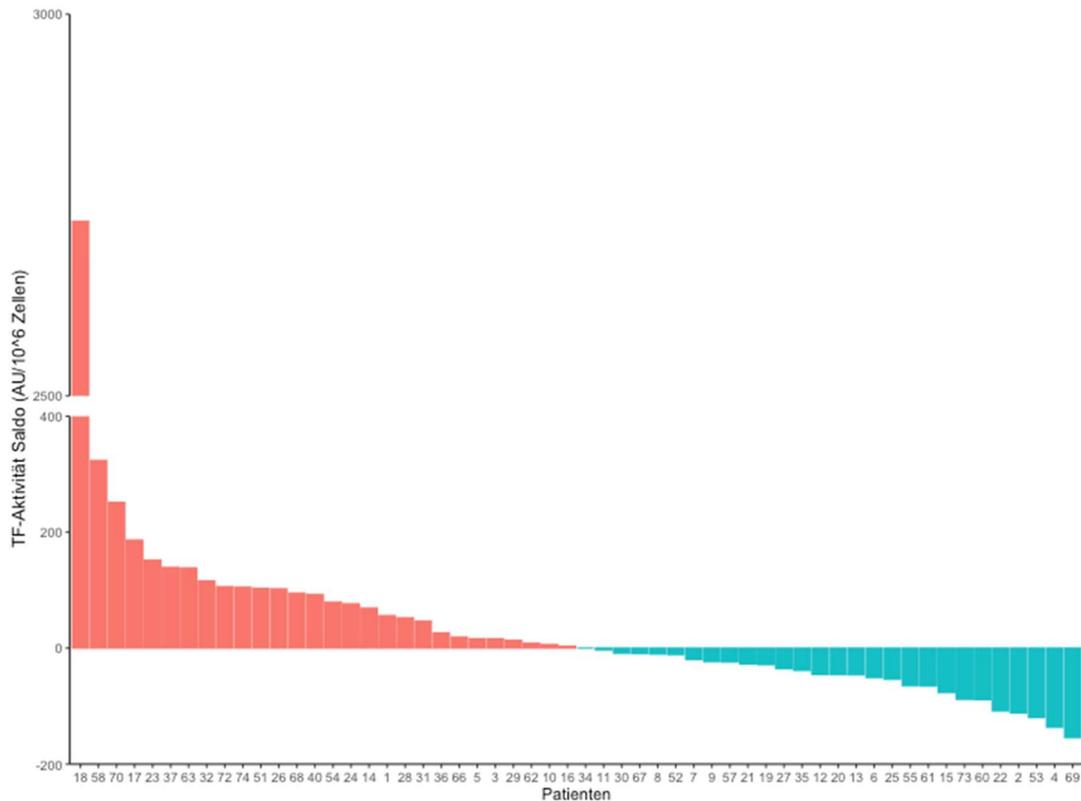
Diese Assoziation war am stärksten ausgeprägt zwischen intrazellulärem MPO-Gehalt (gemessen mittels ELISA) und MV-assoziiierter TF-Aktivität (Abbildung 6C), während kein Zusammenhang zwischen MPO-positiven Zellen und MV-assoziiierter TF-Aktivität zu finden war (Abbildung 6D).



**Abbildung 6:** Assoziation zwischen mononukleärer TF-Aktivität und intrazellulärem MPO-Gehalt mittels ELISA (A), zwischen mononukleärer TF-Aktivität und durchflusszytometrisch ermittelten MPO-positiven Zellen (B), MV-assoziiierter TF-Aktivität, gemessen als Xa-Generierung, und intrazellulärem MPO-Gehalt (C), und MPO-positiven Zellen und MV-assoziiierter TF-Aktivität (D).

Der Einfluss zellulärer MPO auf die TF-Aktivität wurde im Folgenden funktionell untersucht: Nach Inkubation von aus Patientenvollblut isolierten mononukleären Zellen in Gegenwart des MPO-Inhibitors 4-ABAH (4-aminobenzoic acid hydrazide) wurde im Anschluss die TF-Aktivität im Einstufengerinnungstest gemessen. Die Differenz zwischen TF-Aktivität nach MPO-Inhibition und nativer TF-Aktivität wurde ermittelt. Wenn sich unter MPO-Inhibition die Zeit bis zur Gerinnungsbildung verlängerte (und somit die mononukleäre TF-Aktivität reduziert war), wurde eine negative Differenz gemessen (entsprechend einer mit einem negativen Vorzeichen versehenen AU/ml). Bei Erhöhung der TF-Aktivität, gekennzeichnet durch eine Verkürzung der Zeit bis zur Gerinnungsbildung in Gegenwart von 4-ABAH, wurde eine positive Differenz gemessen.

