

1.1 Thema des Forschungsprojektes

Charakterisierung der leukämischen Nische im Knochenmark nach Chemotherapie bei der akuten myeloischen Leukämie

1.2 Zusammenfassung

Die Grundlage der akuten myeloischen Leukämie (AML) ist eine gestörte Zellproduktion im Knochenmark, dem wichtigsten blutbildenden Organ im menschlichen Körper¹. Dabei ist die interzelluläre Kommunikation der AML-Zellen mit ihrem Mikromilieu im Knochenmark ein wichtiger Faktor für ihre Regulation von Proliferation und Apoptose². Es wird angenommen, dass leukämische Zellen die Knochenmarknischen der hämatopoetischen Stammzellen infiltrieren, um damit ihre Fähigkeiten zur Selbsterneuerung, Proliferation und Resistenz gegen Chemotherapeutika zu erhöhen³. Ein wichtiger Mechanismus zur Resistenzbildung ist der Austritt aus dem Zellzyklus, die sogenannte *dormancy*. Viele Zytostatika hemmen den aktiven Zellzyklus und verhindern damit die Zellteilung. *Dormancy* kann in den AML-Zellen durch extrazelluläre Signale aus der Nische induziert werden und damit zu einer Resistenz gegen Zytostatika führen.

Die genauen Mechanismen, wie die Nische die AML-Zellen vor Chemotherapeutika schützen kann, ist aber weiterhin nicht im Detail entschlüsselt⁴. Ziel dieses Forschungsprojektes war es, die leukämische Nische unter Chemotherapie zu untersuchen und neue therapeutische Optionen für die AML zu identifizieren. Durch ein Xenotransplantationsmodell von humanen AML-Proben in immunsupprimierte Mäuse konnten wir die Infiltration des Knochenmarks mit leukämischen Blasten visualisieren und mittels RNA-Sequenzierung einen vielversprechenden Kandidaten identifizieren, dessen Funktion nun in der Leukämie- und Resistenzentwicklung weiter untersucht werden muss.

2. Ergebnisse des Zwischenberichts

2.1 Visualisierung der AML-Infiltration im murinen Knochenmark

In unserem Zwischenbericht 2019 haben wir bereits zeigen können, dass wir ein effizientes Xenotransplantationsmodell für AML mit den immunsupprimierten NSG-SGM3 Mäusen etablieren konnten. Der allgemeine Standard für Mausmodelle basiert auf den immunsupprimierten NSG (*NOD scid gamma*)-Mäusen, deren

reduziertes Immunsystem die humanen Zellen nicht erkennt und damit eine Infiltration ermöglicht. Leider ist dieses Modell für AML-Proben im Vergleich zu akuten lymphatischen Leukämien stark limitiert⁵. Durch den Einsatz der humanisierten NSG-SGM3 Mäuse, in denen murine Gensequenzen durch humane Sequenzen ersetzt wurden, konnten wir die Transplantationseffizienz von AML-Zelllinien sowie von AML-Zellen aus Patientenproben signifikant erhöhen (Abb. 1).

