

Therapeutische Evaluation einer GLI-Blockade in der akuten myeloischen Leukämie

1. Einleitung

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine aggressive hämatologische Neoplasie, deren Prognose insbesondere bei älteren Patientinnen und Patienten trotz erheblicher therapeutischer Fortschritte weiterhin unbefriedigend ist. Die Identifikation neuer zielgerichteter Therapieansätze sowie die Entwicklung wirksamer Kombinationstherapien stellen daher weiterhin wichtige Herausforderungen der AML-Forschung dar.

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass der Hedgehog-Signalweg und insbesondere dessen Effektoren, die GLI-Transkriptionsfaktoren, eine wichtige Rolle in der AML-Biologie spielen und einen potenziell therapeutisch nutzbaren Angriffspunkt darstellen.

Neben dem Anthelminthikum Mebendazol (MBZ), das von unserer Arbeitsgruppe als potenter Inhibitor der GLI-Aktivität identifiziert wurde, gibt es Hinweise aus der Literatur, dass auch das Anthelminthikum Niclosamid (NSM) hemmend auf den Hedgehog/GLI-Signalweg wirken kann. Ziel des beantragten Projekts war daher die präklinische Untersuchung einer kombinierten Behandlung mit MBZ und NSM in AML-Modellen. Hierzu sollten verschiedene funktionelle in-vitro-Analysen durchgeführt werden, um mögliche synergistische Effekte beider Substanzen zu identifizieren.

Im Verlauf des Projekts zeigte sich jedoch, dass die erwarteten synergistischen Effekte der Wirkstoffkombination in den untersuchten AML-Zelllinien nur begrenzt nachweisbar waren. Da sich in den untersuchten AML-Zelllinien keine ausgeprägten synergistischen Effekte der Kombination aus MBZ und NSM zeigten, wurde untersucht, ob bestimmte biologische Eigenschaften von AML-Zellen das Ansprechen auf eine GLI-Inhibition beeinflussen könnten. Da sowohl der Hedgehog/GLI-Signalweg als auch GFI1 mit Stammzeleigenschaften und myeloider Differenzierung assoziiert sind, wurde GFI1 als möglicher Modulator des Therapieansprechens näher untersucht. Ein Schwerpunkt lag auf der Untersuchung von GFI1-assoziierten genetischen Varianten (GFI1-36N) sowie deren Zusammenhang mit immunologischen Charakteristika der AML, insbesondere im Hinblick auf Makrophagen-assoziierte Phänotypen.

Der vorliegende Bericht fasst die im Förderzeitraum durchgeführten Arbeiten, die erzielten Ergebnisse sowie die daraus abgeleiteten Perspektiven für zukünftige Forschungsarbeiten zusammen.

2. Arbeiten zu Mebendazol und Niclosamid

2.1. Methoden

Zur Untersuchung möglicher synergistischer antileukämischer Effekte einer kombinierten Behandlung mit Mebendazol (MBZ) und Niclosamid (NSM) wurden Proliferationsassays in verschiedenen AML-Zelllinien durchgeführt. Hierzu wurden zunächst die Effekte von der neuen Substanz NSM als Monotherapie über einen Zeitraum von drei Tagen und 7 Tagen analysiert und konzentrationsabhängige Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt. Auf Basis dieser Daten wurden die jeweiligen IC50-Werte der Einzelwirkstoffe bestimmt. Anschließend wurden MBZ und NSM in verschiedenen Konzentrationsverhältnissen kombiniert und hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Zellproliferation untersucht. Die Bewertung möglicher synergistischer, additiver oder antagonistischer Effekte erfolgte anhand der Chou-Talalay-Methode durch Berechnung des Combination Index (CI). Dabei gelten CI-Werte < 1 als Hinweis auf synergistische Effekte, während CI-Werte von etwa 1 auf additive und Werte > 1 auf antagonistische Wirkungen hindeuten.

Die Untersuchungen wurden in mehreren AML-Zelllinien durchgeführt, darunter MOLM-13, OCI-AML5, THP-1 und HL60, um mögliche zelllinienspezifische Unterschiede im Ansprechen auf die Kombinationstherapie zu erfassen. Die Proliferations-Assays wurden mithilfe des ViCell XR Cell Counters (Beckman Coulter) auf Grundlage der Trypanblau-Methode durchgeführt werden.

