

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus der Klinik für Hämatologie

CD38-Inhibition als neuer Therapieansatz für die akute myeloische Leukämie

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Meike Farber
aus Oberhausen
2022

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/79006

URN: urn:nbn:de:hbz:465-20231102-110449-1

Alle Rechte vorbehalten.

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. med. M. Hanoun
2. Gutachter: Frau Univ.-Prof. Dr. rer. nat. K. A. Becker-Flegler
3. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. M. Glas

Tag der mündlichen Prüfung: 16. August 2023

Publikation:
Targeting CD38 in acute myeloid leukemia interferes with leukemia trafficking and induces
phagocytosis
Scientific Reports, November 2021
<https://www.nature.com/articles/s41598-021-01300-8>

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 EINLEITUNG	7
1.1 Die akute myeloische Leukämie	7
1.2 Die hämatopoetische Stammzellnische.....	10
1.3 Die Stammzellnische hämatopoetischer Neoplasien	12
1.4 CD38 als Zielstruktur in der Therapie hämatopoetischer Erkrankungen.....	15
2 FRAGESTELLUNG	20
3 MATERIAL UND METHODEN.....	21
3.1 Material.....	21
3.1.1 Geräte und Verbrauchsmittel.....	21
3.1.2 Chemische Substanzen, Reagenzien und Puffer.....	22
3.1.3 Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	24
3.1.4 Kits.....	24
3.1.5 Medien.....	25
3.1.6 Software	25
3.1.7 Primer	26
3.2 Methoden.....	26
3.2.1 Zelllinien und Zellkultur.....	26
3.2.2 Gewinnung und Lagerung von Patientenproben	28
3.2.3 Kokultivierung von AML- und Stroma-Zelllinien.....	29
3.2.4 Kultivierung humaner mesenchymaler Sphäroide.....	30
3.2.5 Triplekultivierung von humanen AML- und gesunden Kontrollzellen.....	30

3.2.6	Durchflusszytometrie	31
3.2.7	Durchflusszytometrische Analyse.....	32
3.2.8	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung.....	32
3.2.9	Einsatz des Medikamentes Daratumumab.....	33
3.2.10	Einsatz von All-trans-Retinsäure	33
3.2.11	Proliferationsanalyse	33
3.2.12	Apoptosedetektion.....	34
3.2.13	Assay für Komplement-abhängige Zytotoxizität	35
3.2.14	Assay für Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität.....	35
3.2.15	Gewinnung und Differenzierung primärer CD14 ⁺ Makrophagen.....	36
3.2.16	Assay für Antikörper-abhängige Phagozytose	36
3.2.17	<i>In vivo</i> NSG-Xenograft Model.....	37
3.2.18	<i>In vivo</i> Homing-Experiment	38
3.2.19	Paraffineinbettung von Knochen und Milz der NSG-Mäuse.....	39
3.2.20	Molekularbiologische Methoden.....	40
3.2.21	Anfertigung von Cytospin-Präparaten	42
3.2.22	IC-50 Untersuchung	42
3.2.23	Statistische Auswertung	43
4	ERGEBNISSE	44
4.1	CD38-Inhibition zeigt anti-leukämische Aktivität in der AML <i>in vitro</i>	44
4.2	Bedeutung und Modulation von CD38 im Mikroenvironment	50
4.3	Mechanismen der CD38-Inhibition mit Daratumumab.....	54
4.4	<i>In vivo</i> Wirksamkeit der CD38-Inhibition in der AML	64
5	DISKUSSION	69
5.1	Anti-leukämische Wirkung von Daratumumab ist abhängig vom Mikroenvironment..	70

5.2	Anti-leukämische Wirksamkeit der CD38-Inhibition <i>in vivo</i>	73
6	ZUSAMMENFASSUNG	75
7	LITERATURVERZEICHNIS	76
8	ANHANG	85
8.1	Abbildungsverzeichnis	85
8.2	Tabellenverzeichnis	86
8.3	Abkürzungsverzeichnis	86
9	DANKSAGUNG	90
10	LEBENS LAUF	91

1 EINLEITUNG

1.1 Die akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine maligne Erkrankung des Blutes, die mit einer Vermehrung von unreifen hämatopoetischen Progenitorzellen einhergeht. Im Verlauf der Erkrankung kommt es zu einer unkontrollierten Proliferation dieser myeloischen Vorläuferzellen, die allerdings nicht weiter zu reifen Zellen differenzieren. Diese klonale Expansion myeloischer Blasten geht mit einem frühen Versagen der gesunden Hämatopoese einher, was zu einer Neutropenie, Thrombozytopenie und Anämie führt (Herold, 2019). Die Inzidenz liegt bei 4,3/100.000 und die Inzidenzrate steigt ab etwa einem Alter von 50-55 Jahren deutlich an. Das mittlere Alter, bei dem die akute myeloische Leukämie diagnostiziert wird, liegt bei 68 Jahren (NationalCancerInstitute, 2019).

Die meisten Erkrankungen entstehen ohne vorausgehende Neoplasien, als so genannte primäre AML. Bestimmte Risikofaktoren konnten für die Entstehung einer AML identifiziert werden. Dazu gehören Schädigungen des Knochenmarks durch ionisierende Strahlen oder bestimmte toxische Stoffe wie Benzol oder Tabak. Das Risiko an einer AML zu erkranken ist bei Rauchern erhöht und korreliert mit der Zigarettenmenge (Fircanis et al., 2014; Röllig et al., 2019). Aber auch hereditäre Erkrankungen, die mit einer Knochenmarkinsuffizienz einhergehen können, wie zum Beispiel die Trisomie 21 oder die Fanconi-Anämie, können prädisponierend wirken (Chirnomas & Kupfer, 2013; Gruber & Downing, 2015). Ebenso kann sich die AML sekundär aus bestimmten anderen Erkrankungen der Hämatopoese entwickeln, den sogenannten myeloproliferativen Neoplasien und myelodysplastischen Syndromen. Zudem kann sie sekundär therapieassoziiert auftreten, wenn eine andere genotoxische Therapie in der Vorgeschichte durchgeführt wurde. Insbesondere häufig assoziiert mit dem Auftreten einer sekundären AML ist die Behandlung mit Zytostatika der Klassen Topoisomerase II Hemmer und Alkylanzien (Röllig et al., 2019). Der wichtigste patientenbezogene Faktor ist das Alter, wobei dieses einen unabhängigen Risikofaktor darstellt. (Röllig et al., 2019)

Biologisch ist die Erkrankung sehr heterogen. Eine erste Einteilung nach zytomorphologischen Kriterien in acht Untergruppen (M0-M7) wurde im Rahmen der Französisch-Amerikanisch-Britisch (FAB)-Klassifikation etabliert (Bennett et al., 1976).

Die 2010 zuerst implementierte Einteilung der European Leukemia Net (ELN) teilt genetische Merkmale verschiedenen prognostischen Gruppen zu, um die Prognose, auf eine intensive Chemotherapie anzusprechen, abzuschätzen. Seit der Weiterentwicklung 2017 unterscheidet die ELN-Klassifikation die Risikogruppen günstig, intermediär und ungünstig (Dohner et al., 2017). Eine verbesserte Objektivität und Reproduzierbarkeit liefert die Einteilung anhand der Klassifikation der World Health Organisation (WHO) von 2016, welche klinische, zytomorphologische, zytogenetische sowie molekulargenetischen Charakteristika vereint (Arber et al., 2016).

Die klinische Symptomatik manifestiert sich vor allem durch das Versagen der normalen Hämatopoese. Eine Granulozytopenie führt zur defizienten Immunabwehr von Bakterien, Viren und Pilzen, eine Thrombozytopenie hat eine erhöhte Blutungsneigung zur Folge und die Anämie manifestiert sich durch Müdigkeit, Dyspnoe und Schwindel. Zusätzlich können extramedulläre Symptome durch Infiltration der Blasten in Lymphknoten, Milz, Leber, Haut oder dem zentralen Nervensystem hinzukommen. Beispielsweise typisch für die AML Subtypen M4 und M5 ist eine Gingivahypertrophie. Hohe Leukozytenzahlen im Blut können mit Störungen der Mikrozirkulation einhergehen oder fokale-neurologische Ausfälle können aufgrund einer Meningeosis leucaemica auftreten (Herold, 2019).

Die Diagnose lässt sich durch zytomorphologische und immunphänotypische Untersuchungen des Knochenmarkes und des peripheren Blutes stellen. Die Diagnose kann ab einer Blastenzahl von $\geq 20\%$ im peripheren Blut oder Knochenmark gestellt werden. Zusätzlich kann die Diagnose der AML unabhängig von der Blastenzahl beim Vorliegen bestimmter Krankheitsdefinierender genetischer Aberrationen gestellt werden (Röllig et al., 2019).

Die Therapie für biologisch fitte Patienten umfasst eine intensive Chemotherapie. Diese gliedert sich in die Induktionstherapie, die meist aus einem Anthrazyklin und dem antimetabolischen Zytostatikum Cytarabin besteht. Meist wird das „7+3“-Protokoll angewendet, bei dem eine siebentägige Therapie mit Cytarabin mit dem Anthrazyklin Daunorubicin an drei Tagen kombiniert wird (Röllig et al., 2019). Das Erreichen einer kompletten Remission, welche definiert ist durch eine Blastenzahl von $< 5\%$ im Knochenmark, Erholung des Blutbildes und das Fehlen von extramedullären Manifestationen (Cheson et al., 2003), ist das vorrangige Ziel nach Einleitung der Therapie. Die Remissionsrate der intensiven Induktionstherapie scheint besonders von der Zytogenetik abzuhängen, so beträgt sie in der günstigen Risikogruppe nach ELN noch bei $> 80-90\%$, jedoch beim Vorliegen von ungünstigen Aberrationen nur noch bei $< 30\%$ (Schlenk & Döhner, 2013).

Zwischen 10% und 40% der Patienten erreichen in der Induktionstherapie keine komplette Remission und gelten somit als primär refraktär. Darüber hinaus erleidet ein großer Teil der Patienten, die zunächst eine komplette Remission erreicht hatten, ein Rezidiv. Abhängig von der Risikostratifizierung nach ELN beträgt die Wahrscheinlichkeit auf ein rezidivfreies Überleben nach 3 Jahren in der günstigen Gruppe noch 87,5%, in der intermediären Risikogruppe allerdings nur noch 56,5% unter Betrachtung der Altersgruppe >60 Jahren (Thol et al., 2015; Yanada et al., 2007). Für Patienten mit Erreichen einer Remission nach der Induktionstherapie und günstigem genetischen Risikoprofil nach der ELN-Klassifikation ist von einer ausreichenden Chemosensitivität auszugehen und deswegen sollte eine Konsolidierungstherapie mit intermediär- bis hochdosiertem Cytarabin erfolgen. Bei Patienten mit intermediärer und ungünstiger Zyto- und Molekulargenetik sollte je nach Verfügbarkeit eines passenden Spenders und den Komorbiditäten des Patienten eine allogene Stammzelltransplantation in erster Remission erfolgen (Röllig et al., 2019).

Über Jahrzehnte hat sich trotz intensiver Bestrebungen zur Modifikation des Chemotherapieprotokolls keine Überlegenheit zum 7+3-Protokoll gezeigt. Erst kürzlich kam es zu einer Reihe von neuen Zulassungen. In der RATIFY-Studie zeigten AML-Patienten ≤60 Jahre mit einer FLT3-Mutation einen signifikanten Überlebensvorteil durch die Hinzunahme des Tyrosinkinase-Inhibitors Midostaurin zur intensiven Chemotherapie, was letztlich auch zur Zulassung unabhängig vom Alter als Kombinationstherapie geführt hat (Stone et al., 2017). Das Antikörper-Arzneimittel-Konjugat Gemtuzumab-Ozogamicin, ein monoklonaler CD33-Antikörper gekoppelt mit dem Zytotoxin Calicheamicin, erhielt 2018 die Zulassung der EMA zur Primärtherapie in Kombination mit der Standardtherapie bei Patienten mit CD33-positiver AML. 2018 veröffentlichte Ergebnisse der französischen ALFA-0701 randomisierten Phase 3 Studie mit 271 Patienten konnte eine signifikante Verlängerung des ereignisfreien Gesamtüberlebens gegenüber der alleinigen Standardinduktionstherapie herausstellen (Lambert et al., 2018). Eine Metaanalyse von mehreren randomisierten Studien zu Gemtuzumab-Ozogamicin stellte weiter eine Reduktion der Rezidivrate sowie eine Verbesserung des Gesamtüberlebens, vor allem bei günstiger und intermediärer Risikokonstellation nach ELN, heraus (Hills et al., 2014). Ferner kürzlich zugelassen wurde die liposomale Formulierung der 7+3-Chemotherapie als festes Mischungsverhältnis von Cytarabin und Daunorubicin von 5:1 (CPX-351). Dieses zeigte insbesondere bei Patienten ≥60 Jahren mit meist biologisch ungünstigen Eigenschaften sekundärer und therapieassoziierter AML einen Überlebensvorteil gegenüber dem standardisierten 7+3-Protokoll (Lancet et al., 2018).

Diese intensiven Chemotherapieprotokolle sind jedoch nebenwirkungsreich. Die Mortalitätsrate in der Induktionstherapie liegt bei >75-Jährigen Patienten bereits bei 29% (Kantarjian et al., 2006).

Deswegen kommt in der Regel eine intensive Chemotherapie für Patienten über 70-75 Jahre oder Patienten mit Komorbiditäten nicht in Frage. Hier kommen nebenwirkungsärmere, palliative Therapiekonzepte zum Einsatz. Die palliative Therapie zielt auf die Verbesserung der Lebensqualität. In Frage kommen insbesondere Kombinationstherapien aus hypomethylierenden Substanzen mit dem BCL2-Inhibitor Venetoclax, nachrangig auch Kombinationen mit niedrig-dosiertem Cytarabin mit entweder Venetoclax oder dem Hedgehog-Inhibitor Glasdegib, wodurch im Vergleich zur niedrig-dosierten Chemotherapie ein Überlebenszuwachs verzeichnet werden kann (Cortes et al., 2019; DiNardo et al., 2020).

Trotz intensiver Behandlungsstrategien ist das Langzeitüberleben schlecht. Prognostische Faktoren sind insbesondere die krankheitsbezogenen Faktoren, also genetische Aberrationen, sowie patientenbezogene Faktoren, hier vor allem das Alter (Döhner et al., 2017). Das Alter hat einen entscheidenden Einfluss auf die Toleranz der Chemotherapie und somit Ansprechen der Therapie, welches durch Komorbiditäten und den Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Performance Status beeinflusst wird. Zusätzlich zu den patientenbezogenen Risikofaktoren der älteren Menschen zeigt sich auch eine vermehrte Häufigkeit von prognostisch ungünstigen genetischen Aberrationen in älteren Patienten (Ossenkoppele & Löwenberg, 2015). Die 5-Jahresüberlebensrate liegt im Mittel bei nur 27,6 %, wobei sie bei jungen Patienten unter 50 Jahren noch bei 57,1% liegt. Mit zunehmendem Alter nimmt die 5-Jahresüberlebensrate rapide ab, auf nur noch 7,5% bei >65-Jährigen und verglichen damit nimmt die Rate an Todesfällen bedingt durch die AML im Alter stark zu (NationalCancerInstitute, 2019). Ausgenommen ist die Sonderform der akuten Promyelozytenleukämie (APL). Diese ist mit Einsatz des Vitamin A Derivates All-trans-Retinsäure (ATRA) sowie Arsen vergleichsweise schonend behandelbar und zeigt ein krankheitsfreies 2-Jahresüberleben von 97% (Lo-Coco et al., 2013).

Zusammenfassend bleibt auch nach Zulassung der oben genannten, zielgerichteten Therapien die Behandlung der AML eine klinische Herausforderung, insbesondere zeigen ältere Patienten aufgrund patienten- als auch krankheitsbezogener Faktoren einen dringenden Bedarf für neue Therapieansätze mit besserem Therapieansprechen bei guter Verträglichkeit, um die Prognose zu verbessern.

1.2 Die hämatopoetische Stammzellnische

Der Begriff der hämatopoetischen Stammzellnische beschreibt das zelluläre und molekulare Umfeld von hämatopoetischen Stammzellen, welches für die Regulation einer balancierten Produktion reifer Blutzellen je nach Bedarf unersetzlich ist.

Das Konzept der Stammzellnische wurde zuerst im Jahre 1978 von Ray Schofield beschrieben, der hervorhob, dass die Stammzellen dem Einfluss von anderen Zellen unterstehen würden (Schofield, 1978).

Heute sind viele verschiedene Komponenten bekannt, die untereinander in komplexer Interaktion stehen, um die Quieszenz, Proliferation sowie Retention von hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark zu steuern. Durch die häufige endosteale Lokalisation der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen (HSPC) wurde zunächst Osteoblasten eine zentrale Rolle für die Regulation der HSPCs zugeschrieben (Zhang et al., 2003). 3D-Rekonstruktionen von photomikrographischen Analysen im murinen Knochenmark zeigen HSPCs gehäuft in direkter Nähe zu Sinusoiden, Arteriolen und dem trabekulären Knochen (Morrison & Scadden, 2014). Tatsächlich scheint es eine perivaskuläre Nische im Knochenmark zu geben, die die Funktion der HSPC reguliert. Kolokalisiert zu den Gefäßen finden sich perivaskuläre mesenchymale Stamm und Progenitorzellen (MSPC) (Kunisaki et al., 2013; Mendez-Ferrer et al., 2010). Zunächst wurden diese perivaskulären Stromazellen als „CXCL-12 abundant reticular“ (CAR)⁺-Zellen beschrieben, welche in direktem Kontakt zu den HSPCs stehen und CXCL-12 sezernieren. Dieses Chemokin ist durch die Interaktion mit seinem Rezeptor CXCR-4 an der Retention der HSPC im Knochenmark beteiligt (Sugiyama et al., 2006). Später wurden diese perivaskulären Zellen als Nestin⁺-Zellen charakterisiert, welche eine Gruppe von MSPC formen, die zur Selbsterneuerung fähig sind und sich in Adipozyten, Chondrozyten sowie Osteoblasten differenzieren können. Darüber hinaus scheinen Nestin⁺-MSPCs in hohem Ausmaß HSPC-regulierende Gene zu exprimieren, so wie das Chemokin CXCL-12, den sogenannten Stammzellofaktor (SCF) oder Angiopoietin-1, Osteopontin und vaskular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1). Diese sind für die Regulation und Retention der HSPCs im Knochenmark unentbehrlich. Ebenfalls beschrieben wurden Leptin-Rezeptor⁺ perivaskuläre Stromazellen im murinen Knochenmark, die ebenso die Charakteristika von MSPCs erfüllen und als Hauptquelle für SCF und CXCL-12 die Regulation von HSPCs maßgeblich unterstützen (Zhou et al., 2014). Letztlich scheinen sowohl CAR-, Nestin- als auch Leptin-Rezeptor-exprimierende Zellen zum überwiegenden Teil dieselbe MSPC-Population im murinen Knochenmark zu beschreiben (Hanoun & Frenette, 2013). Da die Identifizierung dieser MSPCs bislang von Reporter-mäusen abhängig war, erfolgte eine Charakterisierung dieser MPSCs, wodurch sich die Koexpression von PDGFR- α und CD51 MSPCs im murinen Knochenmarkstroma identifizieren ließ (Pinho et al., 2013). Neben MSPCs zeigen Endothelzellen eine für die Regulation von HSPC relevante Expression von SCF und CXCL12 (Ding et al., 2012).

Eine weitere wichtige Komponente der Stammzellnische ist das sympathische Nervensystem. Es konnte gezeigt werden, dass adrenerge Signale im murinen Knochenmark die Quieszenz der Nische aufrechterhalten und die Funktion von MSPCs und Osteoblasten maßgeblich beeinflussen (Hanoun et al., 2014). MSPCs spielen nicht nur eine wichtige Rolle in der strikten Erhaltung der HSPC, sondern interagieren auch mit dem Immunsystem, indem sie dessen Funktion im Falle einer Infektion unterstützen. Unter inflammatorischen Bedingungen sezernieren sie Faktoren, die die Emigration von Monozyten aus dem Knochenmark ins Blut fördern und produzieren vermehrt Zytokine, die die Hämatopoese fördern und somit ein Ausbrennen des HSPC-Pools bei vermehrtem Bedarf an Immunzellen verhindert (Shi et al., 2011; Ziegler et al., 2016). Neben dieser akuten Reaktion auf eine Inflammation ist zudem bekannt, dass MSPCs in der Stammzellnische ein immunsuppressives Umfeld aufrechterhalten, indem sie die Proliferation von T-Zellen und somit indirekt auch von B-Zellen hemmen (Bartholomew et al., 2002; Di Nicola et al., 2002). Auch Immunzellen selbst nehmen einen regulierenden Einfluss auf die Stammzellnische, so modulieren beispielsweise Makrophagen die CXCL-12 Sekretion und somit die Emigration von HSPC aus dem Knochenmark (Chow et al., 2011). Darüber hinaus konnte in einem *in vivo*-Modell herausgestellt werden, dass T-regulatorische Zellen sich im Knochenmark in physikalischer Nähe zu allogent-transplantierten HSPC ansiedeln und für deren Persistenz wichtig zu sein scheinen (Fujisaki et al., 2011). Insgesamt bildet die hämatopoetische Stammzellnische im murinen Knochenmark ein aus unterschiedlichen zellulären und nicht-zellulären Komponenten bestehendes, komplexes System, welches sich untereinander reguliert und letztlich die Funktion der geregelten Hämatopoese kontrolliert.

1.3 Die Stammzellnische hämatopoetischer Neoplasien

Es ist lange bekannt, dass im Prozess der Kanzerogenese nicht nur die malignen Zellen an sich, sondern auch umgebende, nicht-maligne Zellen eine wichtige Rolle spielen können. Hanahan und Weinberg definierten im Jahr 2000 biologische Fähigkeiten von Tumorzellen, die sogenannten „Hallmarks of Cancer“, die zum Verständnis der Komplexität und Heterogenität maligner Erkrankungen beitragen. Sie beschrieben, dass umgebende Stromazellen nicht nur als passive Komponente fungieren, sondern bewirken können, dass die Tumorzelle bestimmte biologische Fähigkeiten erlangt.

Betrachtet werden müssen somit nicht nur die Fähigkeiten der Tumorzelle an sich, sondern auch die des Tumor-Mikroenvironments, das bedeutsam zur Tumorgenese beizutragen scheint (Hanahan & Weinberg, 2011).

Leukämie-initiiierende Zellen können sowohl durch akkumulierte Mutationen in den HSPC als auch aus weiter differenzierten Progenitorzellen entstehen und die Fähigkeit zur Selbsterneuerung zurückgewinnen (Passegué et al., 2003).

Neben diesen zellautonomen Mechanismen scheinen die leukämischen Stammzellen mit ihrem Mikroenvironment zu kommunizieren. Die leukämische Nische unterscheidet sich durch strukturelle und funktionelle Alterationen von der gesunden Nische. Bereits 1996 eröffneten Dührsen und Hossfeld verschiedene Ansätze, die versuchten, den Einfluss des Mikroenvironments auf die Leukämogenese zu erklären (Dührsen & Hossfeld, 1996). Zum einen konnte gezeigt werden, dass durch bestimmte genetische Alterationen der Stromazellen die Entwicklung hämatopoetischer Neoplasien begünstigt werden kann. Die Deletion des Retinoidsäurerezeptors (RAR-gamma) induziert im murinen Knochenmark eine Dysplasie der hämatopoetischen Zellen, ähnlich eines myelodysplastischen Syndromes (Walkley et al., 2007). Eine Rolle bei der Homöostase der hämatopoetischen Stammzellen spielt die Signaltransduktion über den Notch-Signalweg. Tatsächlich führt eine Stromazell-spezifische genetische Modulation im Notch-Signalweg zu einer myeloproliferativen Neoplasie im Mausmodell (Kim et al., 2008). Ebenso führt die Deletion des Moleküls Dicer-1 in mesenchymalen Osteoprogenitorzellen zu einer verminderten Aktivität des Shwachman-Bodian-Diamond-Gens zur Entwicklung eines myelodysplastischen Syndroms (Raaijmakers et al., 2010). Weiterführend konnte eine Aktivierung des β -Catenin-Signalwegs in Osteoblasten mit präleukämischen Veränderungen der hämatopoetischen Stammzellen in der Maus assoziiert werden (Kode et al., 2014). Interessanterweise scheint dies durch eine Hochregulation des Notch-Liganden in den Osteoblasten vermittelt zu sein, welche mit einer vermehrten Notch-Aktivität in den leukämischen Stammzellen interagiert.

Neben den genannten Hinweisen, dass die Leukämogenese bereits durch Veränderungen im Mikroenvironment induziert werden kann, finden sich auch Beweise dafür, dass die Pathogenese der Leukämie auf einer Interaktion der leukämischen Stammzelle mit ihrem Umfeld beruht, wodurch die Leukämie verbesserte Wachstums- und Überlebensbedingungen vorfindet. Dies wird zum Beispiel darin deutlich, dass Fibroblasten eine verminderte Fähigkeit zeigen, die normale Hämatopoese zu unterstützen (Li et al., 2015). Während die Stromazellen in der Knochenmarksnische die Fähigkeit verlieren, die gesunde Hämatopoese zu regulieren, induzieren sie in den transformierten Zellen einen Überlebens- und Proliferationsvorteil, indem sie deren Apoptose inhibieren (Bendall et al., 1994).

In zwei Mausmodellen konnten Veränderungen der hämatopoetischen Stammzellnische detailliert herausgearbeitet werden. Zum einen führt die Interaktion leukämischer Zellen in einem BCR/ABL-Onkogen-exprimierenden Mausmodell der chronischen myeloischen Leukämie zu einer vermehrten Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in Osteoblasten, welche die Fähigkeit verloren haben, die gesunde Hämatopoese zu unterhalten (Schepers et al., 2013).

Weiterführend konnten Hanoun et al. in einem MLL-AF9-Modell der AML eine signifikante Verminderung von sympathischen Fasern im Knochenmark und in der Milz leukämischer Mäuse beobachten. Experimente unter der Verwendung einer funktionellen Denervation führen zu einem Proliferationsvorteil der AML-Zellen und einem schlechteren Gesamtüberleben *in vivo*. Eine Störung der Quieszenz der mesenchymalen Stammzellen bedingt eine Expansion von MSPC in der leukämischen Nische, welche ein erhöhtes Potenzial zeigen, zur osteoblastären Differenzierung, jedoch nicht zu reifen Osteoblasten auszureifen. Infolgedessen ist auch ihre Kapazität, Moleküle wie SCF zu sezernieren und somit gesunde Stammzellen zu unterhalten, verringert (Chen et al., 2020; Hanoun et al., 2014).

Die CXCL-12-CXCR-4 Achse vermittelt ein gezieltes Einwandern (engl.: Homing) von hämatopoetischen Stammzellen in das Knochenmark und ist von großer Bedeutung in der strikten Regulation der Stammzellnische. Eine mittlere und hohe Expression der CXCR-Rezeptors 4 auf den Zellen geht mit einem erhöhten Homing der leukämischen Zellen einher und bedingt ein kürzeres rezidivfreies- und Gesamtüberleben verglichen zu den CXCR-4-niedrig exprimierenden Zellen (Spoo et al., 2007). Zudem birgt das leukämische Mikroenvironment einen Schutz für leukämische Stammzellen und vermittelt Chemoresistenz (Ishikawa et al., 2007). Diese Ergebnisse bekräftigen die Rolle von im Knochenmark verbliebenen leukämischen Stammzellen, die als vermutete Hauptursache in der Entstehung von Rezidiven angesehen werden.

Seit vielen Jahren ist die Assoziation der Inflammation mit der Kanzerogenese bekannt. Viele Tumorentitäten zeigen eine starke inflammatorische Reaktion und Infiltration sowohl des angeborenen Immunsystems, aber auch des adaptiven Immunsystems. Eine große Rolle nehmen Tumor-assoziierte Makrophagen ein, welche den Tumor zwar erkennen und bekämpfen können, durch Produktion von Wachstums- und Angiogenesefaktoren allerdings auch sein Fortbestehen und seine Invasivität unterstützen. Obwohl man diese Entzündungsreaktion zunächst als körpereigene Abwehr gegen den Tumor verstehen kann, scheint die Inflammation paradoxerweise die Progression der Erkrankung zu verstärken (Balkwill & Mantovani, 2001; Hanahan & Weinberg, 2011). Neben der sterilen Inflammation entwickelt der Tumor auch Mechanismen, die das adaptive Immunsystem manipulieren. Viele dieser Mechanismen, durch welche der Tumor sein eigenes Überleben sicherstellt, sind heutzutage bekannt und Angriffspunkt für gezielte Therapieoptionen. Ein erfolgsversprechendes Beispiel ist die Immuncheckpoint-Blockade.

Diese greift an dem Mechanismus an, mit welchem Tumorzellen durch PD1-Liganden an Immunzellen binden und diese inaktivieren (Wei et al., 2018).

Zusätzlich kann der Tumor durch Sekretion von immunsuppressiven Zytokinen sowie Stimulation immunregulatorischer Zellen, insbesondere T-regulatorischer Zellen, die Immunantwort weiter erschweren (Zou, 2006). Ebenso scheint die AML mit einer inflammatorischen Reaktion des Knochenmarks assoziiert zu sein. Ein zentraler Mediator der Entzündungsreaktion und des Überlebens von Immunzellen ist der Transkriptionsfaktor Nuclear factor „kappa light chain enhancer“ of activated B-cells (Nf-κB), der die Expression vieler inflammatorischer Moleküle reguliert. Anhand von Analysen des Knochenmarks von Patienten mit myeloproliferativen Neoplasien konnte gezeigt werden, dass ein Verlust des Notch-Signalweges zu einer Überexpression der microRNA 55 in Knochenmarksendothelzellen führt, welche die Sekretion von Nf-κB und nachfolgend von vielen proinflammatorischen Zytokinen bedingt (L. Wang et al., 2014). Während humane CD34⁺-Progenitorzellen keine Nf-κB-Expression zeigen, liegt in leukämischen Stammzellen eine hohe Aktivität des Nf-κB-Signalweges vor (Braun et al., 2006; Guzman et al., 2001). Studien konnten weiterführend für die Pathogenese vieler hämatopoetischer Neoplasien eine entscheidende Rolle von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin 1, Interleukin-6 oder Tumornekrosefaktor-α herausstellen (Hemmati et al., 2017). Viele proinflammatorische Zytokine aktivieren den JAK/STAT-Signalweg, welchem eine bedeutende Rolle in vielen soliden, aber auch hämatologischen Krebserkrankungen beigemessen wird (Pencik et al., 2016; Rawlings et al., 2004). So konnte in AML-Zellen, als auch deren Mikroenvironment eine Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges gezeigt werden, wobei eine Inhibition dessen eine anti-leukämische Wirksamkeit *in vitro* zeigt (Habbel et al., 2020). Die genauen Mechanismen, durch welche die AML der Überwachung des Immunsystems entgeht, bleiben bisher weitgehend ungeklärt.

1.4 CD38 als Zielstruktur in der Therapie hämatopoetischer Erkrankungen

CD38 ist ein multifunktionales Glykoprotein, welches zuerst 1980 beschrieben wurde (Reinherz et al., 1980). Unter Verwendung eines agonistischen Antikörpers konnte es zunächst als Differenzierungs- und Aktivierungsmarker für T-, B-, Natürlichen Killer (NK-Zellen)- und Plasmazellen charakterisiert werden (Funaro et al., 1990). Interessanterweise befindet sich auf dem CD38-Gen auch ein Retinsäure responsives Element, welches eine Hochregulation von CD38 durch ATRA vermittelt (Kishimoto et al., 1998).

CD38 besitzt sowohl eine Rezeptor- als auch eine Enzymfunktion. Im Rahmen seiner Rezeptorfunktion vermittelt CD38 schwache Adhärenz an CD31-exprimierende Endothelzellen, dem natürlichen Liganden von CD38.