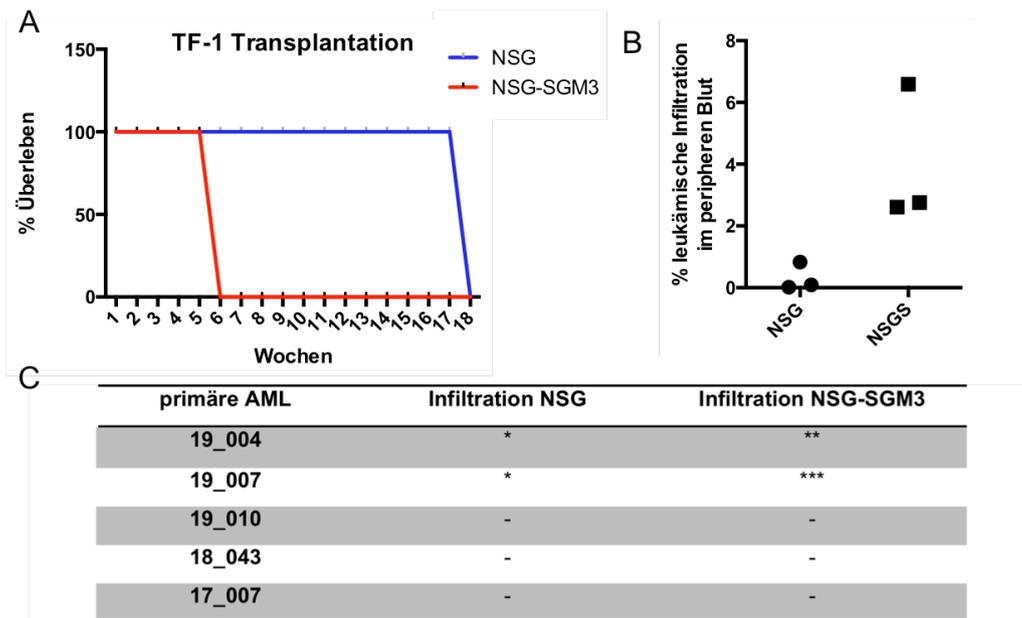


Abbildung 1: Etablierung des NSG-SGM3 basierten Xenotransplantationsmodells. A) Überlebenskurve der beiden Mausstämme NSG und NSG-SGM3 nach Transplantation mit der GM-CSF abhängigen TF-1-Zelllinie. B) Infiltration des peripheren Blutes durch die primäre AML p19_007. Nachweis der Blastenzahl mittels Durchflusszytometrie und dem humanen Oberflächenmolekül hCD45. Die hier dargestellten Werte spiegeln die Infiltration 10 Wochen nach Transplantation wider. C) Übersicht der verwendeten primären AML-Proben und ihr Transplantationspotential.

Grundsätzlich bleibt es jedoch schwierig, primäres Patientenmaterial in Mäuse zu transplantieren und dort eine Infiltration und eine Proliferation zu induzieren. Im weiteren Projekt haben wir uns auf AML-Zelllinien konzentriert, da diese uns vergleichbarere Infiltrationen ermöglichen.

2.2 Etablierung des Chemotherapie-Modells

Das Ziel unserer Arbeit war es, die Nische im Knochenmark unter Chemotherapie zu analysieren, da dies der Ort ist, an dem die Entwicklung von Resistenzen in den AML-Zellen erwartet wird. Wir haben uns hierbei an dem klinischen Protokoll orientiert, welches als Standardbehandlung bei AML genutzt wird. Hierbei werden die Patienten mit einer Kombination aus Cytarabin und

Daunorubicin behandelt. Aufgrund hoher Gewebstoxizität haben wir uns allerdings für Mitoxantron als Alternative zu Daunorubicin entschieden, da es einen vergleichbaren Wirkmechanismus aber eine geringere Toxizität aufweist. Abbildung 2 zeigt die Kontrolle der Chemotherapie mittels Biolumineszenz.

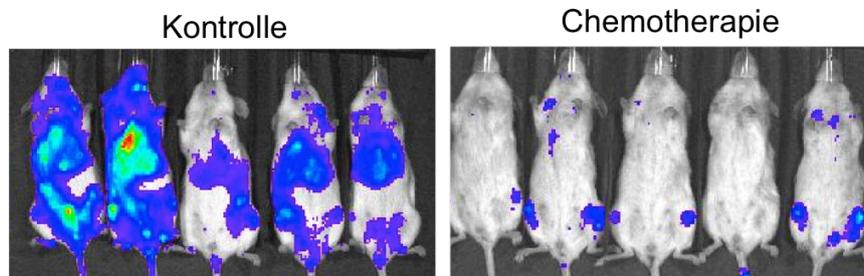


Abbildung 2: Nachweis der Effizienz der Chemotherapie mittels Biolumineszenzanalyse. Die behandelten Mäuse zeigen nach der Chemotherapie eine deutliche Reduktion der leukämischen Signale *in vivo*.

Die hier angesetzte Chemotherapie zeigte eine gute Verträglichkeit für die Mäuse und eine deutliche Effizienz gegen die leukämische Infiltration.

2.3 3D-Visualisierung der leukämischen Knochenmarknische

Das Knochenmark von infiltrierten und Chemotherapie-behandelten Mäusen wurde dann genutzt, um die Lokalisation von AML-Zellen im Knochenmark zu visualisieren (Abb. 3). Die Analyse der Femora von transplantierten Mäusen zeigte, dass die AML-Zellen bevorzugt in der perivaskulären Nische der sinusoidalen Blutgefäße infiltrieren. Interessanterweise reagieren die Blutgefäße mit einem massiven Strukturwandel auf den Stress der Chemotherapie. Dennoch stellen sie weiterhin eine wichtige Nische für die resistenten AML-Zellen im Knochenmark dar (Abb. 3C,D).