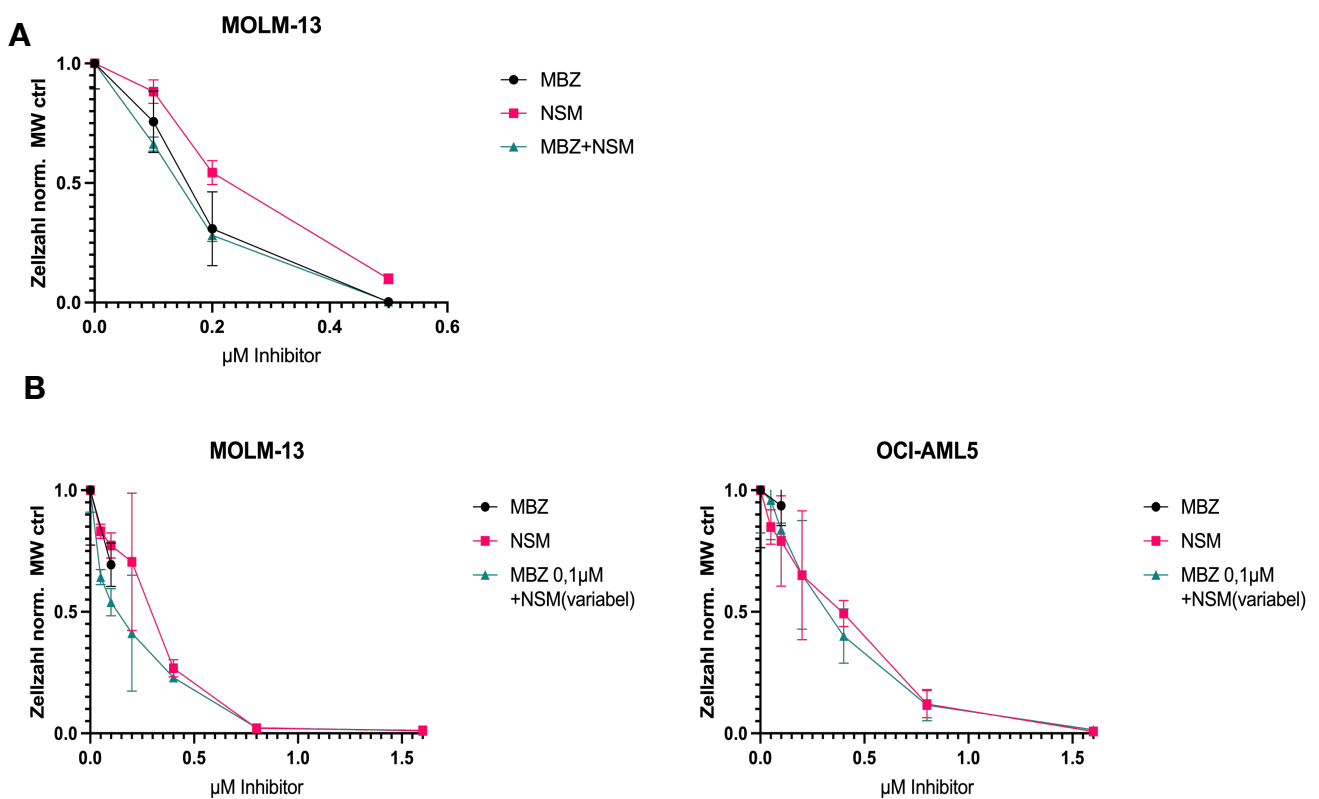
2.2. Ergebnisse

Erste Proliferationsassays mit einer begrenzten Anzahl von Wirkstoffkonzentrationen dienten als Vorversuche zur Abschätzung möglicher Interaktionen zwischen MBZ und NSM. Dabei zeigte sich eine leichte Tendenz zu verstärkten antiproliferativen Effekten der Kombinationstherapie im Vergleich zu den jeweiligen Einzelbehandlungen (Abbildung 1A). Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden weitere Versuchsreihen mit einem erweiterten Konzentrationspektrum für NSM durchgeführt. Die MBZ-Konzentration wurde dabei konstant gehalten, da aufgrund der bereits bei niedrigen Konzentrationen ausgeprägten Wirksamkeit von MBZ die Gefahr bestand, potenzielle zusätzliche Effekte von NSM zu überdecken (Abbildung 1B). Anhand der so gewonnenen Dosis-Wirkungs-Kurven wurden

die IC₅₀-Werte für NSM bestimmt. Diese IC₅₀-Werte decken sich mit den Werten, die in Chae et al. 2017 publiziert wurden. (Abbildung 1C).

Auf Grundlage der im Rahmen dieser Arbeiten bestimmten IC₅₀-Werte für Niclosamid sowie der bereits vorliegenden IC₅₀-Werte für Mebendazol wurden die Wirkstoffkonzentrationen für die Kombinationsversuche so gewählt, dass sie in definierten Verhältnissen zu den jeweiligen IC₅₀-Werten standen. Die resultierenden Daten wurden anschließend mittels der Chou-Talalay-Methode analysiert, um mögliche Wechselwirkungen zwischen beiden Substanzen zu bewerten.

Hierzu wurde für jede Kombination der Combination Index (CI) berechnet. In den durchgeführten Experimenten konnten jedoch keine synergistischen Effekte der Kombination aus Mebendazol und Niclosamid nachgewiesen werden, da die berechneten CI-Werte überwiegend im additiven bis antagonistischen Bereich lagen (Abbildung 1D). Dies wird auch in den entsprechenden Dosis-Wirkungs-Kurven sichtbar (Abbildung 1E).