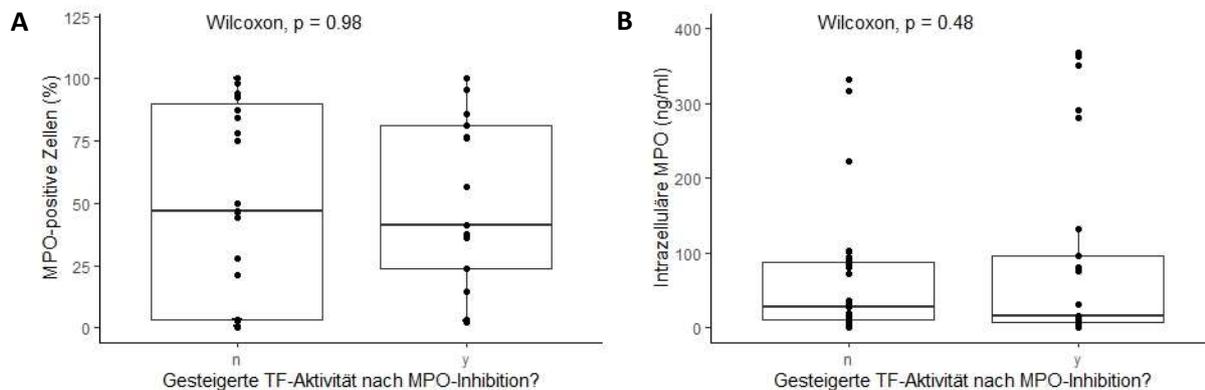
Interessanterweise zeigte sich in unserer Patientenkohorte ein divergenter Effekt unter MPO-Inhibition: Während ein Teil der Patientenproben einen deutlichen Anstieg der TF-Aktivität unter MPO-Hemmung aufwies und somit eine inhibitorische Funktion von MPO auf TF vermuten lässt, trat bei



etwa der anderen Hälfte der analysierten Proben ein gegenteiliger Effekt, eine Reduktion der TF-Aktivität unter MPO-Inhibition, auf (Abbildung 7).

**Abbildung 7:** Waterfall Blot der Differenz (Saldo) der TF-Aktivität (= mononukleäre TF-Aktivität in Anwesenheit eines MPO-Inhibitors – native TF-Aktivität) der einzelnen Patientenproben.  $10^6$  aus Patientenvollblut isolierte mononukleäre Zellen wurden mit 5 mM 4-ABAH (oder PBS) für 60 min bei 37°C inkubiert und anschließend die Zeit bis zur Gerinnselbildung im Einstufengerinnungstest gemessen. Die zelluläre TF-Aktivität wurde anhand einer Standardkurve in AU/ $10^6$  Zellen umgerechnet und die native TF-Aktivität (unter PBS) von der TF-Aktivität unter 4-ABAH subtrahiert. Ein positiver Saldo (Zunahme der TF-Aktivität) wird als inhibitorischer MPO-Effekt auf die TF-Aktivität gewertet, während ein negativer Saldo (Abnahme der TF-Aktivität) für einen TF-aktivierenden MPO-Effekt spricht.

Diese durch MPO-Inhibition vermittelten gegenteiligen Effekte auf die TF-Aktivität waren nicht erklärt durch den intrazellulären (durchflusszytometrisch oder immunologisch ermittelten) MPO-Gehalt (Abbildung 8).