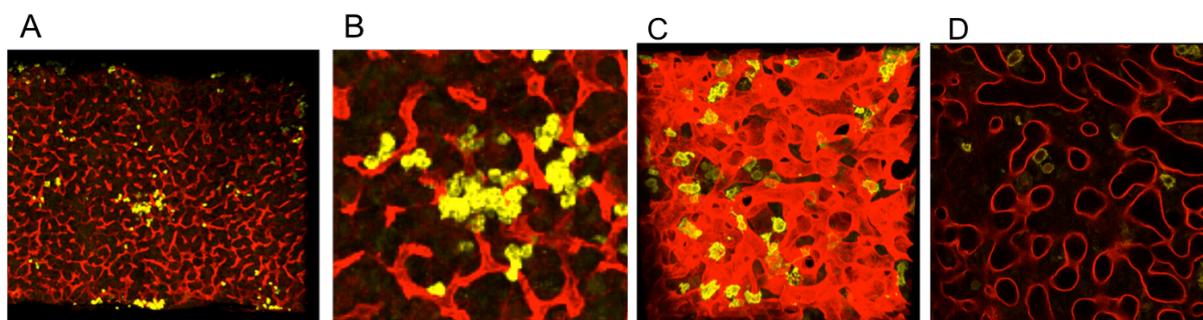


Abbildung 3: Visualisierung der leukämischen Zellen im Knochenmark. A) Dreidimensionale Darstellung des vaskulären Netzwerkes im Knochenmark eines murinen Femurs (Endoglin, rot) nach Infiltration mit AML-Zellen (CD45, gelb). B) AML-Zellen siedeln in einer perivaskulären Nische an den sinusoidalen Blutgefäßen des Knochenmarks. C) 3D und D) 2D Darstellung der Blutgefäße unter dem Druck der Chemotherapie. Deutliche Konformationsänderungen sind sichtbar. Dennoch verbleiben die AML-Zellen im direkten Kontakt mit den Blutgefäßen und damit in ihrer perivaskulären Nische.

Diese Daten haben uns davon überzeugt, dass die wichtigste Nische für die resistenten AML-Zellen die perivaskuläre Nische ist, welche hauptsächlich durch Endothelzellen gebildet wird. Dieser Zelltyp wurde bereits in anderen Studien als kritischer Interaktionspartner für AML-Zellen beschrieben und ist vor allem durch die Interaktion über VEGF und dessen Rezeptor für die Leukämogenese bekannt^{6,7}. Es zeigte sich jedoch, dass VEGF allein nicht ausreicht um Leukämiezellen von Chemotherapeutika zu schützen, weshalb wir uns dazu entschieden haben, diesen Zelltyp näher zu analysieren und die interzelluläre Kommunikation weiter zu entschlüsseln⁸.

3. Ergebnisse

3.1 Erstellung von Genexpressionsprofilen mittels RNA-Sequenzierung

Zur Identifikation neuer Signalwege haben wir uns entschlossen, Endothelzellen und transplantierte AML-Zellen mittels Durchflusszytometrie aus murinem Knochenmark zu isolieren und deren RNA mittels *next generation sequencing* (NGS)-Technologie zu analysieren. Ursprünglich hatten wir dies mit der primären Patientenprobe pAML19_007 etabliert. Leider sind die Isolation von Endothel- und AML-Zellen mittels Durchflusszytometrie und die anschließende RNA-Isolation technisch sehr herausfordernd. Die Zellzahlen sind sehr gering und bisher konnten wir nicht ausreichend RNA aus Endothelzellen sowie pAML19_007-Zellen isolieren. Es ist uns aber gelungen, die Expressionsdaten der AML-Zelllinie Molm13 vor und nach Transplantation in NSG-Mäuse zu generieren.