Interessanterweise vermittelt diese CD38-CD31 Interaktion nicht nur die Migration und Adhäsion von Leukozyten an das Endothel, sondern beeinflusst darüber hinaus deren Proliferation (Deaglio et al., 1998; Dianzani et al., 1994). CD38 agiert ebenso als ein bifunktionales Ektoenzym als Zyklase und Hydrolase. Es konvertiert sein Substrat Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD^+) zu zyklischer Adenosindiphosphat-(ADP)-Ribose (cADPR) oder ADP-Ribose (ADPR). Darüber hinaus katalysiert es die Bildung von Nikotinsäure-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NAADP^+) aus Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADP^+). Die jeweils durch CD38 gebildeten Moleküle nehmen durch Mobilisierung von Calcium ins Zytosol eine große Rolle in verschiedenen Signalwegen der Zelle ein (Aarhus et al., 1995; N. W. C. J. van de Donk et al., 2016). CD38 spielt eine große Rolle als NAD^+ ase und beeinflusst somit den gesamten Energiestoffwechsel der Zelle. Interessanterweise konnte für $\text{Th}_1/\text{Th}_{17}$ -Helferzellen gezeigt werden, dass eine niedrigere CD38-Expression mit höheren NAD^+ -Spiegeln, verbesserter Stoffwechselaktivität und ebenso einer stärkeren Tumorzellkontrolle einhergeht (Chatterjee et al., 2018). Die enzymatische Rolle von CD38 könnte ein wichtiger Faktor in der Entstehung des inflammatorischen und immunsupprimierenden Tumormikroenvironments sein. In diesem Umfeld zeigt sich eine Häufung von katabolen Stoffwechselprodukten, und infolgedessen ein Anstieg der lokalen Adenosinkonzentration, welches eine entscheidende Rolle in der Kontrolle von Entzündung und Immunantwort einnimmt. Untersuchungen zu der Rolle von CD38 als Ektoenzym und NAD^+ ase zeigen, dass das Enzym zur Produktion von Adenosin aus NAD^+ beiträgt und somit höchstwahrscheinlich an der Entstehung des immunsupprimierenden Umfeldes teilnimmt (Horenstein et al., 2013). Neben der wichtigen Rolle in der Adhäsion von Leukozyten und dem Eingreifen in den Energiestoffwechsel zeigt sich darüber hinaus eine häufig hohe CD38-Expression auf malignen Zellen.

Insbesondere für das Multiple Myelom, gekennzeichnet durch CD38-positive Plasmazellen und für das CD38-positive Non-Hodgkin-Lymphom, insbesondere die chronisch lymphatische Leukämie, gilt CD38 als ein vielversprechender Angriffspunkt, welches zur Entwicklung von verschiedenen CD38-Antikörpern führte (Matas-Cespedes et al., 2017; Vidal-Crespo et al., 2020). Auch AML-Blasten zeigen eine regelhaft hohe CD38-Expression. In einer Analyse der CD38-Expressionshöhe bei 304 neudiagnostizierten AML-Patienten konnte gezeigt werden, dass die Expressionshöhe nicht von zytomorphologischen Kriterien gemäß der FAB-Klassifikation abhängt, aber eine Korrelation mit dem genetischen Karyotyp vorweist, mit einem besonders hohen Expressionsanteil von 73% aller Patienten mit Translokation t(8;21). Ausgenommen ist die Promyelozytenleukämie mit der Translokation t(15;17), wo nur eine CD38-Expression von 5% im Gegensatz zu durchschnittlich 41% der Zellen der anderen Kategorien der FAB-Klassifikation deutlich wurde.

Bei Betrachtung der kompletten Remissionsraten und des Gesamtüberlebens der eingeschlossenen Patienten zeigte sich, dass das Vorhandensein von CD38 auf den AML Zellen mit einer günstigen Prognose zusammenhängt (Keyhani et al., 2000).

CD38 bietet sich somit als vielversprechende therapeutische Zielstruktur zur Interferenz der Kommunikation der AML-Blasten mit ihrem Mikroenvironment und dem Immunsystem an.

Am weitesten fortgeschritten ist die Entwicklung und der Einsatz des komplett humanen, monoklonalen IgGk CD38 Antikörper Daratumumab, welches von der Firma Genmab entwickelt wurde. Klinisch wird Daratumumab in Kombination mit verschiedenen Medikamenten der Gruppen der Immunmodulatoren oder Proteasominhibitoren des Multiplen Myeloms angewandt. Seit 2021 besteht darüber hinaus die Zulassung für Isatuximab (Sanofi Oncology), einen weiteren, in Kombinationstherapie verwendeten CD38-Antikörper (Moreau et al., 2021)

Die Monotherapie mit Daratumumab (16mg/kg Körpergewicht) zeigt ein sehr verträgliches Nebenwirkungsprofil in den beiden klinischen Phase II Studien GEN501 und SIRIUS, die zur Zulassung des Medikamentes führten. Häufig aufgetretene Nebenwirkungen waren Erschöpfung, Übelkeit und Anämie. Zudem traten bei etwa 50% der Patienten Infusionsbedingte Reaktionen auf, welche nach der ersten Infusion seltener wurden und nur selten schwerwiegende Symptome hervorriefen. Grad 3/4 Nebenwirkungen betrafen nur einen kleinen Teil der Patienten, hierbei besonders häufig vertreten waren Anämie, Thrombozytopenie und Neutropenie (Usmani et al., 2017)

Antikörper besitzen neben zwei Antigen-bindenden Fragmenten (F(ab)₂) jeweils ein konstantes Fragment (Fc) und sind grundsätzlich in der Lage, verschiedene immunvermittelte Mechanismen auszulösen, wenn sie an das passende Antigen binden (Horn, 2019). Dazu gehören die Komplement-abhängige Zytotoxizität (CDC), die Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC), die Antikörper-abhängige Phagozytose (ADCP) sowie die Fc-Rezeptor vermittelte Kreuzvernetzung. Der Fc-Teil von IgG- und IgM-Antikörpern aktiviert das Komplementsystem, in dem es das Komplementmolekül C1 bindet, und somit den klassischen Weg der Komplementkaskade initiiert, was letztendlich zur Formation des Membran-Attack-Komplexes (MAK) führt und die Zielzelle lysiert (Noris & Remuzzi, 2013). Die Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität wird hauptsächlich durch Natürliche Killer Zellen (NK-Zellen) ausgelöst, allerdings können auch Makrophagen, dendritische Zellen und neutrophile Granulozyten dazu beitragen. Die Fc-Region des Antikörpers ist in der Lage, die Effektorzelle über ihren Fc-Rezeptor zu aktivieren. Die NK-Zelle beispielsweise sezerniert Stoffe, die die Membran der Zielzelle lysieren, so genannte Perforine und Granzyme (W. Wang et al., 2015). Als dritter wichtiger Antikörper-vermittelter Mechanismus wird die Phagozytose angesehen.

Auch Makrophagen exprimieren Fc-Rezeptoren, werden vom Fc-Teil des Antikörpers aktiviert und können somit die ihnen präsentierte Zielstruktur- bzw. Zielzelle phagozytieren und eliminieren (Overdijk et al., 2015). Die Fc-Rezeptor Kreuzvernetzung ist ein weiterer, immunvermittelter Mechanismus. Hierbei binden Fc-Rezeptoren entweder eines sekundären Antikörpers oder Fc-Rezeptoren auf verschiedenen Immunzellen an den Fc-Teil des an das Antigen gebundenen Antikörpers. Werden diese Fc-Rezeptoren kreuzvernetzt, kann dies diverse intrinsische Signalwege in der Zelle aktivieren, die den programmierten Zelltod auslösen können (Overdijk et al., 2016).

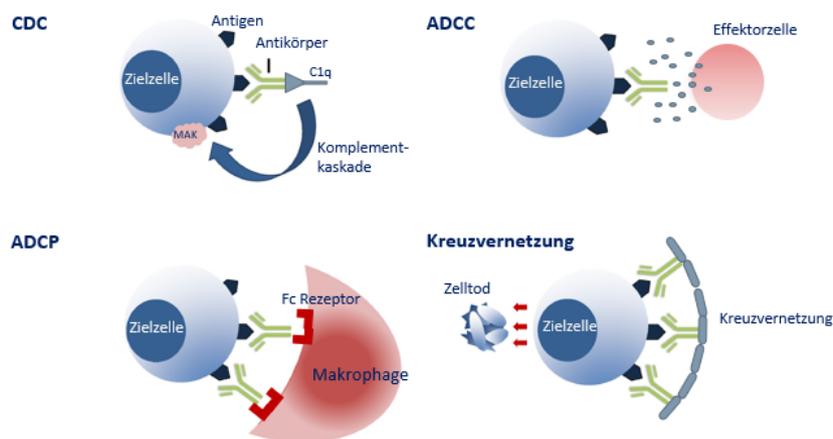


Abbildung 1 Schematische Abbildung der Antikörper-abhängigen, immunvermittelten Effektormechanismen monoklonaler Antikörper.

Komplement abhängige Zytotoxizität (CDC) Der Fc-Teil des Antikörpers aktiviert das Komplementmolekül C1, welches über den klassischen Weg der Komplementkaskade die Bildung des „Membran Attack Komplex“ initiiert und die Zelle lysiert.

Antikörper abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC): Fc-Rezeptoren von Effektorzellen binden den an die Zelle gebundenen Antikörper und initiieren eine Zelllyse.

Antikörper abhängige Phagozytose (ADCP): Fc-Rezeptoren auf Makrophagen agieren mit dem Antikörper und vermitteln die Phagozytose.

Kreuzvernetzung: An das Antigen gebundene Antikörper können von Fc-Rezeptoren kreuzvernetzt werden und die Apoptose initiieren.

Adaptiert aus: (Sanchez et al., 2016)

Der CD38 Antikörper Daratumumab zeigt eine sehr breite und hohe Antitumoraktivität, die im Detail für die Therapie des Multiplen Myeloms erforscht wurde. Daratumumab bindet ein spezifisches Epitop am CD38 Molekül und diese Bindung ist im Stande, verschiedene Effektormechanismen zu initiieren, insbesondere CDC, ADCC, ADCP, Kreuzvernetzung und eine Modulation der CD38-Enzymfunktion (N. W. C. J. van de Donk et al., 2016).

Nijhof et. al untersuchten die Mechanismen CDC und ADCC an Myelom-Zelllinien, als auch an primären Knochenmark-mononukleären Zellen, die sie von Multiplen Myelom-Patienten gewonnen haben. Es findet sich eine heterogene Aktivierung von CDC und ADCC *in vitro*, wobei die Stärke des Effektes abhängig von der Höhe CD38-Expression auf den Zellen ist. Interessanterweise gibt es keine Unterschiede im Effekt von Daratumumab zwischen unbehandelten Myelomzellen bei Erstdiagnose gegenüber Zellen bereits vortherapierter Patienten. Zudem fanden sie heraus, dass ATRA die Höhe von CD38 auf den Zellen stark erhöht und hiermit einhergehend der CDC- und ADCC-Effekt verstärkt wird (Nijhof et al., 2015). Des weiteren ist Daratumumab in der Lage, eine Antikörper-abhängige Phagozytose von CD38⁺-Burkitt-Lymphomzellen und Multiplen Myelom-Zelllinien *in vitro* und *in vivo* zu aktivieren (Overdijk et al., 2015). Ebenselbe Arbeitsgruppe konnte auch zeigen, dass Daratumumab *in vitro* und *in vivo* eine Kreuzvernetzung von Multiplen Myelom-Zelllinien induzieren kann, wenn ein sekundärer Antikörper oder ein Fc- γ -Rezeptor zur Verfügung steht. Daraus resultierend zeigt sich eine Induktion der Apoptose in den kreuzvernetzten Myelomzellen (Overdijk et al., 2016).

Neben diesen Mechanismen der Antitumoraktivität von Daratumumab gibt es weitere aktuelle Einsichten in die Auswirkungen der CD38-Inhibition auf das Immunsystem und das Tumormikroenvironment. Es zeigt sich, dass die CD38-Inhibition mittels Daratumumab das T-Zell-Repertoire moduliert. Blut- und Knochenmarkproben von Multiplen Myelom-Patienten, die an Daratumumab Monotherapie-Studien teilnahmen, zeigten eine verminderte Anzahl immunsupprimierender und eine erhöhte Anzahl von immunkompetenten T-Zellen. Im Detail findet sich insbesondere eine Senkung von CD38⁺ T-regulatorischen Zellen (T-Regs), die immunsupprimierender wirken als CD38⁻ T-Regs. Zusätzlich vergrößern sich die CD8⁺:CD4⁺ und CD8⁺:T-Reg-Verhältnisse und ebenso kommt es unter CD38-Inhibition zum absoluten Anstieg von zytotoxischen T-Zellen (CD8⁺) und T-Helferzellen (CD4⁺). Ferner kann ein Anstieg an Gedächtniszellen im Verhältnis zu naiven T-Zellen und eine verbreiterte T-Zell-Klonalität, gemessen an der Vielfalt von T-Zell-Rezeptoren festgestellt werden (Krejci et al., 2016).

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass die CD38-Inhibition mittels Daratumumab nicht nur eine sehr effektive Antikörper-vermittelte Zytotoxizität gegen Myelomzellen vermittelt, sondern auch das Immunsystem und das Tumormikroenvironment moduliert, in dem es CD38⁺ T-Regs ausschaltet und die T-Zell-Abwehr zu verstärken scheint. Dies könnte insbesondere in Betrachtung der akuten Entzündungsreaktion im Tumormikroenvironment eine sehr erfolgsversprechende Eigenschaft von Daratumumab sein.

2 FRAGESTELLUNG

Die akute myeloische Leukämie ist die häufigste akute Leukämie des Erwachsenen, deren Inzidenz mit dem Lebensalter steigt und aufgrund ihres aggressiven Verlaufs unbehandelt innerhalb kurzer Zeit zum Tod führt. Kurativ intendierte Therapieprotokolle umfassen intensive Chemotherapieprotokolle, welche aufgrund der hohen Nebenwirkungen nicht bei Älteren oder Patienten mit entsprechenden Begleiterkrankungen durchgeführt werden können. Neu zugelassene zielgerichtete Therapieoptionen zeigen zwar ein gutes Ansprechen, sind aber häufig auf eine bestimmte Patientensubgruppe mit bestimmten genetischen Charakteristika beschränkt und leider häufig nur von begrenzter Dauer wirksam. Das Hauptproblem der Therapie der AML stellt die hohe Rezidivrate dar. Neue Einsichten in die hämatopoetische Stammzellnische zeigen, wie AML-Zellen durch aberrante Signale des Mikroenvironments reguliert werden und vermutlich so dem Einfluss der Chemotherapie entkommen können. Die Stammzellnische unterliegt im Verlaufe der Erkrankung wichtigen funktionellen und strukturellen Veränderungen, die gesunde hämatopoetische Stammzellen verdrängen und das Überleben der Leukämiezellen unterstützen. Ebenso entsteht durch die Infiltration der AML-Blasten in der Knochenmarksnische ein inflammatorisches Milieu, welches das Wachstum der Blasten fördert und ihre Überwachung durch das Immunsystem verhindert. Das Antigen CD38 weist unter verschiedenen Gesichtspunkten vielversprechende Eigenschaften für eine zielgerichtete Therapie in der AML vor. Die Interaktion von CD38 mit seinem Liganden CD31 auf Endothelzellen lässt es als geeignetes Ziel, um die Zirkulation von Leukämiezellen zu verhindern, erscheinen. Weiterführend wird es häufig stark von AML-Blasten exprimiert, wodurch die CD38-Inhibition eine zielgerichtete anti-leukämische Wirksamkeit vermuten lässt. Die ebenfalls hohe Expression auf T-regulatorischen Zellen und die enzymatischen Funktionen von CD38 lassen auf einen immunmodulatorischen Effekt schließen, welcher dazu beitragen könnte, das immunsuppressive Tumormikroenvironment zu durchbrechen.

Der monoklonale CD38-Antikörper Daratumumab konnte in präklinischen *in vitro* und *in vivo* Studien, sowie in der klinischen Behandlung des Multiplen Myeloms schon eine hohe Antitumoraktivität herausstellen.

In dieser Forschungsarbeit soll die Regulation der CD38-Expression auf AML-Zellen durch die hämatopoetische Stammzellnische sowie der anti-leukämische Effekt der CD38-Inhibition mittels Daratumumab *in vitro* und *in vivo* herausgearbeitet werden. Ferner sollen zugrunde liegende Mechanismen der vermuteten anti-leukämischen Wirksamkeit von Daratumumab in der AML aufgedeckt werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Verbrauchsmittel

Tabelle 1 Geräte und Verbrauchsmittel

Gerät	Hersteller
Analysenwaage: ALJ 220-4NM	Kern & Sohn, Balingen
CO ₂ -Inkubator: NU-8700E	NuAire, Plymouth, USA
Durchflusszytometer: BD FACSAria III BD LSR II	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
DynaMag™-2 Magnet	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Filter: Nalgene Rapid-Flow Einweg-Filtrationsgerät	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gefrierbehälter: Mr. Frosty™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Kulturschalen: 10cm 35mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada
Laborglasflasche: DURAN	DWK Life Sciences, Wertheim
Mikroskop: Leica DM 1000 LED Olympus CK2 Inversionsmikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar Olympus K.K., Shinjuku, Japan
Optische 384-Well-Reaktionsplatten: Applied Biosystems MicroAmp	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Parafilm	Bemis, Neenah, USA
PCR Thermocycler: FlexCycler	Analytik Jena, Jena
Pipetten: Eppendorf Research® ErgoOne®	Eppendorf, Hamburg Star Lab, Ahrensburg
Pipettenspitzen: TipOne®	Star Lab, Ahrensburg
Pipettierhilfe: pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Reaktionsgefäße: 1,5ml: TubeOne®	Star Lab, Ahrensburg

1,5ml: Eppendorf Safe-Lock Gefäße	Eppendorf, Hamburg
5ml Rundbodenröhrchen: Falcon®	Corning Incorporated, Corning, USA
15ml, 50ml: CELLSTAR®	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Quant-Studio 5 Applied Biosystems	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Shandon Single Cytoslides Objektträger	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Shandon EZ Single Cytofunnel	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sicherheitswerkbank: NU-440-401E	NuAire, Plymouth, USA
Stabpipetten: CELLSTAR®	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Synergy 2	BioTek, Winooski, USA
Zählkammer: Neubauer improved	Assistent, Sondheim
Zellkulturflaschen (25cm ² ; 75cm ²): CELLSTAR®	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatten (6-Loch, 12-Loch, 24-Loch, 48-Loch, 96-Loch): Falcon®	Corning Incorporated, Corning, USA
Zellkulturplatten 96-Loch Ultra Low Adherent	Corning Incorporated, Corning, USA
Zellkulturplatten 96-Loch schwarz	CoStar, Washington DC, USA
Zentrifugen:	
Rotanta 460R	Hettich, Tuttlingen
Mikro 220R	Hettich, Tuttlingen
Shandon Cytospin 2	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

3.1.2 Chemische Substanzen, Reagenzien und Puffer

Tabelle 2 Substanzen, Reagenzien und Puffer

Substanz	Hersteller
2-Methylbutan	Merck, KGaA, Darmstadt
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Aqua	B. Braun, Sempach, Schweiz
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
BD Cytifix™ Fixierungspuffer	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
BD Pharm Lyse™ Lysepuffer	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
BD Phosflow™ Perm Buffer III Permeabilisierungspuffer	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Calcein-AM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
CD14 Microbeads	Miltenyi, Bergisch Gladbach

Cytarabin (Ara-C)	Stada, Bad Vilbel
Daratumumab (Darzalex)	Janssen, Neuss
Dimethylsulfoxid (DMSO)	PAN-Biotech, Aidenbach
DNase	QIAGEN, Venlo, Niederlande
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
FACS Clean	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
FACS Flow	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
FACS Rinse	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	PAN-Biotech, Aidenbach
Glutamax Supplement	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
High Density Lipoprotein (HDL)	Merck, Darmstadt
Histofix 4%	Roth, Karlsruhe
IgG ₁ , Kappa aus humanem Myelomplasma, Isotypkontrolle	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
IgG-b12 Isotypkontrolle	Genmab
Lymphoprep™	STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada
Maisöl	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
MitoTracker Green FM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
0,9% Natriumchloridlösung	Braun, Melsungen
Normal humanes Serum AB	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
OKT3	BioLegend, San Diego, USA
Osteosoft	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd rein	Roth, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Primocin™	InvivoGen, San Diego, USA
Rekombinantes humanes IL-1 β	PeptoTech, Rocky Hill, USA
Rekombinantes humanes IL-3	PeptoTech, Rocky Hill, USA
Rekombinantes humanes IL-6	PeptoTech, Rocky Hill, USA
Rekombinantes humanes M-CSF	PeptoTech, Hamburg
Rekombinantes humanes SCF	PeptoTech, Rocky Hill, USA
Rekombinantes humanes TPO	PeptoTech, Rocky Hill, USA
RNA to cDNA EcoDry™ Premix	Takara Bio, Kusatsu, Japan
RNase-free water	QIAGEN, Venlo, Niederlande
RNaseZAP™	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Sucrose	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
SYBR Green Gene Expression Master Mix (Rox)	Roche, Basel
Tissue-Tek O.C.T. Compound	Sakura, Alphen aan den Rijn, NL
Tretinoin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Triton X100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Zelldissoziationslösungen: Trypsinlösung: TrypLE Express Cell Dissociation Solution, nicht-enzymatisch	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

3.1.3 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Tabelle 2 Antikörper

Antikörper	Hersteller
BrdU APC	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
hCD11b APC	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
hCD14 PE	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
hCD16 APC	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
hCD16 PerCP-Cy5.5	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
hCD3 APC	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
hCD38 PE	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
hCD33 PE-Cy7	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
hCD45 APC	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
hCD45 FITC	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
mCD45 PerCP-Cy5.5	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
hCD144 FITC	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA

3.1.4 Kits

Tabelle 3 Kits

Kit	Hersteller
Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
BrdU Flow Kit:	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA

APC BrdU Flow Kit	
Macs Cell Separation Kit	Miltenyi, Bergisch Gladbach
RNA-Isolations-Kits: Dynabeads® mRNA DIRECT™ Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RNeasy Mini Kit	QIAGEN, Venlo, Niederlande
RNeasy Micro Kit	QIAGEN, Venlo, Niederlande

3.1.5 Medien

Tabelle 4 Medien

Medium	Hersteller
Endothelial Cell GM2	PromoCell, Heidelberg
Endothelial Cell GM2 Supplement Pack	PromoCell, Heidelberg
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Leibovitz's L15 Medium, no phenol red	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Minimum Essential Medium (αMEM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RPMI-Medium 1640	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
StemSpan™ SFEM	STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada

3.1.6 Software

Tabelle 5 Software

Software	Hersteller
BD FACSDiva Software Version 6.1.3	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Endnote X8.2	Clarivate Analytics, Philadelphia, USA
FlowJo v10	FlowJo LLC, Ashland, USA
GraphPad Prism 6	Graphpad Software, Inc., La Jolla, USA
Microsoft Office 2010	Microsoft, Redmond, USA

3.1.7 Primer

Tabelle 7 Primer

Gene symbol	Sequence forward	Sequence reverse
<i>GAPDH</i>	TCTGCTCCTCCTGTTTCGACA	AAAAGCAGCCCTGGTGACC
<i>ANGPT1</i>	GCCATCTCCGACTTCATGTT	CTGCAGAGAGATGCTCCACA
<i>APAF1</i>	AAGGTGGAGTACCACAGAGG	TCCATGTATGGTGACCCATCC
<i>BAX</i>	CCCGAGAGGTCTTTTTCCGAG	CCAGCCCATGATGGTTCTGAT
<i>BCL2</i>	GGTGGGGTCATGTGTGTGG	CGGTTCAAGTACTCAGTCATCC
<i>CASP3</i>	CATGGAAGCGAATCAATGGACT	CTGTACCAGACCGAGATGTCA
<i>CASP8</i>	TTTCTGCCTACAGGGTCATGC	GCTGCTTCTCTCTTTGCTGAA
<i>CASP9</i>	CTTCGTTTCTGCGAACTAACAGG	GCACCACTGGGGTAAGGTTT
<i>CDH5</i>	TTGGAACCAGATGCACATTGAT	TCTTGCGACTCACGCTTGAC
<i>CD38</i>	CAACTCTGTCTTGCGTCAGT	CCCATACACTTTGGCAGTCTACA
<i>CXCL12</i>	TGGGCTCCTACTGTAAGGGTT	TTGACCCGAAGCTAAAGTGG
<i>CXCR4</i>	ACTACACCGAGGAAATGGGCT	CCCACAATGCCAGTTAAGAAGA
<i>CYTC</i>	CTTTGGGCGGAAGACAGGTC	TTATTGGCGGCTGTGTAAGAG
<i>ICAM1</i>	ATGCCCAGACATCTGTGTCC	GGGGTCTCTATGCCCAACAA
<i>MCL1</i>	TGCTTCGGAAACTGGACATCA	TAGCCACAAAGGCACCAAAAG
<i>PECAM1</i>	AACAGTGTTGACATGAAGAGCC	TGTA AACAGCACGTCATCCTT
<i>SELE</i>	AGAGTGGAGCCTGGTCTTACA	CCTTTGCTGACAATAAGCACTGG
<i>BID</i>	ATGGACCGTAGCATCCCTCC	GTAGGTGCGTAGGTTCTGGT
<i>VCAM1</i>	GTCTCCAATCTGAGCAGCAA	TGAGGATGGAAGATTCTGGA
<i>VEGFA</i>	AGGGCAGAATCATCACGAAGT	AGGGTCTCGATTGGATGGCA

3.2 Methoden

3.2.1 Zelllinien und Zellkultur

Zur Kultur aller humanen und murinen Zelllinien wurden diese bei 37°C und 5% CO₂ in einem CO₂ Inkubatur (NU-8700E, NuAire, Plymouth, USA) gehalten. Die verwendeten Zelllinien wurden hierfür gemäß den Vorgaben der Hersteller (ATCC/DSMZ) subkultiviert.

Alle für Experimente eingesetzten Zelllinien wurden maximal fünfmal passagiert. Das Auftauen erfolgte in einem 37°C warmen Wasserbad und die Zellen wurden anschließend sofort in serumhaltiges Medium überführt, einmalig mit 10ml phosphate-buffered saline (PBS) gewaschen und dann anhand der vorgegebenen Zellzahlen in Zellkulturflaschen mit dem jeweiligen Medium der Zelllinie überführt. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt. Die Zellvitalität und die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer lichtmikroskopisch bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit 0,1%igem Trypanblau gefärbt, welches nur Zellen anfärbt, deren Membran bereits beschädigt ist. Diese perforierten und gestorbenen Zellen erscheinen dann lichtmikroskopisch blau, während lebende Zellen nicht angefärbt werden und hell erscheinen. Die Konservierung erfolgte, in dem wir die Zellen im jeweiligen Zelllinienmedium mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) in Mr. Frosty™ Gefrierbehältern bei -80°C einfroren. Mit einer Kühlrate von -1°C/Minute erlaubt dies eine optimale Geschwindigkeit für die Konservierung von Zellen. Anschließend wurden die Zellen in der flüssigen Phase von Stickstoff in einem N₂-Tank-System gelagert.

Es wurden insgesamt acht verschiedene AML- Zelllinien verwendet. THP-1-Zellen wurden in RPMI 1640 mit dem Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (FCS) kultiviert. Diese Zelllinie ist eine akute monozytäre Leukämie. Die Zellen tragen die Translokation t(9;11)(p21;q23) und somit das MLL-MLLT3 (MLL-AF9) Fusionsgen. Die Zelllinie Kasumi-1 trägt die Translokation t(8;21)(q22;q22), welche das RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO) Fusionsgen ausprägt und wurde von einem Patienten mit AML M2 (FAB-Klassifikation) gewonnen. Die Zellen wurden in RPMI 1640 mit 20% FCS kultiviert. KG-1 ist eine Zelllinie, die von einem Patienten mit Erythämie mit Übergang zur AML abgeleitet wurde. Bei dem verwendeten Kulturmedium handelt es sich um IMDM mit 20% FCS. Die Zelllinie HL-60 wurde von einer Patientin mit akuter Promyelozytenleukämie etabliert und ebenfalls in IMDM unter Zugabe von 20% FCS kultiviert. MOLM-13 leitet sich von einer AML M5a (FAB-Klassifikation) auf dem Boden eines myelodysplastischen Syndroms ab und wurde in RPMI+ 20% FCS kultiviert. Die Zelllinie OCI-AML-3 wurde von einem Patienten mit einer AML M4 (FAB-Klassifikation) etabliert. Sie wurde in Alpha-MEM und 20% FCS kultiviert. Die Zelllinie OCI-M2 wurde in IMDM+ 20% FCS kultiviert und leitet sich von einem Patienten mit Erythroleukämie, FAB Klassifikation M6 ab. K562 Zellen stammen von einer Patientin mit einer Blastenkrise bei CML und Erythroleukämie. Diese wurden in IMDM mit 10% FCS kultiviert.

Zusätzlich zu den aufgelisteten AML-Zelllinien wurden zudem noch zwei verschiedene Stroma-Zelllinien eingesetzt. Die MS-5-Zelllinie leitet sich von murinen Knochenmarkstromazellen ab. Sie wachsen als adhärenente Schicht in IMDM-Medium mit 20% FCS und wurden bei einer Konfluenz von 80% überführt. Dafür wurden die Zellen mit 6ml PBS gewaschen und anschließend mit 3ml Trypsin 3 Minuten bei 37°C inkubiert und so abgelöst.

Dabei wurde der Kontakt zur Zellkulturflasche und der Zell-Zell-Kontakt von dem Enzym aufgespalten. Die Reaktion wurde mit 6ml serumhaltigem Medium gestoppt und die in Einzelzellsuspension vorliegenden Zellen abgenommen und in der gewünschten Anzahl weiter ausplattiert und kultiviert. Als zweite Stroma-Zelllinie verwendeten wir humane umbilikale Venenendothelzellen (HUVEC). Diese wurden in dem spezifischen Endothelzellmedium EGM-2 kultiviert. Dieses beinhaltet neben FCS noch weitere Zusätze, nämlich Hydrocortison, Ascorbinsäure, Heparin und die humanen Wachstumsfaktoren fibroblast growth factor (FGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), insulin-like growth factor (IGF) und epidermal growth factor (EGF). Die Zellen wurden identisch zu den MS-5 Zellen gelöst und überführt. Alle oben beschriebenen Kulturmedien wurden mit 1% Penicillin/Streptomycin ergänzt. Das verwendete FCS wurde im Wasserbad bei 56°C für 30 Minuten hitzeinaktiviert und anschließend bis zur Weiterverwendung in 50ml Portionen bei -20°C tiefgefroren.

3.2.2 Gewinnung und Lagerung von Patientenproben

Die primären Zellen, die für unsere *in vitro* Experimente eingesetzt wurden, wurden aus dem peripheren Blut von erstdiagnostizierten, nicht vortherapierten AML-Patienten oder gesunden Kontrollpersonen nach entsprechender Aufklärung und Zustimmung gewonnen (Ethikvotum der Universität Duisburg Essen, #15-6430-BO).

Aus dem heparinisierten peripheren Blut wurde die Population von mononukleären Zellen, auch PBMC genannt, separiert. Dies gelang durch die Verwendung des sogenannten FICOLL Gradienten. Zur Auftrennung der PBMCs werden synthetische Polymere aus Saccharose (Ficoll) eingesetzt (Lymphoprep™, Stem Cell Technologies). Erythrozyten und Granulozyten sinken beim Zentrifugieren durch die Polymere, während PBMCs durch ihre geringere Dichte auf der Substanz schwimmen (Buffy Coat) und nach der Zentrifugation als homogene Zellpopulation abgenommen werden können. Die Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung in IMDM+ 20% FCS und 10% DMSO in der flüssigen Phase von N₂ konserviert. Am Tag der Verwendung wurde die jeweilige Probe im Wasserbad erwärmt und sofort in serumhaltiges Medium überführt.