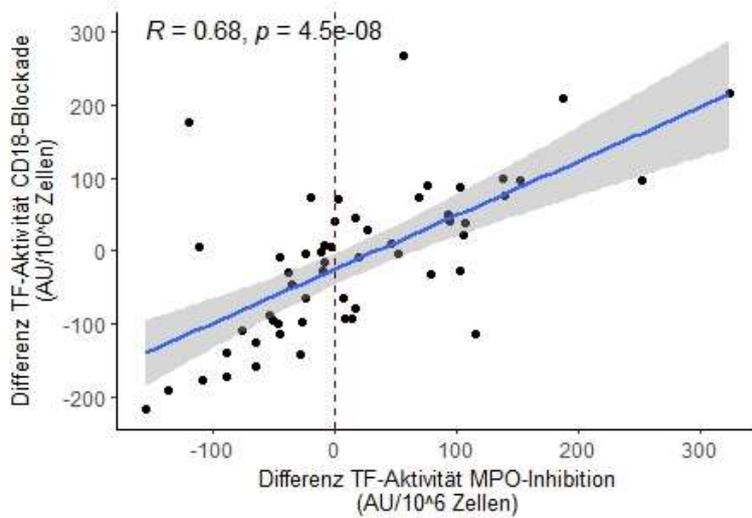


**Abbildung 8:** MPO-Positivität durchflusszytometrisch (A) und intrazellulärer MPO-Gehalt (B) stratifiziert nach positiver (yes=y) und negativer Differenz (no=n) der TF-Aktivität unter MPO-Inhibition.

MPO bindet an CD18 (Integrin beta 2), welches konstitutiv auf der Zelloberfläche von neutrophilen Granulozyten und Monozyten exprimiert wird. Inhibition von CD18 blockiert somit die Bindung von extrazellulärer, freigesetzter MPO an Zelloberflächenstrukturen und bietet somit eine weitere Möglichkeit, den Effekt von MPO auf zellulär exprimierten TF funktionell zu analysieren.

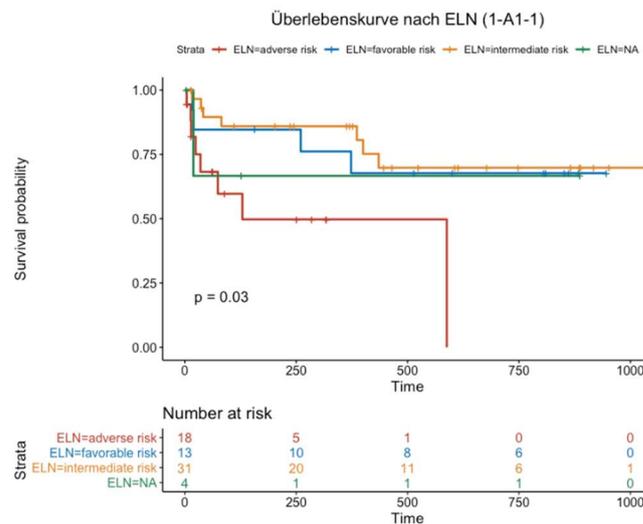
Wir haben daher in einem zeitgleichen Experiment mononukleäre Zellen in Gegenwart eines CD18-blockierenden Antikörpers inkubiert und im Anschluss die TF-Aktivität im Einstufengerinnungstest gemessen. Wie zuvor bei den Analysen der mononukleären TF-Aktivität unter 4-ABAH wurde die native TF-Aktivität von der unter CD18-Blockade ermittelten TF-Aktivität subtrahiert und die Differenz (Saldo) mit den Werten unter MPO-Inhibition verglichen.

Dabei zeigte sich, dass regulatorischer Effekt und Ausmaß der unter beiden Konditionen veränderten TF-Aktivität miteinander korrelierten (Abbildung 9). Diese Ergebnisse verstärken unsere Vermutung einer regulatorischen Funktion von MPO auf die zelluläre TF-Aktivität, da sowohl eine direkte Hemmung von MPO mittels 4-ABAH als auch eine indirekt über CD18-Blockade vermittelte MPO-Hemmung einen gleichzeitigen Effekt erzielten.