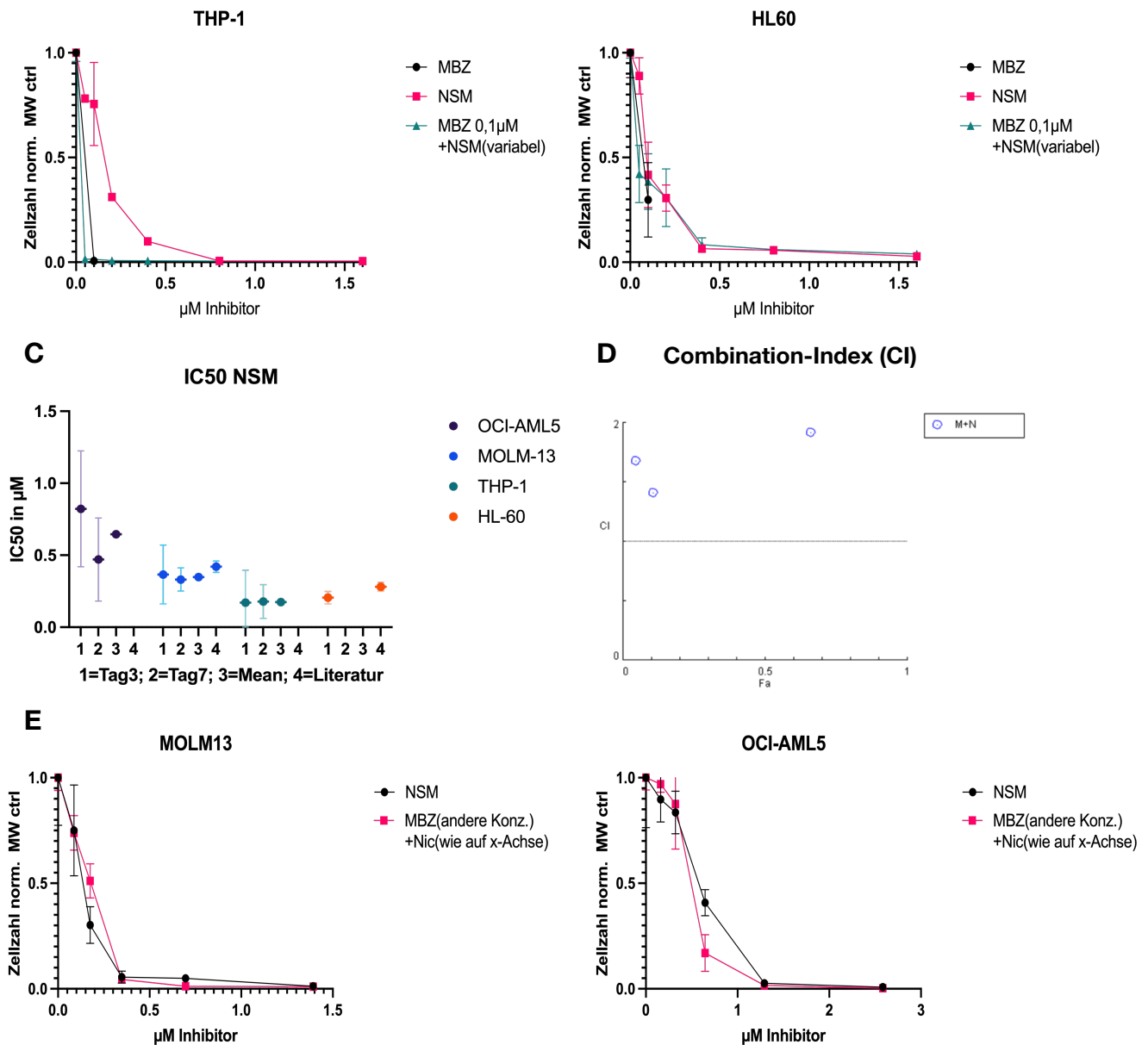


Abbildung 1 Analyse der Kombinationstherapie von Mebendazol (MBZ) und Niclosamid (NSM)

(A), (B), (E) Dosis-Wirkungs-Kurven der Kombinationstherapie aus MBZ und NSM in verschiedenen AML-Zelllinien. Die dargestellte Zellviabilität wurde auf die unbehandelte Kontrollbedingung normiert und als Mittelwert technischer Triplikate dargestellt. Die Zellzahlbestimmung erfolgte nach sieben Tagen Inkubation mit einer Restimulation nach drei Tagen.

(C) Vergleich der berechneten IC_{50} -Werte der untersuchten Zelllinien nach drei bzw. sieben Tagen Behandlung mit den in Chae et al. (2017) beschriebenen IC_{50} -Werten.

(D) Exemplarischer Combination-Index-(CI)-Plot für die AML-Zelllinie OCI-AML5. CI-Werte um 1 weisen auf additive Effekte hin, während Werte deutlich über 1 auf antagonistische Wechselwirkungen zwischen MBZ und NSM hindeuten. Zur Erstellung der CI-Plots wurde die von Dr. Chou entwickelte Software COMPUSYN verwendet

2.3. Konsequenzen für die Projektdurchführung

Die nur begrenzt nachweisbaren synergistischen Effekte der Kombination aus MBZ und NSM in den untersuchten AML-Zelllinien hatten eine Anpassung der weiteren Projektstrategie zur Folge. Statt der ursprünglich im Vordergrund stehenden Bewertung kombinatorischer Wirkungen rückte zunehmend die Frage in den Fokus, welche biologischen Faktoren das Ansprechen auf eine GFI-Inhibition beeinflussen. Damit verlagerte sich der Schwerpunkt auf eine stärker mechanistisch ausgerichtete Analyse, die darauf abzielt, molekulare Determinanten der Therapiesensitivität zu identifizieren.

Vor diesem Hintergrund wurde GFI1 als potenzieller Modulator des Therapieansprechens in den Mittelpunkt der weiteren Analysen gestellt. Ausschlaggebend hierfür waren insbesondere die bekannte Funktion von GFI1 in Prozessen der myeloiden Differenzierung sowie seine Verbindung zu Stammzell-Prozessen (Beauchemin/Möröy 2020). Im Rahmen dessen wurden GFI1-assoziierte genetische Varianten, insbesondere GFI1-36N, systematisch untersucht und in Beziehung zu immunologischen Eigenschaften der AML gesetzt, mit einem besonderen Fokus auf Makrophagen-assoziierte Phänotypen.

3. Identifikation biologischer Determinanten

3.1. Die Rolle von GFI in der myeloiden Differenzierung

GFI1 (Growth Factor Independence 1) ist ein Transkriptionsfaktor, der eine wichtige Rolle in der Hämatopoese spielt und insbesondere die Entwicklung myeloischer Zellen reguliert. Dabei wirkt GFI1 als Transkriptionsrepressor und kontrolliert die Expression von Genen, die für die Selbsterneuerung hämatopoetischer Vorläuferzellen sowie für deren Differenzierung relevant sind (Möröy/Khandanpour 2019).