Es folgten zwei Waschschrte in PBS und eine Zellzahl- und Viabilitätsbestimmung mittels Trypanblaufärbung in Verwendung der Neubauer-Zählkammern unter dem Lichtmikroskop, bevor die Zellen für Experimente eingesetzt wurden. Eine Zusammenstellung der Patientencharakteristika ist der beigefügten Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 8 Patientenproben

Probe	Alter (Jahre)	ELN Risikostratifizierung (2017)	Zytogenetik	Molekulargenetik	CD33 Expression [%]	CD38 Expression [%]
1	73	ungünstig	Komplex aberranter Karyotyp	n.b.	97,1	21,9
2	66	ungünstig	45,XX,t(3;3)(q21;q26),-7	Rearrangement in EVI1-Genregion	97,7	98,1
3	50	ungünstig	46,XX	FLT3-LM	99,4	100
4	64	intermediär	46,XY	keine Mutation	82	83
5	72	günstig	46,XX	NPM-1	99,5	99,7
6	59	ungünstig	45,XX,-7	keine Mutation	77	85
7	63	günstig	46,XX	KMT2A-PTD, NPM-1, FLT3-ITD (0,39)	95	99,3
8	77	n.b.	46,XX[25]	n.b.	96	96
9	76	günstig	46,XY	IDH2, NPM1, FLT3-ITD (0,09)	99	96
10	71	günstig	46,XY	NPM-1	n.b.	98,3
11	52	ungünstig	Komplex aberranter Karyotyp	TP-53 (Missense Mutation c.659A>G in p.Tyr220Cys)	94,3	97,3
12	37	ungünstig	46,XX	FLT3-ITD (0,7)	97,8	99,8
13	39	intermediär	46,XX	FLT-3 (ratio 0,57) NPM-1	100	n.b.
14	76	günstig	46,XX[12]	NPM1, FLT3-TKG	93,6	96,2
15	67	ungünstig	46,XY,-7,+19 [25]	FLT3-TKD	100	0
16	64	intermediär	46,XX	FLT3-LM (ratio 0,391), NPM-1	99	97,4
17	34	günstig	46,XX	NPM-1	98	95

3.2.3 Kokultivierung von AML- und Stroma-Zelllinien

Die Kokultur von AML-Zellen mit verschiedenen Stromazellen ist ein geeignetes Modell, um eine Nachstellung der Knochenmarksnische *in vitro* zu etablieren. Diese Experimente wurden mit AML- und Stroma-Zelllinien auf 96-Multiwell Gewebekulturplatten durchgeführt. Dafür wurde zunächst das Stroma ausgesät (HUVEC Endothelzellen oder MS-5 Fibroblasten). Dieses wurde aus Zellkulturflaschen wie bereits beschrieben geerntet und in einer bestimmten Zellzahl ausgesät, so dass es nach 2 Tagen Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ eine Konfluenz von 80% erreichte. Die Konfluenz bestimmten wir durch Kontrollen mit dem Umkehrmikroskop. Daraufhin wurde das Stromazellmedium entfernt und pro Well 2x10⁴ Zellen der AML-Zelllinien hinzugefügt, entweder in dem jeweiligen AML-Zelllinienmedium (Kontrolle), oder diesem mit 0,1 µg/ml Daratumumab ergänzt. Dieser Ansatz inkubierte für weitere 4 Tage im Inkubator. Am Analysetag wurden die Suspensionszellen abgenommen, das Well mit PBS gewaschen und das adhärenente Stroma mit Trypsin für 3 Minuten bei 37°C gelöst. Die Stromazellen wurden zusammen mit den AML-Zellen in Eppendorf Gefäßen gesammelt und die absolute Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer bestimmt. Danach wurde eine Antigenfärbung der Zellen mit einem humanen CD45-Antikörper durchgeführt. Als letzten Schritt wurden die gefärbten Zellen am Durchflusszytometer untersucht. Jede Kondition wurde in jedem Experiment dreifach ausplattiert.

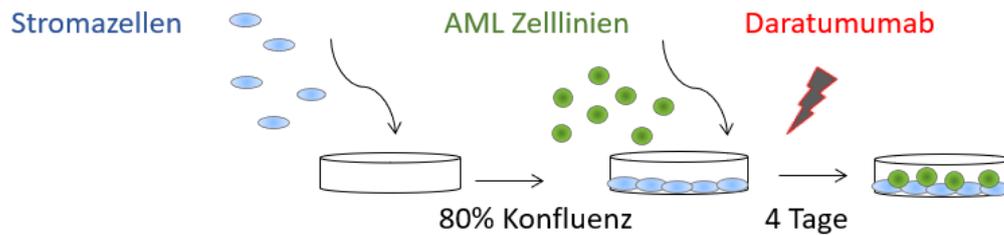


Abbildung 2 Schematischer Aufbau der Durchführung der Kokulturrexperimente mit Stromazellen und AML-Zelllinien. HUVEC Endothelzellen oder MS-5 Fibroblasten wurden bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert und dann mit unterschiedlichen AML-Zelllinien beimpft. Die Kokultur inkubierte entweder in Zellkulturmedium oder in diesem mit 0,1µg/ml Daratumumab versetzt über 4 Tage.

3.2.4 Kultivierung humaner mesenchymaler Sphäroide

Die humane mesenchymale Stamm- und Progenitorzelllinie BMB wurde in IMDM+ 20 % FCS+ 1% Penicillin/Streptomycin+ 1% Glutamin kultiviert. BMB-Zellen wurden in klonaler Zelldichte in DMEM/F12, Humanem Endothel-Serum-freien Medium mit 15% Hühnerembryoextrakt, 0,1mM (Millimolar) B-Mercaptoethanol, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% nicht-essentiellen Aminosäuren, 1% N2 und 2% B27, FGF, PDGF, Oncostatin M, IGF-1 und EGF kultiviert. Die Entstehung von mesenchymalen Sphäroiden wurde regelmäßig mikroskopisch beurteilt.

3.2.5 Triplekultivierung von humanen AML- und gesunden Kontrollzellen

Primäre humane AML- bzw. gesunde Kontrollzellen wurden in serumfreien StemSpan™ Serum-Free Expansion Medium (SFEM) inkubiert, welches mit rekombinanten humanen Wachstumsfaktoren (50ng/ml SCF, 50ng/ml TPO), Zytokinen (5ng/ml IL-3, 5ng/ml IL-6), 40mg/ml humanem High Density Lipoprotein (HDL), 2µl/ml Primocin und Heparin supplementiert wurde. HUVEC-Endothelzellen wurden vergleichbar zu den Kokulturrexperimenten in definierter Zellzahl ausgesät, so dass sie nach 2 Tagen eine Konfluenz von 80% erreichten. Etwa 10 mesenchymale Sphäroide wurden pro anzusetzendem Well hinzugefügt. Sämtliche Konditionen, die mesenchymale Sphäroide enthielten, wurden auf „Ultra Low adherent“ 96 Well Platten angesetzt. Zu jedem Well wurden $1,35 \times 10^5$ primäre Zellen (AML oder gesunde Kontrollzellen) in 0,1µM ATRA oder Kontrollmedium, hinzugefügt. Weitere 2 Tage später wurde Daratumumab (0,1µg/ml) oder in einzelnen Experimenten zusätzlich IgG₁ und IgG-b12 (0,1µg/ml), hinzugefügt.

Zu den Kontrollen wurde weiteres Medium gegeben, so dass das Volumen in allen Konditionen vergleichbar blieb. Jede Kondition wurde in jedem Experiment dreifach ausplattiert. Die Auswertung des Experimentes erfolgte analog zu den Kokulturen. Die Suspensions- und Stromazellen wurden geerntet, mittels Neubauer- Zählkammer am Mikroskop gezählt und mit einem humanen CD45-Antikörper für die Analyse am Durchflusszytometer gefärbt. Fünf von insgesamt 10 Experimenten wurden anschließend Fluoreszenz-aktiviert sortiert. Sortiert wurden CD45⁺ hämatopoetische Zellen und CD144⁺ Zellen.

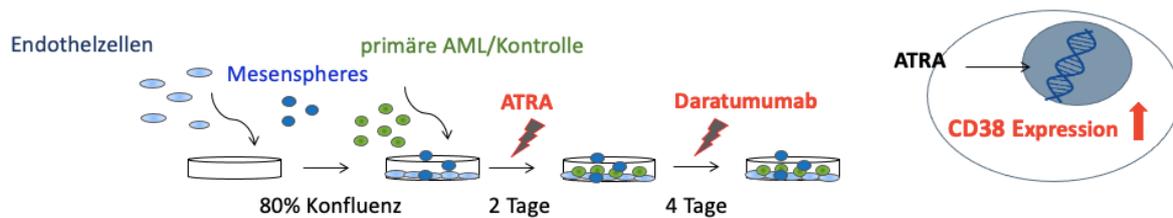


Abbildung 3 Schematischer Aufbau der Durchführung der Triplekulturexperimente mit Stromazellen und primären AML- oder gesunden Spenderzellen. Endothelzellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert und folgend mit mesenchymalen Sphäroiden und primären AML- oder gesunden Kontrollzellen beimpft. Es folgte in der Hälfte der Konditionen eine Vorbehandlung mit 0,1µM ATRA über 2 Tage. Die folgenden 4 Tage wurden die Zellen in Daratumumab 0,1µg/ml oder Zellkulturmedium weiter inkubiert.

3.2.6 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein spezifisches Messverfahren, mit dem man Zellen charakterisieren und quantifizieren kann. Das Prinzip beruht darauf, dass die zu untersuchenden Zellen einzeln durch eine Kapillare fließen und dabei einen Laserstrahl passieren. Durch die Zellen wird der Laserstrahl gebrochen und gebeugt und das emittierte Licht wird in ein elektrisches Signal umgewandelt und von einem Detektor detektiert. An die Zellen gebundene Fluorochrome werden angeregt und können in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen sichtbar gemacht werden. Das Vorwärtsstreulicht (FSC) ist ein Maß für die Beugung des Lichtsignals durch die Zellen und abhängig von der Größe oder des Volumens. Das Seitwärtsstreulicht (SSC) hängt von der Brechung des Lichtes ab und ist abhängig von der Zellstruktur, beispielsweise von der Granularität. Zusätzlich gibt es Detektoren, die Fluoreszenz einzelner Zellen wahrnehmen. Dadurch kann man mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern Zielstrukturen auf den Zellen färben und diese gleichzeitig analysieren.

Dadurch, dass mit diesem Prinzip mehr als 1000 Zellen/Sekunde analysiert werden können, erhält man schnell Informationen zu verschiedenen Zellpopulationen. In Diagrammen können so FSC/SSC und die verschiedenen Fluorochrome gegeneinander aufgetragen und analysiert werden (Picot et al., 2012). Wir verwendeten das BD LSR II Durchflusszytometer. Als Auswertungsprogramm benutzten wir die Software FlowJo® der Firma FlowJow, LLC.

3.2.7 Durchflusszytometrische Analyse

Jede einzelne hier dargestellte durchflusszytometrische Analyse hat als Grundlage dieselbe Einsäum-Strategie (engl.: Gating). Zunächst wurden die zu analysierenden Zellen eingesäumt (SSC-A/FSC-A), darauf folgten zwei Ausschnitte, die es möglich machten, Dupletten auszusortieren (FSC-W/FSC-H und SSC-W/SSC-H). In jeder Analyse wurde der Lebend-Tod-Farbstoff DAPI verwendet, welcher durch die geschädigte Membran toter Zellen treten kann und dort die DNA anfärbt. Nach dem Gating für DAPI⁻ (lebende Zellen) folgten dann schließlich die jeweils spezifische Strategie abhängig von den darüber hinaus verwendeten Antikörpern.

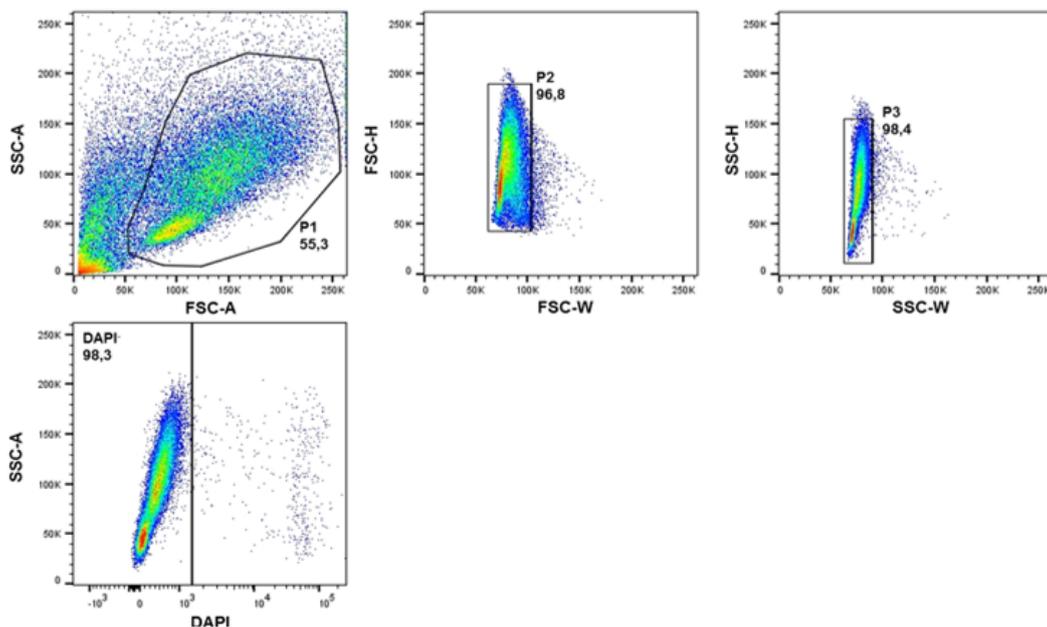


Abbildung 4 Gating-Strategie für die durchflusszytometrische Analyse lebender Einzelzellen.

3.2.8 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung

Das durchflusszytometrische Prinzip machen sich auch Zellsortiersysteme zu Nutzen. Zusätzlich dazu können diese allerdings die einzelnen Zellen anhand von Kriterien sortieren.

Dabei werden die einzelnen Zellen durch den FSC, den SSC und die verschiedenen Fluorochrome charakterisiert. Der Flüssigkeitsstrom wird von dem Gerät in Tröpfchen aufgetrennt, die einzelne Zellen beinhalten. Diese werden anhand von festgelegten Kriterien elektrisch geladen, so dass die Zellen, die den Kriterien entsprechen, im elektrischen Feld herausortiert werden können. Durch verschiedene Auffanggefäße kann man so die unterschiedlichen Zellpopulationen gewinnen. Die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS) wurde bei den Triplekulturexperimenten mit den primären AML- und gesunden Kontrollzellen angewendet, nachdem diese durchflusszytometrisch analysiert wurden. Die hämatopoetischen Zellen (Kriterium: CD45⁺) und die Endothelzellen (Kriterium: CD144⁺) wurden sortiert, um weiterführend molekularbiologische Experimente auszuführen.

3.2.9 Einsatz des Medikamentes Daratumumab

Zum Einsatz in den Experimenten kam das Medikament Daratumumab (Darzalex, Janssen). Dieses hat eine Konzentration von 20mg/ml und wurde im Kühlschrank bei 4°C lichtgeschützt gelagert. Zumeist wurde in den *in vitro* Experimenten eine Konzentration von 0,1µg/ml verwendet, wobei zum Verdünnen der Stocklösung das verwendete Zellkulturmedium benutzt wurde. In einzelnen Experimenten kamen höhere Konzentrationen von bis zu 10µg/ml zum Einsatz. Die Arbeitslösungen des Medikamentes wurden nur am jeweiligen Herstellungstag verwendet.

3.2.10 Einsatz von All-trans-Retinsäure

Das pulverisierte Ausgangsprodukt der All-trans-Retinsäure wurde mit 2,5ml DMSO vermischt, um die gewünschte Konzentration von 40mg/ml zu erreichen. Dieses wurde dann abgefüllt und bei -20°C in Portionen gelagert. Für die Triplekulturexperimente wurde eine Konzentration von 0,1µM verwendet, welche durch Verdünnen mit dem Kulturmedium erreicht wurde. In den *in vivo* Experimenten wurde eine Konzentration von 10mg/kg Körpergewicht (mg/kgKG) verwendet.

3.2.11 Proliferationsanalyse

Um die Proliferation von AML-Zellen in der Kokultur mit MS-5 und HUVEC unter Daratumumab zu charakterisieren, wurde das APC BrdU Flow Kit (BD Biosciences) eingesetzt. BrdU (Bromdesoxyuridin) ist ein Nukleotidanalogen zu Thymin respektive Desoxyuridin. Es wird bei der Desoxyribonuklein (DNA)-Synthese in die DNA der Zelle eingebaut und kann diese so markieren.

Dies passiert allerdings nur mit genau den Zellen, die sich gerade in der S-Phase des Zellzyklus befinden, also die DNA replizieren. Mit einem spezifischen Antikörper kann BrdU im Durchflusszytometer sichtbar gemacht werden. Durch zusätzliche Färbung der Zellen mit DAPI kann ebenfalls unterschieden werden zwischen G₀/G₁- und G₂/Mitose-Phase. Um dies für OCI-AML-3 und Kasumi-1 zu testen, wurde ein Experiment nach Protokoll der Kokulturen auf einer 48-Multiwell-Platte angesetzt. Zunächst wurde das Stroma ausgesät, dann die AML-Zellen nach Erreichen der 80%igen Konfluenz nach 2 Tagen hinzugefügt. Der IgG₁ Antikörper galt als Kontrolle neben der Behandlung mit Daratumumab (jeweils 0,1µg/ml). An Tag 5 nach Ansatz der AML-Zellen wurde das BrdU Flow Kit durchgeführt. Dazu wurde BrdU in einer Konzentration von 1mM zu den Zellen hinzugegeben und für 45 Minuten inkubiert. Danach wurden die Zellen geerntet, die adhären Zellen mit Trypsin gelöst und die Oberflächenantigene mit einem humanen CD45-Antikörper gefärbt. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die Membran nach Protokoll des Kits permeabilisiert. Darauffolgend wurde das BrdU sichtbar gemacht mit 100µl DNase-Lösung/Well (300µg/ml). Danach erfolgte dann die BrdU-Antikörperfärbung mit 10µl Antikörper in 50µl Gesamtvolumen für 20min lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Nach einem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 200µl DAPI in FACS-Buffer aufgenommen und dann durchflusszytometrisch analysiert.

3.2.12 Apoptosedetektion

Analog zur Proliferationsuntersuchung wurde die Apoptoseinduktion durch Daratumumab an beiden AML-Zelllinien (OCI-AML-3 und Kasumi-1) im Kokulturmodell getestet. Die Experimente wurden am selben Tag analog zu den Proliferationsexperimenten angesetzt und an Tag 6 analysiert. Hierfür wurde das PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences) verwendet. Im Prozess der Apoptose wird das Membranlipid Phosphatidylserin von der inneren- auf die äußere Lipidschicht der Zellmembran verlagert, was im früh-apoptotischen Geschehen passiert. Annexin V ist ein Ca²⁺-abhängiges Phospholipid-bindendes Protein, welches besonders stark an Phosphatidylserin bindet. In dem man Annexin V mittels Fluorochrom-konjugierter Antikörperfärbung sichtbar machen kann, kann man früh-apoptotische Prozesse aufdecken. Zusätzlich dazu können durch DAPI-Färbung Zellen mit beschädigter Zellmembran detektiert werden, welche spät-apoptotisch oder nekrotisch sind. So kann man einen detaillierten Einblick in die Apoptose der AML-Zellen bekommen. Die AML- und Stromazellen wurden an Tag 6 geerntet und daraufhin gezählt. Genau 1x10⁵ Zellen wurden dann mit dem Annexin V- FITC Antikörper und einem humanen CD45 Antikörper für 25 Minuten lichtgeschützt gefärbt und nach einem Waschprozess in 200µl DAPI in FACS-Buffer resuspendiert und durchflusszytometrisch untersucht.

3.2.13 Assay für Komplement-abhängige Zytotoxizität

Um die zugrunde liegenden Mechanismen der Wirkung von Daratumumab in der AML zu studieren, wurden Effektorassays durchgeführt. Dazu wurde der Stoff Calcein-AM zur Markierung von gesunden, lebenden Zellen verwendet. Dieser Stoff ist lipophil und diffundiert durch die Zellmembran. In lebenden Zellen wird das Calcein-AM dann von ubiquitär verfügbaren Enzymen in ein Produkt gespalten, das fluoresziert und bei 494nm angeregt wird. Dieses kann dann nicht mehr die Zellmembran passieren und markiert so letztlich jede lebende Zelle.

Um die Komplement-abhängige Zytotoxizität zu testen, wurden zunächst die AML-Zellen (OCI-AML-3 und Kasumi-1) mit 1µg/ml Calcein-AM in PBS für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und danach dreimalig mit PBS gewaschen. Das Experiment wurde auf 96-Multiwell-Platten angesetzt. Dafür wurden die AML-Zellen in Medium mit 10%- normal humanem Serum aufgenommen und es wurde zusätzlich entweder der IgG₁ Antikörper als Kontrolle oder Daratumumab in Konzentrationen von 0,1µg/ml bis 10µg/ml dazugegeben und das Ganze für eine Stunde bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert. Um einen Bereich von 0-100% Zelllyse zu definieren, wurden die markierten AML-Zellen zusätzlich in Medium ohne Serum (Minimalkontrolle) und in Medium mit 1% Triton X 100 (Detergenz, Maximalkontrolle) aufgenommen. Die gesamte Platte wurde zentrifugiert und von den Konditionen das Medium abgenommen. Wurden in den jeweiligen Konditionen Zellen lysiert, so trat das fluoreszierende Calcein-Produkt in das Medium über. Genau dieses Ausmaß an Fluoreszenz des Mediums der verschiedenen Konditionen konnte dann am Spektrophotometer (BioTek, Synergy 2) gemessen werden.

3.2.14 Assay für Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität

Hierbei wurde ein ähnlicher Versuchsaufbau wie für das Komplement-Assay zuvor angewendet. Die AML-Zellen (OCI-AML-3 und Kasumi-1) wurden mit 1µg/ml Calcein-AM markiert. In diesem Modell wurden zusätzlich Effektorzellen benötigt, die die Lyse der Zielzellen und somit das ADCC initiieren. Dafür wurden primäre humane PBMCs verwendet, die aus dem Blut von gesunden Spendern isoliert wurden. Diese inkubierten dann mit den Zielzellen in einem Effektor:Zielzellen-Verhältnis von 50:1 für 4 Stunden in Zellkulturmedium mit IgG₁ oder Daratumumab (0,1µg/ml-10µg/ml) bei 37°C und 5% CO₂ auf einer 96-Multiwell-Platte. Die Minimalkontrolle und die Maximalkontrolle wurden ergänzt. Zuletzt wurde die Fluoreszenz des Zellüberstandes nach Zentrifugation am Spektrophotometer gemessen und das Ausmaß der Lyse der Zielzellen in den verschiedenen Konditionen ermittelt.

3.2.15 Gewinnung und Differenzierung primärer CD14⁺ Makrophagen

Um primäre humane Makrophagen zu gewinnen, wurde peripheres Blut eines gesunden Spenders gesammelt und die mononukleäre Zellfraktion, wie zuvor beschrieben, gewonnen. Die Zellen inkubierten dann mit magnetischen CD14-Beads, die an das Antigen CD14 binden. CD14 ist ein Molekül, welches auf der monozytären-, nicht aber auf der lymphozytären Zellreihe exprimiert wird. Dann wurden mittels magnetischer Zellaufreinigung (MACS® Magnetic Cell Separation) mit LS Depletions-Säulen die Zellen gewonnen, die mit den CD14-Beads markiert wurden. Diese homogene Population von Monozyten inkubierten dann in Zellkulturflaschen in RPMI Medium +1% GlutaMax +1% P/S mit dem Makrophagen-Koloniestimulierenden Faktor (M-CSF) in einer Konzentration von 100ng/ml. Nach 5 Tagen wurde ein Drittel des bereits vorhandenen Mediums mit der doppelten Konzentration M-CSF hinzugegeben. Ab Tag 6 erhielten wir eine Population von differenzierten, adhärenen Makrophagen, die für die Experimente wie bereits beschrieben mit Trypsin abgelöst wurden. Es wurden 1×10^5 Zellen pro Well auf eine 96-Multiwell-Platte ausplattiert, welche über Nacht anwachsen konnten.

3.2.16 Assay für Antikörper-abhängige Phagozytose

Die AML-Zellen (OCI-AML-3 und Kasumi-1, sowie fünf primäre AML-Proben) wurden mit Calcein-AM markiert. Einen Tag vor dem Experiment wurden die humanen Makrophagen in bestimmter Zellzahl auf 96 Multiwell-Platten ausgesät und über Nacht belassen. Dann wurden die AML-Zellen in einem Effektor:Zielzell Verhältnis von 2:1 in Medium hinzugegeben, entweder mit IgG₁ oder Daratumumab (0,1-10µg/ml) ergänzt. Das Experiment inkubierte für 4 Stunden, danach wurden die Suspensionszellen und die Makrophagen wie zuvor beschrieben gelöst. Die Zellmischung aus AML-Zellen und Makrophagen wurde mit dem Antikörper CD16, der nur von den Makrophagen exprimiert wird, gefärbt. Bei der durchflusszytometrischen Analyse konnten so die Makrophagen von den Zielzellen getrennt werden. Zuvor wurde mittels Durchflusszytometrie eine CD16-Expression auf den AML-Zellen ausgeschlossen. Die starke Fluoreszenz des Calcein-AM kann man im FITC-Kanal des Durchflusszytometers messen. Die ADCP-Aktivität wurde anhand der Makrophagen analysiert, die doppelt-positiv waren für CD16 und Calcein. Dadurch dass diese Calcein-fluoreszierten, konnten wir darauf schließen, dass diese eine Zielzelle phagozytiert haben. Durch unsere in 3.2.7 beschriebene Analysestrategie in durchflusszytometrischen Untersuchungen konnten wir sicherstellen, dass wir nur einzelne Makrophagen darstellen und den Fehler ausschließen, dass die AML-Zelle bloß an den Makrophagen gebunden ist.

3.2.17 *In vivo* NSG-Xenograft Model

Sämtliche *in vivo* Experimente wurden mit Mäusen des Genotypes Nod Scid Gamma (NSG) durchgeführt. Dies sind speziell gezüchtete Mäuse, welche die Veränderung NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJl tragen und stark immunsupprimiert sind. Ihnen fehlen reife T-, B-, und NK-Zellen, viele Zytokin-Signalwege sind nicht ausgebildet und es gibt bedeutende Defekte des angeborenen Immunsystems. Durch diese geschwächte Immunabwehr können transplantierte humane Zellen anwachsen. Humane mononukleäre Zellen, die von unbehandelten AML-Patienten stammten, wurden unter Verwendung von 2 µl OKT3/1 × 10⁶-Zellen (BioLegend, San Diego, USA) von CD3⁺-Zellen bereinigt und intravenös in NSG-Mäuse transplantiert. Knochenmark- und Milzzellen von leukämischen Mäusen wurden geerntet und ohne vorherige Konditionierung für eine sekundäre Transplantation verwendet. Nach frühestens 5 Wochen wurde das Anwachsen der Leukämiezellen anhand der humanen Blastenzahl im Blut überprüft. Dafür wurden die Zellen mit humanen CD45-, CD33- und CD3-Antikörpern gefärbt, um die humanen Zellen im Mausblut zu charakterisieren. Zusätzlich verwendeten wir einen murinen CD45-Antikörper und DAPI. Anhand der durchflusszytometrischen Analyse konnte der humane Anteil an Zellen im Blut bestimmt werden und charakterisiert werden, ob dies leukämische Blasten oder T-Zellen sind. Ab einer Infiltration des Mausblutes mit 5-10% humanen Leukämiezellen wurde das *in vivo* Langzeit-Experiment gestartet. Dazu wurden die Mäuse in zwei Gruppen mit einer soweit wie möglich gleichen Anzahl an Mäusen und ähnlichen Infiltrationen an Leukämiezellen im peripheren Blut verteilt. Die Kontrollgruppe wurde über vier Wochen an Tag 1-4 mit ATRA (10mg/kgKG) und an Tag 3 mit IgG₁ (8mg/kgKG) behandelt. Die Medikamentengruppe bekam ebenfalls an Tag 1-4 ATRA (10mg/kgKG) und an Tag 3 Daratumumab (8mg/kgKG). Dies erfolgte jeweils mit einer intraperitonealen Injektion. Sechs Tage nach Ablauf der Behandlungswochen wurden die Mäuse analysiert. Zur Analyse wurden die Milz, die beiden Femurknochen, die Tibiae und die Humeri, sowie das Blut der Mäuse gewonnen. Aus dem Blut wurden Blutaussstriche angefertigt, sowie ein murines Blutbild (VET-ABC) bestimmt. Die Milz wurde gewogen und anschließend ca. ein Viertel des gesamten Organs, sowie je eine Tibia in Fixation mit 4% Paraformaldehyd aufbewahrt. Das Knochenmark wurde durch Spülen der Knochen mit PBS gewonnen. Je ein Femur wurde einzeln gespült und nach Zentrifugation der Knochenmarksüberstand eingefroren. Die Zellzahl des Knochenmarks eines einzelnen Femurs wurde bestimmt.

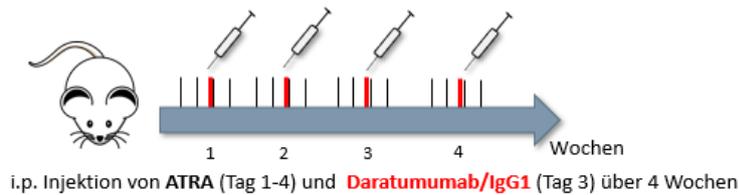


Abbildung 5 Applikationsschema der Langzeitbehandlung der NSG-Mäuse. Leukämische NSG-Mäuse wurden über 4 Wochen mittels intraperitonealer Injektion an 4 Tagen wie folgt behandelt: Tag 1-4 ATRA, Tag 3 zusätzlich Daratumumab oder IgG₁-Kontrollantikörper.

Nach Durchführung des oben beschriebenen Langzeitexperimentes wurde das Therapieprotokoll um eine Behandlung mit dem Zytostatikum Cytarabin ergänzt, um dessen Wirkung in Kombination mit ATRA und Daratumumab herauszuarbeiten. Dazu wurden wie oben beschrieben zwei AML-Proben in NSG-Mäuse transplantiert. Ab einer Leukämieinfiltration zwischen 5-10% im peripheren Blut wurde das um Cytarabin ergänzte Behandlungsprotokoll gestartet. Das Cytarabin (20mg/ml) wurde verdünnt in NaCl und an den Tagen 1-4 nur der ersten Woche zusätzlich zu den anderen Substanzen intraperitoneal verabreicht. Daratumumab respektive IgG₁ und ATRA wurden wie oben beschrieben appliziert. Sechs Tage nach Therapieende wurden die NSG-Mäuse wie bereits beschrieben analysiert.

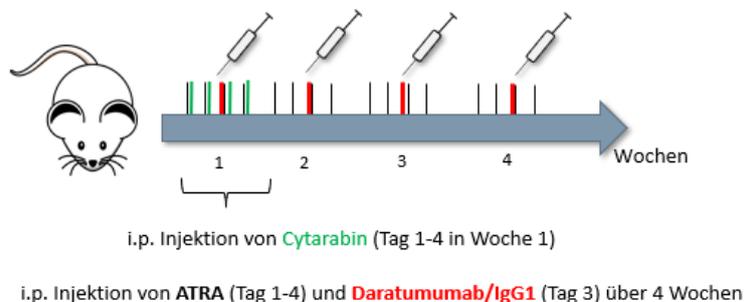


Abbildung 6 Applikationsschema der Langzeitbehandlung der NSG-Mäuse in Kombination mit Cytarabin. Leukämische NSG-Mäuse wurden über 4 Wochen mittels intraperitonealer Injektion an 4 Tagen wie folgt behandelt: Woche 1 Tag 1-4 Cytarabin, Woche 1-4 Tag 1-4 ATRA, Tag 3 zusätzlich Daratumumab oder IgG₁-Kontrollantikörper.

3.2.18 *In vivo* Homing-Experiment

Um den Einfluss der CD38-Inhibition auf das Einwandern von Leukämiezellen in das hämatopoetische Gewebe zu analysieren, wurde ein sogenanntes Homing-Assay durchgeführt.

Dazu wurden zwei Gruppen mit jeweils derselben Anzahl an NSG-Mäusen gebildet (n=5) und IgG₁ oder Daratumumab (8mg/kg KG) intraperitoneal injiziert. 24 Stunden nach der Vorbehandlung wurden den Mäusen primäre humane AML-Zellen transplantiert und nach weiteren 16 Stunden Blut, Milz und Knochenmark wie bereits beschrieben analysiert (siehe 3.2.17).