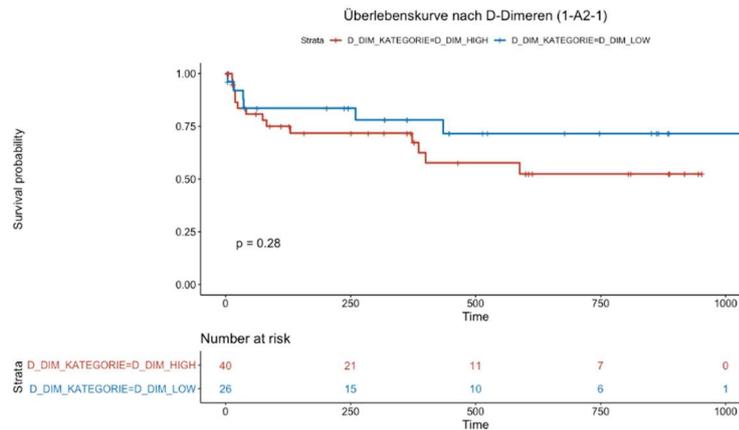


**Abbildung 9:** Assoziation Differenz TF-Aktivität nach MPO-Inhibition und TF-Aktivität nach CD18-Blockade

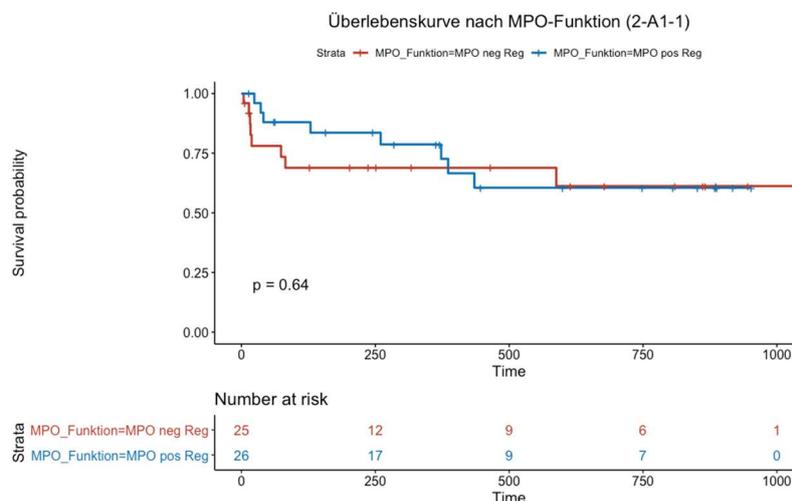
Das Überleben der Patienten wurde nach ELN-Klassifikation, Höhe der D-Dimere bei Studieneinschluss/vor Therapieeinleitung sowie anhand der regulatorischen MPO-Funktion auf die zelluläre TF-Aktivität stratifiziert. Während die nach ELN als „adverse risk“ klassifizierte Patientengruppe mit einem schlechteren Outcome versehen war, zeigte sich kein Unterschied hinsichtlich der Höhe der initial gemessenen D-Dimere oder der regulatorischen MPO-Funktion (Abbildungen 10–12).



**Abbildung 10:** Überlebenskurven nach ELN-Klassifikation



**Abbildung 11:** Überlebenswahrscheinlichkeit nach Höhe der D-Dimere vor Therapiebeginn, stratifiziert nach „high“ und „low“ unter Verwendung eines Cut-off-Wertes von etwa 5 x ULN (2,5 mg/dL)



**Abbildung 12:** Überlebenswahrscheinlichkeit nach regulatorischem MPO-Effekt auf die TF-Aktivität, stratifiziert nach negativ (=inhibitorisch) und positiv (=aktivierend)

### Zusammenfassung

Zusammenfassend zeigen die bisherigen Ergebnisse, dass in unserer Patientenkohorte mit neudiagnostizierter AML a) eine gesteigerte Gerinnungsaktivierung vorliegt, die sowohl prokoagulatorische als auch fibrinolytische Prozesse beinhaltet, b) Patienten mit „adverse risk“ nach ELN signifikant höhere D-Dimere im Vergleich zur „good risk“-Gruppe aufweisen, c) eine Assoziation zwischen MV-assoziiertes TF-Aktivität und Hämostaseaktivierung vorliegt, d) das Ausmaß der TF-Aktivität mit der zellulär exprimierten MPO assoziiert ist, e) MPO einen regulatorischen Effekt auf die mononukleäre TF-Aktivität ausübt, f) dieser Effekt sehr wahrscheinlich über eine CD18-vermittelte Bindung von MPO an die Zelloberfläche vermittelt wird, und f) MPO sowohl einen aktivierenden als auch einen inhibitorischen Effekt auf die mononukleäre TF-Aktivität ausübt.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen werden wir nun die MPO-vermittelten divergenten Effekte auf die mononukleäre TF-Aktivität weiter charakterisieren. Die gewonnenen Resultate dieser Studie werden

zu einem tieferen Verständnis der AML-assoziierten Gerinnungsstörungen beitragen und insbesondere den bisher noch wenig verstandenen Mechanismus der MPO-vermittelten TF-Regulierung besser durchleuchten.