Zur Analyse dieser Datensätze haben wir uns für eine *gene ontology enrichment analysis* entschieden, bei der Gengruppen aufgrund von Ontologien in ihren funktionellen Eigenschaften klassifiziert und zugeordnet werden können. Unter den ersten 20 signifikant regulierten Gengruppen fokussierten wir uns vor allem auf Gruppen mit Bezug auf Kommunikation und Zell-Zell-Interaktionen, wobei vor allem die Gruppe *GO-cytokine-activity* herausstach. Nach weitreichender Literaturrecherche haben wir uns für die weitere Untersuchung von GDF15, dem Wachstums- und Differenzierungsfaktor 15 (*growth differentiation factor 15*) entschieden, welcher bereits in verschiedene Krebsentitäten als Tumormarker identifiziert wurde⁹. GDF15 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von Entzündungsprozessen und Apoptosevorgängen in verletzten Geweben und ist ein wichtiger Regulator der zellulären Seneszenz. Anfang 2021 wurde eine prognostische Relevanz von GDF15

für AML-Patienten publiziert¹⁰. Des Weiteren wurde ein Zusammenhang zwischen einer GDF15-Expression und der Regulation von Adipozyten im leukämischen Knochenmark nachgewiesen¹¹. Interessanterweise gehört GDF15 zu einer Gruppe von Proteinen, die seneszenz-assoziiierter sekretorischer Phänotyp (*senescence-associated secretory phenotype*, SASP) genannt wird. Seneszenz ist eine spezielle Form der *dormancy* und definiert sich als ein nicht umkehrbarer Ruhezustand des Zellzyklus, der als eine Antwort auf zelluläre Schäden auftritt. Der SASP dient dabei der Rekrutierung von Immunzellen zur Beseitigung von seneszenten Zellen. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass dieser Prozess mit steigendem Alter weniger effizient wird und über die Zeit sogar ein pro-tumorales und chemotherapie-resistentes Mikromilieu für solide Tumore bilden kann^{12,13}. Die genauen Zusammenhänge zwischen der Seneszenz-Regulation durch GDF15 und dessen Rolle in der Leukämieentstehung bzw. der Resistenzentwicklung sind bisher aber nicht im Detail entschlüsselt worden.

3.2 Nachweis der GDF15 Expression in AML-Patientenproben

Als nächstes haben wir die xenohub Datenbank genutzt (<https://gdc.xenahubs.net>). Hier sind RNA-Datensätze hinterlegt, in denen man Expressionsniveaus mit Überlebenskurven korrelieren kann. Die Analyse des *TCGA acute myeloid leukemia* Datensatzes ergab eine leichte Korrelation von erhöhter GDF15-Expression und einer schlechteren Überlebensprognose.

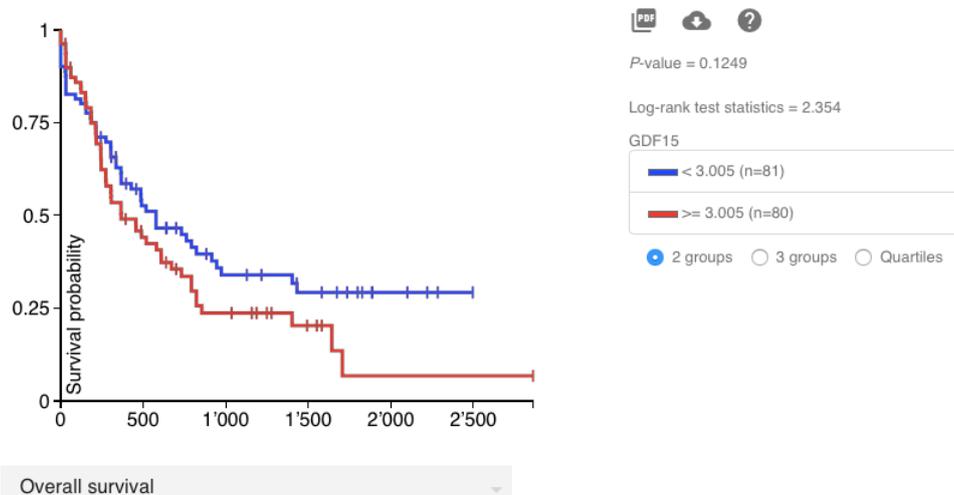


Abbildung 4: Kaplan Meier Kurve zur GDF15-Expression. Patienten mit höherer GDF15-Expression (rot) haben tendenziell eine schlechtere Überlebensprognose als Patienten mit niedrigerer GDF15-Expression (blau).