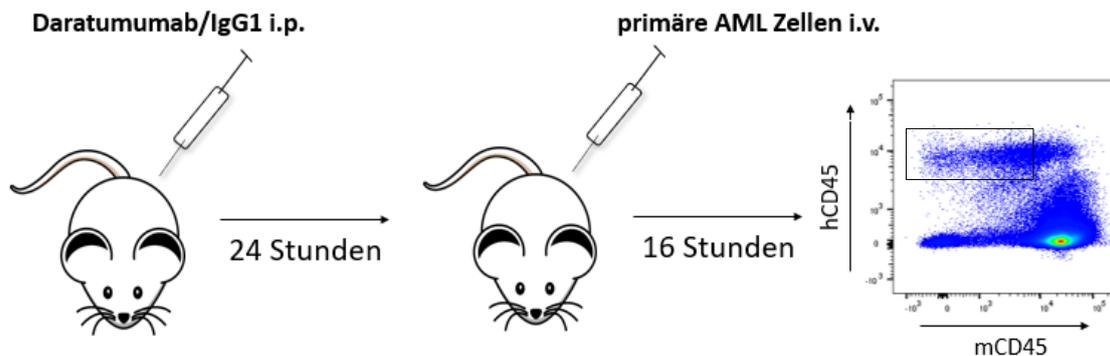


Abbildung 7 Skizze der Durchführung des Homing-Experimentes. NSG-Mäusen wurde zum Startpunkt des Experimentes Daratumumab oder der Kontrollantikörper IgG₁ intraperitoneal verabreicht. Nach 24 Stunden wurden primäre AML-Zellen intravenös appliziert. Weitere 16 Stunden später wurde das Knochenmark, das Blut und die Milz gewonnen und die Analyse mittels Durchflusszytometrie durchgeführt.

3.2.19 Paraffineinbettung von Knochen und Milz der NSG-Mäuse

Nach 24 Stunden Konservierung in 4% Paraformaldehyd wurden die Knochenproben vor der Paraffineinbettung weiterverarbeitet. Dazu wurden diese in PBS gewaschen und zur Dekalzifizierung in Osteosoft (Merck) überführt, worin sie über ca. 3-5 Tage bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert wurden. Darauffolgend wurden die Knochen und die Milz in der Pathologie des Universitätsklinikums Essen über Nacht entwässert und am nächsten Tag in Paraffin eingebettet. Die histologischen Schnitte wurden an einem Mikrotom angefertigt und mit einer Hämatoxylin-Eosinfärbung (H.E.) gefärbt, um die Gewebestruktur zu beurteilen. Die Knochen wurden zusätzlich mit einer Retikulinfärbung versehen, um neben der groben Gewebestruktur auch das Bindegewebe und die retikulären Fasern besser zu beurteilen.

3.2.20 Molekularbiologische Methoden

3.2.20.1 RNA-Isolierung

Zur Isolation der Ribonukleinsäure (RNA) aus Zellen wurde das Dynabeads™ mRNA DIRECT™ Kit von Thermo Fisher Scientific verwendet. Das Prinzip des Kits beruht darauf, dass die Oligo-(dT)₂₅-Reste der Dynabeads an die poly-adenylierten 3' Enden binden, die sich auf der mRNA befinden. Dies sind Enden der mRNA mit multiplen, angehängten Adenin-Nukleotiden. Durch die spezifische Bindung der Dynabeads können bereits kleinste mRNA-Reste aufgereinigt werden. Die mittels Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung gewonnenen Proben wurden zunächst in 100µl des Lyse-/Bindungs-Buffer des Kits aufgenommen, durch vortexen vermischt und bei -80°C zwischengelagert. Dieses lysiert die Zellen und setzt so die RNA aus dem Zellkern frei. Zur RNA-Isolierung wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und mit den Oligo-(dT)₂₅ Dynabeads vermischt. Die Beads hybridisierten in einem 5-minütigen Inkubationsschritt unter ständiger Vermengung an die mRNA. Des weiteren konnten durch Platzierung auf dem DynaMag™-2-Magneten die magnetischen Beads und die gebundene mRNA von der Flüssigkeit separiert werden. Dies ist möglich, da die Komplexe durch das magnetische Feld an der Wand des Reaktionsgefäßes anlagern und so sämtlicher Überstand abgenommen werden kann. Es folgten mehrere Waschschrte mit zwei Waschpuffern und 10mM TRIS-HCL nach Protokoll des Kits und letztlich wurde die mRNA in 20µl Nuclease-freiem Wasser aufgenommen.

3.2.20.2 RNA nach cDNA mit dem EcoDry™ Kit (TaKaRa)

Die gewonnene RNA lässt sich mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in einen doppelsträngigen, komplementären DNA-Strang umschreiben. Dafür wurde das RNA nach cDNA EcoDry™ Vorgemisch verwendet. Die mRNA wurde in 20µl Nuclease-freiem Wasser suspendiert und mit dem Gemisch vermischt. Darauf folgte eine einstündige Inkubation in einem PCR-Thermocycler (Analytik Jena) bei 42°C. In dieser Zeit arbeitete das Enzym und produzierte doppelsträngige DNA-Moleküle. Im Anschluss wurde dann die Reaktion in einem 10-minütigen Schritt bei 70°C gestoppt. Die so entstandene cDNA wurde daraufhin entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -20°C bis zum Einsatz zwischengelagert.

3.2.20.3 Realtime Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine *in vitro* Methode, die es ermöglicht, DNA zu vervielfältigen. Entwickelt wurde diese Methode im Jahr 1983 von Kary Mullis (Mullis & Faloona, 1987). Um die Amplifikation der zu untersuchenden DNA zu erreichen, benötigt man zunächst neben der DNA spezifische Primer. Dies sind kurze Nukleotidsequenzen, die an das zu amplifizierende Gen binden und dort die DNA-Synthese initiieren können. Man benötigt jeweils zwei Primer für ein Gen, da sowohl an den 5' – als auch an den 3' -Strang der DNA ein Primer binden muss, um die Replikation erfolgreich zu initiieren. Darüber hinaus benötigt man das Enzym, das die DNA-Synthese katalysiert, die DNA-Polymerase. Heutzutage wird standardmäßig die Taq-Polymerase verwendet, weil diese ein Arbeitsoptimum bei hohen Temperaturen hat. Damit die Synthese erfolgen kann, müssen die Bestandteile der DNA, die Desoxyribonukleosidtriphosphate Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin in ausreichender Anzahl vorhanden sein. Alle diese Bestandteile werden im PCR Mastermix zur Verfügung gestellt. Verwendet wurde für alle Experimente der SYBR Green Master Mix (Roche). Beim Vorgang der PCR durchläuft das Reaktionsgemisch zumeist in einem Thermocycler drei Vorgänge mit bestimmten Temperaturen. Zunächst startet der Prozess mit der „Denaturierung“ bei 94°C, bei dem durch die Hitze die Wasserstoffbrückenbindungen der doppelsträngigen DNA aufgelöst werden. Darauf folgt dann die „Primerhybridisierung“, die zumeist bei 55-65°C durchgeführt wird. Die „Elongation“ der DNA geschieht dann im Temperaturoptimum der jeweils verwendeten DNA-Polymerase, zumeist bei Verwendung der Taq-Polymerase bei 72°C. Diese drei Phasen beschreiben genau einen Zyklus, in dem sich die zu untersuchende DNA verdoppelt. Standardmäßig wird dieser Zyklus 40-mal wiederholt. Darüber hinaus macht man sich bei der Realtime-PCR das Prinzip zu Nutze, dass bestimmte fluoreszierende Substanzen in die replizierende DNA interkalieren können. Nach jedem Zyklus wird diese Fluoreszenz dann gemessen, und gibt in Echtzeit die Menge an DNA wieder, welche repliziert wurde. Damit kann ein Zeitpunkt bestimmt werden, bei dem die Fluoreszenz zum ersten Mal eine unspezifische Hintergrundfluoreszenz überstrahlt, dies nennt man dann Ct-Wert. Dieser Ct-Wert ist abhängig von der ursprünglich vorhandenen Menge an DNA (bzw. mRNA) des zu untersuchenden Gens. Er wird korreliert zu einem so genannten „House-Keeping-Gen“, hier *GAPDH*, welches in jeder Zelle ubiquitär vorhanden ist. Dadurch ist es möglich, die Expression des zu untersuchenden Gens zu quantifizieren. Sämtliche Versuche wurden mit dem QuantStudio™-5 Thermocycler (Thermo Fisher) durchgeführt. Die Analyse erfolgte an der Software des Gerätes (QuantStudio™ Design & Analysis Software).

Die Replikationszyklen setzen sich wie folgt zusammen:

40 Zyklen:

2 min 50°C

10 min 95°C

15 Sek. 95°C

1 min 60°

3.2.21 Anfertigung von Cytospin-Präparaten

Mit dem Verfahren der Cytospin-Zentrifuge lassen sich Suspensionszellen auf Objektträger konservieren, so dass sie mikroskopisch untersucht werden können. Dazu wurden jeweils 1×10^4 Zellen verwendet. Dafür spannt man Shandon™ Single Cytoslides™ Objektträger in Cytospin-Einrichtungen (Shandon™ EZ Single Cytofunnel™) ein. Die Zellen werden in Suspension hinein pipettiert und für 5 Minuten bei 1200 RPM in einer Shandon™ Cytospin II-Zentrifuge zentrifugiert. Dabei werden die Zellen durch die Zentrifugalkraft auf den Objektträger übertragen. Anschließend wurden die Zellen mit einer Pappenheimfärbung gefärbt und mikroskopiert.

3.2.22 IC-50 Untersuchung

IC-50 Experimente dienen dazu, die Zytotoxizität von einer Substanz in aufsteigenden Konzentrationen auf eine Zellpopulation zu untersuchen. Der IC-50 Wert ist jener, bei dem die anfängliche Zellzahl unter dem Einfluss der Substanz auf genau 50% geschrumpft ist und gibt per definitionem eine Konzentration an. Jeweils acht AML-Zelllinien wurden für vier Tage im Zellkulturmedium mit ansteigenden Konzentrationen von Daratumumab (0-10µg/ml) inkubiert. Die Auswertung erfolgte anhand der Zellzahlen, die mittels Neubauer-Zählkammer mikroskopisch bestimmt wurden.

3.2.23 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Daten und Erstellung der Graphen wurde die Software Graph-Pad Prism 6 verwendet. Die Darstellung erfolgte immer mit der Bestimmung des Standardfehler des Mittelwertes (Mittelwert+ SEM). Zur Bestimmung der Normalverteilung der Daten wurde der D'Agostino-Pearson-Test angewendet. Zeigte die Studienpopulation eine Normalverteilung, so wurde die Signifikanz anhand des „Student's- t-Test“ (gepaart und ungepaart, jeweils gekennzeichnet) kalkuliert, indem der p-Wert bestimmt wurde.

War die Studienpopulation nicht durch Normalverteilung gekennzeichnet oder die Probenanzahl zu gering, so wurde der nichtparametrische Wilcoxon-Vorzeichenrangtest oder der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Zum Vergleich mehrerer Konditionen mit der Kontrolle wurde der One-way ANOVA Test angewendet.

Die Signifikanzen wurden wie folgt dargestellt:

- * $p < 0,05$
- ** $p < 0,01$
- *** $p < 0,001$
- **** $p < 0,0001$

4 ERGEBNISSE

4.1 CD38-Inhibition zeigt anti-leukämische Aktivität in der AML *in vitro*

Ein möglicher anti-leukämischer Effekt der CD38-Inhibition mit Daratumumab wurde zunächst *in vitro* im Mono- und Kokulturmodell mit acht verschiedenen AML-Zelllinien getestet. Der Ansatz, Leukämiezellen mit verschiedenen Stromazelltypen zu kultivieren, stellt eine Annäherung an das Konzept der Knochenmarknische im lebenden Organismus dar und hat den Sinn, Mikroenvironment-vermittelte Effekte auf Leukämiezellen zu untersuchen und von zellautonomen Effekten zu differenzieren. Die AML-Zellen wurden zu diesem Zweck für 4 Tage allein oder auf 80% konfluentem Stroma mit Kulturmedium als Kontrolle oder Daratumumab in einer Konzentration von 0,1µg/ml inkubiert. Um den Einfluss auf das Zellwachstum zu charakterisieren, wurden die jeweiligen Zellzahlen der verschiedenen Konditionen durch mikroskopische Zählung quantifiziert und die Zellen mittels FACS-Analyse charakterisiert. Die Zellzahlen wurden jeweils errechnet aus der absoluten Zellzahl und der Prozentzahl in unserem jeweiligen FACS-Protokoll (Singletten, DAPI⁻, CD45⁺ (hämatopoetische Zellen) oder CD45⁻ (Stromazellen)). Um einen besseren Vergleich zu gewährleisten, wurden die Konditionen der Kokulturen jeweils zur unbehandelten Monokultur der entsprechenden AML-Zelllinie normalisiert. Der Einsatz der murinen Fibroblastenzelllinie MS-5 mit humanen AML-Zelllinien wurde bereits zuvor etabliert (Auffray et al., 1994). Wie einleitend bereits beschrieben unterhalten auch Endothelzellen die Nische für hämatopoetische Stammzellen. Die Kommunikation erfolgt auch über die CD31-CD38 Interaktion, so dass zur Beurteilung der Auswirkung durch CD38-Inhibition eine Endothelzell-Kokultur (HUVEC) ergänzt wurde.

Wir konnten nachweisen, dass die Imitation des Mikroenvironments mit Knochenmarkstromazellen das Wachstum der AML-Zellen unterstützt. Insgesamt war dieser supportive Effekt am ausgeprägtesten in der Kultur mit Fibroblasten bei einem Zuwachs von bis zu +46% der AML-Zellen im Vergleich zur AML-Monokultur. Eine signifikante Zytoreduktion unter Daratumumab zeigte sich in 6 von 8 AML-Zelllinien mit einer Varianz von -7% bis -18% in Monokultur. Interessanterweise stellte sich heraus, dass die MS-5 Kokultur die zytotoxische Effektivität von Daratumumab auf die Zelllinien steigern konnte (ausgenommen der Zelllinie HL-60). Am sensibelsten zeigten sich die Zelllinien Kasumi-1, OCI-AML-3 und MOLM-13, in denen die mittleren Zellzahlreduktionen -24% ($p=0,0004$), -31% ($p=0,0104$) und -30,5% ($p=0,0041$) betragen. Die Kokultur mit HUVEC schien den Effekt von Daratumumab auf die AML-Zellen im Vergleich zur Monokultur nicht weiter zu steigern. Die mittlere Zytoreduktion war mit einem Ausmaß von -1,3% bis hin zu -24,1% vergleichbar mit dem Effekt in Monokultur (Abbildung 8).

Zusammenfassend beschreibt dies eine homogene anti-leukämische Wirksamkeit der CD38-Inhibition im *in vitro* Kokulturmodell von AML-Zelllinien. Die Kultivierung der Zellen mit MS-5 Fibroblasten konnte die Sensitivität der AML-Zellen gegenüber Daratumumab verbessern, wohingegen die HUVEC Kultur keine signifikante Verbesserung der Wirkung auslösen konnte. Insgesamt weist dies zunächst auf eine zellautonome Wirkweise der CD38-Inhibition hin, die allerdings durch Modulation des Mikroenvironments verstärkt werden kann.

Unser Kokulturmodell unter Verwendung von AML- und Stromazellen konnte eine Auswirkung der CD38-Inhibition auf das Wachstum der Stromazellen ausschließen, die beobachtete Wirksamkeit ist somit Leukämie-spezifisch (Abbildung 9).

Eine 4-tägige Inkubation aller Zelllinien in Monokultur in einer Titrationsreihe von Daratumumab mit ansteigenden Konzentrationen von 0-10 µg/ml sollte einen Einblick in die Dynamik der anti-leukämischen Wirksamkeit ermöglichen. Insgesamt zeigte sich hierbei eine anti-leukämische Wirksamkeit von ca. -20% Zytoreduktion bei 0,1µg/ml Daratumumab, die Wirksamkeit ließ sich auch durch höhere Konzentrationen des Medikamentes kaum steigern, so dass kein IC-50 Wert, also die Konzentration des Medikamentes, bei der die Zytoreduktion 50% erreicht, bestimmt werden konnte (Daten nicht gezeigt).

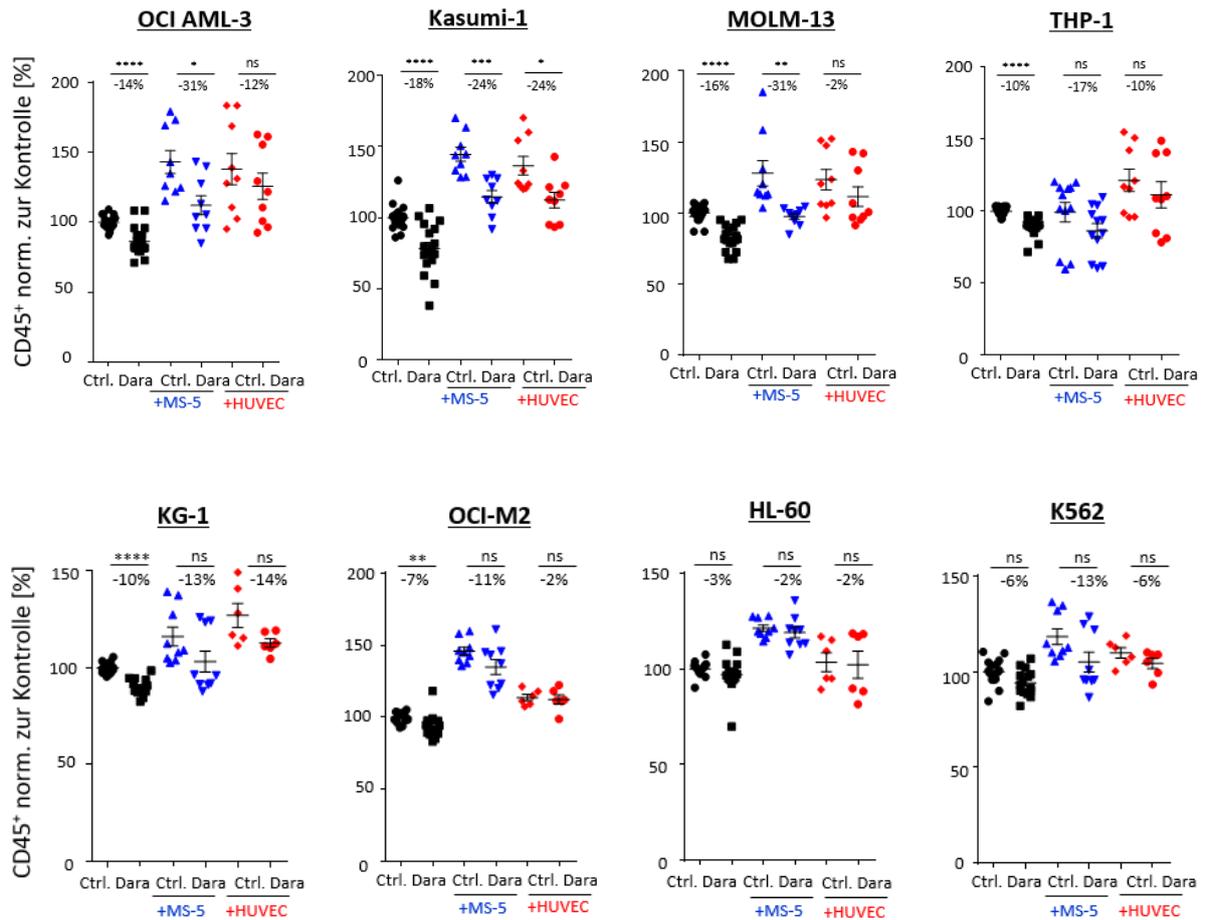


Abbildung 8 Wirksamkeit der CD38-Inhibition in Mono- und Kokultur der AML-Zelllinien.

Die verschiedenen AML-Zelllinien wurden für 4 Tage mit 80% konfluenten Stromazelllinien (MS-5 (blau), HUVEC (rot)) oder allein mit Daratumumab (0,1µg/ml) oder Medium inkubiert. Angegeben sind die absoluten CD45⁺ Zellzahlen normalisiert zur Monokultur der jeweiligen Zelllinie. Darstellung der mittleren Zytoreduktion in Prozent. Pro Kondition jeweils dreifache Ausführung. Darstellung der Daten als Mittelwert ± SEM. Ungepaarter Student's t-Test: ns=nicht signifikant; * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001; **** = p < 0,0001.

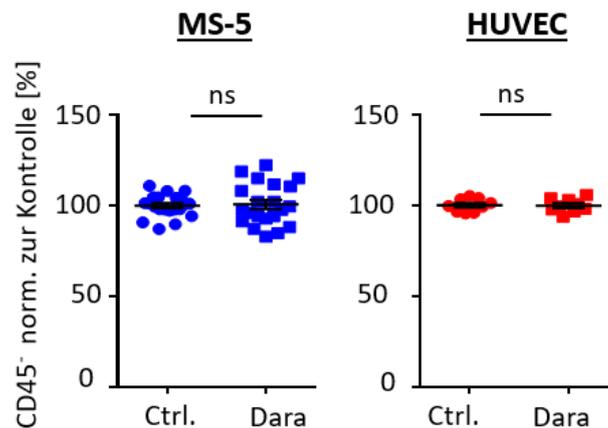


Abbildung 9 CD38-Inhibition hat keinen Einfluss auf Wachstum der Stromazellen. Die verschiedenen Zelllinien (MS-5 (blau) oder HUVEC (rot)) wurden für 4 Tage mit anfänglicher Konfluenz von 80% mit Daratumumab (0,1µg/ml) oder Medium inkubiert. Angegeben sind die absoluten CD45⁻ Zellzahlen normalisiert zur Monokultur der jeweiligen Zelllinie. Pro Kondition jeweils dreifache Ausführung. Darstellung der Daten als Mittelwert ± SEM. Ungepaarter Student's t-Test: ns=nicht signifikant.

Um die klinische Relevanz der CD38-Inhibition mittels Daratumumab für die humane AML herauszuarbeiten, etablierten wir ein 3D Triplekulturmodell. Hierzu wurden AML-Zellen und mesenchymale Sphäroide zusammen mit adhärenenten Endothelzellen kultiviert.

Primäre AML-Zellen (n=10) bzw. mononukleäre Zellen des peripheren Blutes gesunder Kontrollen (n=6), wurden allein, in Kokultur mit HUVEC oder humanen mesenchymalen Sphäroiden, sowie in Triplekultur untersucht und mit 0,1µg/ml Daratumumab behandelt. Im Vergleich zur Monokultur zeigte die Kultur mit Endothel- und mesenchymalen Stammzellen sowie insbesondere die Triplekultur ein gesteigertes Wachstum der primären AML-Zellen oder Kontrollzellen. Insgesamt war dieser supportive Effekt in der Triplekultur am stärksten ausgeprägt und beläuft sich auf +55% in der AML (+10% bis +153% Wachstum) und auf +40% bei den gesunden Spenderzellen (-11% bis hin zu +110% Wachstum). Auch für die primären Zellen lässt sich somit erkennen, dass die Imitation der Knochenmarksnische *in vitro* eine positive Beeinflussung des Wachstums der hämatopoetischen Zellen induziert. Zur Evaluation der anti-leukämischen Wirksamkeit Daratumumabs wurden die zur Monokultur normalisierten Zellzahlen verglichen. Ein nur sehr geringer anti-leukämischer Effekt zeigte sich in der Monokultur der AML-Proben mit einer mittleren Reduktion von 7,2% (ns). Unter Hinzunahme der mesenchymalen Sphäroide und HUVEC ließ sich in den Kokulturen beobachten, dass die Zytoreduktion der primären AML-Zellen auf 10,8% (ns) und 22,8% (p=0,0020) anstieg. Die erfolgreichste Steigerung der anti-leukämischen Wirksamkeit konnte allerdings in Triplekultur mit -35,6% (p=0,0098) mittlerer Zytoreduktion der AML-Zellen erreicht werden.

Im Gegensatz dazu zeigten sich für die gesunden humanen Zellen kein, beziehungsweise nur ein vernachlässigbar geringer Effekt der CD38-Inhibition auf das Zellwachstum (Abbildung 10).

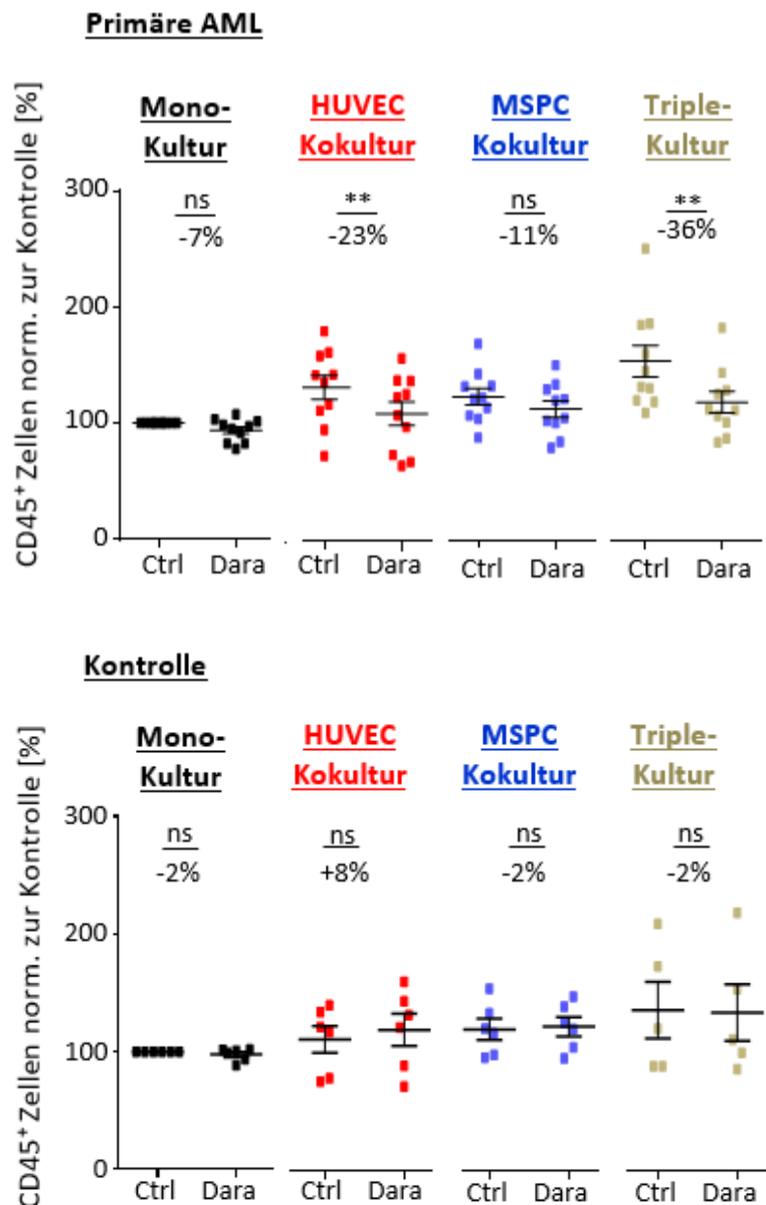


Abbildung 10 Anti-leukämischer Effekt von Daratumumab im Triplekulturmodell mit primären AML- und gesunden Spenderzellen. Primäre AML (n=10, oben) und gesunde Kontrollzellen (n=6, unten), wurden mit Endothelzellen (HUVEC, rot), mesenchymalen Stammzellen (MSPC, blau) kokultiviert und in einem dritten Modell mit HUVEC und MSPC triplekultiviert (braun) und mit Daratumumab (0,1µg/ml) oder Medium behandelt. Angegeben sind die absoluten CD45⁺ Zellzahlen normalisiert zur unbehandelten Monokultur. Jeder Punkt stellt den Mittelwert der Dreifachbestimmungen pro Experiment dar.

Darstellung der mittleren Zytoreduktion in Prozent. Darstellung der Daten als Mittelwert \pm SEM. Wilcoxon Vorzeichenrangtest: ns=nicht signifikant; **= $p < 0,01$.

Weiterführend untersuchten wir, ob der zytotoxische Effekt spezifisch durch die Antigenbindung an CD38 ausgelöst wird, und nicht nur eine unspezifische Aktivität des Antikörpers widerspiegelt. Dazu wurde zusätzlich zur Mediumkontrolle ein IgG₁- und ein IgG-b12- Kontrollantikörper eingesetzt. In sämtlichen Experimenten war zwischen den beiden Kontrollantikörpern und der Mediumkontrolle keine signifikante Veränderung der Zellzahlen zu beobachten, wohingegen sich unter Daratumumab-Therapie der zytotoxische Effekt bestätigte (Abbildung 11).

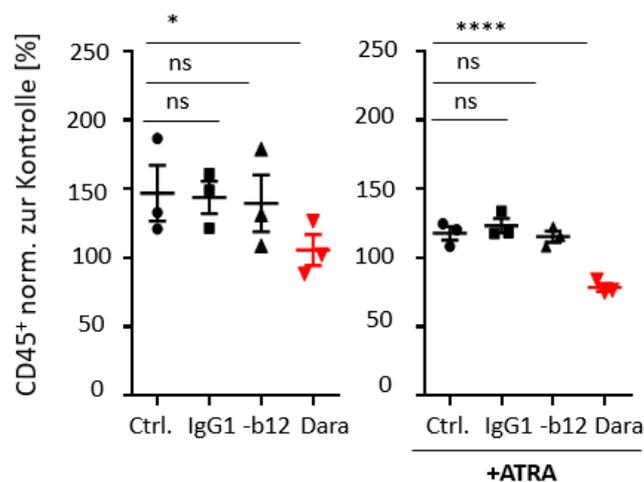


Abbildung 11 Triplekultur von primären AML-Zellen mit Kontrollantikörpern. Primäre AML-Zellen wurden triplekultiviert mit HUVEC und MSCs und mit 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Daratumumab oder zwei Antikörperkontrollen (IgG₁ und IgG-b12) für 3 Tage inkubiert. Angegeben sind die absoluten CD45⁺ Zellzahlen normalisiert zur Monokultur in Mediumkontrolle. Jeder Punkt stellt den Mittelwert der Dreifachbestimmungen pro Experiment dar. Darstellung der Daten als Mittelwert \pm SEM. One-way ANOVA: ns=nicht signifikant; * = $p < 0,05$; **** = $p < 0,0001$.

Um eine Differenzierung der leukämischen Blasten unter Daratumumab als eventuellen Mechanismus zu evaluieren, wurden von den in der Triplekultur behandelten AML-Zellen mikroskopische Präparate mittels Zytospin-Technik angefertigt. Unter Verwendung der Pappenheimfärbung ließ sich keine Ausdifferenzierung der Blasten erkennen (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend kann man aus beiden *in vitro* Modellen einen zellautonomen Effekt der CD38-Inhibition erkennen, der allerdings nur geringfügig ist. Bemerkenswerterweise wird dieser zytoreduktive Effekt durch das Mikroenvironment potenziert, so dass in Betrachtung der AML in ihrer Knochenmarksnische ein signifikanter, spezifisch anti-leukämischer Effekt *in vitro* nachgewiesen werden konnte.

4.2 Bedeutung und Modulation von CD38 im Mikroenvironment

Ein wichtiger Teil dieser Arbeit sollte sein, die Regulation des Antigens CD38 auf hämatopoetischen Zellen durch das Mikroenvironment zu verstehen und den Einfluss der CD38-Inhibition zu untersuchen. Zunächst interessierte uns, ob eine Hochregulation von CD38 auf den Leukämiezellen die Wirkung des Medikamentes verbessern könnte. Es wurde All-trans-Retinsäure verwendet, da dieses Vitamin-A-Derivat eine starke Hochregulation des Antigens CD38 und einhergehend eine bedeutende Verbesserung der Zytotoxizität der CD38-Inhibition in der *in vitro* Behandlung des Multiplen Myeloms induziert (Nijhof et al., 2015). Im 3D *in vitro* Triplekulturmodell wurde die Vorbehandlung der Zellen mit 0,1µM ATRA zwei Tage vor der Zugabe von Daratumumab ergänzt. Durch die Bestimmung der CD38-Expression auf den primären hämatopoetischen Zellen mittels Durchflusszytometrie konnte für jede AML-Probe eine mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) bestimmt werden.

Insgesamt wurde deutlich, dass die verschiedenen humanen AML-Zellen eine heterogene basale CD38-Expression aufweisen. Unter Hinzunahme der Stromazellen zur Kultur ließ sich bereits ohne ATRA eine deutliche Hochregulation der CD38-Expression in AML-Zellen durch das Mikroenvironment nachweisen, mit einem Anstieg um 79% bzw. 78% in Kokultur mit HUVEC bzw. mesenchymalen Stammzellen im Vergleich zur Monokultur. Die Triplekultur zeigte die höchste Steigerung der CD38-Expression der AML-Zellen um 205% (Bereich +71% bis +371%). Diese Mikroenvironment-vermittelte Hochregulation von CD38 ließ sich auch für gesunde hämatopoetische Zellen beobachten. Die Expression war allerdings nicht in so einem hohen Ausmaß beeinflussbar wie die der AML-Zellen und erreichte einen maximalen Anstieg von +126,5% in der Triplekultur (Abbildung 12).