Eine zentrale Funktion von GFI1 besteht in der Förderung der granulozytären Differenzierung (Hock et al. 2003). Gleichzeitig hemmt GFI1 die Entwicklung monozytärer Zellpopulationen. Entsprechend führt ein Verlust oder eine verminderte Aktivität von GFI1 zu Störungen der normalen Myelopoese, die mit einer Anreicherung unreifer Vorläuferzellen sowie Veränderungen von Monozyten- und Makrophagenpopulationen einhergehen können (Khandanpour et al. 2011).

Auch bei myeloischen Neoplasien scheint GFI1 eine wichtige Rolle zu spielen. Eine verminderte GFI1-Expression wurde mit einer beschleunigten Leukämie-Entwicklung und einer ungünstigeren Prognose bei AML in Verbindung gebracht (Höhnes et al. 2016). Darüber hinaus wurde beschrieben, dass die funktionelle SNP-Variante GFI1-36N mit

einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von AML und MDS assoziiert ist (Möröy/Khandanpour 2019).

Da sowohl GFI1 als auch der Hedgehog/GLI-Signalweg an der Regulation von Stammzeleigenschaften und Differenzierungsprozessen beteiligt sind, wurde GFI1 im weiteren Verlauf des Projekts als möglicher Einflussfaktor auf das Ansprechen gegenüber einer GLI-Inhibition untersucht. Der Fokus lag dabei zunächst auf der Analyse der GFI1-36N-Variante in klinischen Datensätzen. Hierbei handelt es sich um einen Einzelnukleotid-Polymorphismus (single nucleotide polymorphism, SNP), der mit einer verminderten Repressoraktivität von GFI1 assoziiert ist. In der Literatur wird die Prävalenz dieser Variante bei AML-Patienten mit etwa 10–15 % angegeben (Vorwerk et al. 2022). Die Auswertung der Genexpressionsdaten einer großen AML-Kohorte zeigte, dass die Expression von GFI1 invers mit der Expression verschiedener anti-phagozytotischer Moleküle korreliert (Abbildung 2). Dies deutete darauf hin, dass eine verminderte GFI1-Aktivität – sei es durch niedrige GFI1-Expression oder durch das Vorliegen der GFI1-36N-Variante – mit einer verstärkten Expression von Mechanismen zur Vermeidung der Immunerkennung und Phagozytose verbunden sein könnte. Aus dieser Beobachtung ergab sich die Hypothese, dass AML-Zellen mit niedriger GFI1-Aktivität einen charakteristischen immunologischen Phänotyp aufweisen und möglicherweise besonders von einer therapeutischen Blockade anti-phagozytotischer Signalwege profitieren könnten. Zudem wurde GFI1 in einem genomweiten CRISPR-Screening als neues regulatorisches Protein für die Phagozytose entdeckt (Kamber et al. 2021). Vor diesem Hintergrund wurden im weiteren Verlauf des Projekts der GFI1-Status sowie Makrophagen-assoziierte immunologische Eigenschaften näher untersucht.

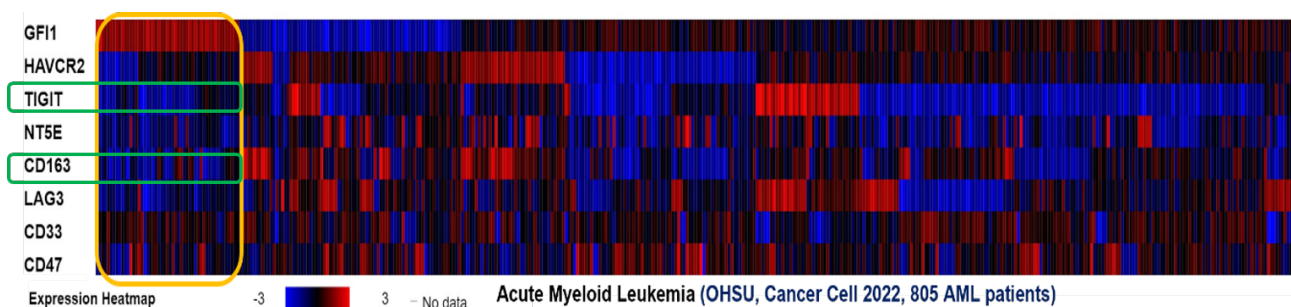


Abbildung 2 Korrelation von GFI1 mit anti-phagozytotischen Markern

Darstellung der Korrelation zwischen der GFI1-Expression und der Expression ausgewählter anti-phagozytotischer Marker auf Grundlage öffentlich verfügbarer AML-Datensätze aus dem cBioPortal. Die Analyse zeigt eine inverse Korrelation zwischen der GFI1-Expression und mehreren anti-phagozytotischen Proteinen, wobei niedrigere GFI1-Expressionswerte mit einer erhöhten Expression dieser Marker assoziiert sind.