Aufgrund dieser Daten haben wir uns entschlossen, die Rolle von GDF15 in der AML-Entstehung zu untersuchen und die GDF15-Proteinmengen im Plasma von AML-Patienten mittels ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) nachzuweisen. Abbildung 5A zeigt die Proteinlevel in gesunden Spendern, sowie AML-Patienten, nach Alter sortiert.

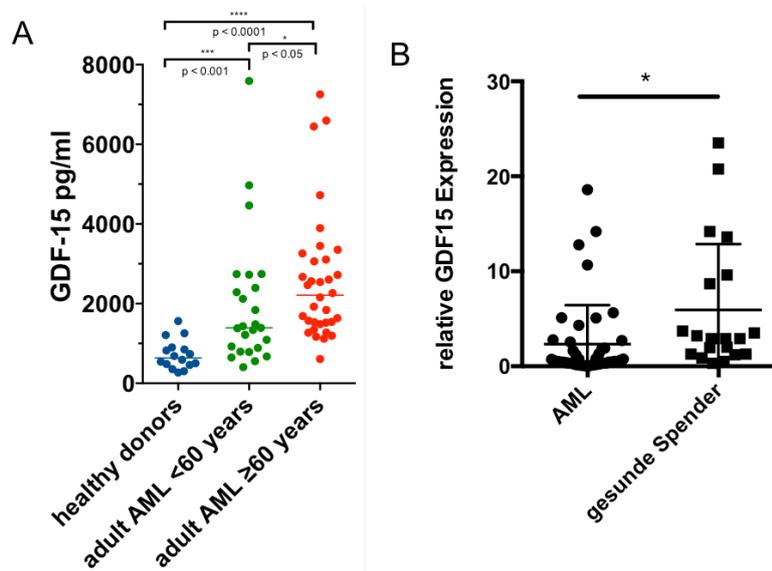


Abbildung 5: Nachweis der GDF15 Expression in AML-Patientenmaterial. A) Mittels ELISA wurden die GDF15-Proteinmengen im Plasma von gesunden Spendern (*healthy donors*) sowie AML Patienten untersucht. Aufgrund der Seneszenzfrage, die vor allem eine Funktion im alternden Gewebe hat, wurden die Patienten in unter und über 60 Jahre aufgeteilt. B) von den gleichen Patienten wurde auch RNA aus den leukämischen Blasten isoliert und das GDF15 Expressionsniveau nachgewiesen. Als Vergleich wurden mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut von gesunden Spendern genutzt.

Wie bereits von Hegab et al. gezeigt, konnte auch in unserer Patientenkohorte signifikant erhöhte GDF15-Proteinmengen nachgewiesen werden, welche sich interessanterweise nicht in der RNA-Expression widerspiegelt (Abbildung 5B). Die Ergebnisse der Expressionsanalyse mittels quantitativer PCR ergaben sogar signifikant geringere GDF15-Expressionsniveaus als in den gesunden Spendern. Diese Daten müssen mit einem größeren Kollektiv noch validiert werden. Ausgehend von der aktuellen Datenlage, stellt sich die Frage, ob GDF15 wirklich von den AML-Blasten oder möglicherweise von den Nischenzellen ins Blut sekretiert wird. Die Beantwortung dieser Frage ist Teil der laufenden Forschung.

3.3 Seneszenz in mesenchymalen Stromazellen

Die Beantwortung der Frage des GDF15-Ursprungs im leukämischen Plasma ist herausfordernd, da der Ursprung von sekretierten Zellen sehr vielfältig ist. Allein im Knochenmark gibt es eine Vielzahl an verschiedenen Zelltypen. Neben den Endothelzellen stehen auch mesenchymale Stromazellen (*mesenchymal stromal*

cells, MSCs) im Fokus der Forschung als potentielle Nischenzellen der AML. MSCs sind der Ursprung für Osteoblasten (Knochen), Chondrozyten (Knorpel) und Adipozyten (Fettgewebe) und können das Überleben und die Proliferation von AML-Zellen unterstützen¹⁴. Wie viele Zellarten, werden auch MSCs durch Seneszenz im Alter reguliert. Im Gegensatz zu Endothelzellen lassen sich MSCs mittels Plastikadhärenz aus murinem Knochenmark isolieren und für *in vitro* Experimente einsetzen. Während die MSCs aus jungen Mäusen sich problemlos in Adipozyten differenzieren ließen, war dies bei MSCs aus alten Mäusen nicht möglich, da diese nach kurzer Zeit *in vitro* die Proliferation einstellten und eine Aussaat zur Differenzierung nicht mehr möglich war. Eine β -Galaktosidasefärbung bestätigte dann unsere Vermutung, dass die MSCs aus alten Mäusen in die Seneszenz gegangen waren, wodurch eine Proliferation nicht mehr möglich war (Abb. 6A).