AML- und gesunde Kontrollzellen wurden mit ATRA behandelt. Tatsächlich konnte die Vorbehandlung die CD38-Expression um das 25-fache in AML-Zellen und um das 3-fache in Kontrollzellen steigern (Abbildung 12).

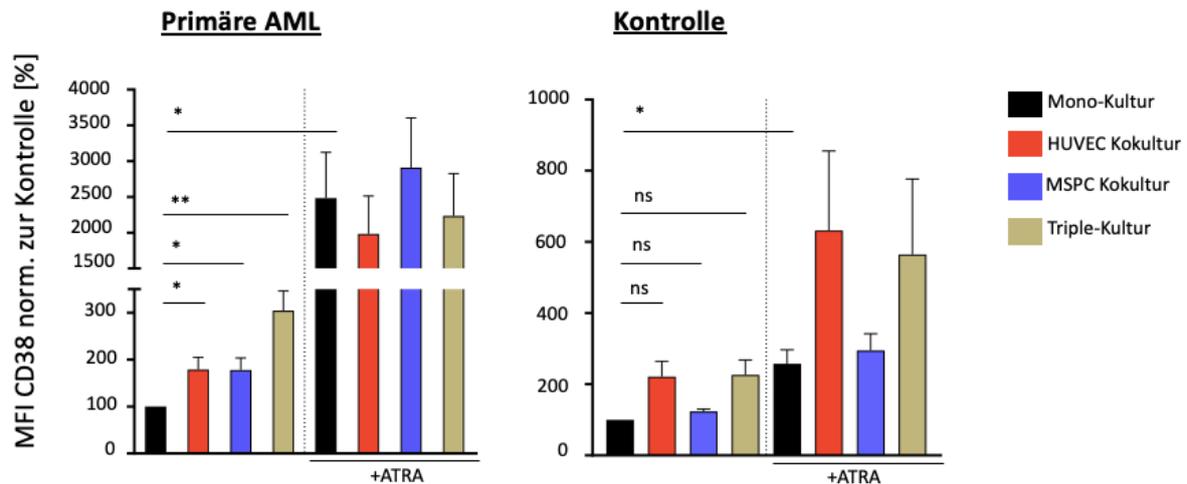


Abbildung 12 Modulation der CD38-Expression auf hämatopoetischen Zellen durch ATRA und das Mikroenvironment. Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CD38 auf primären AML-Zellen (n=10, links) bzw. gesunden Kontrollzellen (n=6, rechts) in Monokultur, Kokultur mit Endothelzellen HUVEC (rot), mesenchymalen Stammzellen (MSPC, blau) oder Triplekultur (braun) ohne bzw. mit 0.1µM ATRA-Vorbehandlung. Angegeben sind MFI-CD38 normalisiert zur Monokultur. Darstellung der Daten als Mittelwert \pm SEM. One-way ANOVA: ns= nicht signifikant; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

Um die Abhängigkeit der anti-leukämischen Wirksamkeit von Daratumumab von der CD38-Expressionshöhe zu untersuchen, erfolgte eine 2-tägige Vorbehandlung der AML- und Kontrollzellen mit 0,1µM ATRA vor Applikation von Daratumumab in unserem Triplekulturmodell. Interessanterweise konnte in den meisten Konditionen keine signifikante Steigerung der anti-leukämischen Wirksamkeit durch Hochregulation von CD38 auf den AML-Zellen erwirkt werden. Einzig in der Kokultur der primären AML-Zellen mit MSPC konnte eine signifikante Steigerung der durchschnittlichen Zytoreduktion von -11% auf -20% erzielt werden. Die Kombinationstherapie mit ATRA zeigte ähnlich zur Monotherapie mit Daratumumab keinen bedeutsamen zytotoxischen Effekt auf die gesunden hämatopoetischen Zellen (Abbildung 13).

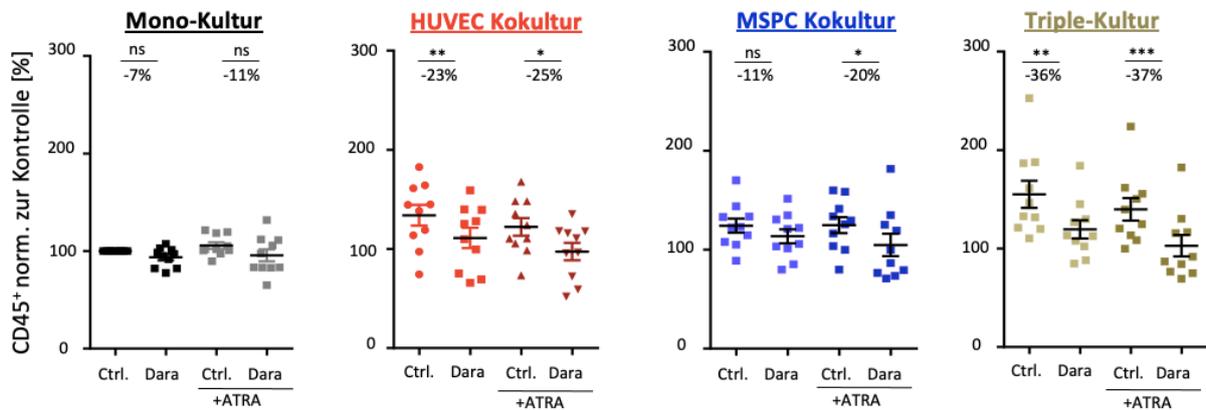
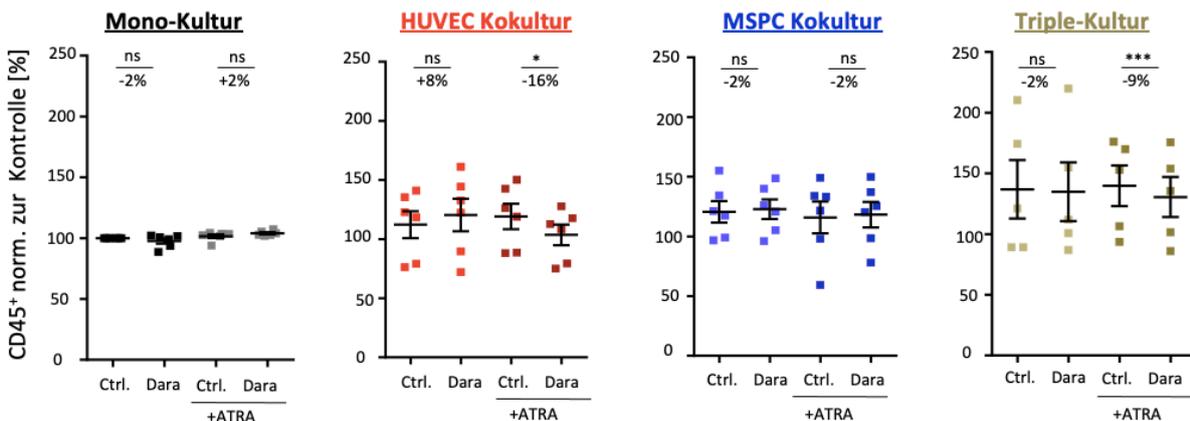
Primäre AML**Kontrolle**

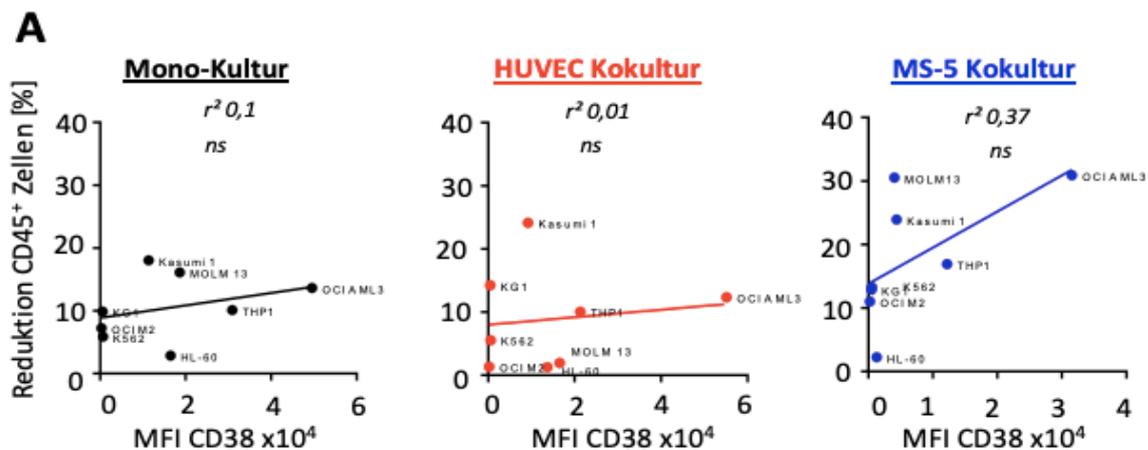
Abbildung 13 Anti-leukämischer Effekt von Daratumumab in Kombination mit ATRA im Triplekulturmodell mit primären AML- und gesunden Zellen. Primäre AML (n=10, oben) und gesunde Kontrollzellen (n=6, unten) wurden mit Endothelzellen (HUVEC, rot), humanen mesenchymalen Stammzellen (MSPC, blau) kokultiviert und in einem dritten Modell mit HUVEC und MSPC triplekultiviert (braun), für 2 Tage mit 0,1µM ATRA inkubiert und darauffolgend für weitere 3 Tage mit 0,1µg/ml Daratumumab behandelt. Angegeben sind die absoluten CD45⁺ Zellzahlen normalisiert zur Monokultur. Jeder Punkt stellt den Mittelwert der Dreifachbestimmungen pro Experiment dar. Darstellung der mittleren Zytoreduktion in Prozent. Darstellung der Daten als Mittelwert ± SEM. Wilcoxon Vorzeichenrangtest: ns=nicht signifikant; * = p <0,05; ** = p <0,01; *** = p <0,001.

Nachdem sich eine deutliche Regulation der CD38-Expression durch ATRA und das Mikroenvironment herausarbeiten ließ, wurde eine Korrelation der CD38-Expression der AML-Zellen mit der anti-leukämischen Wirksamkeit gemessen, an der mittleren Zytoreduktion der *in vitro* Kulturmodelle von AML-Zelllinien und primären AML-Zellen, durchgeführt (siehe Abbildung 8 und 13).

Die verschiedenen AML-Zelllinien weisen analog zu den primären Zellen basale Unterschiede in der Expression von CD38 auf. Während K562, OCI M-2 und KG-1 niedrige CD38-Werte exprimieren (mittlere MFI <1000), exprimieren die restlichen Zelllinien CD38 in einem relativ höheren Ausmaß (mittlere MFI-CD38: 11.000-49.000).

Betrachtet man die Korrelation der CD38 Expression mit der anti-leukämischen Wirkung von Daratumumab zeigte sich nur in Kokultur mit MS-5 Fibroblasten ein schwach positiver Zusammenhang zwischen CD38-Expression und anti-leukämischer Wirksamkeit ($r^2 = 0,3706$), die Monokultur der Zelllinien sowie die HUVEC-Kultur ergab keine Korrelation ($r^2 = 0,1084$ und $r^2 = 0,01835$) (Abbildung 14A).

Bestätigend konnten wir auch bei den primären AML-Zellen die Abhängigkeit der Wirksamkeit Daratumumabs von der Höhe der CD38-Expression ausschließen. Dies gilt ebenfalls nach Vorbehandlung der Zellen mit ATRA (Abbildung 14B).



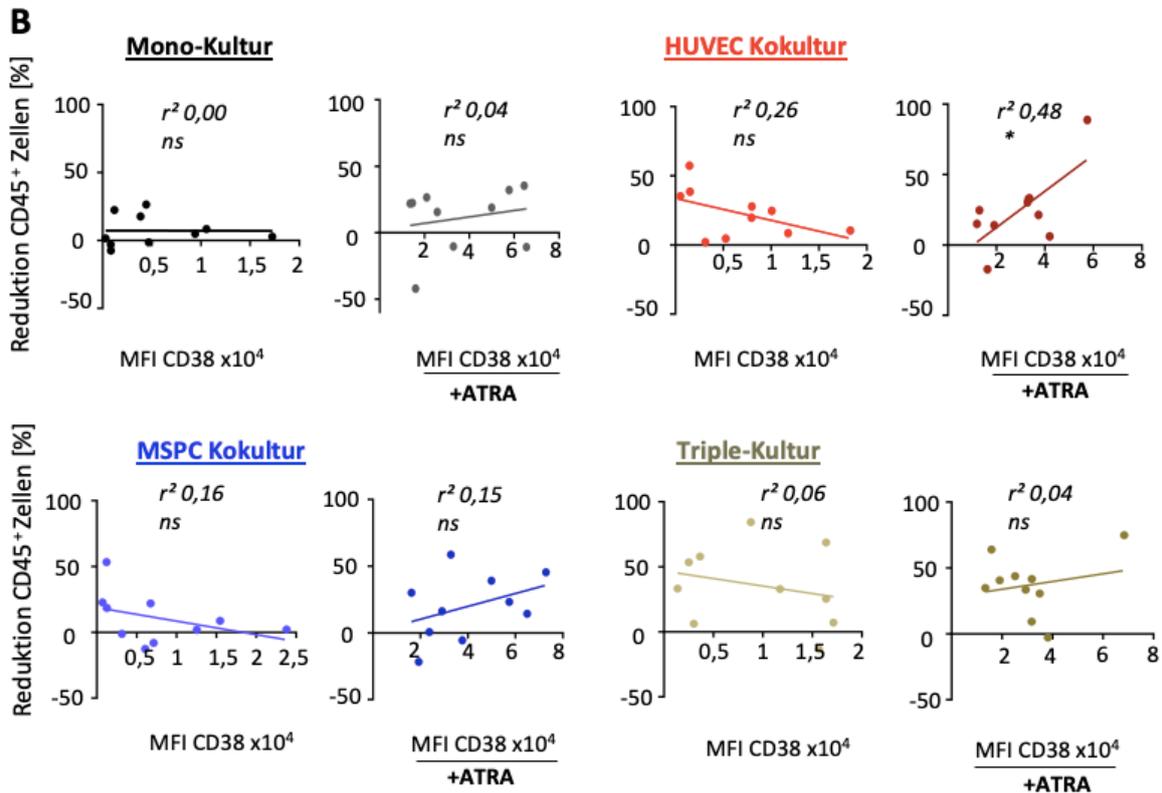


Abbildung 14 Wirksamkeit unabhängig von CD38-Expression der AML-Zellen. Analyse der Korrelation mittels linearer Regression von mittlerer Zytoreduktion und CD38-Expression (MFI) der Experimente mit **A**) AML-Zelllinien und mit **B**) primären AML-Zellen (n=10) mit oder ohne Vorbehandlung mit 0,1µM ATRA. Dargestellt sind der Mittelwert der MFI und der Zytoreduktion aus allen Ko- und Triplekulturexperimenten. Lineare Regression mit R-Quadrat: ns= nicht signifikant.

4.3 Mechanismen der CD38-Inhibition mit Daratumumab

Um die zugrunde liegenden Mechanismen des anti-leukämischen Effektes von Daratumumab auf AML-Zellen herauszuarbeiten, wurde zunächst überprüft, ob Daratumumab die Proliferation der Leukämiezellen beeinflusst. Hierzu wurde das Kokulturmodell mit den AML-Zelllinien mit der höchsten Sensitivität gegenüber der CD38-Inhibition eingesetzt (OCI AML-3 und Kasumi-1). Nach vier Tagen Inkubation mit Daratumumab oder dem Kontrollantikörper IgG₁ (jeweils 0,1µg/ml), wurde am fünften Tag ein BrdU-Assay durchgeführt. Durch Inkorporation des Stoffes BrdU in die replizierende DNA der Zellen kann man mittels Durchflusszytometrie die proliferierenden Zellen differenzieren. Die S-Phase wird bestimmt durch BrdU-positive Zellen, da diese in der DNA-Replikation befindlichen Zellen das BrdU inkorporieren.

Diese Population kann mittels anti-BrdU-Antikörperfärbung im Durchflusszytometer dargestellt werden. Die CD38-Inhibition mit Daratumumab induzierte keine Veränderung der Proliferation der Leukämiezellen (Abbildung 15).

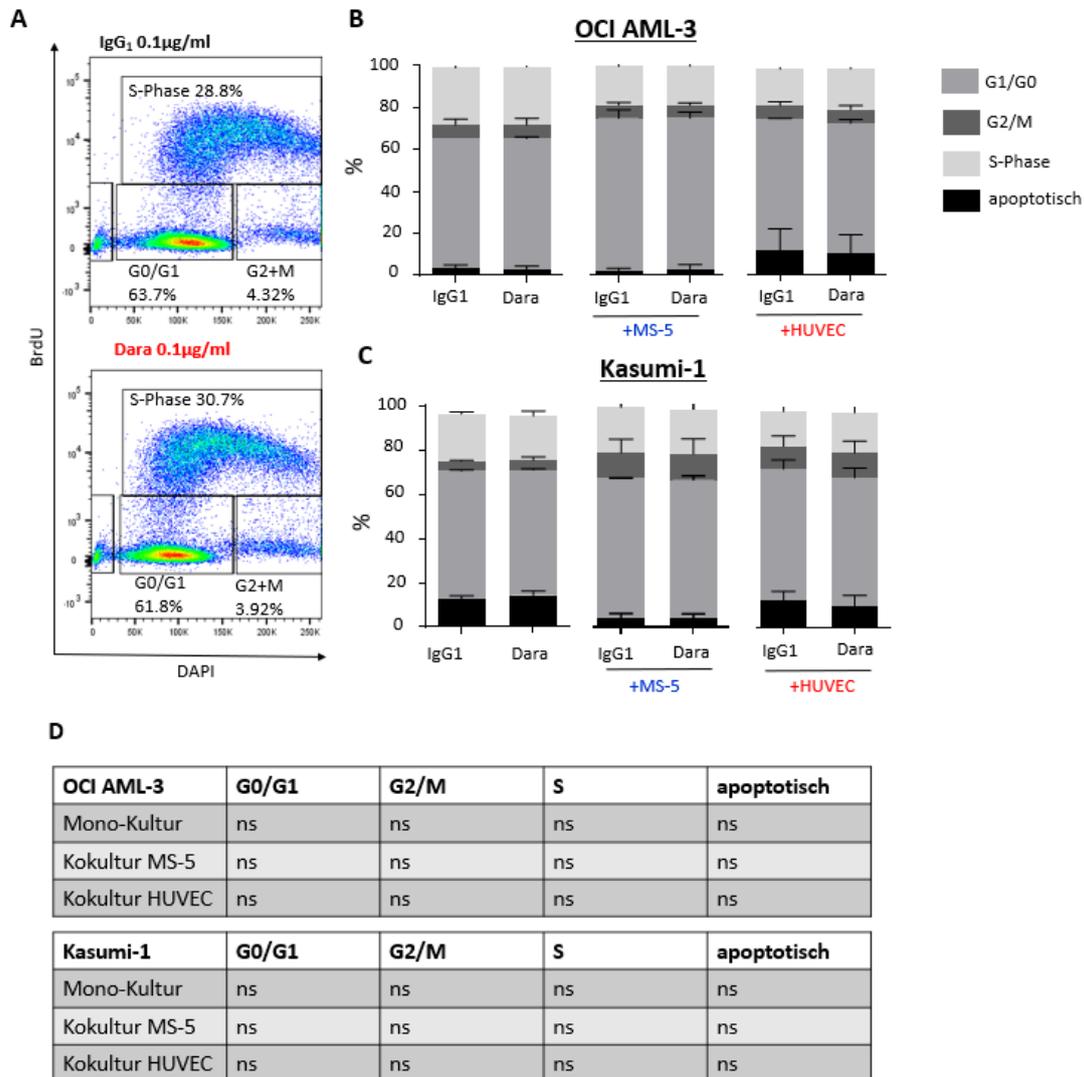


Abbildung 15 Keine Beeinflussung der Zellproliferation durch Daratumumab. Analyse der Proliferation von AML-Zelllinien mittels BrdU-Assay (BD Biosciences). **A)** Repräsentative FACS-Abbildungen der Analysestrategie. Bestimmung der Zellzyklusverteilung in Mono- und Kokultur für **B)** OCI AML-3 und **C)** Kasumi-1 nach Behandlung mit 0,1µg/ml Daratumumab oder Kontrollantikörper für vier Tage. **D)** Statistische Auswertung. Darstellung der Mittelwerte der Dreifachbestimmungen von drei unabhängigen Experimenten. Darstellung der Daten als Mittelwert ± SEM. Ungepaarter Student's t-Test: ns= nicht signifikant.

Als nächstes wurde der Einfluss von Daratumumab auf die Apoptose von AML-Zellen als möglicher Erklärungsansatz für die induzierte Zytoreduktion untersucht. In einem apoptotischen Prozess wird das Lipid Phosphatidylserin auf die äußere Membran der Lipidschicht von Zellen transferiert.

Durch Bindung des fluoreszierenden Annexin-V an dieses ist es möglich Phosphatidylserin an der äußeren Lipidmembran zu detektieren und eine frühe Apoptose zu bestimmen. Zusätzlich zu einem Annexin-V-Antikörper werden die Zellen mit DAPI gefärbt, welches durch Beschädigungen der Zellmembran in die Zelle eintreten und in die DNA inkorporieren kann. Dies ermöglicht es, sowohl früh-, als auch spätapoptotische Prozesse in Zellen zu detektieren. In unserem Kokulturmodell mit MS-5 und HUVEC zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Anteil der apoptotischen, Annexin⁺-Zellen im Vergleich von Daratumumab und IgG₁-Kontrollantikörper (Abbildung 16).

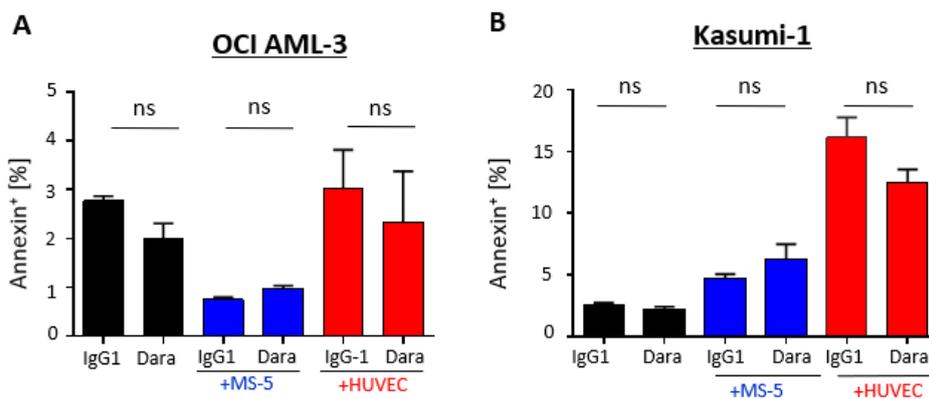


Abbildung 16 Daratumumab induziert keine Apoptose in Leukämiezellen. Analyse der Apoptoseinduktion mittels Annexin-V-Assay. Darstellung der Anteile Annexin⁺-Zellen in **A)** OCI AML-3 und **B)** Kasumi-1 nach Behandlung mit Daratumumab 0,1 µg/ml oder Kontrollantikörper für vier Tage. Mittelwerte der Dreifachbestimmungen von drei unabhängigen Experimenten. Darstellung der Daten als Mittelwert ± SEM. Ungepaarter Student's t-Test: ns= nicht signifikant.

Neben der durchflusszytometrischen Beurteilung einer möglichen Induktion der Apoptose durch Daratumumab wurde die Expression bestimmter Schlüsselmoleküle der Apoptose in primären AML-Proben quantifiziert. Nach Triplekultur wurden hämatopoetische Zellen im FACS isoliert und mittels Realtime-PCR die Expression von Schlüsselmolekülen der Apoptose untersucht (Abbildung 17). Dazu gehören Caspasen, welche für die Initiierung der Apoptose von zentraler Rolle sind. Caspasen bilden eine Gruppe von Cysteinproteasen, die am C-terminalen Ende der Peptidbindung von Aspartat spalten. Caspase 8 und 9 sind die beiden wichtigsten Initiator-Caspasen, welche die Funktion haben, die Vorform der Effektorcaspasen zur aktiven Effektorcaspase zu spalten. Zu diesen Effektorcaspasen gehört Caspase 3, welche die Aufgabe hat, die Zelle proteolytisch zu zerlegen. Ebenso wichtig neben dieser extrinsischen Form der Apoptose, ist die intrinsische Form, bei der Stoffe aus den Mitochondrien freigesetzt werden. Da diese sich normalerweise nicht im Zytosol befinden, erhält die Zelle das Signal zur Apoptoseinduktion. Dazu gehören das Mitochondrienprotein Cytochrom-c und das Molekül Apaf-1, welches die Caspase 9 aktiviert.

Beide Stoffe bilden einen Komplex, das so genannte Apoptosom, welches für diesen Weg der Apoptoseinduktion verantwortlich ist (Horn (2019)). Des weiteren interessierten wir uns für verschiedene anti- oder pro-apoptotische Stoffe der Bcl-2 Familie, welche im Prozess der Apoptose modulatorisch einwirken können.

Ähnlich zu den Ergebnissen der Annexin-V-Assays zeigte sich in den primären AML-Zellen keine unterschiedliche Expression von Apoptose-assoziierten Genen nach Daratumumab-Behandlung und somit kein Anhalt für eine Induktion der Apoptose.

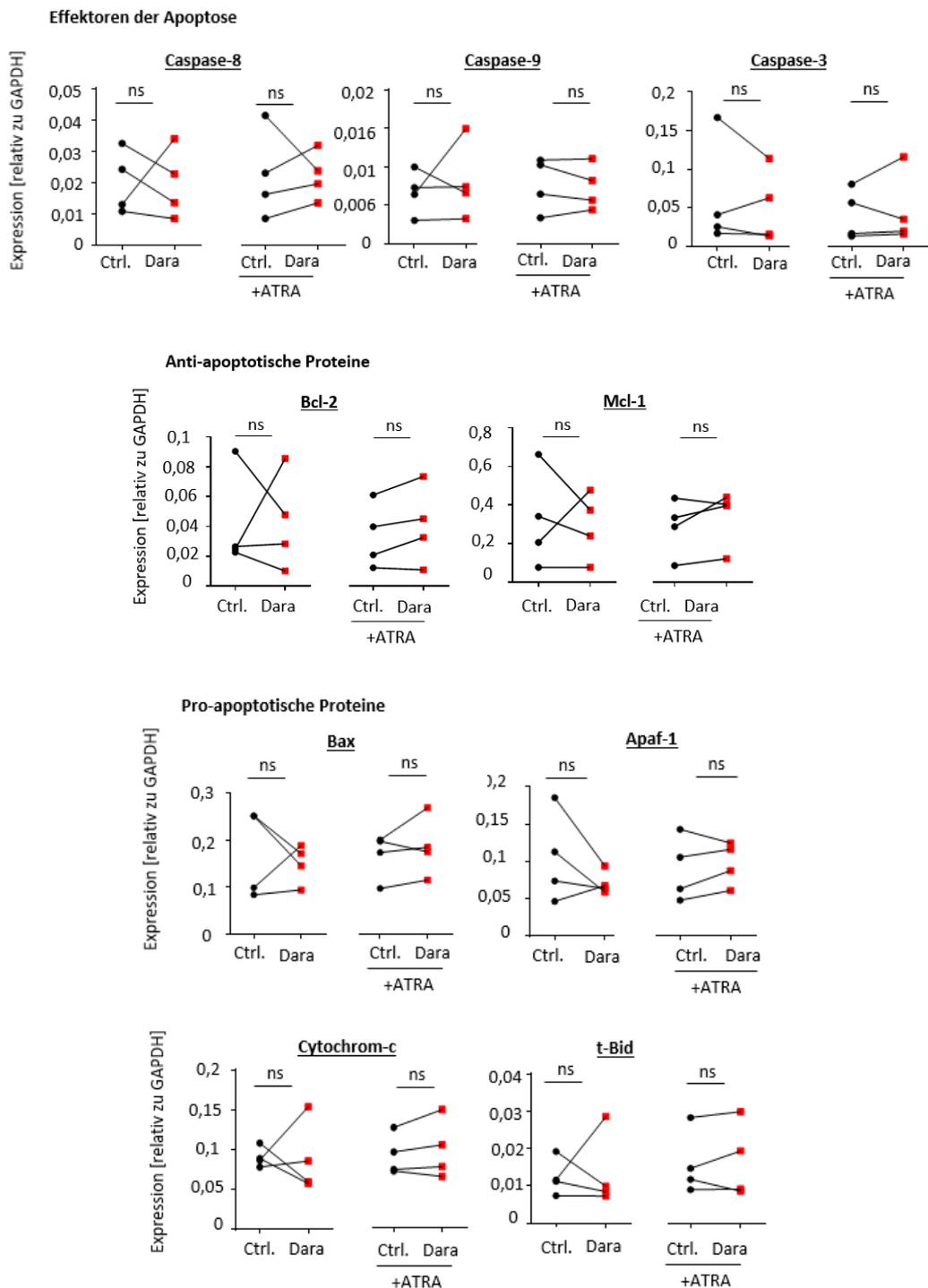


Abbildung 17 Daratumumab behandelte AML-Zellen zeigen keine veränderte Genexpression von Schlüsselmolekülen der Apoptose. Triplekultivierte primäre AML-Zellen (n=4) wurden durch FACS sortiert und mittels rt-PCR auf die Expression verschiedener Schlüsselmoleküle der Apoptose untersucht. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression der Moleküle korreliert zur internen Kontrolle GAPDH. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert der Dreifachbestimmung. Wilcoxon Vorzeichenrangtest: ns= nicht signifikant.

Der monoklonale Antikörper Daratumumab aktiviert diverse immunvermittelte, zytotoxische Mechanismen im multiplen Myelom. Hierzu gehören die Antikörper-abhängige Zell-vermittelte Zytotoxizität (ADCC), die Komplement-vermittelte Zytotoxizität (CDC) und die Antikörper-vermittelte Phagozytose (ADCP). Um die Rolle dieser Antikörper-vermittelten Mechanismen für die anti-leukämische Wirksamkeit von Daratumumab in der AML herauszuarbeiten wurden entsprechende Effektorassays durchgeführt. Alle Assays wurden mittels des Stoffes Calcein-AM durchgeführt, welcher aufgrund von hoher Lipophilie durch die Membranen der Zellen diffundieren kann. Ubiquitär vorkommende Enzyme spalten das Calcein-AM in ein Produkt, welches im Durchflusszytometer und auch im Spektrophotometer durch starke Fluoreszenz nachweisbar ist. Dementsprechend kann man mit Calcein lebende Zellen markieren, da nur in diesen die Reaktion zum fluoreszierenden Produkt erfolgen kann.

Hinsichtlich der Testung des ADCC-Mechanismus wurden die beiden AML-Zelllinien OCI-AML-3 und Kasumi-1 mit Calcein-AM für 4 Stunden mit 0,1-10µg/ml Daratumumab oder IgG₁ in Anwesenheit von gesunden mononukleären Zellen des peripheren Blutes, die als Effektorzellen fungierten, kultiviert. Danach wurde der Überstand der Konditionen gesammelt und die Calceinfluoreszenz gemessen, an der man das Ausmaß an Zellen einschätzen konnte, welche lysiert wurden. Ein Bereich zwischen 0 und 100% Lyse konnte bestimmt werden, in dem eine Mediumkontrolle als Minimal- und eine Maximalkontrolle angesetzt wurden, bei der durch Zugabe eines Detergenz eine vollständige Zellyse erzielt wurde. In drei unabhängigen Experimenten mit OCI AML-3 oder Kasumi-1 Zellen zeigte Daratumumab keine signifikante Aktivierung von ADCC (Abbildung 18A).

Für die Bestimmung der CDC-Aktivität wurden AML-Zellen in Zellkulturmedium mit 10% humanem Serum zur Bereitstellung der Komplementfaktoren in Anwesenheit von 0,1-10µg/ml Daratumumab oder IgG₁ kultiviert. Anhand der Calceinfluoreszenz im Überstand konnte auch hier eine Induktion der CDC durch Daratumumab evaluiert werden. Jedoch zeigte sich auch hier keine signifikante Induktion der Komplement-abhängigen Zytotoxizität durch Daratumumab in der AML (Abbildung 18B).

Die Verlässlichkeit der Methodik testeten wir durch Hinzunahme einer Plasmazelleukämie als Positivkontrolle, für welche die Induktion der ADCC und CDC durch Daratumumab ja bereits beschrieben sind.