3.2. Methoden

3.2.1 Genotypisierung

Für das GFI1-36N-Screening wurden Knochenmarksproben von AML-Patienten untersucht. Die mononukleären Zellen des Knochenmarks wurden zunächst mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Im Anschluss erfolgte die RNA-Extraktion sowie die Synthese von cDNA. Die Bestimmung der GFI1-36N-Variante wurde anschließend mittels TaqMan-basierter quantitativer PCR durchgeführt. Hierbei wurden zwei unterschiedliche fluoreszenzmarkierte Sonden eingesetzt: eine FAM-markierte Sonde zur spezifischen Detektion der GFI1-36N-Variante sowie eine VIC-markierte Sonde, die das Wildtyp-Allel erkennt. In den untersuchten Proben zeigte sich ein Signal der FAM-Sonde ausschließlich in den GFI1-36N-positiven Fällen. Das VIC-Signal war in allen Proben nachweisbar, fiel jedoch in den Proben mit GFI1-36N-Variante im Vergleich zu Wildtyp-Proben geringer aus (Abbildung 3A). Dies entspricht der heterozygoten Ausprägung der Keimbahnmutation, bei der neben dem mutierten weiterhin auch das Wildtyp-Allel vorliegt.

3.2.2 Immunphänotypisierung

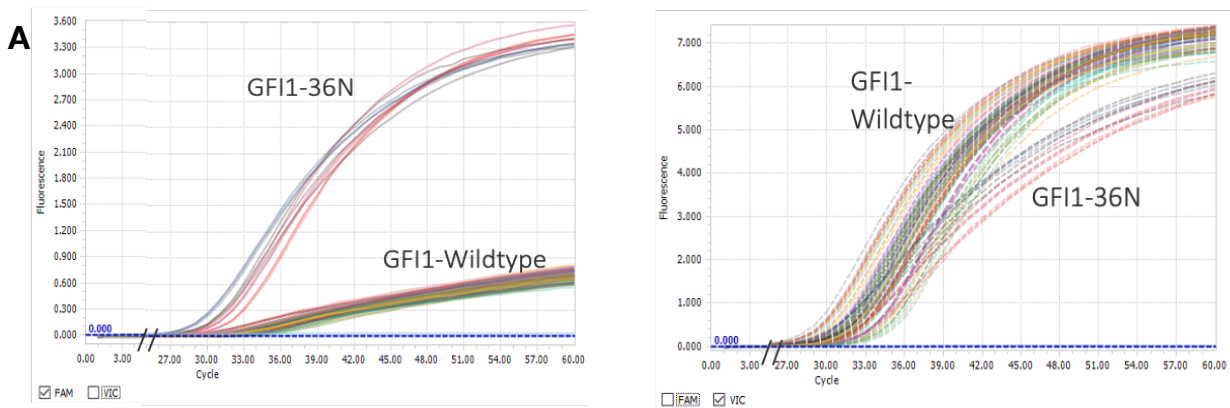
Zur weiterführenden Charakterisierung möglicher immunologischer Unterschiede zwischen GFI1-36N-mutierten und Wildtyp-AML-Proben wurden klinische und molekulare Daten der untersuchten Patientenkohorte herangezogen, um eine passende Vergleichsgruppe zu erstellen. Auf dieser Grundlage konnten GFI1-36N-positive Patienten mit GFI1-Wildtyp-Patienten hinsichtlich Alter, Geschlecht, ELN-Risikoklassifikation (2022) sowie relevanter molekularer und zytogenetischer Aberrationen vergleichbar gegenübergestellt werden.

Für die immunphänotypische Analyse wurden sowohl Knochenmark- als auch periphere Blutproben verwendet. Die mononukleären Zellen wurden isoliert, kryokonserviert und nach dem Auftauen mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper gegen ausgewählte Oberflächen- und intrazelluläre Marker gefärbt. Die Messung erfolgte anschließend mittels Durchflusszytometrie.

Im Fokus der Analyse stand die Charakterisierung monozytärer und makrophagen-assoziiertes Zellpopulationen im Vergleich zwischen den beiden Patientenkollektiven. Die Auswertung erfolgte anhand eines standardisierten Gating-Schemas (Abbildung 3B).

3.2.3 Phagozytose-Assay

Zur funktionellen Validierung der in den vorherigen Analysen erhobenen Befunde wurde ein Phagozytose-Assay mit primären Patientenmaterialien etabliert, da für die Untersuchung der GFI1-36N-abhängigen Effekte keine geeigneten Zelllinienmodelle in ausreichender Nähe zur physiologischen Situation verfügbar sind. Das System basiert daher auf der Verwendung primärer Immunzellen aus peripherem Blut bzw. Knochenmarkaspiraten sowie ergänzend auf AML-Zelllinien mit definiertem GFI1-36N-Status. Zunächst wurden Monozyten und Makrophagen aus den Patientenproben isoliert und anschließend unter standardisierten Bedingungen in einen Differenzierungszustand überführt. Parallel wurden auch Ansätze geprüft, diese Differenzierung in zukünftigen Experimenten zu reduzieren oder zu umgehen. Für die funktionelle Testung wurden die Effektorzellen (Makrophagen) mit CellTracker Green markiert. Als Zielzellen dienten sowohl autologe AML-Blasten aus denselben Patientenproben als auch AML-Zelllinien mit bzw. ohne GFI1-36N-Variante. Die Zielzellen wurden mit dem pH-sensitiven Farbstoff pHrodo markiert, der bei Aufnahme in die saure Umgebung phagozytotischer Vesikel eine Zunahme der Fluoreszenzintensität zeigt. Zusätzlich wurde DAPI eingesetzt, um tote Zellen zu markieren und diese bei der quantitativen Auswertung zu berücksichtigen. Im Anschluss erfolgte eine Ko-Kultur von Effektor- und Zielzellen. Die Quantifizierung der Phagozytoseaktivität wurde mittels Durchflusszytometrie durchgeführt und erlaubte eine vergleichende funktionelle Analyse der Interaktion zwischen Makrophagen und AML-Zellen in Abhängigkeit vom GFI1-Status sowohl in autologen Systemen als auch in definierten Zelllinienmodellen (Abbildung 3C).



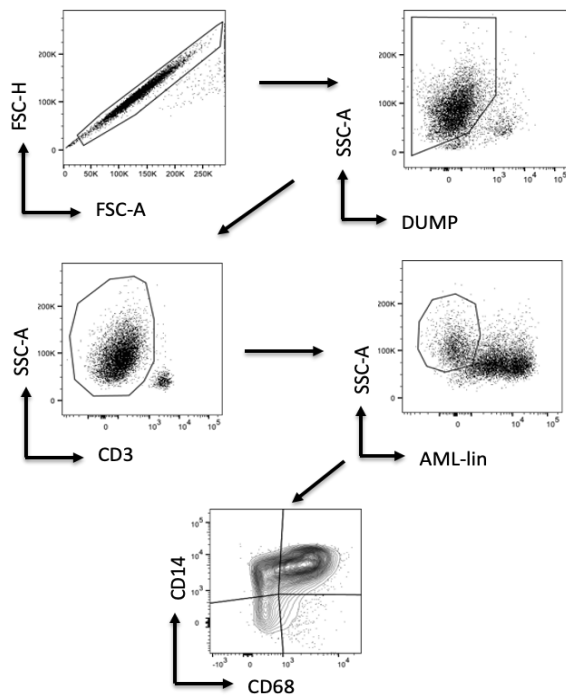
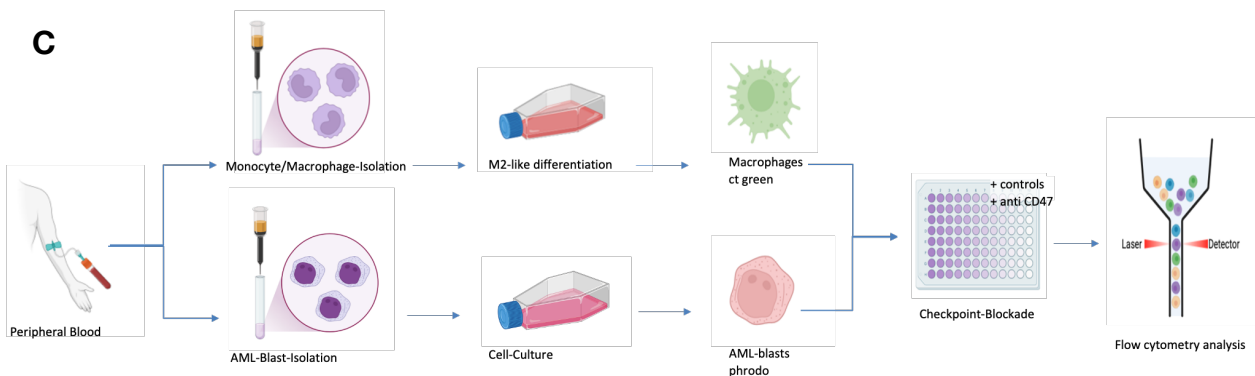
B**C**

Abbildung 3 Methodischer Workflow zur Untersuchung GFI1-assoziiertes immunologischer Veränderungen

(A) Repräsentative Amplifikationskurven des TaqMan-qPCR-Screenings zur Identifikation der GFI1-36N-Variante. Links: FAM-markierte Sonde für das GFI1-36N-Allel; Rechts: VIC-markierte Sonde für das GFI1-Wildtyp-Allel

(B) Gating-Strategie zur Identifikation und Analyse monozytärer und makrophagen-assoziiertes Zellpopulationen mittels Durchflusszytometrie.

(C) Schematische Darstellung des Phagozytose-Assays. Nach siebentägiger Differenzierung der aus Blut- oder Knochenmarkproben isolierten Monozyten und Makrophagen erfolgte die Ko-Kultur mit AML-Zelllinien oder primären AML-Blasten. Die Auswertung der Phagozytoseaktivität erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Zusammenhang von GFI1-Status und klinischen bzw. molekularen Merkmalen

Im Rahmen des qPCR-basierten Screenings wurden insgesamt 119 AML-Patientenproben analysiert. Bei etwa 10% konnte die GFI1-36N-Variante nachgewiesen werden. Die beobachtete Prävalenz entspricht damit den in der Literatur beschriebenen Häufigkeiten von etwa 10–15 % (Vorwerk et al. 2022).

Zur weiteren Charakterisierung wurden klinische und molekulare Parameter zwischen GFI1-36N-positiven und GFI1-Wildtyp-Patienten verglichen. Dabei zeigten sich keine relevanten Unterschiede hinsichtlich Alter, Geschlecht, Blastenanteil, ELN-Risikoklassifikation sowie der Verteilung relevanter molekularer Mutationen und zytogenetischer Aberrationen.

Darüber hinaus wurde eine explorative Gesamtüberlebensanalyse durchgeführt. Aufgrund der geringen Anzahl GFI1-36N-positiver Patienten war die Aussagekraft dieser Analyse jedoch eingeschränkt. Im Gegensatz zu früheren Berichten konnte in der vorliegenden Kohorte keine relevante Verschlechterung des Gesamtüberlebens für Patienten mit GFI1-36N nachgewiesen werden. Innerhalb der ersten zwölf Monate nach Diagnosestellung zeigte sich jedoch ein Trend zu einem ungünstigeren Überleben in der GFI1-36N-Gruppe.

