

Catana Allert

Dr. med.

Targeting hematopoietic niche-related mechanisms to overcome therapy resistance in Acute myeloid leukemia

Fach/Einrichtung: Innere Medizin

Doktorvater: Prof. Dr. med. Carsten Müller-Tidow

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine maligne Erkrankung, bei der es zur unkontrollierten Proliferation unreifer hämatopoetischer Vorläufer oder Stammzellen kommt. Diese verdrängen die normale Hämatopoese und können daher zu Symptomen und Komplikationen einer Thrombozytopenie, Anämie und Leukopenie führen. Während einige Patient*innen mittels intensiver Therapie zunächst eine komplette Remission erreichen, rezidiert die Leukämie schlussendlich bei den meisten und führt zum Versterben der Patient*innen. Die Erforschung der Ursachen für die Resistenz und das Therapieversagen ist daher essentiell, um die Prognose dieser Patient*innen zu verbessern. In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass insbesondere die hämatopoetische Nische im Knochenmark leukämischen Blasten einen guten Schutz vor der Therapie bietet und daher eine wichtige Rolle für das Therapieerfolg spielt.

In dieser kumulativen Dissertation wurden daher im Übersichtsartikel (Publikation 1) Mikromilieu medierte Resistenzmechanismen im Knochenmark genauer beleuchtet. Es wurden verschiedene Resistenzmechanismen herausgearbeitet, für die Zell-Adhäsions vermittelte Prozesse oder die Wirkung löslicher Faktoren auf die Umgebung relevant sind. Insbesondere wurden Resistenzmechanismen, die auf der Aktivierung von Signalwegen durch Zell-Adhäsions Moleküle der Integrine, Cadherine und Selektine beruhen, diskutiert. Forschungsarbeiten, die den Einfluss von durch Zellen der hämatopoetischen Nische sezernierten Zytokinen und Chemokinen auf die Therapieresistenz analysieren, wurden hier beschrieben. Der Effekt der Inhibition von Zielstrukturen, die Bestandteil dieser schützenden Nische sind, wird in einigen präklinischen und klinischen Studien untersucht. Diese wurden im Übersichtsartikel zusammengefasst. Eine häufige Mutation bei über 25% der Patient*innen mit AML stellt die FLT3-ITD Mutation dar. Seit 2017 ist für neu diagnostizierte Patient*innen mit einer solchen Mutation der Tyrosin Kinase Inhibitor (TKI) Midostaurin zugelassen. Resistenzen gegenüber TKIs sind jedoch häufig und die hierzu führenden Mechanismen noch nicht ausreichend verstanden. Im Forschungsartikel (Publikation 2) wurden daher Midostaurin resistente FLT3-ITD mutierte AML Zelllinien generiert und mittels verschiedener massenspektrometrischer Experimente charakterisiert. Es konnte das für Migration und Adhäsion wichtige Protein Leupaxin (LPXN) identifiziert werden, welches in resistenten Zellen induziert wird. Des Weiteren konnte in Co-Immunpräzipitations Experimenten ein bereits bekannter Interaktionspartner von LPXN, die Protein Kinase 2B (PTK2B), ein Mitglied aus der Gruppe der Fokalen Adhäsions Kinasen, bestätigt werden. Eine Korrelation der Expression der beiden Proteine konnte sowohl in Total Proteome Analysen verschiedener Zelllinien, als auch in Tissue-Micro-Array Analysen aus Knochenmarks Biopsien von 190 Patient*innen gezeigt werden. Darüberhinaus konnte aufgedeckt werden, dass LPXN von PTK2B phosphoryliert wird. Nascent Proteome Analysen und Analysen der Proteinstabilität ergaben, dass PTK2B in resistenten Zellen auf transkriptionaler und translationaler Ebenen hochreguliert und darüberhinaus posttranslational stabilisiert wird. Dahingegen beruht die vermehrte Expression von Leupaxin in resistenten Zellen allein auf einer vermehrten Translation. Eine Behandlung mittels eines PTK2B/Fokale Adhäsions Kinase (FAK) Inhibitors PF-431396 führte zu einer Aufhebung von Resistenz vermittelten Veränderungen

im Translatom und Phänotyp, wie zum Beispiel verstärkte Adhäsion und Migration der Leukämiezellen. Ausschließlich in FLT3-ITD mutierten Zelllinien waren PTK2B/FAK Inhibitoren wirksam. PTK2B/FAK Inhibitoren zeigten mit TKIs und dem Chemotherapeutikum Daunorubicin einen synergistischen Effekt auf die Proliferationsreduktion in FLT3-ITD mutierten Zelllinien und Patient*innenproben, sowie in Zelllinien in der verminderten Kapazität Kolonien zu bilden. Dieser war besonders stark in resistenten Zellen ausgeprägt. Mittels eines gemeinsamen Knockouts von PTK2B und FAK wurde untersucht, welche Kinasen Inhibition für den Effekt der dualen Inhibitoren verantwortlich ist. Nur in Zellen in denen beide Proteine gemeinsam herunterreguliert wurden, war die synergistische Wirkung von Gilteritinib und dem PTK2B/FAK Inhibitor Defactinib reduziert. Somit konnte gezeigt werden, dass die Inhibition beider Proteine essenziell ist. Der synergistische Effekt des PTK2B/FAK Inhibitors mit einem TKI blieb auch in einem, der hämatopoetischen Nische näher kommenden, Co-Kultur Experiment aus mesenchymalen Stromazellen und AML Zellen, welches mit konfokaler Mikroskopie analysiert wurde, bestehen. Im Mausexperiment konnte ein verlängertes Leukämie freies Überleben für Mäuse gezeigt werden, die mit der Kombination aus Defactinib und Gilteritinib behandelt wurden, gegenüber Mäusen die nur die Monotherapie beider Inhibitoren erhielten. Weitere Erforschung des genauen Mechanismus der Resistenz vermittelnden LPXN-PTK2B Achse und eine Testung von Defactinib mit TKI in Patient*innen mit einer FLT3-ITD mutierten Leukämie in klinischen Studien ist in Zukunft nötig, um diesen neuen möglichen therapeutischen Ansatz weiter zu evaluieren.