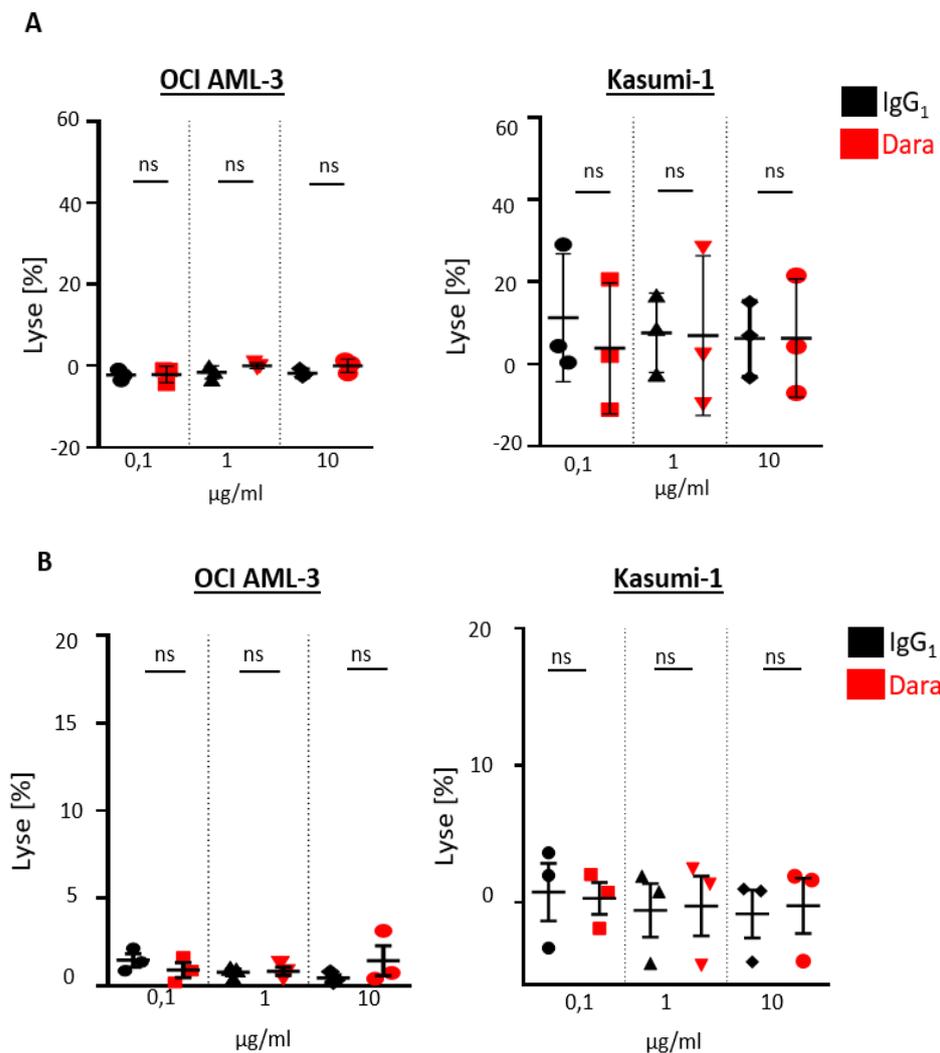


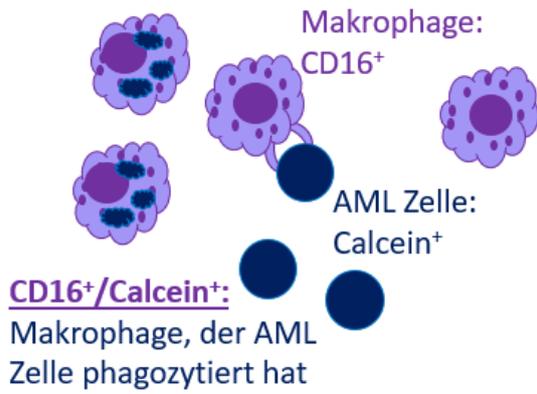
Abbildung 18 Keine Induktion von ADCC oder CDC durch Daratumumab. Testung der antikörper-abhängigen Mechanismen **A)** ADCC oder **B)** CDC durch Markierung der AML-Zellen mit Calcein-AM und Behandlung mit Daratumumab 0,1-10µg/ml. Dargestellt ist die Zelllyse in Prozent, die mit einer Mediumkontrolle (Negativkontrolle) und einer Detergenzkontrolle (Positivkontrolle) bestimmt wurde. Mittelwerte der Dreifachbestimmungen drei unabhängiger Experimente. Darstellung der Daten als Mittelwert ± SEM. Mann-Whitney-U Test: ns= nicht signifikant.

Als dritter, wichtiger immunvermittelter Mechanismus der CD38-Inhibition gilt die Antikörper-abhängige Phagozytose. Um diese näher zu untersuchen, wurden CD14⁺ mononukleäre Zellen aus humanem Blut isoliert, um diese mit M-CSF für 6 Tage zu reifen Makrophagen auszudifferenzieren.

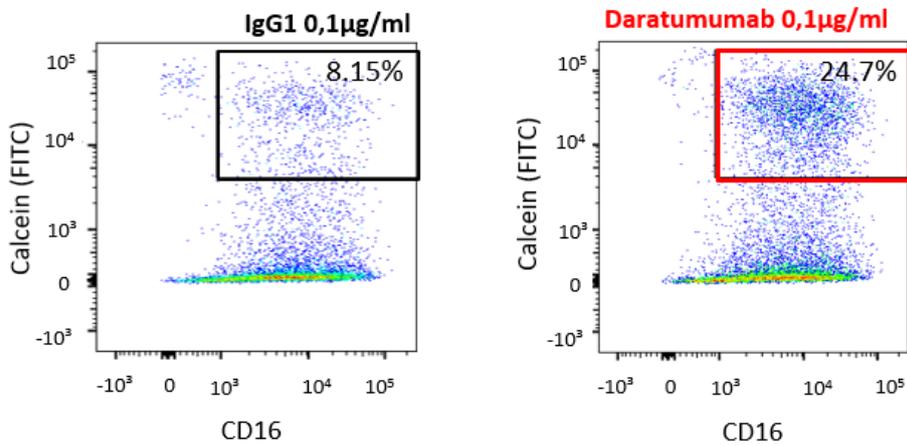
Die reifen Makrophagen wurden über Nacht ausplattiert und am darauffolgenden Tag mit den Zelllinien OCI AML-3 oder Kasumi-1 in aufsteigender Konzentration mit Daratumumab oder IgG₁ (0,1-10µg/ml) für vier Stunden inkubiert. Die Leukämiezellen wurden zuvor als Zielzelle mit Calcein-AM gefärbt. Die Induktion der Phagozytose wurde durch Quantifizierung von Calcein-positiven Makrophagen mittels Durchflusszytometer bestimmt. Daratumumab induzierte signifikant die Phagozytose von OCI AML-3- und Kasumi-1 Zellen. Im Detail konnte die Phagozytose in der niedrigsten Daratumumabkonzentration von 0,1µg/ml um insgesamt +64,4% bzw. +79,4% (OCI AML-3 bzw. Kasumi-1) gesteigert werden. Interessanterweise scheint dieser Effekt nicht konzentrationsabhängig zu sein, denn eine weitere Erhöhung der Daratumumab-Konzentration über 0,1µg/ml zeigte keine Änderung der Induktion der Phagozytose (+79,2% bei 1µg/ml und +75,6% bei 10µg/ml für Kasumi-1) (Abbildung 19C-D). Um die Relevanz auch für die primäre, humane AML zu verifizieren, wurde der ADCP-Assay mit fünf verschiedenen nicht monozytären AML-Proben durchgeführt. Bemerkenswerterweise steigerte die Behandlung mit Daratumumab (0,1µg/ml) in allen fünf Proben die Phagozytose zu einem deutlichen Ausmaß, im Durchschnitt um das 1,75-fache im Vergleich zur Kontrolle (+75%) (Abbildung 19E).

Zusammenfassend konnte in Übereinstimmung mit der geringfügigen zellautonomen anti-leukämischen Wirksamkeit von Daratumumab keine signifikante Auswirkung auf die Proliferation, Apoptose, Differenzierung oder CDC und ADCC beobachtet werden, während Daratumumab signifikant die Phagozytose von AML-Zellen induzierte. Da auch Endothelzellen dafür bekannt sind, phagozytäre Kapazitäten zu besitzen, könnte dies den Microenvironment-vermittelten Effekt von Daratumumab in unserem 3D-Triple-Kultur-Modell erklären.

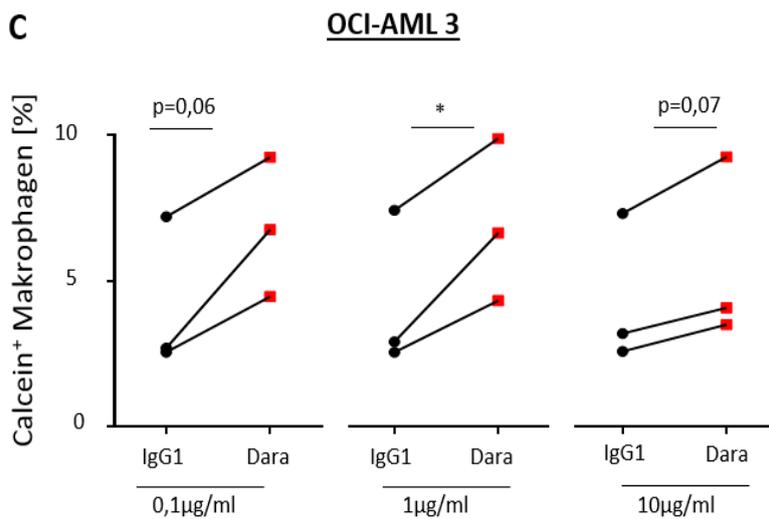
A



B



C



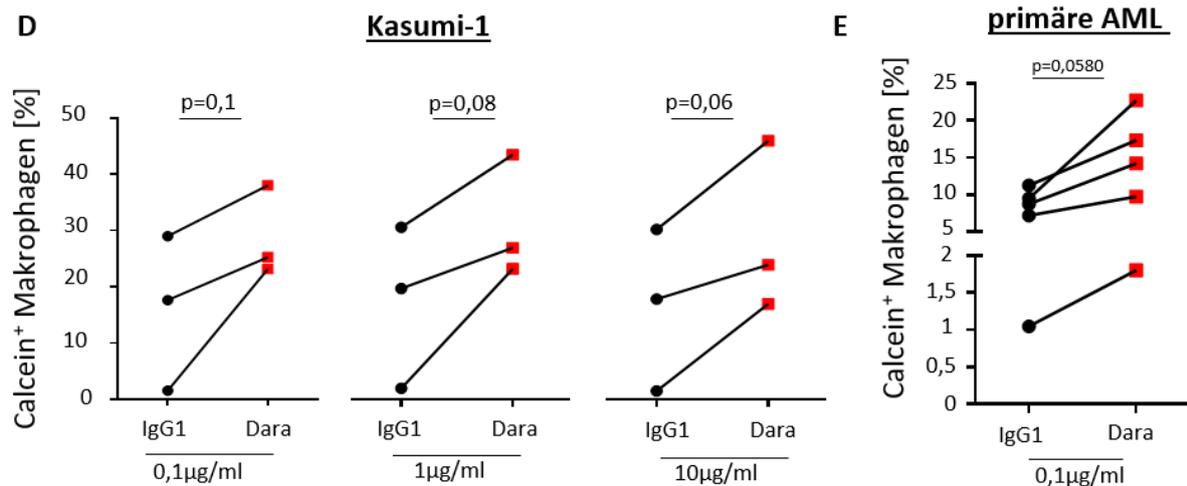


Abbildung 19 Antikörper-abhängige Phagozytose (ADCP) von AML-Zellen durch Daratumumab. A) Schema der Analysestrategie. **B)** Repräsentative FACS-Abbildung einer primären Probe. Die Calcein-gefärbten AML-Zellen **C)** OCI AML-3 und **D)** Kasumi-1 (jeweils $n=3$) sowie die **E)** primären AML-Zellen ($n=5$) inkubierten mit primären humanen Makrophagen für vier Stunden in 0,1-10 µg/ml Daratumumab oder IgG₁. Dargestellt ist der Anteil CD16/Calcein-doppelt positiver Makrophagen im Durchflusszytometer. Mittelwerte der Dreifachbestimmungen. Ungepaarter Student's t-Test (C,D) und Wilcoxon Vorzeichenrangtest (primäre AML): ns=nicht signifikant; * = $p < 0,05$.

Die zugrunde liegenden Mechanismen für die nicht zellautonome anti-leukämische Wirksamkeit von Daratumumab blieb bisher nur teilweise erklärt. Wir vermuteten einen Effekt von Daratumumab auf die Interaktion von Leukämiezellen und Endothelzellen auf die Adhäsion und Migration. Wir gewannen die CD45⁺ hämatopoetische und CD144⁺ Endothelzellen aus dem *in vitro* Triplekulturmodell durch FACS und untersuchten die Expression von verschiedenen Molekülen, die eine wichtige Rolle für die Adhäsion, Migration und Angiogenese spielen. Wir untersuchten Moleküle mit Einfluss auf die Migration und Adhäsion an Endothelzellen, nämlich CXCR-4, ICAM-1 und VCAM. Zusätzlich wurde die Expression der Adhäsionsmoleküle CD31 (PECAM), E-Selektin und CD144 (VE-Cadherin) betrachtet, die vorwiegend auf Endothelzellen exprimiert werden. Als weitere Schlüsselmoleküle wurden Endothelzellen-regulierende Moleküle untersucht, im Detail das sogenannte Angiopoietin-1, VEGF und zusätzlich das CXCL-12, welches Stammzellen-regulierend wirkt, aber von Endothelzellen sezerniert werden kann. Insgesamt beobachteten wir keine Unterschiede in der Menge an mRNA eines der Schlüsselmoleküle nach CD38-Inhibition, weder in den AML-Zellen noch in den Endothelzellen. Schlussfolgernd können wir einen Effekt der Expression von Adhäsions-, Migrations- und Angiogenesemolekülen auf den von uns beobachteten Mikroenvironment-vermittelten Effekt nicht sicher belegen.

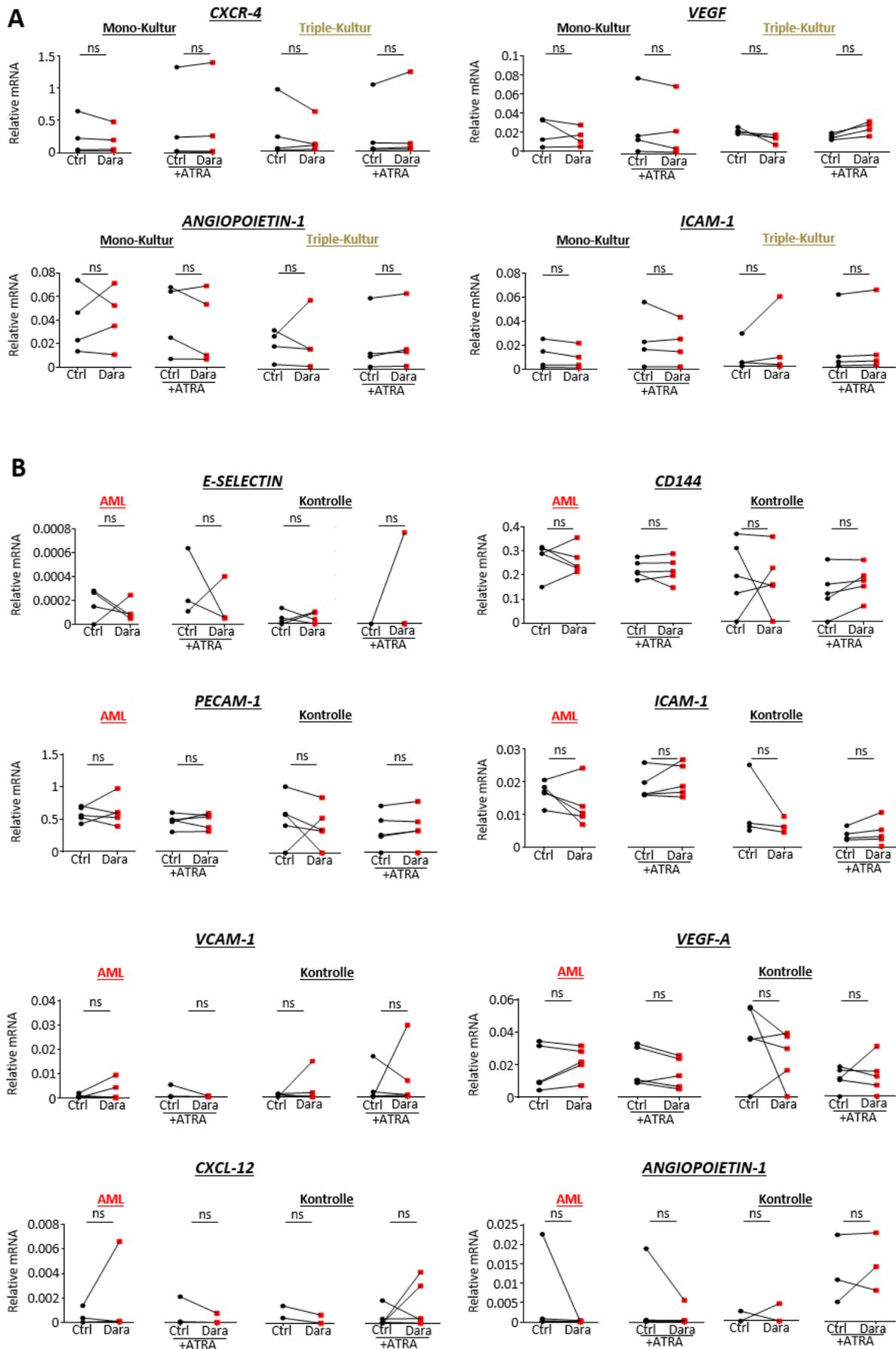


Abbildung 20 Genexpression verschiedener Schlüsselmoleküle der Knochenmarksnische in AML-Zellen. Primäre AML-Zellen (**A**, n=4) oder CD144⁺ Endothelzellen (**B**, n=5, kultiviert mit AML-Zellen oder Kontrollzellen) wurden nach Triplekultivierung mit Daratumumab und ATRA durch FACS gewonnen und auf die mRNA-Expression verschiedener Moleküle im Bezug zur Knochenmarksnische untersucht. Dargestellt ist die Genexpression relativ zu *GAPDH*. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert der Dreifachbestimmung. Wilcoxon Vorzeichenrangtest: ns= nicht signifikant.

4.4 *In vivo* Wirksamkeit der CD38-Inhibition in der AML

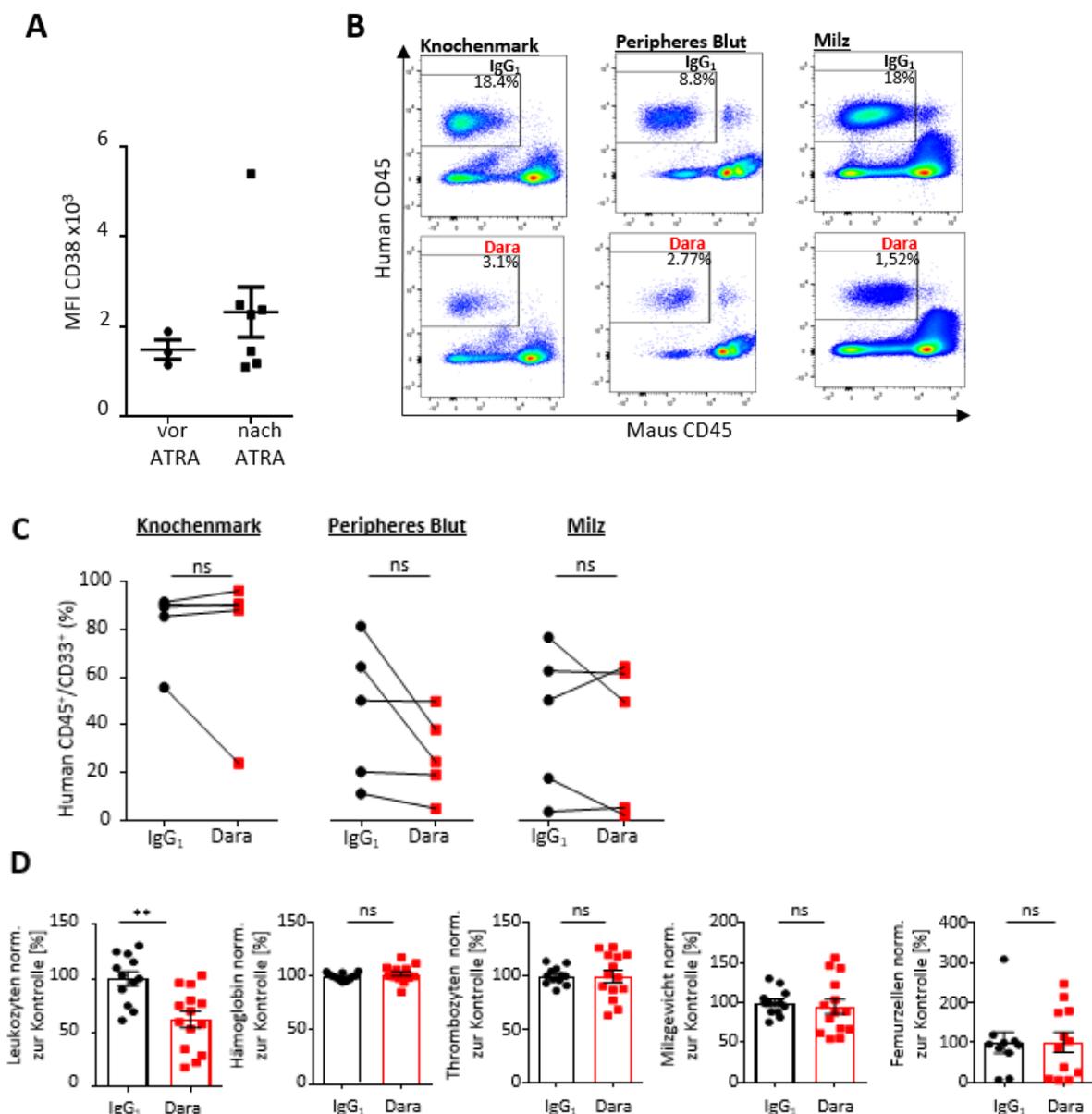
Die *in vitro* Experimente mit AML-Zelllinien und primären AML-Zellen belegen eine vielversprechende, vor allem Mikroenvironment-vermittelte Wirkung der CD38-Inhibition mit Daratumumab in der AML. Um diese *in vivo* zu testen, wurde ein NSG-Xenograft Modell verwendet. Die hierbei verwendeten NSG-Mäuse sind immuninkompetent und erlauben eine Transplantation von menschlichen AML-Zellen, die in der Maus anwachsen und eine Leukämie induzieren. Nach der Transplantation wurde die Leukämie last fortlaufend durch Bestimmung der humanen Zellen im Blut verfolgt und das Experiment ab einer ungefähren Infiltration von 5-10% humanen Blasten im peripheren Blut gestartet. Die Mäuse wurden in zwei Gruppen verteilt (Daratumumab und IgG₁-Kontrolle). Dabei wurde darauf geachtet, dass die Verteilung der Leukämie last im Blut der Mäuse in beiden Gruppen vergleichbar ist (mittlere Leukämie last im murinen peripheren Blut vor Start des Experimentes 7%). Die Mäuse wurden über 4 Wochen behandelt, im Detail wurde an vier aufeinander folgenden Tagen intraperitoneal ATRA (10mg/kgKG) injiziert, um eine Hochregulation von CD38 auf den Zellen zu vermitteln. An Tag 3 erfolgte die Behandlung mit Daratumumab oder dem Kontrollantikörper IgG₁ (8mg/kgKG). Nach der vierten Behandlungswoche wurden die Mäuse weitere sechs Tage beobachtet und dann durch Gewinnung des Knochenmarks, der Milz und des Blutes die Leukämie last durchflusszytometrisch bestimmt und verglichen. Insgesamt wurden fünf verschiedene primäre AML-Proben transplantiert und in diesem Modell behandelt.

Tatsächlich konnten wir nachweisen, dass die Zugabe von ATRA die CD38-Expression in AML-Zellen in mit IgG₁ behandelten Kontrollmäusen induzierte, wenn auch in geringerem Maße als *in vitro* (Abbildung 21A). In drei von fünf Experimenten beobachteten wir eine deutliche Abnahme der humanen AML-Zellen im peripheren Blut um -30 %, während insgesamt keine signifikante Verringerung der Leukämie last im Knochenmark und in der Milz beobachtet wurde (Abbildung 21B-C). In Übereinstimmung mit der offensichtlichen anti-leukämischen Aktivität, die im peripheren Blut beobachtet wurde, waren die Leukozytenzahlen bei mit Daratumumab behandelten Mäusen signifikant niedriger (Abbildung 21D).

Nach der Daratumumab-Behandlung war die Knochenmarkszellularität leicht erhöht (Abbildung 20D), während keine offensichtlichen histologischen Unterschiede in der Knochenmarkarchitektur beobachtet werden konnten, insbesondere keine offensichtlichen Unterschiede in der Menge der retikulären Fasern (Abbildung 20E).

Bemerkenswerterweise zeichnete sich innerhalb eines Experimentes eine stärkere anti-leukämische Aktivität von Daratumumab ab, wobei die durchschnittliche Leukämielast in der Kontrollgruppe mit 55 % AML-Infiltration im Knochenmark vergleichsweise gering war.

Die anti-leukämische Wirksamkeit zeigte sich zwischen den einzelnen eingesetzten AML-Proben heterogen, wobei weder zytomorphologische, zytogenetische Charakteristika oder die CD38-Expression der verwendeten AML-Proben einen Hinweis auf die Wahrscheinlichkeit des Ansprechens auf Daratumumab lieferten.



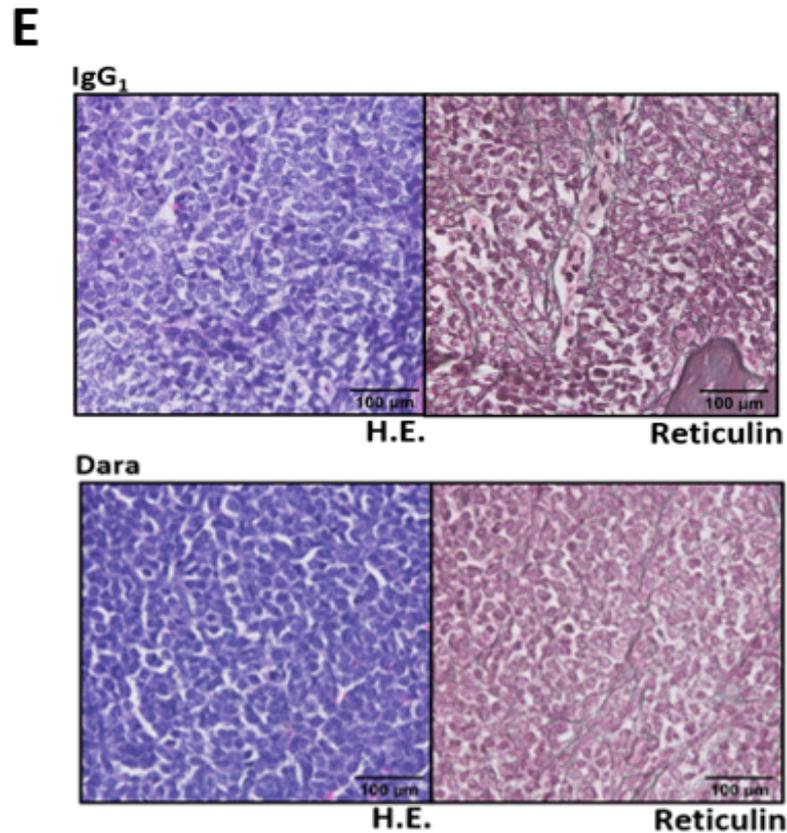


Abbildung 21 Langzeitbehandlung *in vivo* mit Daratumumab zeigt heterogene Wirksamkeit.

A) Darstellung der MFI-CD38 aus einer primären AML-Probe vor Transplantation (links) und nach Langzeitbehandlung mit ATRA und IgG₁ gewonnen aus dem Knochenmark (rechts). **B)** Repräsentative FACS-Abbildung humaner CD45⁺ Zellen und **C)** Quantifizierung der humanen AML-Zellen (CD45⁺/CD33⁺) im Knochenmark, peripheren Blut und Milz nach Behandlung mit Daratumumab und IgG₁ Kontrolle. Jeder Punkt repräsentiert die Mittelwerte aller jeweiligen Mäuse/AML-Probe, n=5 verschiedene AML-Proben und n=2-9 Mäuse/Probe. **D)** Analyse der Leukozytenzahl, des Hämoglobins sowie der Thrombozyten aus dem peripheren Mausblut sowie des feuchten Milzgewichts und der Zellzahlen/Femur behandelter Mäuse normalisiert zur Kontrolle. **E)** Repräsentative histologische Abbildung des Knochenmarkes zweier Mäuse (IgG₁ oben, Daratumumab, unten); links: H.E. Färbung, rechts: Retikulinfärbung. 40x Vergrößerung. Darstellung der Daten als Mittelwert ± SEM. Wilcoxon Vorzeichenrangtest (C) und gepaarter Student's t-Test (D): ns= nicht signifikant, **=p<0,01.

Anschließend ergänzten wir unser Modell der Langzeitbehandlung um eine Therapie mit dem Zytostatikum Cytarabin, da wir vermuteten, dass die Kombinationstherapie in Synergismus einen Vorteil in der anti-leukämischen Behandlung erbringen könnte. Wir führten in der ersten Woche des Versuchsansatzes eine viertägige Induktionsbehandlung der Mäuse mit Cytarabin (200mg/kgKG) durch. Insgesamt wurden zwei verschiedene AML-Proben in insgesamt 10 NSG-Mäuse transplantiert. Nach Beendigung der vierwöchigen Behandlung gewannen wir Knochenmark, Milz und peripheres Blut und analysierten die Leukämiebelastung wie zuvor erwähnt. Die Leukämieinfiltrationen der behandelten Mäuse waren vergleichbar mit denen der Kontrollgruppe, ebenso ließ sich kein Effekt auf die Blutbilder, das Milzgewicht oder die Zellzahlen pro Femur erkennen (Abbildung 22).

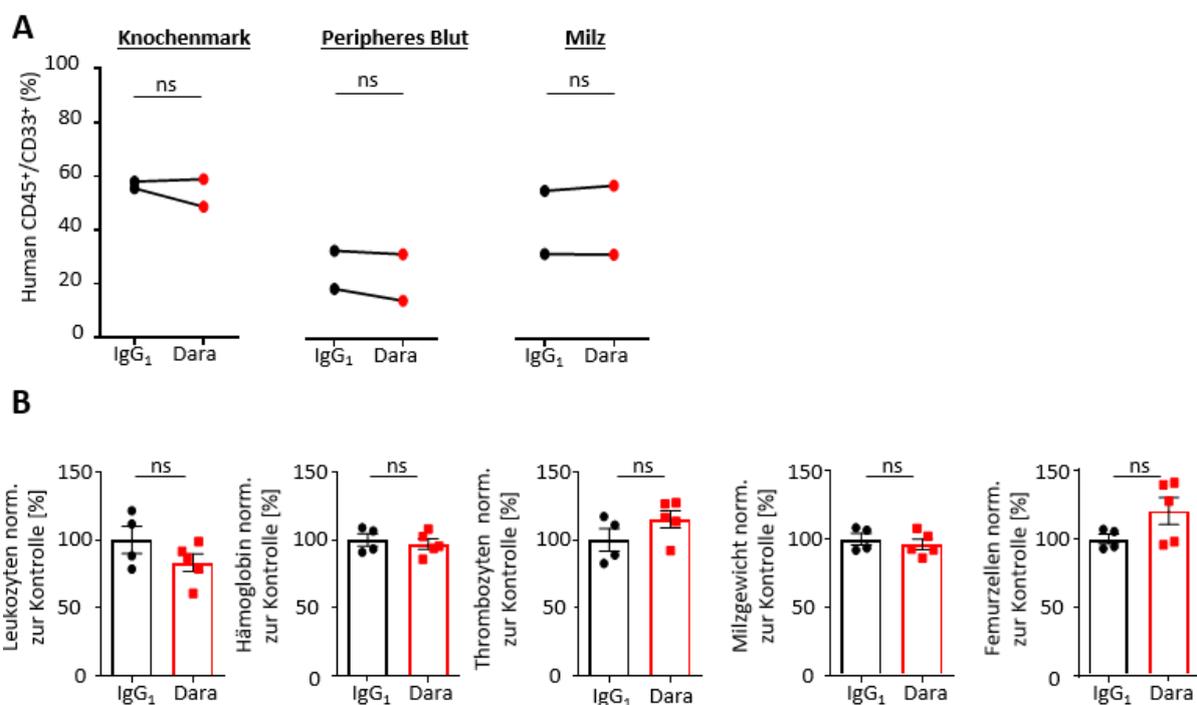


Abbildung 22 Kombinationstherapie mit ATRA und Cytarabin zeigt keine verbesserte anti-leukämische Wirkung Daratumumabs. **A)** Quantifizierung der humanen AML-Zellen (CD45⁺/CD33⁺) im Knochenmark, peripheren Blut und Milz nach Behandlung mit Cytarabin, Daratumumab oder IgG₁ Kontrolle. Jeder Punkt repräsentiert die Mittelwerte aller jeweiligen Mäuse/AML-Probe, n=2 verschiedene AML-Proben und n=4-6 Mäuse/Probe. **B)** Analyse der Leukozytenzahl, des Hämoglobins sowie der Thrombozyten aus dem peripheren Mausblut sowie des feuchten Milzgewichts und der Zellzahlen/Femur behandelter Mäuse normalisiert zur Kontrolle. Darstellung der Daten als Mittelwert ± SEM. Wilcoxon Vorzeichenrangtest: ns= nicht signifikant.