3.3.2 GFI1-assoziierte Unterschiede im immunologischen Phänotyp

Zur Untersuchung möglicher immunologischer Unterschiede wurde eine Kohorte von GFI1-36N-positiven Patienten mit einer hinsichtlich Alter, Geschlecht und ELN-Risikoklassifikation gematchten GFI1-Wildtyp-Kohorte verglichen. Die Analyse erfolgte mittels multiparametrischer Durchflusszytometrie in peripherem Blut und Knochenmark. Die Analysen zeigten eine verstärkte Ausprägung monozyten-abgeleiteter Makrophagen bei Vorliegen der GFI1-36N-Variante, sowie eine erhöhte Expression von M2-assoziierten Markern auf dieser Population. Die Befunde deuten ebenfalls auf eine reduzierte Antigenpräsentationskapazität der GFI1-36N-assoziierten Zellpopulationen hin. Da M2-assoziierte Makrophagen als potenziell therapeutisch relevante Zielpopulation identifiziert wurden, erfolgte eine weiterführende Analyse immunregulatorischer Oberflächenmarker. Hierbei zeigte sich eine erhöhte Expression von ein paar Immuncheckpoint-Molekülen im Vergleich zur Wildtyp-Kohorte, welche als potenzielle therapeutische Zielstrukturen für weiterführende Untersuchungen identifiziert werden konnten.

3.3.3 Funktionelle Konsequenzen der GFI1-Variabilität

Basierend auf den immunphänotypischen Befunden wurde untersucht, ob die identifizierten Zielstrukturen auch funktionelle Auswirkungen auf die Phagozytoseaktivität von Makrophagen haben könnten. Frühere Arbeiten konnten bereits zeigen, dass eine kombinierte Blockade von TIGIT und CD47 die antikörperabhängige Phagozytose von AML-Zellen verstärken kann. Eigene Vorversuche in AML-Zelllinien bestätigten diese Beobachtung und zeigten eine gesteigerte Phagozytoserate unter kombinierter Behandlung mit Anti-TIGIT- und Anti-CD47-Antikörpern (Brauneck et al. 2022). Zur Überprüfung, ob Patienten mit GFI1-36N von einem solchen Therapieansatz profitieren könnten, wurde ein neuartiger Phagozytose-Assay auf Basis primärer Patientenproben etabliert. Die Etablierung des Modells erwies sich als technisch anspruchsvoll, da die Generierung funktioneller Makrophagen aus primären AML-Proben durch die ausgeprägte Heterogenität der Zellpopulationen erschwert wurde. Erste funktionelle Untersuchungen konnten bei drei GFI1-36N-Patient:innen und drei gematchten Wildtyp-Patient:innen durchgeführt werden. Aufgrund der geringen Fallzahl lassen diese Ergebnisse derzeit keine belastbaren Schlussfolgerungen zu. Weitere Untersuchungen mit größeren Patientenkollektiven und optimierten Kulturbedingungen sind erforderlich, um die Beobachtungen zu validieren.

3.4. Zusammenfassung

Da sich in den AML-Zelllinien keine ausgeprägten synergistischen Effekte der Kombination aus MBZ und NSM nachweisen ließen, wurde die Identifikation biologischer Determinanten des Therapieansprechens als alternatives Arbeitspaket verfolgt. Dabei konnte die GFI1-36N-Variante bei etwa 10% der untersuchten AML-Patienten nachgewiesen werden. Klinische und molekulare Basisparameter unterschieden sich nicht signifikant zwischen GFI1-36N-positiven und Wildtyp-Patienten.

Die immunphänotypische Analyse zeigte jedoch deutliche Unterschiede im myeloiden Kompartiment.

Auf Grundlage dieser Befunde wurde ein funktioneller Phagozytose-Assay mit primären Patientenproben etabliert. Obwohl die ersten Ergebnisse aufgrund der geringen Fallzahl noch vorläufig sind, stellen sie eine wichtige Grundlage für zukünftige Untersuchungen dar. Insgesamt identifizieren die erhobenen Daten GFI1-36N als Marker eines veränderten immunologischen Phänotyps und liefern Hinweise auf potenzielle neue immuntherapeutische Angriffspunkte bei AML.

4. Diskussion und Ausblick

Die im Rahmen dieses Projekts durchgeführten Untersuchungen konnten die ursprünglich angenommene ausgeprägte Synergie zwischen MBZ und NSM in AML-Zelllinien nicht bestätigen. Die daraus resultierende Fokussierung auf mögliche biologische Determinanten des Therapieansprechens erwies sich jedoch als wertvoll und führte zur Identifikation neuer Fragestellungen mit potenzieller translationaler Relevanz.

Insbesondere die Untersuchungen zur GFI1-36N-Variante lieferten Hinweise auf einen veränderten immunologischen Phänotyp bei betroffenen AML-Patienten. Während sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich klinischer Basischarakteristika oder molekularer Risikofaktoren zeigten, konnten deutliche Veränderungen innerhalb monozytärer und makrophagen-assoziiierter Zellpopulationen nachgewiesen werden.

Die funktionellen Untersuchungen mittels neu etablierter Phagozytose-Assays befinden sich noch in einem frühen Stadium. Die bislang erhobenen Daten zeigen, dass die zugrunde liegenden Mechanismen komplexer sind als zunächst angenommen und weiterer Aufklärung bedürfen. Insbesondere wird es wichtig sein zu verstehen, wie GFI1-abhängige Veränderungen die Funktion myeloider Immunzellen beeinflussen und ob sich daraus therapeutisch nutzbare Angriffspunkte ableiten lassen. Langfristig soll untersucht werden, ob Patienten mit GFI1-36N oder niedriger GFI1-Expression von spezifischen immunmodulatorischen Therapiestrategien profitieren könnten.

Die Arbeiten zu GFI1 erfolgen in enger Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Khandanpour am Universitären Cancer Center Schleswig-Holstein (UCCSH). Während im Rahmen des vorliegenden Projekts klinische Proben und patientenbasierte Analysen im Mittelpunkt standen, werden in der Kooperationsgruppe ergänzende Untersuchungen in präklinischen Mausmodellen durchgeführt. Die Zusammenführung beider Datensätze wird derzeit vorbereitet und soll die Grundlage für eine gemeinsame wissenschaftliche Publikation bilden.

Abschließend möchte ich mich herzlich bei der Hamburger Krebsgesellschaft für die Förderung dieses Projekts bedanken. Die Unterstützung hat wesentlich dazu beigetragen, die beschriebenen Arbeiten durchzuführen und neue wissenschaftliche Fragestellungen zu entwickeln. Mein besonderer Dank gilt meinen Betreuerinnen, insbesondere Franziska Brauneck, Franziska Westendorf und Jasmin Wellbrock, aber auch unseren Kooperationspartnern am UCCSH im Rahmen des CONNECT Grants für ihre fachliche Unterstützung sowie allen Mitgliedern des Labors für die angenehme Zusammenarbeit und ihre wertvolle Hilfe bei der Durchführung der Experimente.

5. Quellen

- Beauchemin H, Möröy T. Multifaceted Actions of GFI1 and GFI1B in Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal and Lineage Commitment. *Front Genet.* 2020 Oct 26;11:591099. doi: 10.3389/fgene.2020.591099. PMID: 33193732; PMCID: PMC7649360.
- Brauneck F, Fischer B, Witt M, Muschhammer J, Oelrich J, da Costa Avelar PH, Tsoka S, Bullinger L, Seubert E, Smit DJ, Bokemeyer C, Ackermann C, Wellbrock J, Haag F, Fiedler W. TIGIT blockade repolarizes AML-associated TIGIT+ M2 macrophages to an M1 phenotype and increases CD47-mediated phagocytosis. *J Immunother Cancer.* 2022 Dec;10(12):e004794. doi: 10.1136/jitc-2022-004794. PMID: 36549780; PMCID: PMC9791419.
- Chae HD, Cox N, Dahl GV, Lacayo NJ, Davis KL, Capolicchio S, Smith M, Sakamoto KM. Niclosamide suppresses acute myeloid leukemia cell proliferation through inhibition of CREB-dependent signaling pathways. *Oncotarget.* 2017 Dec 31;9(4):4301-4317. doi: 10.18632/oncotarget.23794. PMID: 29435104; PMCID: PMC5796975.
- Hock H, Hamblen MJ, Rooke HM, Traver D, Bronson RT, Cameron S, Orkin SH. Intrinsic requirement for zinc finger transcription factor Gfi-1 in neutrophil differentiation. *Immunity.* 2003 Jan;18(1):109-20. doi: 10.1016/s1074-7613(02)00501-0. PMID: 12530980.
- Hönes JM, Botezatu L, Helness A, Vadnais C, Vassen L, Robert F, Hergenhan SM, Thivakaran A, Schütte J, Al-Matary YS, Lams RF, Fraszczak J, Makishima H, Radivoyevitch T, Przychodzen B, da Conceição Castro SV, Görgens A, Giebel B, Klein-Hitpass L, Lennartz K, Heuser M, Thiede C, Ehninger G, Dührsen U, Maciejewski JP, Möröy T, Khandanpour C. GFI1 as a novel prognostic and therapeutic factor for AML/MDS. *Leukemia.* 2016 Jun;30(6):1237-45. doi: 10.1038/leu.2016.11. Epub 2016 Feb 5. PMID: 26847026.
- Kamber RA, Nishiga Y, Morton B, Banuelos AM, Barkal AA, Vences-Catalán F, Gu M, Fernandez D, Seoane JA, Yao D, Liu K, Lin S, Spees K, Curtis C, Jerby-Arnon L, Weissman IL, Sage J, Bassik MC. Inter-cellular CRISPR screens reveal regulators of cancer cell phagocytosis. *Nature.* 2021 Sep;597(7877):549-554. doi: 10.1038/s41586-021-03879-4. Epub 2021 Sep 8. PMID: 34497417; PMCID: PMC9419706.
- Khandanpour C, Kosan C, Gaudreau MC, Dührsen U, Hébert J, Zeng H, Möröy T. Growth factor independence 1 protects hematopoietic stem cells against apoptosis but also prevents the development of a myeloproliferative-like disease. *Stem Cells.* 2011 Feb;29(2):376-85. doi: 10.1002/stem.575. PMID: 21732494.
- Möröy T, Khandanpour C. Role of GFI1 in Epigenetic Regulation of MDS and AML Pathogenesis: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Front Oncol.* 2019 Aug 27;9:824. doi: 10.3389/fonc.2019.00824. PMID: 31508375; PMCID: PMC6718700.
- Vorwerk J, Sun K, Frank D, Neumann F, Hüve J, Budde PM, Liu L, Xie X, Patnana PK, Ahmed HMM, Opalka B, Lenz G, Jayavelu AK, Khandanpour C. Presence of the *GFI1-36N* single nucleotide polymorphism enhances the response of *MLL-AF9* leukemic cells to CDK4/6 inhibition. *Front Oncol.* 2022 Aug 8;12:903691. doi: 10.3389/fonc.2022.903691. PMID: 36003783; PMCID: PMC9393725.