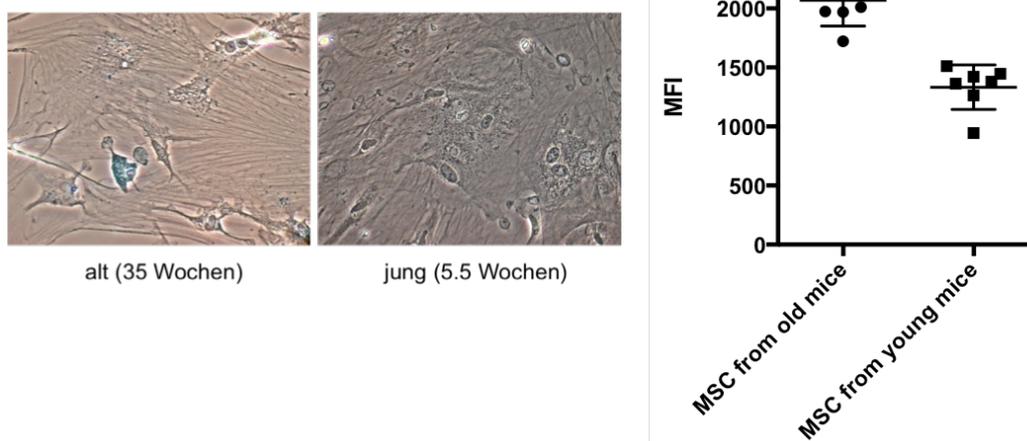


Abbildung 6: Seneszenznachweis in primären murinen MSCs. A) Die MSCs wurden mittels Plastikadhärenz aus murinem Knochenmark isoliert und kultiviert. Nach zwei Wochen zeigte sich eine deutlich schlechtere Proliferation in den Proben aus alten Mäusen im Vergleich zu jungen Mäusen. Eine β -Galaktosidasefärbung diente zum Nachweis von Seneszenz (blau). B) Zur Quantifizierung der Seneszenz wurden MSC aus alten und jungen Mäusen isoliert, für zwei Wochen kultiviert und mittels eines Durchflusszytometrie-basierten Assays analysiert.

Zur Quantifizierung der Seneszenz haben wir einen Durchflusszytometrie-basierten Assay etabliert, der zeigt, dass MSCs aus alten Mäusen (älter als 30 Wochen) im Vergleich zu MSCs aus jungen Mäusen (maximal 8 Wochen) eine verstärkte Seneszenz aufweisen (Abb. 6B). Aufgrund dieser erhöhten Seneszenz kann eine GDF15-Sekretion erwartet werden. Die Analyse der RNA-Niveaus in jungen und alten MSCs ist Gegenstand unserer aktuellen Forschung.

3.4 GDF15 als Immunregulator

Neben seiner Rolle in der Seneszenz wurde GDF15 auch als Immunregulator definiert. Normalerweise ist das Immunsystem in der Lage entartete Zellen zu identifizieren und zu eliminieren¹⁵. Diese Überwachung durch das Immunsystem können Tumorzellen umgehen (*immune escape*), indem sie sogenannte *immune checkpoint* Moleküle exprimieren. Diese regulieren im gesunden Gewebe die Dauer und Stärke der Immunantwort, wodurch sie wichtige Faktoren zur Aufrechterhaltung der Eigentoleranz des Immunsystems darstellen. GDF15 wurde erst kürzlich als Regulator der *immune checkpoint* Moleküle PD-1/PDL-1 identifiziert. PD-1 (*programmed cell death-1*) wird auf T-Zellen exprimiert, während PDL-1 als PD-1-Ligand auf antigen-präsentierenden Zellen bzw. Tumorzellen zu finden ist^{16,17}. In verschiedenen Tumorentitäten konnte gezeigt werden, dass GDF15 eine deutliche Relevanz für das *immune escape* der Tumorzellen hat^{16,18,19}. Zum Nachweis, dass GDF15 auch in AML einen *immune escape* begünstigt, haben wir einen Durchflusszytometrie-basierten *kill assay* durchgeführt. Hierbei werden mononukleäre Zellen eines gesunden Spenders mit AML-Zellen kultiviert und nach 24h der Anteil der toten AML-Zellen bestimmt.

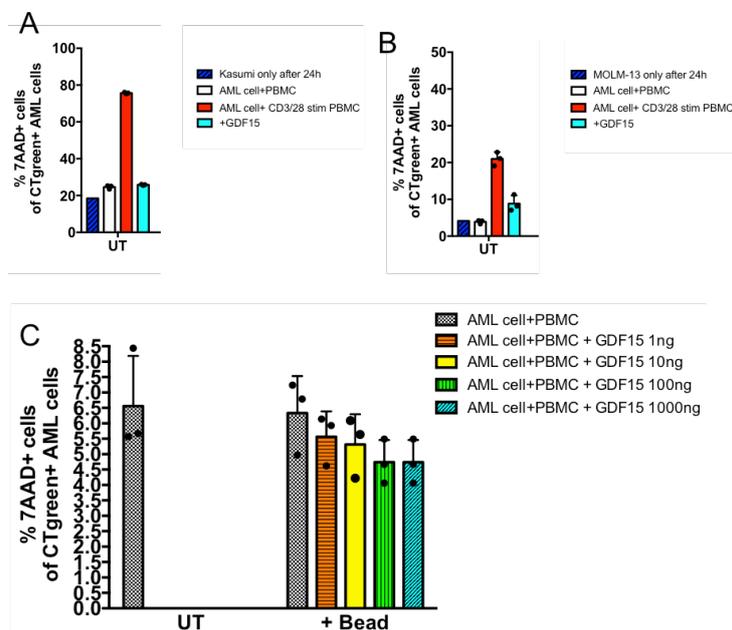


Abbildung 7: GDF15 zeigt immunregulatorische Wirkung. Die Kombination von mononukleären Zellen aus peripherem Blut (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) und zwei AML-Zelllinien A) Kasumi und B) Molm-13 zeigt eine deutliche Inhibition der zytotoxischen Kapazitäten der PBMCs auf AML-Zellen. Durch die Stimulation mit CD3/CD28 beads erreichen wir eine Aktivierung des Immunsystems, die sich in einem deutlichen Anstieg der toten AML-Zellen zeigt. Durch die Behandlung mit rekombinanten GDF15-Protein erreichen wir eine Reduktion dieses Effekts, welcher sich sogar konzentrationsabhängig darstellen lässt (C).

4. Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel dieses Projektes war es, die Nische der akuten myeloischen Leukämie zu identifizieren und die Kommunikation der AML-Zellen mit ihrem Mikromilieu zu entschlüsseln, damit neue Signalwege gefunden werden können, die ein therapeutisches Potential haben können. Die Grundlage dafür stellt unser Xenotransplantationsmodell mit immunsupprimierten Mäusen, welches wir erfolgreich durch die NSG-SGM3 Mäuse erweitern konnten. Dank dieser humanisierten Maus sind wir nun in der Lage einen Teil der primären AML-Patienten zu transplantieren und die Infiltration und Expansion der Zellen *in vivo* zu studieren. Mittels 3D-Visualisierung haben wir uns das Knochenmark unter AML-Infiltration anschauen können und haben die perivaskuläre Nische als primäres Mikromilieu für AML-Zellen identifiziert. Leider waren die Isolation der Endothelzellen und deren RNA-Sequenzierung technisch sehr herausfordernd, so dass wir uns bisher nur auf die Sequenzierung der AML-Zelllinie Molm13 konzentrieren konnten. Nichtsdestotrotz konnten wir in diesem Datensatz GDF15 identifizieren, einen Wachstumsfaktor, welcher eine Rolle als SASP- sowie als *immune checkpoint*-Regulator hat. Diese beiden Funktionen spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer AML und der Entwicklung einer Chemotherapieresistenz. Die bisherigen Daten zeigen vielversprechende Hinweise, dass GDF15 tatsächlich in die Regulation der AML *in vitro* aber auch *in vivo* spielt. Durch die Induktion der Seneszenz in den MSCs des Knochenmarks und durch die Inhibition der immunologischen Zellen kann sich die AML wichtige Wachstumsvorteile erschaffen und dadurch auch der Chemotherapie ausweichen. Die nächsten Schritte in diesem Projekt werden sich mit der Identifikation des GDF15-Ursprungs sowie dessen Rolle in der Seneszenzinduktion und Immunmodulation beschäftigen. Die hier präsentierten Daten haben bereits erfolgreich die Grundlage für einen Folgeantrag bei der Jackstädt-Stiftung gebildet. Wir erwarten daher, dass wir die Rolle von GDF15 detailliert charakterisieren und schon bald erfolgreich publizieren können.

5. Literatur

1. Döhner, H., Weisdorf, D. J. & Bloomfield, C. D. Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine* **373**, 1136–1152 (2015).
2. Behrmann, L., Wellbrock, J. & Fiedler, W. Acute Myeloid Leukemia and the Bone Marrow Niche—Take a Closer Look. *Front. Oncol.* **8**, (2018).
3. Krause, D. S., Scadden, D. T. & Preffer, F. I. The hematopoietic stem cell niche—home for friend and foe? *Cytometry B Clin Cytom* **84**, 7–20 (2013).
4. Meads, M. B., Gatenby, R. A. & Dalton, W. S. Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 665–674 (2009).

5. Vick, B. *et al.* An Advanced Preclinical Mouse Model for Acute Myeloid Leukemia Using Patients' Cells of Various Genetic Subgroups and In Vivo Bioluminescence Imaging. *PLoS One* **10**, (2015).
6. Cogle, C. R. *et al.* Functional Integration of Acute Myeloid Leukemia into the Vascular Niche. *Leukemia* **28**, 1978–1987 (2014).
7. Fiedler, W. *et al.* Vascular endothelial growth factor, a possible paracrine growth factor in human acute myeloid leukemia. *Blood* **89**, 1870–1875 (1997).
8. Zahiragic, L. *et al.* Bevacizumab reduces VEGF expression in patients with relapsed and refractory acute myeloid leukemia without clinical antileukemic activity. *Leukemia* **21**, 1310–1312 (2007).
9. Wischhusen, J., Melero, I. & Fridman, W. H. Growth/Differentiation Factor-15 (GDF-15): From Biomarker to Novel Targetable Immune Checkpoint. *Front Immunol* **11**, 951 (2020).
10. Hegab, H. M., El-Ghammaz, A. M. S., El-Razzaz, M. K. & Helal, R. A. A. Prognostic Impact of Serum Growth Differentiation Factor 15 Level in Acute Myeloid Leukemia Patients. *Indian J Hematol Blood Transfus* **37**, 37–44 (2021).
11. Yang, S. *et al.* Leukemia cells remodel marrow adipocytes via TRPV4-dependent lipolysis. *Haematologica* **105**, 2572–2583 (2020).
12. Campisi, J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol* **75**, 685–705 (2013).
13. Sun, Y. *et al.* Treatment-induced damage to the tumor microenvironment promotes prostate cancer therapy resistance through WNT16B. *Nat Med* **18**, 1359–1368 (2012).
14. Brenner, A. K., Nepstad, I. & Bruserud, Ø. Mesenchymal Stem Cells Support Survival and Proliferation of Primary Human Acute Myeloid Leukemia Cells through Heterogeneous Molecular Mechanisms. *Front Immunol* **8**, 106 (2017).
15. Janakiram, M., Pareek, V., Cheng, H., Narasimhulu, D. M. & Zang, X. Immune checkpoint blockade in human cancer therapy: lung cancer and hematologic malignancies. *Immunotherapy* **8**, 809–819 (2016).
16. Peng, H., Li, Z., Fu, J. & Zhou, R. Growth and differentiation factor 15 regulates PD-L1 expression in glioblastoma. *Cancer Manag Res* **11**, 2653–2661 (2019).
17. Pardoll, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer* **12**, 252–264 (2012).
18. Zhou, Z. *et al.* Growth differentiation factor-15 suppresses maturation and function of dendritic cells and inhibits tumor-specific immune response. *PLoS One* **8**, e78618 (2013).
19. Ratnam, N. M. *et al.* NF- κ B regulates GDF-15 to suppress macrophage surveillance during early tumor development. *J Clin Invest* **127**, 3796–3809 (2017).