Angesichts der beobachteten Umverteilung von Leukämiezellen nach der Behandlung mit Daratumumab stellte sich die Frage, ob die CD38-Inhibition das Homing der AML-Zellen *in vivo* beeinflusst. Dazu wurden die Mäuse durch intraperitoneale Injektion von Daratumumab oder IgG₁ (8mg/kgKG, n=5 pro Gruppe) vorbehandelt und 24 Stunden später primäre AML-Zellen transplantiert (n=2 verschiedene AML-Proben, 2-3 Mäuse pro AML-Probe).

Weitere 16 Stunden später wurde das Knochenmark, die Milz und das Blut der Mäuse gewonnen und durch durchflusszytometrische Analyse der Anteil an humanen AML-Zellen in den unterschiedlichen Kompartimenten bestimmt. Bemerkenswerterweise migrierten deutlich weniger Zellen in das Knochenmark und die Milz von Daratumumab-behandelten Mäusen, was eine Interferenz von Daratumumab in der Zirkulation von AML-Zellen nahelegt.

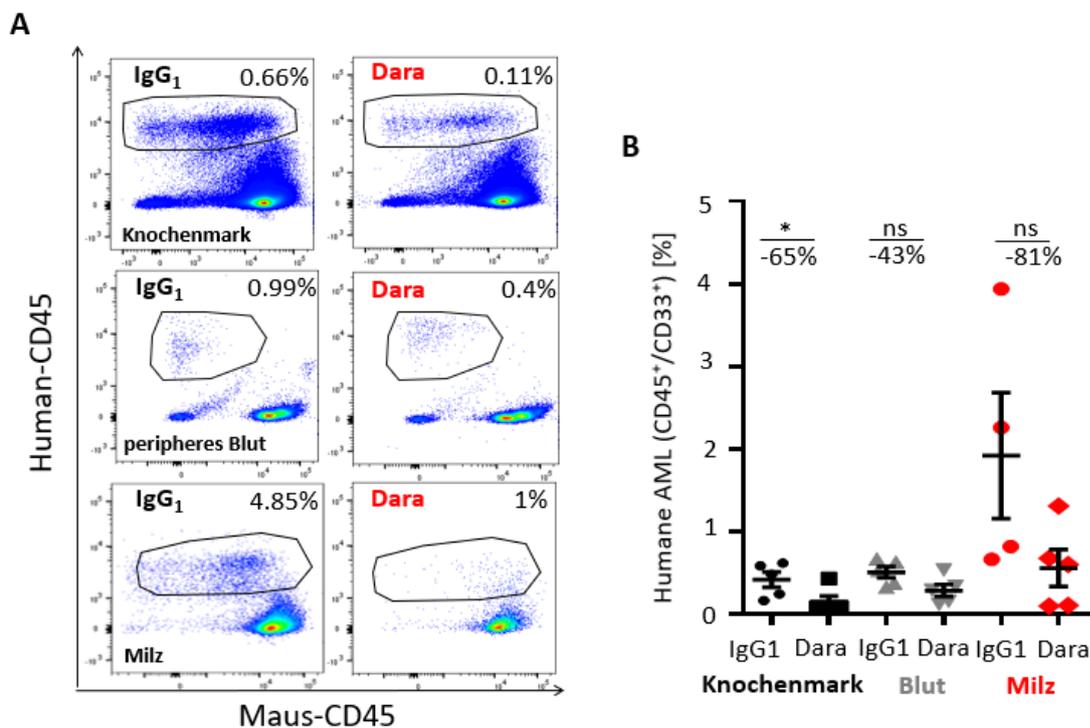


Abbildung 23 Daratumumab vermindert Migration von AML-Zellen *in vivo*. **A)** repräsentative FACS-Abbildungen einer primären AML-Probe sowie **B)** Quantifizierung humaner AML-Zellen (human CD45⁺/CD33⁺) im Durchflusszytometer im Knochenmark, peripheren Blut sowie der Milz nach Behandlung mit Daratumumab oder IgG₁ Kontrolle. Jeder Punkt repräsentiert die Mittelwerte aller jeweiligen Mäuse/AML-Probe, n=2 verschiedene AML-Proben und n=5 Mäuse/Gruppe. Darstellung der Daten als Mittelwert ± SEM. Mann-Whitney U-Test: ns= nicht signifikant; *= p < 0,05.

5 DISKUSSION

In der Behandlung der akuten myeloischen Leukämie stellen insbesondere die hohen Rezidivraten sowie die eingeschränkten Behandlungsmöglichkeiten von älteren Patienten ein bisher ungelöstes Problem dar. Aktuelle Forschungsergebnisse betonen die Wichtigkeit des Konzeptes der hämatopoetischen Stammzellnische- und insbesondere der leukämischen Stammzellnische in Bezug auf die Entstehung und Fortbestehung der Krankheit (Schepers et al., 2015). Es wird vermutet, dass leukämische Stammzellen wie ihre gesunden Gegenstücke, die hämatopoetischen Stammzellen, in der Knochenmarknische ruhen. Ebenso scheinen die leukämischen Zellen viele Mechanismen zu entwickeln, um einen Überlebensvorteil zu erlangen und die Chemotherapie zu überdauern (Ishikawa et al., 2007). Durch die Transformation der hämatopoetischen Stammzellnische wird der Fortbestand der Krankheit, auch über die Chemotherapie hinaus vermutet. Die hämatopoetische Stammzellnische bietet also einen geeigneten Angriffspunkt, um die Kommunikation der leukämischen Stammzellen mit ihrem Mikroenvironment zu unterbinden.

Die standardisierten Therapieprotokolle für die AML zeigen vielversprechende Ansprechraten im kurativen Konzept, erreichen doch eine Mehrheit der Patienten zunächst eine komplette Remission (65-75% der unter 60-Jährigen und 40-60% der >60-Jährigen Patienten) (Schlenk & Döhner, 2013). Für ältere, biologisch unfitte Patienten kommt diese intensivierete, kurativ intendierte Chemotherapie allerdings nicht in Frage (Röllig et al., 2019). Insgesamt besteht ein großer Bedarf, neue zielgerichtete Therapien zu finden, die insbesondere in Synergismus mit den bestehenden Protokollen einen Überlebensvorteil erzielen und auf die protektive leukämische Nische gerichtet sind. Insbesondere für ältere Patienten würde also ein zielgerichtetes, nebenwirkungsarmes Mittel, welches das Überleben von leukämischen Stammzellen in der Knochenmarksnische angreift, erhebliche Vorteile erbringen.

Der Einsatz von zielgerichteten Biologika zeigt in den letzten Jahren eine erfolgreiche Veränderung der Therapiemöglichkeiten für viele Tumorentitäten. Die Entwicklung von diesen zielgerichteten Medikamenten zeigt eine überraschende Effektivität und verglichen zur hochdosierten Chemotherapie eine bessere Verträglichkeit.

Auch im Bereich der Hämatologie werden bereits zielgerichtete Therapien verwendet, nicht zuletzt der Einsatz des Medikamentes Daratumumab, welches auf das Antigen CD38 abzielt. Das transmembranäre Glykoprotein scheint einen maßgeblichen Einfluss auf Zytokinsekretion, Adhäsion und Migration im Sinne einer proinflammatorischen Reaktion zu nehmen (Piedra-Quintero et al., 2020). Es ist darüber hinaus weit verbreitet auf Immunzellen, unabhängig vom Ausreifen und Funktionsstatus (Funaro et al., 1990).

Tatsächlich exprimieren auch AML-Blasten regelhaft zu einem hohen Ausmaß CD38, ohne dass die Expressionshöhe mit morphologischen oder zytogenetischen Charakteristika korreliert (Keyhani et al., 2000). Auf dieser Grundlage, und mit dem Wissen um die inflammatorische Reaktion in der AML-Knochenmarknische, zeichnet sich CD38 als hervorragende Zielstruktur zum Eingreifen in die Kommunikation der leukämischen Nische- aber auch als direkte Zielstruktur zur Therapie der AML ab. Neben der Kernfrage nach der anti-leukämischen Wirksamkeit, konzentrierte sich die Arbeit zudem auf die Regulation des Antigens CD38 im Konzept der Stammzellnische.

5.1 Anti-leukämische Wirkung von Daratumumab ist abhängig vom Mikroenvironment

Der Versuch, die Kommunikation des Mikroenvironments mit den AML-Zellen zu unterbrechen, ist ein attraktiver Ansatz, um Leukämie-initiiierende Zellen anzugreifen und damit ihre Empfindlichkeit gegenüber genotoxischen Einflüssen zu erhöhen. Sowohl zellautonome, als auch vom Mikroenvironment abgeleitete Entzündungssignale, fördern die klonale Hämatopoese. Chronischer Stress, ausgelöst beispielsweise durch Chemotherapie, aber auch durch eine andauernde niedrige Entzündungsreaktion im alternden Knochenmark, fördert die Ausschöpfung gesunder hämatopoetischer Stammzellen bis hin zum Versagen des Knochenmarks und Entstehung einer Leukämie. Der Einfluss chronischer Inflammation auf die Leukämogenese ist beispielsweise bei Malignomen der B-Linie sowie bei myeloischen Neoplasmen beschrieben (Henry et al., 2015; Leimkühler & Schneider, 2019). Verschiedene Ansätze, die Entzündungsreaktion zu unterbrechen, zeigen Wirksamkeit bei der Behandlung myeloischer Malignome. So konnte beispielsweise die Blockierung der IL-6-Signalübertragung die Entwicklung der chronischen myeloischen Leukämie verzögern (Reynaud et al., 2011). Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass die Inhibition des proinflammatorischen JAK/STAT-Signalwegs eine anti-leukämische Aktivität bei AML *in vitro* zeigt (Habbel et al., 2020).

Basierend auf der ausgeprägten immunmodulatorischen Funktion von CD38 (N. van de Donk & Usmani, 2018), wählten wir die CD38-Inhibition mit Daratumumab als vielversprechenden Therapieansatz der AML. In verschiedenen *in vitro* Kulturmodellen mit Stroma- und mesenchymalen Stammzellen konnten wir die Komplexität der hämatopoetischen Stammzellnische ansatzweise nachstellen. Daratumumab zeigt eine geringe anti-leukämische Wirksamkeit in Monokultur der AML-Zellen, was auf einen vernachlässigbaren zellautonomen Wirkmechanismus schließen lässt. Im 3D Triplekulturmodell bewirkt die CD38-Inhibition einen signifikanten anti-leukämischen Effekt, moduliert durch die verschiedenen Komponenten des Mikroenvironments.

Als Beleg für die Bedeutung der Knochenmarknische für das Antigen CD38 konnten wir herausstellen, dass die Expression von CD38 durch das Mikroenvironment auf hämatopoetischen Zellen induziert wird, insbesondere auf AML-Zellen. Wie bereits vorher beschrieben kann die CD38-Expression durch Induktion der Transkription durch ATRA reguliert werden (Drach et al., 1994). In zahlreichen Studien zum Multiplen Myelom konnte dieser Effekt verifiziert werden und interessanterweise führte die CD38 Hochregulation durch ATRA zu einer deutlichen Verbesserung der zytotoxischen Effektivität der CD38-Inhibition beim Multiplen Myeloms (Nijhof et al., 2015). Auch wir beobachteten eine deutliche Hochregulation von CD38 auf hämatopoetischen Zellen, insbesondere auf den AML-Zellen. Die Kombination aus Daratumumab und ATRA in einem 3D Triplekulturmodell konnte jedoch keine Verstärkung der anti-leukämischen Wirksamkeit erreichen. Gegenätzlich zu unseren Ergebnissen konnte in einer weiteren Studie mit Daratumumab eine Kombinationstherapie mit ATRA die Wirksamkeit gegen myeloische Blasten *in vitro*, als auch einem *in vivo* Kulturmodell steigern (Buteyn et al., 2018).

Um den Mikroenvironment-vermittelten Effekt zu entschlüsseln, fokussierten wir uns auf die Interaktion von AML- und Endothelzellen, welche den natürlichen Liganden von CD38, nämlich CD31, exprimieren (Deaglio et al., 1998). Im leukämisch veränderten Knochenmark findet gleichzeitig zur inflammatorischen Infiltration eine Steigerung der Angiogenese statt, welche zu einer erhöhten Anzahl von Endothelzellen führt (Padró et al., 2000). Wir untersuchten in unserem 3D Triplekulturmodell die mRNA-Expression verschiedener Moleküle, die für die Vermittlung der Adhäsion und Migration der AML-Zellen oder Unterhalt der Endothelzellen in der Knochenmarknische relevant sind. Die CD38-Inhibition hatte jedoch keinen Einfluss auf die Expression der untersuchten Moleküle.

Daratumumab zeigt diverse immunvermittelte, zytotoxische Mechanismen. Bereits für das Multiple Myelom beschrieben sind die Aktivierung der CDC, der ADCC und der ADCP sowie der Fc-Kreuzvernetzung mit Induktion der Apoptose (N. W. C. J. van de Donk et al., 2016). In dieser Arbeit konnte deutlich herausgearbeitet werden, dass Daratumumab die Phagozytose von AML-Zellen induziert, während die anderen Mechanismen keine Relevanz zeigten.

Limitierend zur grundsätzlichen Durchführung des ADCC-Assays ist, dass die eingesetzten mononukleäre Zellen nur zu einem geringen Teil aus den eigentlichen Effektorzellen, den NK-Zellen, bestehen (Matas-Cespedes et al., 2017; Nijhof et al., 2016). Als weiterer, Antikörper-vermittelter Mechanismus gilt die Fc- γ -Rezeptor-Kreuzvernetzung von der an das Zielantigen gebundenen Antikörper. Findet eine Kreuzvernetzung mehrerer Rezeptoren statt, so kann dies in der Zelle den Zelltod auslösen.

Während dieser Mechanismus in dieser Arbeit nicht untersucht wurde, stellten Buteyn et al. heraus, dass Daratumumab und insbesondere eine Kombination aus Daratumumab und ATRA, eine Konjugation von AML-Zellen (MV4-11, myelomonozytäre Leukämie) und über Fc- γ -Kreuzvernetzung konsekutiv eine deutliche anti-leukämische Wirksamkeit auslöste (Buteyn et al., 2018).

Heutzutage gibt es ein wachsendes Verständnis dafür, wie zellautonome sowie dem Mikroenvironment-entstammende entzündliche Signale die Leukämogenese fördern. Ein Unterbinden dieser inflammatorischen Antwort, beispielweise durch Inhibition des JAK/STAT-Signalweges (Habbel et al., 2020), zeigt *in vitro* anti-leukämische Aktivität bei AML-Zellen.

In Bezug auf die CD38-Inhibition ist ein Eingreifen in die inflammatorische Reaktion durch mögliche Beeinflussung der immunregulatorischen Tumorkontrolle zu diskutieren.

In der Arbeit von Chatterjee et al. konnte herausgestellt werden, dass die Immunkontrolle von T-Zellen abhängig ist von ihrem intrazellulären NAD⁺-Gehalt, welcher durch Beeinflussung des Zellstoffwechsels einen entscheidenden Einfluss auf die Zellfunktion nimmt. CD38 nimmt Einfluss auf den NAD⁺ Spiegel, in dem es durch die enzymatische Funktion als NADase dieses degradiert. T-Zellen, in denen die CD38-Aktivität durch einen Antikörper blockiert wurde, zeigten eine verbesserte Tumorkontrolle in einem murinen Melanommodell und somit eine potenziell wirkungsvolle Immunmodulation durch CD38-Inhibition (Chatterjee et al., 2018). Ergänzend dazu konnten Krejcik et al. bereits eine immunmodulatorische Wirkung von Daratumumab herausarbeiten, in dem eine veränderte T-Zell Zusammensetzung im Blut von behandelten Patienten auffiel. Es zeigte sich eine Vergrößerung von immunkompetenten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und insbesondere auch eine Verminderung immunsuppressiver T-Zellen (Krejci et al., 2016). Diese Ergebnisse lassen die Vermutung offen, dass Daratumumab einen entscheidenden Einfluss auf die Tumorkontrolle durch das adaptive Immunsystem nehmen könnte. Dieser weitere, in dieser Arbeit nicht rekapitulierte Effekt auf die Knochenmarksnische soll hier am Rande nur Erwähnung finden und die bisher für die AML bisher nicht weiter erforschte Wirksamkeit von Daratumumab über das Eingreifen in die Immunkontrolle zur Geltung bringen.

Zusammenfassend stellte sich also heraus, dass die *in vitro* Wirksamkeit der CD38-Inhibition in der AML nur durch einen geringen zellautonomen Effekt, aber vorwiegend durch das Mikroenvironment vermittelt wird. Zu diesem tragen insbesondere die Antikörper-vermittelten Mechanismen bei, wie in dieser Arbeit beschrieben, insbesondere die Phagozytose von AML-Zellen. Zudem scheint die Fc-Kreuzvernetzung ein weiterer, Antikörper-vermittelter anti-leukämischer Mechanismus in der Behandlung der AML mit Daratumumab zu sein.

5.2 Anti-leukämische Wirksamkeit der CD38-Inhibition *in vivo*

Zur Validierung der anti-leukämischen Wirksamkeit von Daratumumab in der AML verwendeten wir ein NSG-Xenograft-Mausmodell. Während in dieser Arbeit ein nur geringfügiger anti-leukämischer Effekt der CD38-Inhibition *in vivo* nachgewiesen werden konnte, gibt es weitere, aktuelle Studien, die eine *in vivo* Wirksamkeit von Daratumumab in der AML unterstützen. Buteyn et al. Arbeiteten eine anti-leukämische Wirksamkeit in zwei unterschiedlichen Mausmodellen heraus, die insbesondere in Kombination mit ATRA zu maximieren war. In einem soliden Tumormodell, worin MV4-11 Leukämiezellen subkutan in NSG-Mäuse injiziert wurden und zu einem soliden Tumor heranwuchsen, konnte eine signifikante Reduktion des Tumorwachstums und -volumens mit der Kombinationstherapie erreicht werden, obwohl anzumerken ist, dass die Nische für Leukämiezellen in einem soliden Tumormodell nicht realistisch abgebildet wird.

Weiterführend verlängerte die Behandlung mit Daratumumab und ATRA auch signifikant das Überleben von NSG-Mäusen, bei denen zuvor durch intravenöse Transplantation von MV4-11 Zellen eine humane Leukämie induziert wurde (Buteyn et al., 2018).

In einem weiteren Xenograft-Modell und einem heterotopen Transplantationsmodell wurden u.a. AML-Zellen in ein Gerüst aus Calciumphosphat, welches mit humanen, mesenchymalen Stammzellen beschichtet wurde, injiziert. Nach 3 Wochen wurden die Mäuse mit 16mg/kgKG Daratumumab intraperitoneal über 5 Wochen behandelt. Verglichen mit der Kontrolle war die leukämische Infiltration in den Nischen deutlich reduziert. Interessanterweise wuchs eine AML-Probe nicht nur in den humanen Nischen, sondern auch im murinen Knochenmark an. Auch dort konnte die Leukämiebelastung durch Daratumumab signifikant reduziert werden (Naik et al., 2019).

Weiterführend konnte unter Verwendung eines NSG-Xenograft-Modells mit OCI AML-3 Zellen eine reduzierte Leukämiebelastung und verlängertes Überleben leukämischer Mäuse nach Behandlung mit Daratumumab erreicht werden (Mistry et al., 2021).

Die Ergebnisse der anti-leukämischen Wirksamkeit im NSG-Xenograft-Modell weisen deutlich auf einen Effekt der CD38-Inhibition auf die Migration von AML-Zellen hin. Wir führten Homing-Assays durch, um dieser Hypothese nachzugehen und die Wichtigkeit der CD38-Interaktion mit dem Endothelzellliganden CD31 zu untersuchen. Diese Interaktion spielt eine wesentliche Rolle bei der Zirkulation von AML-Zellen aus dem Blut ins Gewebe. Unter Applikation von Daratumumab wanderten insbesondere in das Knochenmark und die Milz signifikant weniger AML-Zellen aus, was eine Evidenz dafür liefert, dass die CD38-Inhibition das zielgerichtete Homing von Leukämiezellen beeinflussen kann. Unsere Ergebnisse der Homing-Assays stimmen mit den Untersuchungen von Taussig et al. überein.

Diese stellten heraus, dass ein CD38 Antikörper das Anwachsen von Nabelschnurblutzellen und primären AML-Zellen im Knochenmark von NSG-Mäusen im Vergleich zur Kontrolle stark verringerte. Insgesamt wurde beobachtet, dass normalerweise insbesondere die CD34⁺CD38⁺ AML-Zellen im Knochenmark anwachsen und eine Leukämie auslösten (Taussig et al., 2008). Dies könnte bedeuten, dass sich in dieser Population besonders viele leukämische Progenitorzellen befinden, die man durch Verwendung eines CD38-Antikörpers am Einwandern in das Knochenmark hindern könnte.

Als Limitation des NSG-Xenograft-Modells muss angeführt werden, dass aufgrund des defizienten Immunsystems eine allumfängliche Immunantwort nicht beurteilbar ist. Angesichts der diversifizierten immunmodulatorischen Funktion von CD38 bleibt unklar, inwieweit die tatsächliche Wirksamkeit von Daratumumab bei AML bei immundefizienten NSG-Mäusen, denen funktionelle B-Zellen, T-Zellen und natürliche Killerzellen fehlen, rekapituliert wird. Darüber hinaus könnte das Fehlen von humanen phagozytierenden Zellen bei NSG-Mäusen die doch nur geringfügige, anti-leukämische Aktivität von Daratumumab *in vivo* erklären. Daher sind weitere Untersuchungen erforderlich, um das geeignete Modell zur Prüfung der antileukämischen Wirksamkeit von Daratumumab in der AML zu finden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist trotz neuer Therapieoptionen immer noch durch eine hohe Rezidivrate gekennzeichnet und insbesondere für nicht intensiv behandelbare Patienten mit einer schlechten Prognose assoziiert. Die hohe Rezidivrate wird vor allem zurückgeführt auf residuelle leukämische Stammzellen, die durch den Schutz einer Leukämie-bedingten, veränderten hämatopoetischen Stammzellnische den genotoxischen Einflüssen konventioneller Therapien entgehen. Ein Eingriff in die Kommunikation der Leukämiezellen mit ihrem Mikroenvironment soll residuelle Leukämiezellen effektiver angreifbar machen und letztlich einen Überlebensvorteil für AML-Patienten hervorrufen. Die AML geht mit einer signifikanten Freisetzung von entzündlichen Zytokinen in der Knochenmarknische einher, welche die Leukämogenese beschleunigen. Die Zytokinfreisetzung wird auch durch das Transmembran-Glykoprotein CD38 reguliert, welches auf AML-Zellen häufig hoch exprimiert wird, weswegen wir die therapeutische Wirksamkeit einer CD38-Inhibition in der AML untersuchten. Wir konnten in einem 3D *in vitro* Kokulturmodell mit Endothelzellen und mesenchymalen Sphäroiden zeigen, dass das Mikroenvironment eine Hochregulation der Expression des Antigens CD38 auf den AML-Zellen induziert, welche durch die Hinzunahme von All-trans-Retinsäure weiter potenziert wird. Die CD38-Inhibition mit dem monoklonalen Antikörper Daratumumab zeigt nur einen geringen anti-leukämischen Effekt in Monokultur. In Kultivierung mit verschiedenen Knochenmarkstromazellen zeigt sich eine signifikante anti-leukämische Wirksamkeit, welches auf einen Mikroenvironment-vermittelten Effekt schließen lässt. Diese ist zumindest teilweise auf eine durch Daratumumab induzierte Antikörper-abhängige Phagozytose von AML-Zelllinien und primären humanen AML-Zellen zurückzuführen. Um die anti-leukämische Wirksamkeit von Daratumumab in der AML *in vivo* zu testen, wurden in einem Xenograft-Transplantationsmodell immundefiziente Nod Scid Gamma (NSG)-Mäuse mit primären humanen AML-Zellen transplantiert und leukämische Mäuse mit dem monoklonalen Antikörper behandelt. Es zeigt sich, dass Daratumumab die Zirkulation von AML-Zellen aus dem Blut in das Knochenmark und die Milz hemmt. Allerdings zeigt sich eine nur geringe anti-leukämische Wirksamkeit von Daratumumab *in vivo*, auch in Kombination mit Chemotherapeutika. Dies könnte eventuell durch das Fehlen der Immunzell-vermittelten Wirkung in immundefizienten NSG-Mäusen erklärt werden. Zur weiteren Beurteilung der vielversprechenden anti-leukämischen Wirkung von Daratumumab aus den *in vitro*- und *in vivo* Modellen ist es also notwendig, ein geeigneteres Modell zu finden, in welchem sowohl die Antikörper-vermittelten Mechanismen als auch die immunmodulierende Funktion von Daratumumab in der AML besser reproduziert werden können.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Aarhus, R., Graeff, R. M., Dickey, D. M., Walseth, T. F., Lee, H. C. (1995): ADP-ribosyl cyclase and CD38 catalyze the synthesis of a calcium-mobilizing metabolite from NADP. *J Biol Chem* 270, 30327-30333.
2. Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M. J., Le Beau, M. M., Bloomfield, C. D., Cazzola, M., Vardiman, J. W. (2016): The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 127, 2391-2405.
3. Balkwill, F., Mantovani, A. (2001): Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357, 539-545.
4. Bartholomew, A., Sturgeon, C., Siatskas, M., Ferrer, K., McIntosh, K., Patil, S., Hardy, W., Devine, S., Ucker, D., Deans, R., Moseley, A., Hoffman, R. (2002): Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* 30, 42-48.
5. Bendall, L. J., Daniel, A., Kortlepel, K., Gottlieb, D. J. (1994): Bone marrow adherent layers inhibit apoptosis of acute myeloid leukemia cells. *Exp Hematol* 22, 1252-1260.
6. Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. T., Flandrin, G., Galton, D. A., Gralnick, H. R., Sultan, C. (1976): Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 33, 451-458.
7. Braun, T., Carvalho, G., Fabre, C., Grosjean, J., Fenaux, P., Kroemer, G. (2006): Targeting NF- κ B in hematologic malignancies. *Cell Death And Differentiation* 13, 748.
8. Buteyn, N. J., Fatehchand, K., Santhanam, R., Fang, H., Dettorre, G. M., Gautam, S., Harrington, B. K., Henderson, S. E., Merchand-Reyes, G., Mo, X., Benson, D. M., Carson, I. I. W. E., Vasu, S., Byrd, J. C., Butchar, J. P., Tridandapani, S. (2018): Anti-leukemic effects of all-trans retinoic acid in combination with Daratumumab in acute myeloid leukemia. *International Immunology* 30, 375-383.
9. Chatterjee, S., Daenthanasamak, A., Chakraborty, P., Wyatt, M. W., Dhar, P., Selvam, S. P., Fu, J., Zhang, J., Nguyen, H., Kang, I., Toth, K., Al-Homrani, M., Husain, M., Beeson, G., Ball, L., Helke, K., Husain, S., Garrett-Mayer, E., Hardiman, G., Mehrotra, M., Nishimura, M. I., Beeson, C. C., Bupp, M. G., Wu, J., Ogretmen, B., Paulos, C. M., Rathmell, J., Yu, X. Z., Mehrotra, S. (2018): CD38-NAD(+) Axis Regulates Immunotherapeutic Anti-Tumor T Cell Response. *Cell Metab* 27, 85-100.e108.
10. Chen, Y., Hoffmeister, L. M., Zaun, Y., Arnold, L., Schmid, K. W., Giebel, B., Klein-Hitpass, L., Hanenberg, H., Squire, A., Reinhardt, H. C., Dührsen, U., Bertram, S., Hanoun, M. (2020): Acute myeloid leukemia-induced remodeling of the human bone marrow niche predicts clinical outcome. *Blood Advances* 4, 5257-5268.
11. Cheson, B. D., Bennett, J. M., Kopecky, K. J., Buchner, T., Willman, C. L., Estey, E. H., Schiffer, C. A., Doehner, H., Tallman, M. S., Lister, T. A., Lo-Coco, F., Willemze, R., Biondi, A., Hiddemann, W., Larson, R. A., Lowenberg, B., Sanz, M. A., Head, D. R., Ohno, R., Bloomfield, C. D. (2003): Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol* 21, 4642-4649.

12. Chirnomas, S. D., Kupfer, G. M. (2013): The inherited bone marrow failure syndromes. *Pediatr Clin North Am* 60, 1291-1310.
13. Chow, A., Lucas, D., Hidalgo, A., Méndez-Ferrer, S., Hashimoto, D., Scheiermann, C., Battista, M., Leboeuf, M., Prophete, C., van Rooijen, N., Tanaka, M., Merad, M., Frenette, P. S. (2011): Bone marrow CD169⁺ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *The Journal of Experimental Medicine* 208, 261-271.
14. Cortes, J. E., Heidel, F. H., Hellmann, A., Fiedler, W., Smith, B. D., Robak, T., Montesinos, P., Pollyea, D. A., DesJardins, P., Ottmann, O., Ma, W. W., Shaik, M. N., Laird, A. D., Zeremski, M., O'Connell, A., Chan, G., Heuser, M. (2019): Randomized comparison of low dose cytarabine with or without glasdegib in patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 33, 379-389.
15. Deaglio, S., Morra, M., Mallone, R., Ausiello, C. M., Prager, E., Garbarino, G., Dianzani, U., Stockinger, H., Malavasi, F. (1998): Human CD38 (ADP-ribosyl cyclase) is a counter-receptor of CD31, an Ig superfamily member. *J Immunol* 160, 395-402.
16. Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanese, M., Longoni, P. D., Matteucci, P., Grisanti, S., Gianni, A. M. (2002): Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 99, 3838-3843.
17. Dianzani, U., Funaro, A., DiFranco, D., Garbarino, G., Bragardo, M., Redoglia, V., Buonfiglio, D., De Monte, L. B., Pileri, A., Malavasi, F. (1994): Interaction between endothelium and CD4⁺CD45RA⁺ lymphocytes. Role of the human CD38 molecule. *J Immunol* 153, 952-959.
18. DiNardo, C. D., Jonas, B. A., Pullarkat, V., Thirman, M. J., Garcia, J. S., Wei, A. H., Konopleva, M., Döhner, H., Letai, A., Fenaux, P., Koller, E., Havelange, V., Leber, B., Esteve, J., Wang, J., Pejsa, V., Hájek, R., Porkka, K., Illés, Á., Lavie, D., Lemoli, R. M., Yamamoto, K., Yoon, S.-S., Jang, J.-H., Yeh, S.-P., Turgut, M., Hong, W.-J., Zhou, Y., Potluri, J., Pratz, K. W. (2020): Azacitidine and Venetoclax in Previously Untreated Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine* 383, 617-629.
19. Ding, L., Saunders, T. L., Enikolopov, G., Morrison, S. J. (2012): Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* 481, 457-462.
20. Döhner, H., Estey, E., Grimwade, D., Amadori, S., Appelbaum, F. R., Büchner, T., Dombret, H., Ebert, B. L., Fenaux, P., Larson, R. A., Levine, R. L., Lo-Coco, F., Naoe, T., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G. J., Sanz, M., Sierra, J., Tallman, M. S., Tien, H.-F., Wei, A. H., Löwenberg, B., Bloomfield, C. D. (2017): Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 129, 424-447.
21. Döhner, H., Estey, E., Grimwade, D., Amadori, S., Appelbaum, F. R., Buchner, T., Dombret, H., Ebert, B. L., Fenaux, P., Larson, R. A., Levine, R. L., Lo-Coco, F., Naoe, T., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G. J., Sanz, M., Sierra, J., Tallman, M. S., Tien, H. F., Wei, A. H., Löwenberg, B., Bloomfield, C. D. (2017): Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 129, 424-447.

22. Drach, J., McQueen, T. J., Engel, H., Andreeff, M., Robertson, K. A., Collins, S. J., Malavasi, F., Mehta, K. R. (1994): Retinoic acid-induced expression of CD38 antigen in myeloid cells is mediated through retinoic acid receptor-alpha. *Cancer research* 54 **7**, 1746-1752.
23. Dührsen, U., Hossfeld, D. K. (1996): Stromal abnormalities in neoplastic bone marrow diseases. *Ann Hematol* 73, 53-70.
24. Fircanis, S., Merriam, P., Khan, N., Castillo, J. J. (2014): The relation between cigarette smoking and risk of acute myeloid leukemia: An updated meta-analysis of epidemiological studies. *American Journal of Hematology* 89, E125-E132.
25. Fujisaki, J., Wu, J., Carlson, A. L., Silberstein, L., Putheti, P., Larocca, R., Gao, W., Saito, T. I., Lo Celso, C., Tsuyuzaki, H., Sato, T., Cote, D., Sykes, M., Strom, T. B., Scadden, D. T., Lin, C. P. (2011): In vivo imaging of Treg cells providing immune privilege to the haematopoietic stem-cell niche. *Nature* 474, 216-219.
26. Funaro, A., Spagnoli, G. C., Ausiello, C. M., Alessio, M., Roggero, S., Delia, D., Zaccolo, M., Malavasi, F. (1990): Involvement of the multilineage CD38 molecule in a unique pathway of cell activation and proliferation. *The Journal of Immunology* 145, 2390-2396.
27. Gruber, T. A., Downing, J. R. (2015): The biology of pediatric acute megakaryoblastic leukemia. *Blood* 126, 943-949.
28. Guzman, M. L., Neering, S. J., Upchurch, D., Grimes, B., Howard, D. S., Rizzieri, D. A., Luger, S. M., Jordan, C. T. (2001): Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. *Blood* 98, 2301-2307.
29. Habbel, J., Arnold, L., Chen, Y., Möllmann, M., Bruderek, K., Brandau, S., Dührsen, U., Hanoun, M. (2020): Inflammation-driven activation of JAK/STAT signaling reversibly accelerates acute myeloid leukemia in vitro. *Blood Adv* 4, 3000-3010.
30. Hanahan, D., Weinberg, Robert A. (2011): Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646-674.
31. Hanoun, M., Frenette, P. S. (2013): This niche is a maze; an amazing niche. *Cell Stem Cell* 12, 391-392.
32. Hanoun, M., Zhang, D., Mizoguchi, T., Pinho, S., Pierce, H., Kunisaki, Y., Lacombe, J., Armstrong, S. A., Dührsen, U., Frenette, P. S. (2014): Acute myelogenous leukemia-induced sympathetic neuropathy promotes malignancy in an altered hematopoietic stem cell niche. *Cell Stem Cell* 15, 365-375.
33. Hemmati, S., Haque, T., Gritsman, K. (2017): Inflammatory Signaling Pathways in Preleukemic and Leukemic Stem Cells. *Front Oncol* 7, 265.
34. Henry, C. J., Casás-Selves, M., Kim, J., Zaberezhnyy, V., Aghili, L., Daniel, A. E., Jimenez, L., Azam, T., McNamee, E. N., Clambey, E. T., Klawitter, J., Serkova, N. J., Tan, A. C., Dinarello, C. A., DeGregori, J. (2015): Aging-associated inflammation promotes selection for adaptive oncogenic events in B cell progenitors. *J Clin Invest* 125, 4666-4680.
35. Herold, G. (2019): *Innere Medizin*. Köln: Dr. Gerd Herold.

36. Hills, R. K., Castaigne, S., Appelbaum, F. R., Delaunay, J., Petersdorf, S., Othus, M., Estey, E. H., Dombret, H., Chevret, S., Ifrah, N., Cahn, J.-Y., Récher, C., Chilton, L., Moorman, A. V., Burnett, A. K. (2014): Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials. *The Lancet Oncology* 15, 986-996.
37. Horenstein, A. L., Chillemi, A., Zaccarello, G., Bruzzone, S., Quarona, V., Zito, A., Serra, S., Malavasi, F. (2013): A CD38/CD203a/CD73 ectoenzymatic pathway independent of CD39 drives a novel adenosinergic loop in human T lymphocytes. *Oncoimmunology* 2, e26246.
38. Horn, F. (2019): *Biochemie des Menschen*. 7. korrigierte Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
39. Ishikawa, F., Yoshida, S., Saito, Y., Hijikata, A., Kitamura, H., Tanaka, S., Nakamura, R., Tanaka, T., Tomiyama, H., Saito, N., Fukata, M., Miyamoto, T., Lyons, B., Ohshima, K., Uchida, N., Taniguchi, S., Ohara, O., Akashi, K., Harada, M., Shultz, L. D. (2007): Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. *Nat Biotechnol* 25, 1315-1321.
40. Kantarjian, H., O'Brien, S., Cortes, J., Giles, F., Faderl, S., Jabbour, E., Garcia-Manero, G., Wierda, W., Pierce, S., Shan, J., Estey, E. (2006): Results of intensive chemotherapy in 998 patients age 65 years or older with acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome. *Cancer* 106, 1090-1098.
41. Keyhani, A., Huh, Y. O., Jendiroba, D., Pagliaro, L., Cortez, J., Pierce, S., Pearlman, M., Estey, E., Kantarjian, H., Freireich, E. J. (2000): Increased CD38 expression is associated with favorable prognosis in adult acute leukemia. *Leuk Res* 24, 153-159.
42. Kim, Y. W., Koo, B. K., Jeong, H. W., Yoon, M. J., Song, R., Shin, J., Jeong, D. C., Kim, S. H., Kong, Y. Y. (2008): Defective Notch activation in microenvironment leads to myeloproliferative disease. *Blood* 112, 4628-4638.
43. Kishimoto, H., Hoshino, S., Ohori, M., Kontani, K., Nishina, H., Suzawa, M., Kato, S., Katada, T. (1998): Molecular mechanism of human CD38 gene expression by retinoic acid. Identification of retinoic acid response element in the first intron. *J Biol Chem* 273, 15429-15434.
44. Kode, A., Manavalan, J. S., Mosialou, I., Bhagat, G., Rathinam, C. V., Luo, N., Khiabani, H., Lee, A., Murty, V. V., Friedman, R., Brum, A., Park, D., Galili, N., Mukherjee, S., Teruya-Feldstein, J., Raza, A., Rabadan, R., Berman, E., Kousteni, S. (2014): Leukaemogenesis induced by an activating beta-catenin mutation in osteoblasts. *Nature* 506, 240-244.
45. Krejcik, J., Casneuf, T., Nijhof, I. S., Verbist, B., Bald, J., Plesner, T., Syed, K., Liu, K., van de Donk, N. W., Weiss, B. M., Ahmadi, T., Lokhorst, H. M., Mutis, T., Sasser, A. K. (2016): Daratumumab depletes CD38+ immune regulatory cells, promotes T-cell expansion, and skews T-cell repertoire in multiple myeloma. *Blood* 128, 384-394.
46. Kunisaki, Y., Bruns, I., Scheiermann, C., Ahmed, J., Pinho, S., Zhang, D., Mizoguchi, T., Wei, Q., Lucas, D., Ito, K., Mar, J. C., Bergman, A., Frenette, P. S. (2013): Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature* 502, 637-643.

47. Lambert, J., Pautas, C., Terré, C., Raffoux, E., Turlure, P., Caillot, D., Legrand, O., Thomas, X., Gardin, C., Gogat-Marchant, K., Rubin, S. D., Benner, R. J., Bousset, P., Preudhomme, C., Chevret, S., Dombret, H., Castaigne, S. (2018): Gemtuzumab ozogamicin for de novo acute myeloid leukemia: final efficacy and safety updates from the open-label, phase 3 ALFA-0701 trial. *Haematologica*, haematol.2018.188888.
48. Lancet, J. E., Uy, G. L., Cortes, J. E., Newell, L. F., Lin, T. L., Ritchie, E. K., Stuart, R. K., Strickland, S. A., Hogge, D., Solomon, S. R., Stone, R. M., Bixby, D. L., Kolitz, J. E., Schiller, G. J., Wieduwilt, M. J., Ryan, D. H., Hoering, A., Banerjee, K., Chiarella, M., Louie, A. C., Medeiros, B. C. (2018): CPX-351 (cytarabine and daunorubicin) Liposome for Injection Versus Conventional Cytarabine Plus Daunorubicin in Older Patients With Newly Diagnosed Secondary Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 36, 2684-2692.
49. Leimkühler, N. B., Schneider, R. K. (2019): Inflammatory bone marrow microenvironment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2019, 294-302.
50. Li, Y., Durig, J., Gobel, M., Hanoun, M., Klein-Hitpass, L., Duhrsen, U. (2015): Functional abnormalities and changes in gene expression in fibroblasts and macrophages from the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. *Int J Hematol* 102, 278-288.
51. Lo-Coco, F., Avisati, G., Vignetti, M., Thiede, C., Orlando, S. M., Iacobelli, S., Ferrara, F., Fazi, P., Cicconi, L., Di Bona, E., Specchia, G., Sica, S., Divona, M., Levis, A., Fiedler, W., Cerqui, E., Breccia, M., Fioritoni, G., Salih, H. R., Cazzola, M., Melillo, L., Carella, A. M., Brandts, C. H., Morra, E., von Lilienfeld-Toal, M., Hertenstein, B., Wattad, M., Lübbert, M., Hänel, M., Schmitz, N., Link, H., Kropp, M. G., Rambaldi, A., La Nasa, G., Luppi, M., Ciceri, F., Finizio, O., Venditti, A., Fabbiano, F., Döhner, K., Sauer, M., Ganser, A., Amadori, S., Mandelli, F., Döhner, H., Ehninger, G., Schlenk, R. F., Platzbecker, U. (2013): Retinoic Acid and Arsenic Trioxide for Acute Promyelocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine* 369, 111-121.
52. Matas-Cespedes, A., Vidal-Crespo, A., Rodriguez, V., Villamor, N., Delgado, J., Gine, E., Roca-Ho, H., Menendez, P., Campo, E., Lopez-Guillermo, A., Colomer, D., Roue, G., Wiestner, A., Parren, P. W., Doshi, P., van Bueren, J. L., Perez-Galan, P. (2017): The Human CD38 Monoclonal Antibody Daratumumab Shows Antitumor Activity and Hampers Leukemia-Microenvironment Interactions in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Cancer Res* 23, 1493-1505.
53. Mendez-Ferrer, S., Michurina, T. V., Ferraro, F., Mazloom, A. R., Macarthur, B. D., Lira, S. A., Scadden, D. T., Ma'ayan, A., Enikolopov, G. N., Frenette, P. S. (2010): Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 466, 829-834.
54. Mistry, J. J., Moore, J. A., Kumar, P., Marlein, C. R., Hellmich, C., Pillinger, G., Jibril, A., Di Palma, F., Collins, A., Bowles, K. M., Rushworth, S. A. (2021): Daratumumab inhibits acute myeloid leukaemia metabolic capacity by blocking mitochondrial transfer from mesenchymal stromal cells. *Haematologica* 106, 589-592.
55. Moreau, P., Dimopoulos, M. A., Mikhael, J., Yong, K., Capra, M., Facon, T., Hajek, R., Špička, I., Baker, R., Kim, K., Martinez, G., Min, C. K., Pour, L., Leleu, X., Oriol, A., Koh, Y., Suzuki, K., Risse, M. L., Asset, G., Macé, S., Martin, T. (2021): Isatuximab, carfilzomib, and dexamethasone in relapsed multiple myeloma (IKEMA): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet* 397, 2361-2371.
56. Morrison, S. J., Scadden, D. T. (2014): The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* 505, 327-334.

57. Mullis, K. B., Faloona, F. A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155, 335-350.
58. Naik, J., Themeli, M., de Jong-Korlaar, R., Ruiter, R. W. J., Poddighe, P. J., Yuan, H., de Bruijn, J. D., Ossenkoppele, G. J., Zweegman, S., Smit, L., Mutis, T., Martens, A. C. M., van de Donk, N., Groen, R. W. J. (2019): CD38 as a therapeutic target for adult acute myeloid leukemia and T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 104, e100-e103.
59. National Cancer Institute. (2019). SEER Cancer Statistic Reviews. Online-Publikation: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html>
60. Nijhof, I. S., Casneuf, T., van Velzen, J., van Kessel, B., Axel, A. E., Syed, K., Groen, R. W., van Duin, M., Sonneveld, P., Minnema, M. C., Zweegman, S., Chiu, C., Bloem, A. C., Mutis, T., Lokhorst, H. M., Sasser, A. K., van de Donk, N. W. (2016): CD38 expression and complement inhibitors affect response and resistance to daratumumab therapy in myeloma. *Blood* 128, 959-970.
61. Nijhof, I. S., Groen, R. W., Lokhorst, H. M., van Kessel, B., Bloem, A. C., van Velzen, J., de Jong-Korlaar, R., Yuan, H., Noort, W. A., Klein, S. K., Martens, A. C., Doshi, P., Sasser, K., Mutis, T., van de Donk, N. W. (2015): Upregulation of CD38 expression on multiple myeloma cells by all-trans retinoic acid improves the efficacy of daratumumab. *Leukemia* 29, 2039-2049.
62. Noris, M., Remuzzi, G. (2013): Overview of complement activation and regulation. *Seminars in nephrology* 33, 479-492.
63. Ossenkoppele, G., Löwenberg, B. (2015): How I treat the older patient with acute myeloid leukemia. *Blood* 125, 767-774.
64. Overdijk, M. B., Jansen, J. H., Nederend, M., Lammerts van Bueren, J. J., Groen, R. W., Parren, P. W., Leusen, J. H., Boross, P. (2016): The Therapeutic CD38 Monoclonal Antibody Daratumumab Induces Programmed Cell Death via Fcγ Receptor-Mediated Cross-Linking. *J Immunol* 197, 807-813.
65. Overdijk, M. B., Verploegen, S., Bogels, M., van Egmond, M., Lammerts van Bueren, J. J., Mutis, T., Groen, R. W., Breij, E., Martens, A. C., Bleeker, W. K., Parren, P. W. (2015): Antibody-mediated phagocytosis contributes to the anti-tumor activity of the therapeutic antibody daratumumab in lymphoma and multiple myeloma. *MAbs* 7, 311-321.
66. Padró, T., Ruiz, S., Bieker, R., Bürger, H., Steins, M., Kienast, J., Büchner, T., Berdel, W. E., Mesters, R. M. (2000): Increased angiogenesis in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 95, 2637-2644.
67. Passegué, E., Jamieson, C. H. M., Ailles, L. E., Weissman, I. L. (2003): Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 Suppl 1, 11842-11849.
68. Pencik, J., Pham, H. T., Schmoellerl, J., Javaheri, T., Schleder, M., Culig, Z., Merkel, O., Moriggl, R., Grebien, F., Kenner, L. (2016): JAK-STAT signaling in cancer: From cytokines to non-coding genome. *Cytokine* 87, 26-36.
69. Picot, J., Guerin, C. L., Le Van Kim, C., Boulanger, C. M. (2012): Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology* 64, 109-130.

70. Piedra-Quintero, Z. L., Wilson, Z., Nava, P., Guerau-de-Arellano, M. (2020): CD38: An Immunomodulatory Molecule in Inflammation and Autoimmunity. *Frontiers in immunology* 11, 597959-597959.
71. Pinho, S., Lacombe, J., Hanoun, M., Mizoguchi, T., Bruns, I., Kunisaki, Y., Frenette, P. S. (2013): PDGFR α and CD51 mark human nestin+ sphere-forming mesenchymal stem cells capable of hematopoietic progenitor cell expansion. *The Journal of experimental medicine* 210, 1351-1367.
72. Raaijmakers, M. H. G. P., Mukherjee, S., Guo, S., Zhang, S., Kobayashi, T., Schoonmaker, J. A., Ebert, B. L., Al-Shahrour, F., Hasserjian, R. P., Scadden, E. O., Aung, Z., Matza, M., Merckenschlager, M., Lin, C., Rommens, J. M., Scadden, D. T. (2010): Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature* 464, 852-857.
73. Rawlings, J. S., Rosler, K. M., Harrison, D. A. (2004): The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci* 117, 1281-1283.
74. Reinherz, E. L., Kung, P. C., Goldstein, G., Levey, R. H., Schlossman, S. F. (1980): Discrete stages of human intrathymic differentiation: analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T-cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 1588-1592.
75. Reynaud, D., Pietras, E., Barry-Holson, K., Mir, A., Binnewies, M., Jeanne, M., Sala-Torra, O., Radich, Jerald P., Passegué, E. (2011): IL-6 Controls Leukemic Multipotent Progenitor Cell Fate and Contributes to Chronic Myelogenous Leukemia Development. *Cancer Cell* 20, 661-673.
76. Röllig, C., Beelen, D. W., Braess, J., Greil, R., Niederwieser, D., Passweg, J., Reinhardt, D., Schlenk, R. F. (2019). *Onkopedia*. Online-Publikation: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/akute-myeloische-leukaemie-aml/@@guideline/html/index.html>
77. Sanchez, L., Wang, Y., Siegel, D. S., Wang, M. L. (2016): Daratumumab: a first-in-class CD38 monoclonal antibody for the treatment of multiple myeloma. *J Hematol Oncol* 9, 51.
78. Schepers, K., Campbell, T. B., Passegue, E. (2015): Normal and leukemic stem cell niches: insights and therapeutic opportunities. *Cell Stem Cell* 16, 254-267.
79. Schepers, K., Pietras, E. M., Reynaud, D., Flach, J., Binnewies, M., Garg, T., Wagers, A. J., Hsiao, E. C., Passegue, E. (2013): Myeloproliferative neoplasia remodels the endosteal bone marrow niche into a self-reinforcing leukemic niche. *Cell Stem Cell* 13, 285-299.
80. Schlenk, R. F., Döhner, H. (2013): Genomic applications in the clinic: use in treatment paradigm of acute myeloid leukemia. *Hematology* 2013, 324-330.
81. Schofield, R. (1978): The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4, 7-25.
82. Shi, C., Jia, T., Mendez-Ferrer, S., Hohl, Tobias M., Serbina, Natalya V., Lipuma, L., Leiner, I., Li, Ming O., Frenette, Paul S., Pamer, Eric G. (2011): Bone Marrow Mesenchymal Stem and Progenitor Cells Induce Monocyte Emigration in Response to Circulating Toll-like Receptor Ligands. *Immunity* 34, 590-601.

83. Spoo, A. C., Lübbert, M., Wierda, W. G., Burger, J. A. (2007): CXCR4 is a prognostic marker in acute myelogenous leukemia. *Blood* 109, 786-791.
84. Stone, R. M., Mandrekar, S. J., Sanford, B. L., Laumann, K., Geyer, S., Bloomfield, C. D., Thiede, C., Prior, T. W., Döhner, K., Marcucci, G., Lo-Coco, F., Klisovic, R. B., Wei, A., Sierra, J., Sanz, M. A., Brandwein, J. M., de Witte, T., Niederwieser, D., Appelbaum, F. R., Medeiros, B. C., Tallman, M. S., Krauter, J., Schlenk, R. F., Ganser, A., Serve, H., Ehninger, G., Amadori, S., Larson, R. A., Döhner, H. (2017): Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *New England Journal of Medicine* 377, 454-464.
85. Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., Nagasawa, T. (2006): Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* 25, 977-988.
86. Taussig, D. C., Miraki-Moud, F., Anjos-Afonso, F., Pearce, D. J., Allen, K., Ridler, C., Lillington, D., Oakervee, H., Cavenagh, J., Agrawal, S. G., Lister, T. A., Gribben, J. G., Bonnet, D. (2008): Anti-CD38 antibody-mediated clearance of human repopulating cells masks the heterogeneity of leukemia-initiating cells. *Blood* 112, 568-575.
87. Thol, F., Schlenk, R. F., Heuser, M., Ganser, A. (2015): How I treat refractory and early relapsed acute myeloid leukemia. *Blood* 126, 319-327.
88. Usmani, S. Z., Nahi, H., Weiss, B. M., Bahlis, N. J., Belch, A., Lokhorst, H. M., Voorhees, P. M., Richardson, P. G., Uhlir, C., Wang, J., Qi, M., Lonial, S. (2017): Safety and Efficacy of Daratumumab Monotherapy in Patients with Heavily Pretreated Relapsed and Refractory Multiple Myeloma: Final Results from GEN501 and Sirius. *Blood* 130, 3107-3107.
89. van de Donk, N., Usmani, S. Z. (2018): CD38 Antibodies in Multiple Myeloma: Mechanisms of Action and Modes of Resistance. *Front Immunol* 9, 2134.
90. van de Donk, N. W. C. J., Janmaat, M. L., Mutis, T., Lammerts van Bueren, J. J., Ahmadi, T., Sasser, A. K., Lokhorst, H. M., Parren, P. W. H. I. (2016): Monoclonal antibodies targeting CD38 in hematological malignancies and beyond. *Immunological Reviews*
91. Vidal-Crespo, A., Matas-Cespedes, A., Rodriguez, V., Rossi, C., Valero, J. G., Serrat, N., Sanjuan-Pla, A., Menendez, P., Roue, G., Lopez-Guillermo, A., Gine, E., Campo, E., Colomer, D., Bezombes, C., van Bueren, J. L., Chiu, C., Doshi, P., Perez-Galan, P. (2020): Daratumumab displays in vitro and in vivo anti-tumor activity in models of B-cell non-Hodgkin lymphoma and improves responses to standard chemo-immunotherapy regimens. *Haematologica* 105, 1032-1041.
92. Walkley, C. R., Olsen, G. H., Dworkin, S., Fabb, S. A., Swann, J., McArthur, G. A., Westmoreland, S. V., Chambon, P., Scadden, D. T., Purton, L. E. (2007): A microenvironment-induced myeloproliferative syndrome caused by retinoic acid receptor gamma deficiency. *Cell* 129, 1097-1110.
93. Wang, L., Zhang, H., Rodriguez, S., Cao, L., Parish, J., Mumaw, C., Zollman, A., Kamoka, M. M., Mu, J., Chen, D. Z., Srour, E. F., Chitteti, B. R., HogenEsch, H., Tu, X., Bellido, T. M., Boswell, H. S., Manshour, T., Verstovsek, S., Yoder, M. C., Kapur, R., Cardoso, A. A., Carlesso, N. (2014): Notch-dependent repression of miR-155 in the bone marrow niche regulates hematopoiesis in an NF-kappaB-dependent manner. *Cell Stem Cell* 15, 51-65.

94. Wang, W., Erbe, A. K., Hank, J. A., Morris, Z. S., Sondel, P. M. (2015): NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology* 6, 368-368.
95. Wei, S. C., Duffy, C. R., Allison, J. P. (2018): Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy. *Cancer Discovery* 8, 1069-1086.
96. Yanada, M., Garcia-Manero, G., Borthakur, G., Ravandi, F., Kantarjian, H., Estey, E. (2007): Potential cure of acute myeloid leukemia. *Cancer* 110, 2756-2760.
97. Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W. G., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J. Q., Harris, S., Wiedemann, L. M., Mishina, Y., Li, L. (2003): Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425, 836-841.
98. Zhou, B. O., Yue, R., Murphy, M. M., Peyer, J. G., Morrison, S. J. (2014): Leptin-receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow. *Cell Stem Cell* 15, 154-168.
99. Ziegler, P., Boettcher, S., Takizawa, H., Manz, M. G., Brümmerdorf, T. H. (2016): LPS-stimulated human bone marrow stroma cells support myeloid cell development and progenitor cell maintenance. *Annals of Hematology* 95, 173-178.
100. Zou, W. (2006): Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* 6, 295-307.

8 ANHANG

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Abbildung der Antikörper-abhängigen, immunvermittelten Effektormechanismen monoklonaler Antikörper.....	18
Abbildung 2 Schematischer Aufbau der Durchführung der Kokulturrexperimente mit Stromazellen und AML-Zelllinien.....	30
Abbildung 3 Schematischer Aufbau der Durchführung der Triplekulturrexperimente mit Stromazellen und primären AML- oder gesunden Spenderzellen.....	31
Abbildung 4 Gating-Strategie für die durchflusszytometrische Analyse lebender Einzelzellen.	32
Abbildung 5 Applikationsschema der Langzeitbehandlung der NSG-Mäuse.....	38
Abbildung 6 Applikationsschema der Langzeitbehandlung der NSG-Mäuse in Kombination mit Cytarabin	38
Abbildung 7 Skizze der Durchführung des Homing-Experimentes.....	39
Abbildung 8 Wirksamkeit der CD38-Inhibition in Mono- und Kokultur der AML-Zelllinien....	46
Abbildung 9 CD38-Inhibition hat keinen Einfluss auf Wachstum der Stromazellen	47
Abbildung 10 Anti-leukämischer Effekt von Daratumumab im Triplekulturmodell mit primären AML- und gesunden Spenderzellen	48
Abbildung 11 Triplekultur von primären AML-Zellen mit Kontrollantikörpern	49
Abbildung 12 Modulation der CD38-Expression auf hämatopoetischen Zellen durch ATRA und das Mikroenvironment.....	51
Abbildung 13 Anti-leukämischer Effekt von Daratumumab in Kombination mit ATRA im Triplekulturmodell mit primären AML- und gesunden Zellen.....	52
Abbildung 14 Wirksamkeit unabhängig von CD38-Expression der AML-Zellen.	54
Abbildung 15 Keine Beeinflussung der Zellproliferation durch Daratumumab	55
Abbildung 16 Daratumumab induziert keine Apoptose in Leukämiezellen.	56
Abbildung 17 Daratumumab behandelte AML-Zellen zeigen keine veränderte Genexpression von Schlüsselmolekülen der Apoptose	58
Abbildung 18 Keine Induktion von ADCC oder CDC durch Daratumumab.....	59

Abbildung 19 Antikörper-abhängige Phagozytose (ADCP) von AML-Zellen durch Daratumumab..... 62

Abbildung 20 Genexpression verschiedener Schlüssel-moleküle der Knochenmarksnische in AML-Zellen 64

Abbildung 21 Langzeitbehandlung in vivo mit Daratumumab zeigt heterogene Wirksamkeit. 66

Abbildung 22 Kombinationstherapie mit ATRA und Cytarabin zeigt keine verbesserte anti-leukämische Wirkung Daratumumabs..... 67

Abbildung 23 Daratumumab vermindert Migration von AML-Zellen in vivo..... 68

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Geräte und Verbrauchsmittel..... 15

Tabelle 2 Substanzen, Reagenzien und Puffer..... 16

Tabelle 3 Antikörper..... 18

Tabelle 4 Kits..... 18

Tabelle 5 Medien..... 19

Tabelle 6 Software..... 19

Tabelle 7 Primer..... 20

Tabelle 8 Patientenproben..... 23

8.3 Abkürzungsverzeichnis

A

ADCC Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität

ADCP Antikörper-abhängige Phagozytose

ADP Adenosindiphosphat

ADPR ADP-Ribose

AML Akute myeloische Leukämie

APL..... Akute Promyelozyten Leukämie

ATRA..... All-trans Retinsäure

B

BRDU Bromdesoxyuridin

C

CADPR.....	Cyclische Adenosindiphosphat-(ADP)-Ribose
CAR.....	CXCL12-abundant reticular
CDC.....	Komplement-abhängige Zytotoxizität
cDNA.....	Complementary DNA
CML.....	Chronisch myeloische Leukämie
Ct.....	Cycle threshold

D

DAPI.....	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO.....	Dimethylsulfoxid
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure

E

ECOG.....	Eastern Cooperative Oncology Group
EGF.....	Epidermal growth factor
ELN.....	European Leukemia Net
EMA.....	Europäische Arzneimittel-Agentur

F

F(ab) ₂	Antigen-bindende Fragmente
FAB.....	Französisch-Amerikanisch-Britisch
FACS.....	Fluorescence activated cell sorting
Fc.....	Konstantes Fragment
FCS.....	Fetales Kälberserum
FGF.....	Fibroblast growth factor
FSC.....	Forward Scatter

G

GAPDH.....	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
------------	--

H

H.E.....	Hämatoxylin-Eosin
HDL.....	High density lipoprotein
HSPC.....	Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen
HUVEC.....	Humane umbilikale Venenendothelzellen

I

IGF.....	Insulin like growth factor
IL-3.....	Interleukin-3
IL-6.....	Interleukin-6

M

MAK..... Membran-Attack-Komplex
M-CSF..... Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
MFI..... Mittlere Fluoreszenzintensität
mg/kgKG..... Milligramm/Kilogramm Körpergewicht
ml..... Milliliter
mM..... Millimolar
mRNA..... Messenger RNA
MSPC..... Mesenchymale Stamm und Progenitorzellen

N

NAADP⁺..... Nikotinsäure-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NAD⁺..... Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADP⁺..... Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
Nf-kb..... Nuclear factor „kappa light chain enhancer“ of activated B-cells
NK-Zellen..... Natürliche Killer Zellen
NSG..... Nod Scid Gamma

P

PBMC..... Peripheral blood mononuclear cells
PBS..... Phosphate buffered saline
PCR..... Polymerase chain reaction
PDGF..... Platelet derived growth factor
PDGFR- α Platelet derived growth factor receptor α

R

RNA..... Ribonukleinsäure
SCF..... Stammzellfaktor

S

SEM..... Standardfehler des Mittelwertes
SFEM..... Stemspan™ Serum-Free Expansion Medium
SSC..... Sideward Scatter

T

Taq..... Thermophilus aquaticus
TPO..... Thrombopoetin
T-Regs..... T-regulatorische Zellen

V

VCAM-1..... Vascular cell adhesion molecul-1
VEGF..... Vascular endothelial growth factor

W

WHO.....World Health Organisation

μ

μgMikrogramm

9 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst bei meinem Betreuer, Maher Hanoun, bedanken. Insbesondere für die außergewöhnlich enge Betreuung während der experimentellen Forschungstätigkeit im Labor, der Auswertung der Daten und letztlich auch bei der Präsentation der Daten auf Kongressen und die Verschriftlichung sowohl der wissenschaftlichen Publikation als auch dieser Dissertation. Ich danke dir für die Ausbildung in exzellenter wissenschaftlicher Praxis, für die du mir als Vorbild jederzeit zu Rate standest.

Meinen lieben KollegInnen/FreundInnen, namentlich: Lucas Arnold, Michael Möllmann, Yiyang Chen, Marco Luciani, Karlotta Kahmann, Maren Fiori, Eva Boog-Whiteside, Yu-An Lin; danke ich für ihre unermüdliche Hilfe bei den Experimenten, vielen investierten Stunden zusammen oder in Eigenverantwortung. Insbesondere durch euch und den Zusammenhalt war die Zeit im Labor eine Zeit, die ich niemals vergessen werde und in der ich von euch eine Menge gelernt habe!

Vielen Dank an Prof. Dr. Ulrich Dührsen für die Möglichkeit zur Promotion in Ihrer Klinik, die ideelle und auch finanzielle Unterstützung, um meine Daten auf wissenschaftlichen Kongressen vorzustellen.

Vielen Dank an das Imaging Center Essen, die Pathologie, und das Forschungslabor der Klinik für HNO des Universitätsklinikums Essen bei der Unterstützung der Experimente.

Vielen Dank an die Else-Kröner Fresenius Stiftung und die Jackstädt-Stiftung für die finanzielle Förderung dieser Forschungsarbeit, sowie an alle Beteiligten des ELAN-Promotionsstipendiums, für die besondere ideelle Unterstützung während der gesamten Promotionsarbeit.

Und zuletzt als Fundament an meine Familie und an Christian Raber: vielen Dank, dass ihr mich während des gesamten Studiums und dieser Promotionsarbeit bedingungslos unterstützt und mich in allen Vorhaben (auch finanziell) gefördert und bestärkt habt.

10 LEBENSLAUF

"Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten."

"Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten."