

Aus dem
Institut für Pharmakologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Jens W. Fischer

**Veränderungen der extrazellulären Matrix in
der Entstehung einer Akuten Myeloischen
Leukämie**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Pablo Rabes

2025

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Sören Twarock

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Rainer Haas

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Acute myeloid leukemia-induced functional inhibition of healthy CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells

Jäger P, Geyh S, Twarock S, Cadeddu RP, Rabes P, Koch A, Maus U, Hesper T, Zilkens C, Rautenberg C, Bormann F, Köhrer K, Petzsch P, Wieczorek D, Betz B, Surowy H, Hildebrandt B, Germing U, Kobbe G, Haas R, Schroeder T.

Stem Cells. 2021 Sep;39(9):1270-1284. doi: 10.1002/stem.3387

Zusammenfassung

Bei der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) handelt es sich um eine bösartige Veränderung der Hämatopoese mit unkontrollierter Proliferation krankhafter myeloischer Vorläuferzellen. Durch die Verdrängung gesunder Zellen führt die AML zu einer hämatopoetischen Insuffizienz und damit unbehandelt zum Tode. Es wird von einer multikausalen Ätiologie aus zytogenetischen und molekulargenetischen Aberrationen, chromosomalen Veränderungen und daraus hervorgehend dysfunktionaler Interaktion der Zellen mit ihrem Umfeld, der Knochenmarksnische und der extrazellulären Matrix ausgegangen, die in Zusammenschau zur unkontrollierten Proliferation der Vorläuferzellen führen. Hier spielen die Knochenmarksnische und die extrazelluläre Matrix sowohl eine Rolle bei der Entstehung als auch in der Folge bei der Progression der Leukämie.

Um die Interaktion zwischen hämatopoetischen Zellen und Knochenmarkstroma zu untersuchen, wurden für die vorliegende Arbeit *ex-vivo*-Extrazellulär-Matrizes verschiedener Zellkulturkonstellationen analysiert, die stellvertretend für die Progressstadien der AML stehen sollten. Die Zellkulturen wurden massenspektrometrisch auf in der extrazellulären Matrix exprimierte Proteine untersucht. Hierbei ließen sich einige Proteine finden, die im Vergleich von mehreren Kokulturen signifikant überrepräsentiert waren und somit, z.B. bei Überexpression in der leukämischen Kultur, möglicherweise eine Rolle in der Krankheitsentstehung und -entwicklung spielen. Durch eine umfassende Literaturrecherche wurde eine Zuordnung dieser Proteine zu den drei wichtigsten Netzwerken der extrazellulären Matrix, dem Kollagen, dem Elastin- und dem Hyaluronsäure-Netzwerk, durchgeführt. Dabei zeigten sich bioinformatisch auffällige Veränderungen insbesondere im Elastin-Netzwerk, das speziell in Hinblick auf hämatologische Tumorerkrankungen bisher wenig erforscht ist. Somit bilden die Ergebnisse dieser Arbeit eine Basis zur weiteren Erforschung der Relevanz dieser Netzwerke für die Leukämieentstehung und -progression.

Insbesondere die in den leukämischen Kokulturen überrepräsentierten, miteinander in Interaktion stehenden, Proteine wie die Adapterproteine EFEMP2 und EMILIN-1, die Kollagen- und Elastin-quervernetzenden Proteine LOX2, P4HA1, P4HB sowie die Integrine ITGA5 und ITGB1 oder das Proteoglykan Versican bieten potenzielle Angriffspunkte für neue gezieltere und individualisierte Therapieoptionen oder könnten durch weitere wissenschaftliche Forschung als Biomarker für den Verlauf der Erkrankung validiert werden.

Summary

Acute Myeloid Leukemia (AML) is a malignant disease of the hematopoietic system causing myeloid progenitor cells to uncontrollably proliferate. Through inhibition and suppression of benign cells AML causes hematopoietic insufficiency and leads to certain death if medically untreated.

There is a multitude of aetiologic factors of AML including cytogenetic and molecular genetic malfunctions, chromosomal alterations and dysfunctional interaction of cells with their immediate surrounding, i.e., the bone marrow microenvironment and the extracellular matrix. Both, bone marrow microenvironment and extracellular matrix play an important role not only in leukemogenesis but also in support of leukemia.

To further elucidate the interaction of hematopoietic stem cells and their bone marrow microenvironment, cell culture models representing different stages of leukemia progression were analyzed with respect to their extracellular matrices. In mass spectrometric analyses several proteins were found to be significantly altered in specific co-culture conditions. These proteins might be implicated in outbreak and progression of the disease, for example if they are highly expressed in the leukemic coculture. The differential regulation of a distinct set of proteins detected in this thesis point towards the involvement of three major systems in the extracellular matrix that have not been reported before in this context: the elastin, hyaluronan and collagen network in AML. Of note, particularly proteins of the elastin network showed bioinformatically significant changes in these experiments. The results of this work therefore form a basis for further research into the relevance of these networks for the development and progression of leukemia.

Examples for interacting proteins that were overrepresented in the leukemic co-cultures are EFEMP2 and EMILIN-1, collagen and elastin cross-linking proteins LOX2, P4HA1, P4HB as well as the integrins ITGA5 and ITGB1 or the proteoglycan versican, These have the potential to become targets for new and individualized therapy options or they could be validated as biomarkers for the progression of the disease through further scientific research.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Die Akute Myeloische Leukämie.....	1
1.1.1 Definition.....	1
1.1.2 Epidemiologie	1
1.1.3 Ätiologie und Pathogenese.....	2
1.1.4 Klinische Symptomatik und Krankheitsverlauf.....	4
1.1.5 Diagnostik und Klassifikation	4
1.1.6 Therapie.....	5
1.2 Die Hämatopoese	6
1.3 Die Knochenmarksnische	7
1.3.1 Aufbau der Knochenmarksnische.....	7
1.3.2 Die extrazelluläre Matrix als azellulärer Bestandteil der Knochenmarksnische	9
1.3.3 Die Mesenchymale Stromazelle als zentraler zellulärer Bestandteil der Knochenmarksnische	9
1.4 Tumorentstehung in der Knochenmarksnische	11
1.4.1 Einfluss der Hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzelle auf die Knochenmarksnische in der AML	12
1.4.2 Einfluss der Knochenmarksnische auf die Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzelle in der AML	12
1.5 Publierte Untersuchungen des Matrisoms im Kontext der AML.....	14
1.6 Ziele der Arbeit	15
2 Material und Methoden	17
2.1 Arbeitsmittel	17
2.1.1 Substanzen.....	17
2.1.2 Geräte.....	17
2.1.3 Software.....	17
2.1.4 Hersteller	18

2.1.5	Ethikvotum und verwendete Zellen.....	18
2.2	Zellkultur	19
2.2.1	Kultivierung	19
2.2.2	Zellzählung	20
2.2.3	Studiendesign des Zellkulturmodells	20
2.2.4	Beschichtung, Aussaat	21
2.2.5	Durchführung, Vorbereitung für die Matrisomanalyse	22
2.3	Readout	23
2.3.1	Matrisomanalyse.....	23
2.3.2	Quantifizierung der <i>Colony-Forming-Units</i>	24
2.3.3	Statistik	26
3	Ergebnisse	27
3.1	Colony-Forming-Unit-Assays.....	27
3.2	Massenspektrometrische Analyse der extrazellulären Matrix.....	28
3.2.1	Vergleich der hämatologisch gesunden und der leukämischen MSC-Monokultur	29
3.2.2	Vergleich hämatologisch gesunder und leukämischer HSPC-Monokultur .	31
3.2.3	Vergleich der hämatologisch gesunden Kokultur MSC _{hc} /34 _{hc} mit der Kokultur aus gesunden MSC und leukämischen HSPC (MSC _{hc} /34 _{AML})	32
3.2.4	Vergleich der leukämischen Kokultur MSC _{AML} /34 _{AML} mit der Kokultur aus gesunden MSC und leukämischen HSPC (MSC _{hc} /34 _{AML})	33
3.2.5	Vergleich der hämatologisch gesunden Kokultur MSC _{hc} /34 _{hc} mit der leukämischen Kokultur MSC _{AML} /34 _{AML}	35
3.2.6	In der leukämischen Kokultur durchgehend überrepräsentierte Proteine...	37
3.3	Gruppierung der signifikant überexprimierten Proteine nach Zugehörigkeit zu einem der drei Hauptssysteme der extrazellulären Matrix.....	38
4	Diskussion.....	40
4.1	Einfluss der Interaktion zwischen MSC und HSPC auf das Differenzierungspotential der HSPC.....	40
4.2	Massenspektrometrische Analyse des Matrisoms.....	42
4.2.1	Einflussfaktoren auf Veränderungen im Matrisom.....	42
4.2.2	Charakterisierung der im Vergleich zu anderen Kokulturen in der MSC _{AML} /34 _{AML} überrepräsentierten Proteine.....	44
4.2.2.1	Charakterisierung der Proteine mittels StringDB	44
4.2.2.2	Charakterisierung der Proteine anhand der Zugehörigkeit zu Netzwerken der EZM mittels MatrisomeDB und GeneOntology.....	46
4.2.3	Funktion und Effekte des Elastin-Netzwerks in der extrazellulären Matrix	47

4.2.3.1	Interaktionen des Elastin-Netzwerks mit dem Hyaluronsäure-Netzwerk ...	49
4.2.3.2	Interaktionen des Elastin-Netzwerks mit dem Kollagen-Netzwerk und Steifheit der Matrix.....	50
4.2.3.3	Zusammenspiel des Elastin-Netzwerks mit dem Kollagen- und dem Hyaluronsäurenetzwerk.....	52
4.2.4	Einfluss von überrepräsentierten Matrixproteinen auf onkologische Entitäten und bekannte Tumorsignalkaskaden.....	54
4.2.4.1	Fibulin-2	55
4.2.4.2	Versican	56
4.2.4.3	Lysyl Oxidase homolog 2.....	57
4.2.4.4	Kollagen	58
4.2.4.5	Serinprotease HTRA1	59
4.2.4.6	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 2.....	60
4.2.4.7	EMILIN-1	60
4.2.5	Zusammenfassung	61
5	Schlussfolgerung	62
6	Literaturverzeichnis.....	64

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 - Differenzierung der HSPC zu leukämischen Blasten	2
Abb. 2 - Genmutationen in der AML	3
Abb. 3 - Übersicht Hämatopoese.....	7
Abb. 4 - Die Knochenmarksnische	8
Abb. 5 - Differenzierung der mesenchymalen Stammzelle.....	10
Abb. 6 - Tumorcharakteristika.....	11
Abb. 7 - Mono- und Kokulturkonstellationen.....	20
Abb. 8 – Schematischer Versuchsaufbau der Zellkulturkonstellationen.....	23
Abb. 9 - Übersicht über die Kolonie-Arten des <i>Colony-Forming-Unit-Assays</i>	25
Abb. 10 - Ausdifferenzierungskapazität von Mono- und Kokulturen im Colony-Forming-Unit-Assay.....	27
Abb. 11 - Volcano Plot differenziell exprimierter Proteine in leukämischer und hämatologisch gesunder MSC-Monokultur	30
Abb. 12 - Netzwerkzugehörigkeit signifikant unter- oder überrepräsentierter Proteine in leukämischer und hämatologisch gesunder MSC-Monokultur.	30
Abb. 13 - Volcano Plot dysregulierter Proteine im Vergleich der 34 _{hc} mit der 34 _{AML}	31
Abb. 14 - Übersicht signifikant differenziell regulierter Proteine im Vergleich 34 _{hc} mit 34 _{AML}	31
Abb. 15 - Volcano Plot differenziell regulierter Proteine im Vergleich der MSC _{hc} /34 _{hc} mit der MSC _{hc} /34 _{AML}	32
Abb.16 - Netzwerkzugehörigkeit signifikant differenziell regulierter Proteine im Vergleich der Kokulturen MSC _{hc} /34 _{hc} mit MSC _{hc} /34 _{AML}	33
Abb. 17 - Volcano Plot differenziell exprimierter Proteine aus MSC _{hc} /34 _{AML} und MSC _{AML} /34 _{AML}	34
Abb. 18 - Netzwerkzugehörigkeit signifikant differenziell repräsentierter Proteine in der Kokultur MSC _{AML} /34 _{AML} im Vergleich zur Kokultur MSC _{hc} /34 _{AML}	34
Abb.19 - Volcano Plot differenziell regulierter Proteine in leukämischer und hämatologisch gesunder Kokultur	36
Abb. 20 - Übersicht signifikant überrepräsentierte Proteine in leukämischer und hämatologisch gesunder Kokultur	36
Abb. 21 - Venn Diagramm der signifikant überrepräsentierten Proteine in der Kokultur MSC _{AML} /34 _{AML} im Vergleich mit den beiden Kokulturen MSC _{hc} /34 _{hc} und MSC _{hc} /34 _{AML}	37
Abb. 22 - Netzwerkzugehörigkeit der signifikant überrepräsentierten Proteine in der Kokultur MSC _{AML} /34 _{AML} im Vergleich mit den beiden Kokulturen MSC _{hc} /34 _{hc} und MSC _{hc} /34 _{AML}	38
Abb. 23 - Zuordnung von signifikant überrepräsentierten Proteinen in der MSC _{AML} /34 _{AML} zum Elastin-, Hyaluronsäure- oder Kollagenetzwerk.....	39

Abb. 24 - Interaktionen zwischen signifikant dysregulierten Proteinen in der MSC _{AML} /34 _{AML} im Vergleich zur MSC _{hc} /34 _{AML}	45
Abb. 25 - Interaktionen zwischen signifikant dysregulierten Proteinen in der MSC _{AML} /34 _{AML} im Vergleich zur MSC _{hc} /34 _{hc}	46
Abb. 26 - Überblick über die am Elastin-, Hyaluronsäure- und Kollagen-Netzwerk beteiligten in der leukämischen Kokultur überexprimierten Proteine in der Matrisomanalyse	53
Abb. 27 - Übersicht über tumorsupportive Funktionen von Kollagen	59

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - Fünfjahresüberleben in der AML	2
Tabelle 2 - Geräte	17
Tabelle 3 - Softwareprogramme	17
Tabelle 4 - Herstellerverzeichnis.....	18
Tabelle 5 - Patientencharakteristika	21
Tabelle 6 - Kolonie-Arten des <i>Colony-Forming-Unit-Assays</i>	24

Abkürzungsverzeichnis

34(hc/AML)	(A)leukämische CD34 ⁺ Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzelle (healthy control/Akute Myeloische Leukämie)
ACTB, ACTG1	Aktin B, Aktin G1
Angpt1	Angiopoetin-1
AML	Akute Myeloische Leukämie
ASXL1	<i>Additional Sex-Combs like protein 1</i>
BMFZ	Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum
Cath A	Cathepsin A
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> – Oberflächenantigen
CEMIP	<i>Cell migration-inducing and hyaluronan-binding protein</i>
CFU	<i>Colony-Forming-Unit-Assay</i>
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie
COL	Kollagen
CXCL12	C-X-C motif Chemokin 12
CXCR4	C-X-C motif Chemokinrezeptor 4
c-Kit	c-Kit-Rezeptor
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNMT3A	DNA-Methyltransferase 3A
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EBP	Elastin-bindendes Protein
EZM	Extrazelluläre Matrix
EDP	Elastin-Degradationsprodukte
EFEMP-2	<i>EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 2</i>
EGFR	EGF-Rezeptor
ERC	Elastin-Rezeptorkomplex
FBLN2	Fibulin-2
FCS	Fetales Kälberserum
FLT3	<i>fms-like tyrosine kinase 3</i>
FLT3L	<i>fms-related Tyrosinkinase-3-Ligand</i>
GO	<i>GeneOntology</i>
HA	Hyaluronsäure
HAS	Hyaluronsäure-Synthase
HBSS (+/+)	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i> mit Calcium und Magnesium
HTRA1	Serinprotease HTRA1
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
HSPC	Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzelle
HTRA1	Serinprotease HTRA1
HYAL	Hyaluronidase
IDH1, IDH2	Isocitratdehydrogenase 1, Isocitratdehydrogenase 2
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
IGFBP	<i>Insulin-like Growth Factor</i> bindendes Protein
IL-3, IL-6	Interleukin 3, Interleukin 6
LOX(L2)	Lysyloxidase (homolog 2)
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MMP	Matrix-Metalloprotease
MPP	Multipotente Progenitorzelle

MSC _(hc/AML)	(A)leukämische Mesenchymale Stromazelle (healthy control/Akute Myeloische Leukämie)
MSC _{hc/34hc}	Kokultur aleukämischer mesenchymaler Stromazelle mit aleukämischer Hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzelle
MSC _{hc/34AML}	Kokultur aleukämischer mesenchymaler Stromazelle mit leukämischer Hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzelle
MSC _{AML/34hc}	Kokultur leukämischer mesenchymaler Stromazelle mit aleukämischer Hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzelle
MSC _{AML/34AML}	Kokultur leukämischer mesenchymaler Stromazelle mit leukämischer Hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzelle
MSC	Mesenchymale Stromazelle
mut	Mutiertes Gen
Neu-1	Neuraminidase-1
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NPM1	Nucleophosmin 1
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PLOX	Protein-Lysin-6-Oxidase
PSG	Penicillin/Streptomycin/L-Glutamin
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> Nährmedium 1640
S100-A11	Protein S100-A11
SCF	<i>Stem Cell Factor</i>
TE	Trypsin/EDTA
TLR	Toll-like Rezeptor
tie2	Angiopoetin-1-Rezeptor
UKD	Universitätsklinikum Düsseldorf
VCAN	Versican
WHO	<i>World Health Organization</i>

1 Einleitung

Als Rudolf Virchow 1845 bei einem Patienten von einer „umgekehrten Proportion roter und farbloser (in der Masse weißer) Blutkörperchen“ sprach, legte der damals 23-jährige promovierte Pathologe den Grundstein für die Erforschung der Leukämien, welche er 1847 erstmalig als Begrifflichkeit einführte [1]. Fast 180 Jahre später wird noch immer an hämatologischen Erkrankungen wie Leukämien, (Non-)Hodgkin-Lymphomen und dem Multiplen Myelom geforscht, die zusammen 2018 für über 690.000 Todesfälle weltweit verantwortlich waren [2]. In dieser Arbeit wird insbesondere auf die Akute Myeloische Leukämie (AML) eingegangen.

1.1 Die Akute Myeloische Leukämie

1.1.1 Definition

Die Akute Myeloische Leukämie (AML) ist eine neoplastische Erkrankung der Myelopoese, bei der krankhaft veränderte myeloische Vorläuferzellen unkontrolliert proliferieren. Die proliferierenden Zellen verdrängen und beeinflussen gesunde Progenitoren in ihrer Differenzierung, Ausbreitung und Funktion, was zu einer hämatopoetischen Insuffizienz führt.

Unbehandelt verläuft die AML tödlich. Mit modernen Therapieansätzen kann sie zwar im besten Falle geheilt werden, trotzdem sind die exakte Ätiologie und Teile der Pathogenese noch unbekannt und Bestandteil aktueller Forschung (1.1.3).

Somit ist die AML eine aggressive Erkrankung des hämatopoetischen Systems, die trotz bestehender kurativ intendierter Therapien noch immer zu den zehn häufigsten Todesursachen zählt. Die betroffenen Patientinnen und Patienten leiden unter hohen Rezidivraten und Therapieresistenzen, die möglicherweise durch ein besseres Verständnis der Krankheit verringert werden könnten.

1.1.2 Epidemiologie

2018 waren Leukämien mit weltweit über 309.000 Todesfällen die zehnthäufigste Todesursache [2]. Die AML ist nach der Chronisch Lymphatischen Leukämie (CLL) und dem Myelodysplastischen Syndrom (MDS) mit 21% aller Leukämien die dritthäufigste Leukämieform und die häufigste akute Leukämie bei Erwachsenen [3]. Sie betrifft eher das männliche Geschlecht und zeigt mit höherem Alter eine gesteigerte Inzidenz. Das 5-Jahres-Überleben korreliert ebenfalls negativ mit dem Alter (Tabelle 1). Während an AML erkrankte Patientinnen und Patienten von 15-34 Jahren noch eine relative 5-

Jahres-Überlebensrate von über 60% aufweisen, nimmt diese stetig ab und liegt bei den über 75-jährigen bei unter 5% [4].

Tabelle 1 - Fünfjahresüberleben in der AML

Alter	Relatives Fünfjahresüberleben	95%- Konfidenzintervall
15-34 Jahre	60,2	54,6-65,8
35-54 Jahre	52,7	49,4-55,9
55-64 Jahre	34,3	31,2-37,5
65-74 Jahre	15,8	14-17,6
75 Jahre und älter	4,6	3,5-5,8
AML gesamt	23,7	22,6-24,9

(modifiziert nach Kraywinkel und Spix, 2017 [4])

1.1.3 Ätiologie und Pathogenese

Ätiologisch gibt es für die AML einige mögliche Erklärungsansätze, in Bezug auf die Pathogenese führt sie jedoch immer zu einer pathologisch gesteigerten Proliferation der myeloischen Vorläuferzellen, der sogenannten Blasten (s. 1.2). Diese myeloischen Blasten gehören meistens einem stark proliferierenden Progenitorzellpool an, seltener auch einem Stammzellpool [5]. Es wird davon ausgegangen, dass der Tumor von einer Urzelle ausgeht, die krankhaft proliferiert, trotzdem findet aber keine homogene, klonale Expansion statt [6]. Die gesteigerte Proliferation resultiert in der Beeinflussung hämatologisch gesunder, funktionaler Zellen und führt zur Verdrängungssymptomatik, die im folgenden Abschnitt 1.1.4 besprochen wird.

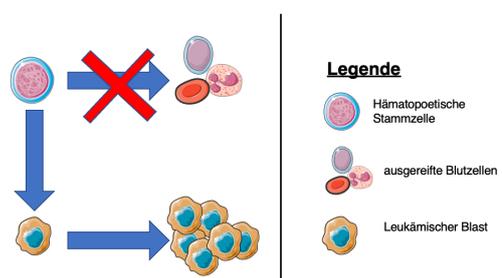


Abb. 1 - Differenzierung der HSPC zu leukämischen Blasten

Anstelle der Ausreifung zu Blutzellen transformiert sich die HSPC zu einem leukämischen Blasten, der in der Folge krankhaft proliferiert. Grafik erstellt mit Elementen von Servier Medical Art [7]

Der ätiologische Ursprung der AML liegt nach aktuellem Kenntnisstand in der Zytogenetik und Molekulargenetik und umfasst Veränderungen auf chromosomaler Ebene (Translokationen, Inversionen), numerische Veränderungen (Mono- und Trisomien) und mutierte Gene (Abb. 1). Des Weiteren kann eine AML sekundär, also im Rahmen anderer Erkrankungen wie dem Myelodysplastischen Syndrom, oder auch

therapieassoziiert entstehen. Risikofaktoren für das Auftreten von genetischen Veränderungen, die eine Tumorprogression der AML vorantreiben, sind im Wesentlichen vorangegangene zytostatische Chemotherapien (z.B. Topoisomeraseinhibitoren), die Exposition gegenüber radioaktiver Strahlung und Tabakkonsum. Bei letzterem korrelierten Zigarettenmenge und Zeit als Raucher:in mit einem erhöhten Risiko [8].

Die zytogenetischen Auslöser beschreiben Veränderungen der Chromosomen, welche bei der AML Inversionen, Translokationen und numerische Veränderungen umfassen. In der aktuellen Forschung rückt der Fokus vermehrt auf krankheitsrelevante Genmutationen [9]. Hier konnten in der letzten Dekade zahlreiche neue Erkenntnisse für das Verständnis der Tumorprogression gewonnen werden. So findet sich in nahezu allen Patientinnen und Patienten mindestens eine von neun genetischen Aberrationen, die laut aktueller Leitlinie relevant für die Pathogenese einer AML ist [5, 10]. Unter diesen am häufigsten vertreten sind jeweils mutierte Signaltransduktionsgene (z.B. *fms-like tyrosine kinase 3* (FLT3)), epigenetische Faktoren (DNA-Methyltransferase 3A (DNMT3A), Isocitratdehydrogenase 1/2 (IDH1, IDH2), *Additional Sex-Combs like protein 1* (ASXL1)) oder Shuttleproteingene (Nucleophosmin 1 (NPM1)), die durch ihre Wirkmechanismen einen Einfluss auf die Transkriptionsleistung der Blasten haben (Abb. 2). Diese sind oft auch in Mischformen miteinander assoziiert.

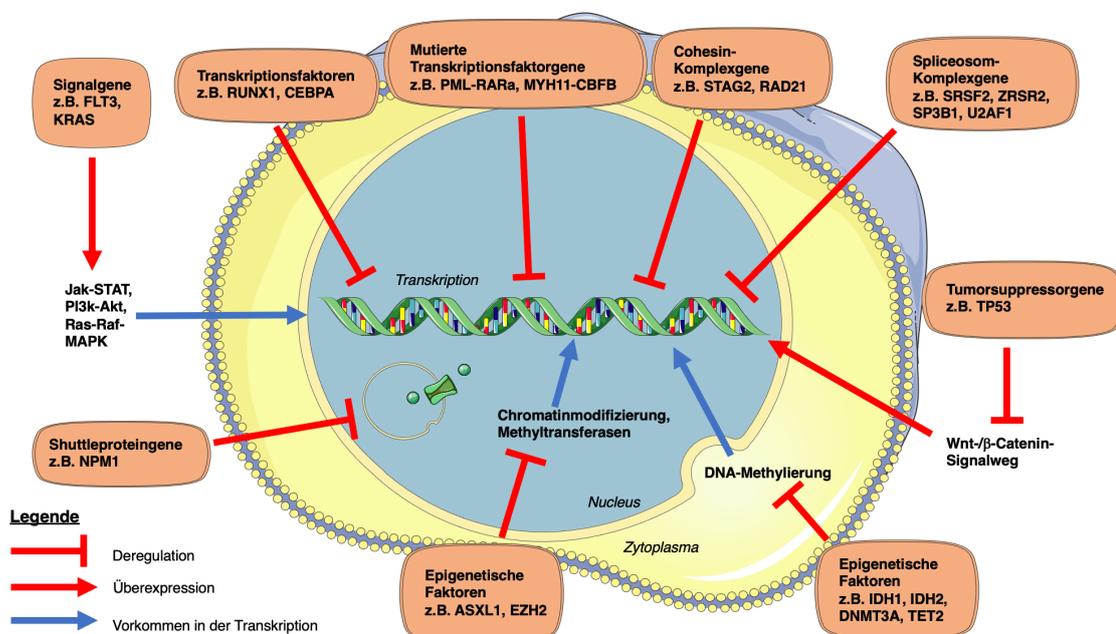


Abb. 2 - Genmutationen in der AML

Verschiedene genetische Mutationen sind an der AML beteiligt (von oben links im Uhrzeigersinn): Gestörte Signalgene wie FLT3 führen über entkoppelte Signalkaskaden zur Überexpression von Transkriptionsfaktoren. Jeweils mutierte Transkriptionsfaktoren (RUNX1), fusionierte Transkriptionsfaktorgene (PML-RARa), Cohesin-Komplexgene (STAG2) sowie Spliceosom-

Komplexgene (SRSF2) deregulieren die Transkription. Weiterhin führt das mutierte Tumorsuppressorgen TP53 über den Wnt- β -Catenin-Signalweg zur gesteigerten Transkription. Auch beeinflussen epigenetische Faktoren (DNMT3A) und das Shuttleprotein NPM1 über ihre jeweiligen Wirkmechanismen die Transkriptionsleistung. Abbildung modifiziert nach Döhner *et al.*, 2015 [9] unter Verwendung von Bildelementen von Servier Medical Art [7].

Die *World Health Organization* (WHO)-Klassifikation der AML wurde bereits verändert, indem einige genetische Aberrationen wie die AML mit mutiertem NPM1 mit aufgenommen wurden [11]. Gegenstand aktueller Forschung ist es, die Mutationen besser hinsichtlich deren Einfluss auf Vorkommen, Prognose und Therapierbarkeit zu analysieren.

Die prävalentesten Mutationen in der AML folgen einer klaren Zeitachse: Mutationen der epigenetischen Faktoren DNMT3A, IDH2 und ASXL1 sind besonders in präleukämischen Zellen zu finden, was zur Etablierung neuer Therapieansätze und darauf aufbauend im besten Fall zur Prävention eines Leukämieausbruchs der betroffenen Patientinnen und Patienten führen könnte [12, 13]. Das für Stoffwechsel- und Transportmechanismen von Proteinen codierende Gen Nucleophosmin NPM1 sowie in Signalkaskaden involvierte Gene (FLT3, KRAS) sind eher in späteren Phasen der AML zu finden [14, 15]. FLT3-ITD (*fms-like* Tyrosinkinase 3-interne Tandemduplikation) und das mutierte TP53 sind prognostisch schlecht bis sehr schlecht einzuordnen, was für die Diagnostik und Therapieplanung eine Rolle spielt.

1.1.4 Klinische Symptomatik und Krankheitsverlauf

Das klinische Bild der AML ergibt sich aus der oben beschriebenen Verdrängung der verschiedenen Zellreihen in der Hämatopoese. So klagen die Patientinnen und Patienten bei Anämie über Leistungsabfall, Müdigkeit und Abgeschlagenheit. Sind die Leukozyten oder Thrombozyten betroffen, neigen sie zu Infekten (Neutropenie) und zu einer gesteigerten Blutungsneigung (Thrombozytopenie). Je nach betroffener Zellreihe können die Symptome auch kombiniert auftreten. Bei krankhafter Proliferation der leukozytären Linie kann es zusätzlich zum hämatologischen Notfall des Leukostasesyndroms kommen, welches in der Folge zu kritischen Mikrozirkulationsstörungen bis hin zum Multiorganversagen führen kann [16].

1.1.5 Diagnostik und Klassifikation

Die Diagnose einer AML wird dann gestellt, wenn sich im peripheren Blut oder im Knochenmark ein myeloischer Blastenanteil von $\geq 20\%$ befindet [17]. Nach Anamnese und körperlicher Untersuchung wird dem Patienten oder der Patientin peripheres Blut für

ein Blutbild entnommen, sowie eine Knochenmarksaspiration für die Knochenmarkzytologie und -zytochemie durchgeführt. In der Folge wird die Person für das weitere therapeutische Prozedere immunphänotypisch (Oberflächenantigenprofil), zytogenetisch (Profil/ Nachweis der Chromosomen, evtl. Translokationen) und molekulargenetisch (Mutationen und Genumlagerungen auf Erbgutebene, d.h. in der DNA oder RNA, (Abb. 1) untersucht, sowie der Allgemeinzustand, Komorbiditäten und Begleitsymptome evaluiert.

Differenzialdiagnostisch sind weitere Leukämien, z.B. Akute Lymphatische Leukämie, das Myelodysplastische Syndrom, Lymphome oder die aplastische Anämie zu nennen, wobei die AML durch die genannten diagnostischen Maßnahmen in der Regel zweifelsfrei festgestellt werden kann.

Laut WHO von 2016 wird die AML klassifiziert in AML mit rekurrenten genetischen Anomalien, AML mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen, Therapie-assoziierten myeloischen Neoplasien und nicht anderweitig klassifizierter AML oder AML mit unklarer Linienzugehörigkeit [11].

1.1.6 Therapie

Therapie und Prognose einer AML sind abhängig vom Alter, Allgemeinzustand, eventuellen Komorbiditäten und den Heilungschancen der Patientinnen und Patienten (je nach molekular- und zytogenetischem Profil). So sind ein biologisches Alter von ≥ 75 Jahren, Komorbiditäten (z.B. Leber- und Nierenerkrankungen) oder ein verminderter Allgemeinzustand in der Regel eine Indikation für eine Palliativtherapie, während bei jüngeren Patientinnen und Patienten mit besserem Allgemeinzustand eine kurativ intendierte Therapie vorgesehen ist.

Die kurative Therapie besteht aus einer Induktionschemotherapie mit 1-2 Zyklen eines Anthrazyklins (z.B. Daunorubicin) und dem Antimetabolit Cytarabin. In der näheren Vergangenheit wurden, wie in 1.1.3 erwähnt, bei Patientinnen und Patienten mit bestimmten molekulargenetischen Profilen einige additive Therapien bereits in die Leitlinie mit aufgenommen, z.B. der Tyrosinkinaseinhibitor Midostaurin bei FLT3-Mutation [5]. Das Ziel der Induktionschemotherapie ist eine komplette Remission der Erkrankung, nach der mit einer Konsolidierungstherapie aus Hochdosis-Cytarabin oder einer allogenen Blutstammzelltransplantation weiterbehandelt wird, um Rezidiven der AML vorzubeugen.

Die Palliativtherapie wird zur Lebensverlängerung und Qualitätserhaltung der Patientinnen und Patienten durchgeführt. Diese bekommen hypomethylierende

Substanzen (Azacitidin oder Decitabin), sowie die jeweils spezifischen Additivtherapien und eine Supportivtherapie.

Eine Supportivtherapie ist bei allen Patientinnen und Patienten angedacht, um die Symptome der AML zu bekämpfen. Bei Patientinnen und Patienten mit Neutropenie ist eine antibiotische und/ oder antimykotische Infektionsprophylaxe vorgesehen, gegen die Anämie und die Thrombozytopenie kann jeweils mit Erythrozyten- oder Thrombozytentransfusionen vorgegangen werden. Sollten therapieassoziierte Nebenwirkungen auftreten, können diese unter Beachtung von Wechsel- und Nebenwirkungen symptomatisch behandelt werden, z.B. mit Antiemetika bei Übelkeit und Erbrechen.

1.2 Die Hämatopoese

Die Hämatopoese beschreibt die Blutbildung, also die Produktion aller Zellen, die für die Aufrechterhaltung des menschlichen Blut- und Immunsystems von Bedeutung sind. Diese sind verantwortlich für den Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidtransport (Erythrozyten), die Blutgerinnung (Thrombozyten) sowie die Infekt- und Immunabwehr (Leukozyten, welche Granulozyten, Monozyten und lymphatische Zellen umfassen).

Die Hämatopoese, welche größtenteils im Knochenmark stattfindet, geht von der hämatopoetischen Stammzelle (HSC) aus (Abb. 3) [18]. Diese Stammzelle ist zur Selbsterneuerung fähig und differenziert sich zu einer multipotenten Progenitorzelle (MPP) [19], die wiederum die myeloische und die lymphatische Progenitorzelle hervorbringt [20]. Im MPP-Stadium ist die Zelle nicht mehr zur Selbsterneuerung fähig, was neben der Multipotenz die terminologische Definition einer Stammzelle ist [21]. Aus Gründen der Übersicht und der im klinisch-experimentellen Bereich oft nur eingeschränkten Differenzierbarkeit werden die HSC und die MPP zur Hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzelle (HSPC) zusammengefasst. Die myeloische Progenitorzelle entwickelt sich in mehreren Vorläuferschritten zu Erythrozyten, Granulozyten, Thrombozyten und Makrophagen (Myelopoese)[22], während aus der lymphatischen Progenitorzelle die Natürlichen-Killer-Zellen (NK-Zellen) sowie B- und T-Lymphozyten hervorgehen (Lymphopoese) [23].

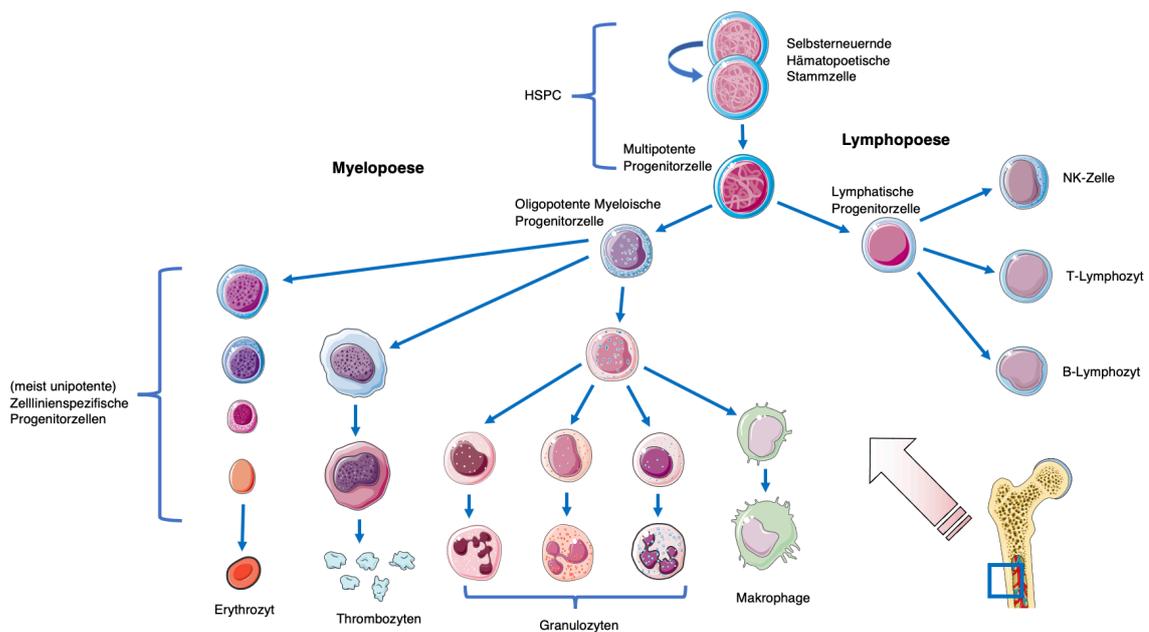


Abb. 3 - Übersicht Hämatopoese

Von der sich selbsterneuernden Stammzelle ausgehend entwickeln sich aus der Multipotenten Progenitorzelle zunächst die myeloischen und die lymphatischen Progenitoren, aus denen dann über zelllinienspezifische Vorläuferzellen Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten, Makrophagen, NK-Zellen, sowie B- und T-Lymphozyten hervorgehen. Die Prozesse der Ausdifferenzierung finden im Knochenmark statt. Grafik erstellt mit Elementen von Servier Medical Art [7].

Durch bedarfsgerechte Anpassung und strikte Regulationsmechanismen der Selbsterneuerung und der Ausdifferenzierung von HSPC wird sichergestellt, dass der Körper nicht nur seine physiologischen Prozesse aufrechterhalten, sondern auch auf pathologische Situationen wie Entzündungen reagieren kann. Diese Regulationsmechanismen umfassen sowohl Abläufe innerhalb der Zelle (auf genetischer und epigenetischer Ebene), als auch außerhalb der Zelle (durch Zytokine, Signal- und Interaktionsmoleküle, wie auch Zell-Zell-Kontakte mit Stromazellen) (s. 1.3). Im Bereich des Knochenmarks, wo diese Interaktionen und Regulationen stattfinden, spricht man von der Knochenmarksnische [24].

1.3 Die Knochenmarksnische

1.3.1 Aufbau der Knochenmarksnische

Als Knochenmarksnische werden die Bereiche im Knochenmark bezeichnet, in denen hämatopoetische Progenitoren in Kontakt mit anderen Zellen und azellulären Bestandteilen wie der extrazellulären Matrix (EZM) treten und von diesen hinsichtlich Selbsterneuerung und Ausdifferenzierung reguliert werden [21]. Hier liegt auch der

Ursprung zur Entstehung vieler hämatonkologischer Erkrankungen. Die azellulären und zellulären Bestandteile der Knochenmarksnische werden aufgrund ihrer Bedeutung für die vorliegende Arbeit in den folgenden Unterkapiteln detaillierter besprochen.

Die Zellen, mit denen die HSPC interagieren, sind im Wesentlichen Osteoblasten, Osteoklasten, Endothelzellen, Makrophagen und Adipozyten, sowie mesenchymale Stromazellen, die ein Hauptbestandteil dieser Arbeit sind und daher in 1.3.3 gesondert besprochen werden [25]. Des Weiteren interagieren die HSPC mit azellulären Bestandteilen wie löslichen Faktoren (Sauerstoff, Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone), dem autonomen sympathischen Nervensystem oder der EZM [26, 27].

Die Knochenmarksnische wird in mindestens zwei Untereinheiten - die endosteale und die perivaskuläre Nische (Abb. 4) - eingeteilt, die räumlich nicht klar voneinander abgetrennt werden, aber funktionelle Unterschiede aufweisen [28]. Die eher sauerstoffarme endosteale Nische besteht vornehmlich aus Osteoblasten, Osteoklasten, Adipozyten, Endothelzellen und mesenchymalen Stromazellen, die durch diverse Interaktionsmechanismen für einen Ruhezustand der HSPC bei kontinuierlicher Selbsterneuerung und somit Aufrechterhaltung des Bestands sorgen [29]. Durch endogene oder exogene Stimuli, z.B. bei erhöhtem peripheren Blutbedarf, können die HSPC aus der endostealen zunächst in die sauerstoffreichere perivaskuläre Nische wandern, wo sie differenzieren und angepasst werden, bevor sie von hier aus als ausgereifte Blutzellen (Abb. 3) über die, der Nische namensgebenden, venösen Knochenmarksinusoide in das periphere Blut mobilisiert werden.

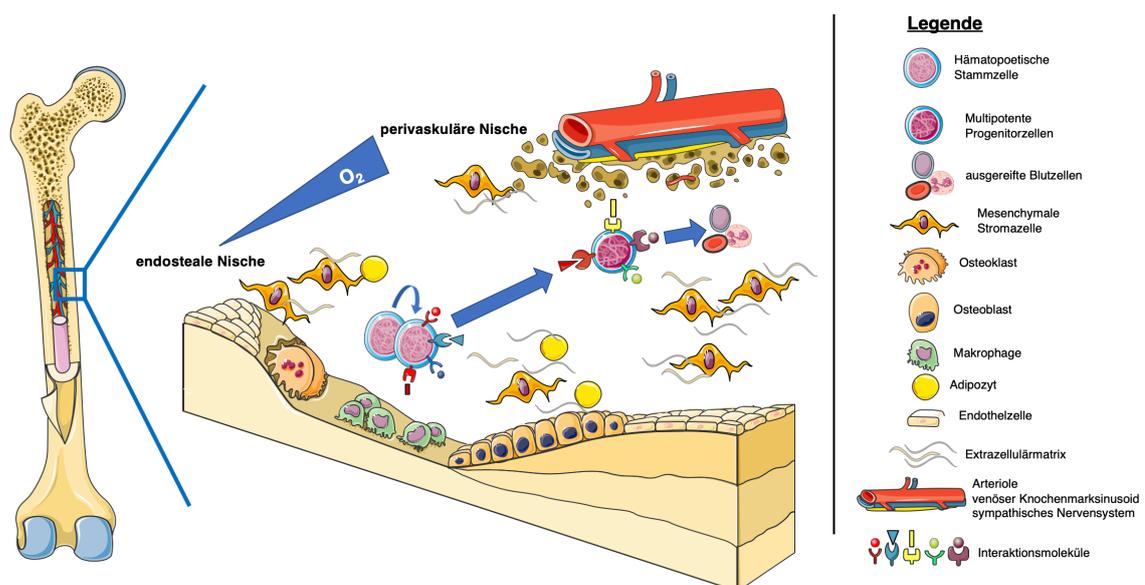


Abb. 4 - Die Knochenmarksnische

In der sauerstoffarmen endostealen Knochenmarksnische sitzen die HSPC im Ruhezustand, die ihren Bestand durch Selbsterneuerung aufrechterhalten und hierzu mit mesenchymalen Stromazellen, Adipozyten, Osteoklasten, Makrophagen und Endothelzellen interagieren. In der sauerstoffreicheren perivaskulären Nische differenzieren sie über MPP zu ausgereiften Blutzellen und können durch venöse Sinusoide in den Blutkreislauf aufgenommen werden. Die Grafik wurde mit Elementen von Servier Medical Art erstellt [7].

Die Interaktionsmechanismen mit den Zellen der Knochenmarksnische haben einen bedeutenden Einfluss darauf, ob HSPC eher im Ruhezustand verbleiben oder proliferieren und sich den Sinusoiden annähern. Einige bereits bekannte Kaskaden umfassen Zytokine wie das C-X-C motif Chemokin 12 (CXCL12) mit dem C-X-C motif Chemokinrezeptor 4 (CXCR4), den *Stem Cell Factor* (SCF) mit dem c-Kit-Rezeptor (c-Kit) oder Angiopoetin-1 (Angpt1) mit dem Angiopoetin-1-Rezeptor (tie2) [30-32].

1.3.2 Die extrazelluläre Matrix als azellulärer Bestandteil der Knochenmarksnische

Die EZM umfasst sowohl räumliche Bereiche als auch Makro- und Mikromoleküle, die alle Zellen umgeben und maßgeblich an der Form, Verankerung und Konsistenz von Geweben sowie vielen Interaktionsmechanismen beteiligt sind [33]. Sie ist der strukturelle Rahmen eines Zellverbandes, bestehend aus einem komplexen Netzwerk aus Proteinen, Glykoproteinen und Proteoglykanen wie beispielsweise Kollagenen und einem Elastin-Netzwerk mit Fibrillinen, Fibulinen, Fibronectin, Versican und Hyaluronsäure [34].

Diese extrazellulären Bestandteile beeinflussen durch direkte und indirekte Interaktion die Zellen eines jeden Gewebes im physiologischen und im pathologischen Zustand. Es findet eine bidirektionale Interaktion statt, die EZM beeinflusst zelluläre Prozesse und wird gleichermaßen auch von Zellen modifiziert und reguliert.

Bei hämatoonkologischen Erkrankungen spielt besonders die EZM im Bereich der Knochenmarksnische eine wichtige Rolle.

1.3.3 Die Mesenchymale Stromazelle als zentraler zellulärer Bestandteil der Knochenmarksnische

Die Stammzeleigenschaft der mesenchymalen Stammzelle definiert sich ebenso wie bei der HSC (1.2) über die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zur Ausdifferenzierung in verschiedene Zelllinien [21]. Die genauere Definition zur Stammzelle umfasst weiterhin die Plastikadhärenz bei kultivierten Zellen, die mindestens trilineare Differenzierung zu

Knochen-, Knorpel- und Fettgewebe, sowie die Expression der Oberflächenantigene CD73 (*cluster of differentiation 73*), CD90 und CD105. Gleichzeitig dürfen die hämatopoetischen Antigene CD34, CD45 oder HLAII nicht oder nur in $\leq 2\%$ der Zellen vorhanden sein [35].

Analog zur Unterscheidung zwischen HSC und HSPC bestehen Zellkulturen mesenchymalen Stammzellen nach Isolation und Kultivierung immer zu einem signifikanten Anteil auch aus bereits teilweise differenzierten Zellen. Unter *in-vitro*-Bedingungen werden diese Zellen, die ein Gemisch aus teilweise differenzierten und „echten“ Stammzellen sind, als mesenchymale Stromazellen (MSC) bezeichnet.

Aus den MSC gehen weitere Zellarten hervor, die wichtige Bestandteile der Knochenmarksnische sind: Osteoblasten, Osteozyten, Chondrozyten und Adipozyten (Abb. 5) [36].

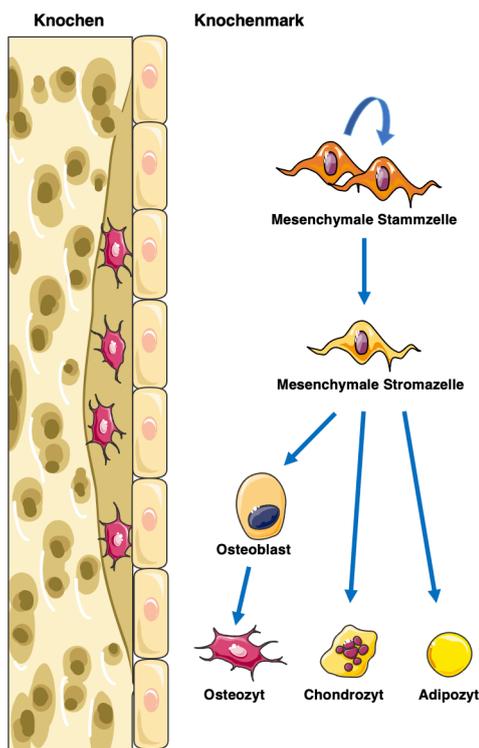


Abb. 5 - Differenzierung der mesenchymalen Stammzelle

Die sich selbsterneuernde Stammzelle differenziert im Knochenmark über die mesenchymale Stromazelle zu Osteoblasten, Osteozyten, Chondrozyten und Adipozyten. Grafik erstellt mit Elementen von Servier Medical Art [7]

Nach dem aktuellen Wissensstand beeinflussen die aus der MSC hervorgehenden Zellen die Hämatopoese durch direkte Zell-Zell-Kontakte [37-39] oder die Ausschüttung bestimmter Faktoren wie *CXCL12*, *Stem Cell Factor*, *Angpt1* oder Fibronectin (1.3.1). Auch hier liegen im pathologischen Zustand veränderte Interaktionsmechanismen vor, auf die in 1.4.2 näher eingegangen wird. Dies wirft die Frage auf, ob eine deregulierte Interaktion von MSC und HSPC eine hämatologische Erkrankung auslöst, oder ob eine hämatologische Erkrankung die Interaktion für ihre Zwecke verändert [40].

1.4 Tumorentstehung in der Knochenmarksnische

2011 fassten Hanahan und Weinberg die bis heute gültigen, grundlegenden Charakteristika der Tumorbiologie zusammen [41]: So zeichnen Tumore im Allgemeinen ihre Proliferationskapazität, die Evasion von Wachstumsinhibitoren, die Vermeidung von Immunabwehr, die Replikationskapazität, die tumorfördernde Inflammation, die Invasion und Metastasierung, die Induktion von Angiogenese, Mutationen und genomische Instabilität, Vermeidung von Zelltod oder die dysregulierte Zellenergetik aus (Abb. 6).

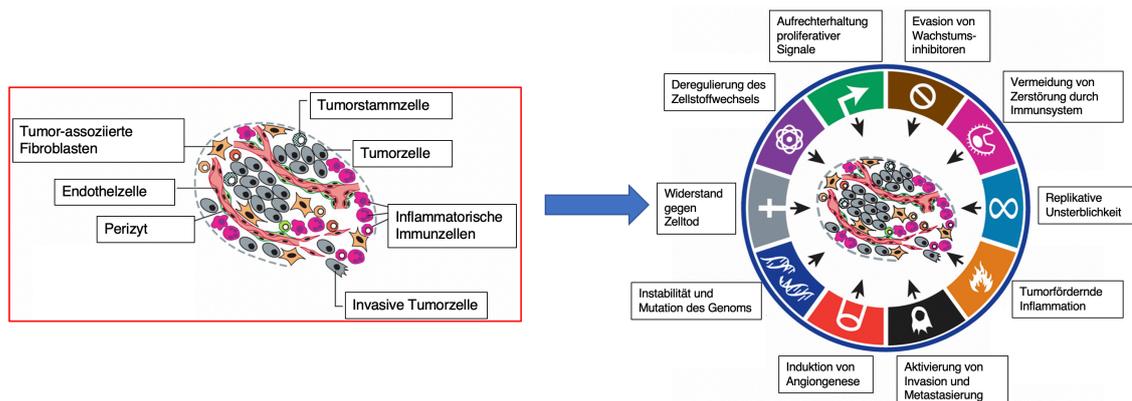


Abb. 6 - Tumorcharakteristika

Der Tumor entsteht aus einem Zusammenschluss verschiedener Zellarten: Tumorstammzellen, Tumorzellen, akquirierte Immunzellen, Perizyten, Endothelzellen und Tumor-assoziierten Fibroblasten, sowie eingewanderte Stroma-Stamm- und Progenitorzellen. Dieser Zellverbund verfügt über verschiedene Qualitäten wie unter anderem nachhaltigen proliferativen Signalkaskaden, genomischer Instabilität und fortschreitender Deregulation der Zellenergetik bei gleichzeitiger Immunevasion und Angiogeneseinduktion. All dies fördert ein gesteigertes Tumorüberleben, sowie die Möglichkeit der Ausbreitung in andere Gewebe. Abbildung modifiziert nach Hanahan und Weinberg [41] mit freundlicher Genehmigung des Verlages.

Dieses Modell kann auch auf Leukämien übertragen werden. Insbesondere die Knochenmarksnische spielt in der Entstehung der AML eine signifikante Rolle durch ihre beteiligten Zellarten wie die bereits beschriebenen HSPC und MSC und den von ihnen produzierten azellulären EZM-Bestandteilen, die ein komplexes Mikromilieu mit wichtigen regulatorischen und strukturellen Funktionen schaffen. So können sich die in 1.3.1 besprochenen Interaktionsmechanismen zwischen zellulären und azellulären Bestandteilen der Knochenmarksnische im pathologischen Zustand deutlich vom physiologischen unterscheiden, wobei sie auch tumorfördernd verändert sein können [25]. Durch die verschiedenen Wachstumsfaktoren und Zytokine kann nicht nur eine adäquate Umgebung für die Hämatopoese, sondern auch eine für die Metastasierung

solider Tumore oder den Ausbruch einer Leukämie (Leukämogenese) permissive oder sogar stimulierende Zone geschaffen werden [39].

1.4.1 Einfluss der Hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzelle auf die Knochenmarksnische in der AML

Durch die bidirektionale Interaktion der Knochenmarksnische und der EZM können mutierte HSPC in der Leukämie die Nische zu ihren Gunsten verändern und somit die Entstehung einer Leukämie begünstigen [40]. So können sie über die Integrin-vermittelte Interaktion mit der EZM die Zelladhäsion und das Überleben von leukämischen Zellen fördern [42]. Sie können über das Hypoxie-vermittelte Zytokin IL-8 die MSC zur Migration in Richtung leukämischer Zellen bewegen und damit die Knochenmarksnische verändern [43]. Darüber hinaus können sie angiogene Faktoren stimulieren, was im schlechtesten Fall zur Selektion therapieresistenter Tumorzellen führen kann [6]. Außerdem können sie T-Zellen in ihrer Aktivierung und Proliferation einschränken und somit das Immunsystem umgehen [44].

1.4.2 Einfluss der Knochenmarksnische auf die Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzelle in der AML

In der Literatur werden verschiedene Aspekte des Einflusses der Knochenmarksnische auf die AML beschrieben. So vermitteln die azellulären Komponenten der Knochenmarksnische durch Aktivierung und Beeinflussung von diversen intrazellulären Tumorsignalkaskaden wie PI3K/AKT/mTOR, VEGFR, MAPK oder CXCL12 [45] wichtige Zell-Zell-Interaktionen (s. auch 1.3.1 bis 1.3.3), was auch das Verhalten von Stamm- und Progenitorzellen verändert. Durch Regulation inflammatorischer Zytokine, Umbau der azellulären Nischenanteile und Beeinflussung der zellulären Anteile wie der MSC fördert die leukämische Nische ein Milieu, das die physiologische Hämatopoese supprimiert und die klonale Expansion leukämischer Zellen verstärkt, da sie den supprimierenden Mechanismen entgehen können [46]. Durch Einflussnahme auf Interaktionsmoleküle zwischen leukämischen Zellen und MSC wie CXCL12 oder JAG1 supprimiert die AML weiterhin die normale Hämatopoese [47]. Außerdem konnte unsere Arbeitsgruppe in vorangegangenen Experimenten nachweisen, dass MSC im Umfeld hämatologischer Erkrankungen nicht nur funktionell, sondern auch strukturell und epigenetisch verändert sind [48, 49]. Zudem kann die osteoblastische Nische AML-Zellen vor der Apoptose schützen [50].

Darüber hinaus ist die Hämatopoese abhängig von MSC-exprimierten extrazellulären Vesikeln, die als Reaktion auf bestimmte Stimuli wie Stress oder Erkrankung mit der

Ausschüttung von bestimmten Faktoren reagiert. Diese Faktoren können u.a. die Proliferation, Differenzierung und die Apoptose von Zellen, den Wnt- β -Catenin-Signalweg und die Angiogenese beeinflussen [51]. So fördern die von der MSC produzierten extrazellulären Vesikel das Tumorwachstum, die Metastasierung und die Therapieresistenz von leukämischen Zellen [52]. Es ist beschrieben, dass leukämische HSPC die von der MSC produzierten Exosomen inkorporieren können, um daraus Wachstumsfaktoren zu extrahieren und Tyrosinkinaseinhibitoren zu bremsen. Darüber hinaus können HSPC eigenständig Exosomen herstellen und damit ihre Umgebung, insbesondere die MSCs dazu anzuregen, die Leukämie unterstützende Faktoren zu exprimieren und die Knochenmarksnische zu modifizieren [53]. Es liegt also eine bidirektionale Interaktion zwischen MSC und HSPC über extrazelluläre Vesikel vor. Während die genauen molekularbiologischen und zellulären Mechanismen noch nicht abschließend geklärt sind, werden die extrazellulären Vesikel bereits als therapeutische Ziele diskutiert [54]. Sie scheinen eine wichtige Rolle bei der Entstehung der AML zu spielen und sollen in dieser Arbeit näher besprochen werden (s.4.2 und 4.2.2.1). Auch soll in dieser Arbeit untersucht werden, inwiefern leukämische MSC die physiologische Hämatopoese beeinflussen (s. 3.1 und 4.1).

Die Knochenmarksnische kann zusätzlich durch ihre physikalischen Eigenschaften Einfluss auf leukämische Zellen nehmen. So spielt die Steifigkeit der EZM eine große Rolle in der Modulation von Proliferation und Chemosensitivität von HSPC [55] und wird daher im Rahmen der Diskussion der Ergebnisse dieser Arbeit in 4.2.3.2 gesondert betrachtet.

Bei veränderten Zuständen der Knochenmarksnische ist in den meisten Fällen noch nicht abschließend geklärt, ob ein solcher pathologischer Zustand ein Ursprung oder eine sekundäre Folge von hämatologischen Erkrankungen wie der AML ist [56].

Zusammenfassend spielt die Knochenmarksnische eine zentrale Rolle in der Entstehung von AML, indem sie das Umfeld von HSPC reguliert und durch Veränderung des Mikromilieus zur malignen Transformation beiträgt. Die beschriebenen Veränderungen der Knochenmarksnische, der MSC und der HSPC schaffen ein permissives Umfeld, welches die Leukämie unterstützt und die physiologische Hämatopoese inhibiert oder für ihre Zwecke modifiziert. Dies unterstreicht die zunehmende Bedeutung der Knochenmarksnische und der EZM als möglichen therapeutischen Angriffspunkt.

1.5 Publierte Untersuchungen des Matrisoms im Kontext der AML

Die vorliegende Arbeit basiert auf einer massenspektrometrischen Analyse der EZM in der AML. Bisher sind nur wenige massenspektrometrische Analysen der Knochenmarksnische, insbesondere in der AML, publiziert.

Eine Arbeit von Aasebø *et al.* beschäftigt sich mit der Herkunft von exosomalen Proteinen aus Zellkulturen der AML. Dazu wurden periphere leukämische und nicht-leukämische HSPC mit MSC kokultiviert und die Überstände massenspektrometrisch analysiert, um exosomale Proteine zu identifizieren [57]. Hierbei ließ sich feststellen, dass in leukämischen Kokulturen durch Zusammenspiel aus AML-Zellen mit MSC viele intrazelluläre Proteine - am ehesten über exosomale Prozesse - in den extrazellulären Raum transportiert werden. Die Menge an freigesetzten extrazellulären Proteinen war abhängig von der Menge an exprimierten Zytokinen und Proteasen, die große interindividuelle Unterschiede aufzeigten. Die exosomale Freisetzung von Proteinen wurde als möglicher Therapieansatz in der AML diskutiert. In der hier beschriebenen Arbeit wurden jedoch die Proteine aus verschiedenen, auch intrazellulären, Zellkompartimenten ausgewertet und sind somit nur bedingt mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit vergleichbar.

Außerdem konnte die Arbeitsgruppe um Selheim und Aasebø mittels Proteomanalyse zeigen, dass selbst innerhalb einer FAB-Klassifikation (in diesem Fall monozytische AML, FAB M4/5) Monozyten in der AML biologisch heterogen waren und unterschiedlich auf Therapien ansprachen [58].

Izzi *et al.* untersuchten mit bioinformatischen Methoden anhand von öffentlich verfügbaren Microarray-Genexpressions-Daten (u.a. Abgleich mit GeneOntology-, Matrisome-, NCBI Gene Expression Omnibus-Datenbank, Auswertung von Transkriptionsprofilen mittels PCR), inwiefern leukämische HSPC die EZM modifizieren [59]. Dabei zeigte sich, dass leukämische Vorläuferzellen nicht nur den Hyaluronsäurerezeptor CD44 vermehrt exprimieren, sondern parallel dazu die Gene hochregulieren, die unmittelbar mit dem Rezeptor interagieren (COL4A5, LAMB2, MMP2, COL18A1). Auf dieser Grundlage wurde ein „CD44-ECM-Netzwerk“ beschrieben. Die Hyaluronsäure und CD44 werden in 4.2.3.1 näher betrachtet.

Naba *et al.* zeigten Unterschiede zwischen der Tumormatrix aus Melanomzellen und gesundem Gewebe aus Lunge und Darm auf, indem sie massenspektrometrische Analysen durchführten [60]. Eine weitere Arbeit untersuchte mittels

Massenspektrometrie die Unterschiede von MSC aus Lungen- und Knochenmarksgewebe und stellte Veränderungen in der Regulierung von Zellproliferation fest [61]. Darüber hinaus wurde 2022 eine massenspektrometrische Matrisomanalyse publiziert, die in pädiatrischer AML die Proteinexpression von leukämischen HSPC mit gesunden HSPC verglich und einige Proteine wie *heat shock protein E1*, *serine and arginine rich splicing factor 1* oder Nucleoporin 210 als mögliche Biomarker identifizierte [62].

Insgesamt gibt es also bereits einige vielversprechende Ansätze zur Verwendung von Massenspektrometrie zur Charakterisierung der AML und anderer Tumorentitäten: u.a. die Analyse der Proteinexpression, die Identifizierung von klinisch relevanten Biomarkern, welche individualisierte Therapien ermöglicht, die Definition von pharmakologischen Zielstrukturen sowie die Prognose des Therapieansprechens [63]. Nahezu sämtliche Arbeiten verwendeten hierzu Zelllinien der AML zu einem nicht näher definierten Transformationszeitpunkt. Eine massenspektrometrische Analyse der EZM von Primärzellen der AML und die sich daraus ergebenden Veränderungen der Knochenmarksnische über den Verlauf der Leukämogenese hinweg, wie sie in der vorliegenden Arbeit erfolgte, wurde bisher nicht durchgeführt.

1.6 Ziele der Arbeit

Die Untersuchung der Interaktionen zwischen leukämischen Zellen und dem sie umgebenden Stroma ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Die genaue Kenntnis der zugrundeliegenden Prozesse könnte potenzielle Zielstrukturen für neue Behandlungsstrategien ergeben oder zur Identifikation von Proteinen führen, die den Leukämie-Progress besser diagnostisch abbilden.

Arbeiten der letzten Jahrzehnte haben gezeigt, dass die Leukämie am ehesten von der hämatopoetischen Zellreihe ausgeht [5]. Inwiefern Bestandteile der Knochenmarksnische wie MSC und das von diesen beeinflusste Matrisom am Prozess der Leukämogenese direkt oder indirekt beteiligt sein könnten, ist Gegenstand dieser Arbeit. Während bisher einige Arbeiten periphere Zellen oder Zelllinien der AML analysierten, ließ sich noch keine detaillierte, massenspektrometrische Untersuchung von Primärzellen und der EZM im Verlauf von Ausbruch und Aufrechterhaltung der AML finden. Durch die gezielte Untersuchung verschiedener *ex-vivo*-Kokultur-Ansätze aus sowohl leukämischen als auch hämatologisch gesunden MSC und HSPC soll in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der Interaktion dieser Zellarten auf das Differenzierungspotential der HSPC und die Zusammensetzung der EZM nachgestellt und analysiert werden. Unter der Annahme, dass die Leukämie von einer erkrankten

HSPC ausgeht, wurde in dieser Arbeit von folgenden vereinfachten Zwischenstufen von hämatologisch gesunder zu vollausgeprägt kranker und beide Zellreihen betreffender Leukämie ausgegangen: Physiologische Bedingung ($MSC_{hc}/34_{hc}$) → Interaktion von transformierten HSPC mit gesunden MSC ($MSC_{hc}/34_{AML}$) → Vollaussprägung einer AML ($MSC_{AML}/34_{AML}$). Hierbei bedeutet jeweils der Zusatz „AML“, dass die Zellen aus einem AML-Patienten stammen, während „hc“ für die hämatologisch gesunde Kontrolle steht (*healthy control*, s. 2.2.4). Der Einfluss der gesunden und leukämischen MSC auf das Differenzierungspotential von HSPC soll mithilfe eines *Colony-Forming-Unit-Assays* bestimmt werden. Die Untersuchung des Matrisoms erfolgt durch eine Anreicherung der Matrixproteine mit anschließender massenspektrometrischer Analyse der Proteine und die Durchführung eines Vergleichs der detektierten Proteine für ausgewählte Kulturbedingungen. Hier sollen die Proteine, im Gegensatz zur bisher vorhandenen Matrixforschung in der AML, nicht nur identifiziert, sondern auch über den Verlauf der Leukämogenese hinweg verfolgt werden. Im Anschluss sollen durch eine Zuordnung der detektierten Proteine zu Netzwerken der extrazellulären Matrix Hypothesen entwickelt werden, inwiefern diese Veränderungen eine funktionelle Relevanz für die Leukämogenese haben könnten. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen so einen Beitrag leisten, die Mechanismen der Entstehung einer AML besser zu verstehen und mögliche Zielstrukturen aufzuzeigen.

Zusammenfassend sollen in dieser Arbeit folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- Welchen Einfluss hat die Interaktion zwischen MSC und HSPC auf das Differenzierungspotential der HSPC?
- Unter welchen Kokultur-Bedingungen, entsprechend den Phasen der Leukämogenese, kann eine wesentliche Veränderung in der Zusammensetzung der EZM festgestellt werden?
- Inwiefern lassen sich die detektierten Veränderungen in der Zusammensetzung des Matrisoms charakterisieren und entsprechenden Netzwerken der EZM zuordnen?

Die Beantwortung dieser Fragen hat das Potential, eine Grundlage für neue, effizientere Therapiestrategien oder Biomarker als Verlaufsparemeter der Erkrankung zu identifizieren und so einen Beitrag zur besseren Behandlung der AML zu leisten.

2 Material und Methoden

2.1 Arbeitsmittel

2.1.1 Substanzen

Alle Substanzen ohne weitere spezifische Angaben stammen von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim).

2.1.2 Geräte

Tabelle 2 - Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Axiovert 25, 5x/0,12 Ph0	Mikroskop	Zeiss
Biofuge Primo R	Zentrifuge	ThermoFisher Scientific
BSB6 Laminarflow	Sterile Werkbank	Gelaire
Casy Model TT	Zellzählgerät	Roche Diagnostics
Megafuge 1.0R #7570D	Zentrifuge	ThermoFisher Scientific
Pipetus	Pipettiergerät	Hirschmann
Proteinnachweis-Kit	<i>Pierce BCA Protein Assay, Kat. 23227</i>	ThermoFisher Scientific
Reax Top	Vortex	Heidolph Instruments
Reinstwasseraufbereitungsgerät	<i>Millipore Milli-Q Biocel Water Purification System ZMQS50F01</i>	Millipore
<i>Q Exactive™ Plus Hybrid Quadrupol-Orbitrap™</i>	ESI-Massenspektrometer	ThermoFisher Scientific
Schüttelwasserbad 1083	Wasserbad	GFL

2.1.3 Software

Tabelle 3 - Softwareprogramme

Softwareprogramme	Hersteller
EndNote X9	Clarivate Analytics, PA, USA
Gen5 Microplate Reader and Imager Software	BioTek, VT, USA

2.05	
Office 365 ProPlus	Microsoft, WA, USA
Prism 8	GraphPad Software, CA, USA

2.1.4 Hersteller

Tabelle 4 - Herstellerverzeichnis

Hersteller	Hauptsitz
Biocel	Rockgrove, Little Island, IRE
Biotek	Winooski, Vermont, USA
Biozym Scientific	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Cellstar	Schadendorf, Österreich
Clarivate Analytics	Philadelphia, PA, USA
Ecolab	St. Paul, MIN, USA
Eppendorf SE	Hamburg, Deutschland
Gelaire	Seven Hills, Australien
GFL Gesellschaft für Labortechnik	Burgwedel, Deutschland
Graphpad Software	La Jolla, CA, USA
Greiner	Kremsmünster, Österreich
Heidolph Instruments	Schwabach, Deutschland
Hirschmann Laborgeräte	Eberstadt, Deutschland
Microsoft	Redmond, WA, USA
Polysciences	Warrington, PA, USA
PreproTech GmbH	Hamburg, Deutschland
Roche Diagnostics	Basel, Schweiz
Schärfe Systems	Reutlingen, Deutschland
Schülke	Norderstedt, Deutschland
Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Stemcell Technologies	Vancouver, Kanada
Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Zeiss	Oberkochen, Deutschland

2.1.5 Ethikvotum und verwendete Zellen

Für die hier beschriebenen Versuche wurde im Vorfeld ein Ethikvotum mit der Studiennummer 2019-511-KFogU (Antragssteller Dr. Dr. Sören Twarock) eingeholt.

Für die experimentelle Durchführung dieser Arbeit wurden sowohl Zelllinien als auch Primärzellen genutzt. Alle Zelllinien (immortalisierte HL-60-, THP1- und Kyse410-Zelllinien) wurden ursprünglich von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Leibniz-Institut, Braunschweig) bezogen. Die primären Zellen wurden nach Einverständniserklärung von unbehandelten AML-Patientinnen und Patienten mittels Knochenmarkaspiration (Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie des Universitätsklinikums Düsseldorf) bzw. Patientinnen und Patienten, die im Zuge einer orthopädischen Operation einen Hüftkopfersatz bekamen, intraoperativ gewonnen (Klinik für Orthopädie des Universitätsklinikums Düsseldorf). In der Folge wurden die Zellen im Forschungslabor der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie des Universitätsklinikums Düsseldorf freundlicherweise unter Leitung von Dr. Stefanie Geyh aufgearbeitet. Für die Matrisomanalyse wurden für sämtliche Kulturen $n = 3$ Zellproben isoliert und verwendet.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Kultivierung

Für die Methodenetablierung wurden die immortalisierten AML-Zelllinien HL-60 und THP-1 verwendet. Diese wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Medium 1640 und den Zusätzen von 10 % fetalem Kälberserum (FCS, *fetal calf serum*) sowie 1 % Penicillin/Streptomycin/Glutamin (PSG). Soweit nicht anders bezeichnet, stammen sämtliche Substanzen von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim). Für die Durchführung der etablierten Methode wurden aus Knochenmarkaspiraten, Knochenmarkbiopsien und Apheresaten gewonnene mesenchymale Stromazellen (MSC) und CD34⁺-hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen verwendet (HSPC), die freundlicherweise von Dr. Stefanie Geyh aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie des UKD aufbereitet wurden. Eine genaue Darstellung des Zellkulturmodells und der Aufteilung in Mono- und Kokulturen wird in 2.2.3 beschrieben.

Sämtliche Kulturen wurden 5 % CO₂ und 37 °C kultiviert. Die MSCs und die Kokulturen wurden in *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) low Glucose* (1,0 g/L; DMEM^{low}) mit Zusatz von 30 % FCS und 1 % PSG kultiviert. Die HSPCs wurden ebenfalls in DMEM^{low} mit Zusatz von 30 % FCS und 1 % PSG kultiviert, jedoch benötigten sie in der Monokultur den Zusatz von Interleukin-3 (IL-3), Interleukin-6 (IL-6), *Stem Cell Factor* (SCF) (jeweils 10 ng/mL) und 20 ng/mL *FMS-related Tyrosinkinase-3-Ligand (FLT3L)*; alle Zusätze von PreproTech GmbH, Hamburg, Germany). Das hier beschriebene Nährmedium wird in der Folge mit „DMEM^{low++++}“ abgekürzt.

Die Passagierung der Zellen erfolgte durch Absaugen des jeweiligen Nährmediums, Waschung mit *Phosphate Buffered Saline (PBS)* und Ablösung unter lichtmikroskopischer Beobachtung durch 5 Minuten Inkubation mit 0,5 % Trypsin/EDTA (TE) bei 37 °C. Im Anschluss wurde das TE abgestoppt von Nährmedium, über 5 Minuten bei 1100 Umdrehungen zentrifugiert, in frischem Nährmedium resuspendiert und in gewünschter Menge, meistens zwischen 5.000-6.000 Zellen/cm² ausgesät. Die nicht-adhären AML-Zellen wurden passagiert durch Zentrifugierung über 5 Min. bei 1100 Umdrehungen und Resuspension in frischem Medium, gefolgt von einer Aussaat in gewünschter Menge, meistens 5.000 Zellen/cm².

2.2.2 Zellzählung

Die Zellzählung wurde für die MSCs aufgrund ihrer Größe in einer Neubauer Zählkammer durchgeführt [64]. Die HSPCs wurden gezählt mit dem *Casy Model TT – Cell Counter and Analyser (Roche Diagnostics)*.

2.2.3 Studiendesign des Zellkulturmodells

Für die Charakterisierung des Matrisoms der MSCs und der HSPCs wurden diese zunächst in Mono- und Kokulturkonstellationen kultiviert. Im Anschluss wurde die Kultur zur Darstellung der EZM dezellularisiert. Es ergaben sich acht verschiedene Konstellationen (Abb. 7). Die Abkürzungen setzen sich durch die Zellart (MSC bzw. 34 für CD34⁺-HSPC) und den Krankheitsstatus („AML“ für Akute Myeloische Leukämie und „hc“ für „*healthy control*“ bzw. keine AML) zusammen. Beispielsweise wird die Kokulturkonstellation mit leukämischen MSCs und HSPC somit MSC_{AML}/34_{AML} genannt, die Monokultur nicht leukämischer MSCs sind MSC_{hc}.

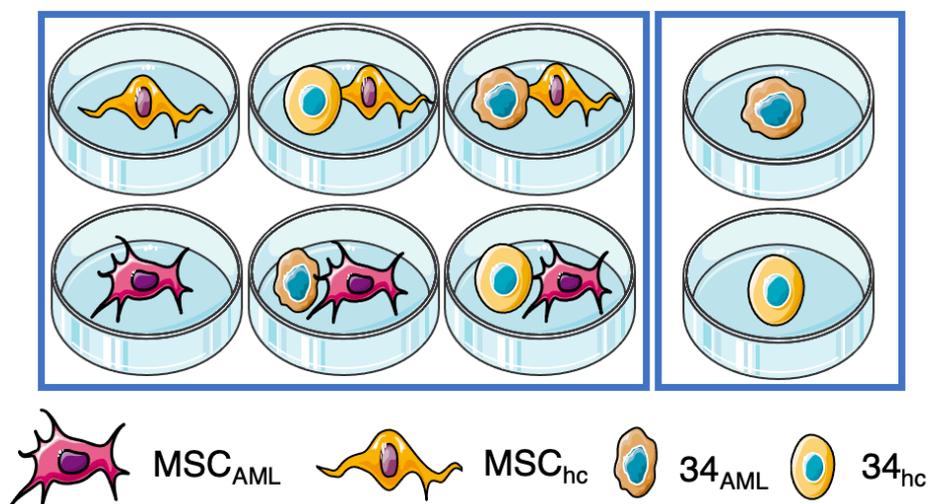


Abb. 7 - Mono- und Kokulturkonstellationen

Es wurden Monokulturen der vier Zellarten angelegt: nicht-leukämische MSC (MSC_{hc}, links oben), leukämische MSCs (MSC_{AML}, links unten), nicht-leukämische HSPCs (34_{hc}, rechts unten), wie

auch leukämische HSPCs (34_{AML} , rechts oben). Des Weiteren wurden Kokulturen in den Konstellationen $MSC_{hc}/34_{hc}$ (oben, 2.v.l.), $MSC_{hc}/34_{AML}$ (oben, 3.v.l.), $MSC_{AML}/34_{AML}$ (unten, 2.v.l.) und $MSC_{AML}/34_{hc}$ (unten, 3.v.l.) angelegt. Abbildung erstellt mit Elementen von Servier Medical Art [7].

Für die Experimente dienten MSCs sowie HSPCs von Patientinnen und Patienten mit und ohne diagnostizierte Leukämie, jeweils als Kontrollgruppe in der Monokultur als auch in sämtlichen möglichen Konstellationen von Kokulturen. Die Patientencharakteristika werden in Tabelle 5 beschrieben.

Tabelle 5 - Patientencharakteristika

Zellen	Geschlecht	Alter bei Erstdiagnose
34_{AML}	m	30
	m	66
	m	62
34_{hc}	m	n/a
	f	85
	f	60
MSC_{AML}	m	57
	m	64
	f	59
MSC_{hc}	m	68
	m	59
	f	40

2.2.4 Beschichtung, Aussaat

Als Grundlage für Versuchsaufbau und Zellzahl dienten die Arbeiten von Ragelle *et al.* sowie Harris *et al.*, die an die hier verwendeten Zellen angepasst wurden [65, 66]. Für die einzelnen Kulturansätze wurden zunächst die 6-Well-Platten (*Cellstar*) mit 50 μg Fibronectin in 1 ml PBS beschichtet. Die Beschichtung diente zur Nachahmung der *in-vivo*-Situation in der Knochenmarksnische, da Fibronectin ein Bestandteil der EZM ist und für eine bessere Adhäsion der nicht-adhären HSPC sorgen soll.

Nach einer vierstündigen Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 wurde der Überstand der Fibronectin-Beschichtung entfernt und die Platte eine weitere Stunde trocknen lassen.

Anschließend wurden jeweils 7×10^4 leukämische und nicht-leukämische / *healthy control* MSCs für die Monokulturen als auch für die Kokulturen in 3 mL Nährmedium ausplattiert. Bei einer Konfluenz von 50-60% wurden bei den Kokulturansätzen jeweils 2×10^5 CD34⁺ AML- bzw. HSPC hinzugegeben, sowie zwei weitere Ansätze mit 2×10^5 Zellen für je eine hämatologisch gesunde und eine kranke CD34⁺-Monokultur als Kontrollgruppen begonnen. Für letztere Ansätze wurde DMEM^{low}++++ (s. 2.2.1) als Nährmedium verwendet.

Für die Etablierung der Mono- und Kokulturmodelle wurde sich in Bezug auf Zellzahl und Dauer des Experiments an Ragelle *et al.* und an Harris *et al.* orientiert [65, 66] und wie in 2.2.5 beschrieben angepasst. Eine, wie in Ragelle *et al.* beschriebene Kultivierungsdauer von 14 Tagen führte in der Etablierungsphase zu keinem signifikanten Anstieg der Proteinmenge. Des Weiteren kultivierten Harris *et al.* die Zellen nur 2 Tage bis zur Konfluenz, bevor sie sie mit Ascorbinsäure zum artifiziellen Enhancement der EZM-Produktion behandelten, was bei der vorliegenden Arbeit nicht vorgesehen war.

2.2.5 Durchführung, Vorbereitung für die Matrisomanalyse

Für die Analyse des Matrisoms wurden die Mono- und Kokulturkonstellationen nach drei (CD34⁺ Zellen) bzw. sechs (MSCs) Tagen in Kultur dezellularisiert, um ausschließlich die EZM darzustellen und die Inkorporation intrazellulärer Proteine in weiterführenden Analysen auszuschließen (Abb. 8).

Nach der Kultivierung wurde zunächst das Nährmedium einer jeweiligen Platte abgesaugt. Die adhärennten Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen und in 1 mL 0,5 % Triton-X-100 in 20 mM Ammoniumhydroxid 5 Minuten lysiert und lichtmikroskopisch kontrolliert. Hiernach wurde die Probe zweifach vorsichtig mit jeweils 1 mL *Hank's Balanced Salt Solution* mit Calcium und Magnesium (HBSS +/-) gewaschen, so wie einmal mit 1 mL reinstem H₂O aus Milli-Q Biocel. Nach den Waschsritten wurde die EZM unter Zugabe von 200 μ L PBS mit einem Zellschaber gelöst und bei -20 °C gelagert, bis weiterführende Analysen durchgeführt wurden.

Der Dezellularisationsversuch wurde eigens etabliert, ähnlich wie bei Ragelle *et al.* beschrieben [65].

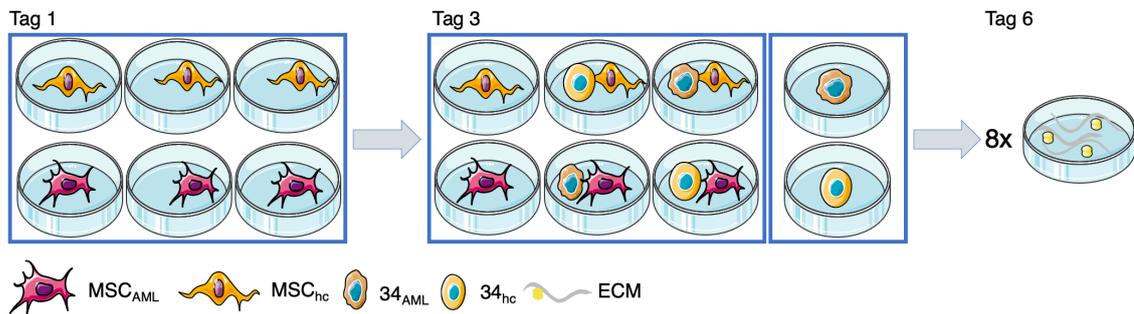


Abb. 8 – Schematischer Versuchsaufbau der Zellkulturkonstellationen

An Tag 1 wurden 6 mit Fibronectin/PBS beschichtete Wells mit je 7×10^4 MSC_{hc} bzw. MSC_{AML} belegt. Diese wurden neben der Monokultur an Tag 3 mit je 2×10^5 CD34⁺ AML- und hämatologisch gesunden HSPCs kokultiviert und Monokulturansätze für die CD34⁺ Zellen wurden begonnen. Alle Ansätze wurden an Tag 6 dezellularisiert, sodass pro Durchlauf 8 Proben mit aufgereinigter extrazellulärer Matrix (EZM) entstanden. Abbildung erstellt mit Elementen von Servier Medical Art [7].

2.3 Readout

2.3.1 Matrisomanalyse

Die dezellularisierten Proben wurden im Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mittels hochsensitiver massenspektrometrischer Analyse zur Detektion und Charakterisierung von Proteinen untersucht.

Die Aufarbeitung und anschließende Analyse wurde im BMFZ durchgeführt. Für die massenspektrometrische Analyse wurden Proben in einem ESI-Massenspektrometer (ThermoFisher Scientific, s. Tabelle 2) in drei Schritten ionisiert, nach ihrem Ladungsverhältnis eingestuft und detektiert. Massenspektrometrisch wurden dann sog. Abundanzen ermittelt, die als relative Parameter für die Expression eines jeweiligen Proteins interpretiert werden können. Anhand dieser konnten die verschiedenen Kokulturkonstellationen hinsichtlich ihrer Proteinexpression verglichen werden [67]. Die absolute Proteinexpression ist durch Vergleich von ermittelten Abundanzen der Massenspektrometrie nicht messbar. Aus den Abundanzen wurden durch u.s. Berechnungen statistische Signifikanzen von Unterschieden der Proteinexpression berechnet. Die Darstellung der sich signifikant zwischen den jeweiligen Bedingungen unterscheidenden Proteine erfolgt als Tabelle und als Volcano-Plot. Es folgt ein Trefferabgleich mit der von Shao *et al.* [68] definierten und unter MatrisomeDB

zugreifbaren Auflistung von Proteinen des Matrisoms und eine anschließende Einteilung in folgende Gruppenzugehörigkeiten zu den *GeneOntology terms* [69]:

GO-Gruppen mit Bezug zur EZM

- Proteine der supramolekularen Faserorganisation (*GeneOntology term* GO:0097435)
- Proteine der Organisation des Zytoskeletts (GO:0007010)
- Proteine der Zelladhäsion (GO:0007155)
- Proteine der Zellverbindungsorganisation (GO:0034330)
- Proteine der EZM-Organisation (GO:0030198)
- Proteine der Bildung von *Membranrafts* (GO:0045121)

GO-Gruppen mit Bezug zu wichtigen intrazellulären Stoffwechselwegen

- Proteine des Katabolismus von nukleobasenhaltigen Verbindungen (GO:0034655)
- Proteine des Nukleinsäuremetabolismus (GO:0090304)
- Proteine der Ribonukleoproteinbiosynthese (GO:0022613)
- Proteine des Proteinstoffwechsels (GO:0019538)
- Proteine der Chaperon-vermittelten Proteinfaltung (GO:0061077)

2.3.2 Quantifizierung der *Colony-Forming-Units*

Die CD34⁺-HSPC wurden im *Colony-Forming-Unit-Assay* (CFU) weiter analysiert.

CFUs beschreiben die Differenzierungsfähigkeit von hämatopoetischen Vorläuferzellen zur weißen und roten Zellreihe. Hierzu wurden die Zellen 14 Tage in einem semisoliden Medium mit Wachstumsfaktoren und Zytokinen inkubiert, woraufhin sie zu Kolonien der verschiedenen Zellreihen ausdifferenzierten. Es gingen, analog zur Hämatopoese (Abb. 3) aus einem myeloischen Progenitor, der CFU-GEMM-Kolonie (*CFU-Granulocyte, Erythroid, Macrophage, Megakaryocyte*), verschiedene zelllinienspezifischen Progenitoren hervor, die unterschieden werden konnten (Tabelle 6, Abb. 9) Danach wurden lichtmikroskopisch die Kolonien differenziert und quantifiziert.

Tabelle 6 – Kolonie-Arten des *Colony-Forming-Unit-Assays*

Kolonie	Zelllinie	Anmerkung
<i>BFU-E (Burst Forming Unit Erythroid)</i>	Erythrozyten	Hochproliferative, frühe Progenitoren

<i>CFU-E (CFU-Erythroid)</i>	Erythrozyten	Weniger proliferative, spätere Progenitoren
<i>CFU-GM (CFU-Granulocyte, Macrophage)</i>	Granulozyten, Makrophagen	
<i>CFU-G (CFU-Granulocyte)</i>	Granulozyten	
<i>CFU-M (CFU-Macrophage)</i>	Makrophagen	

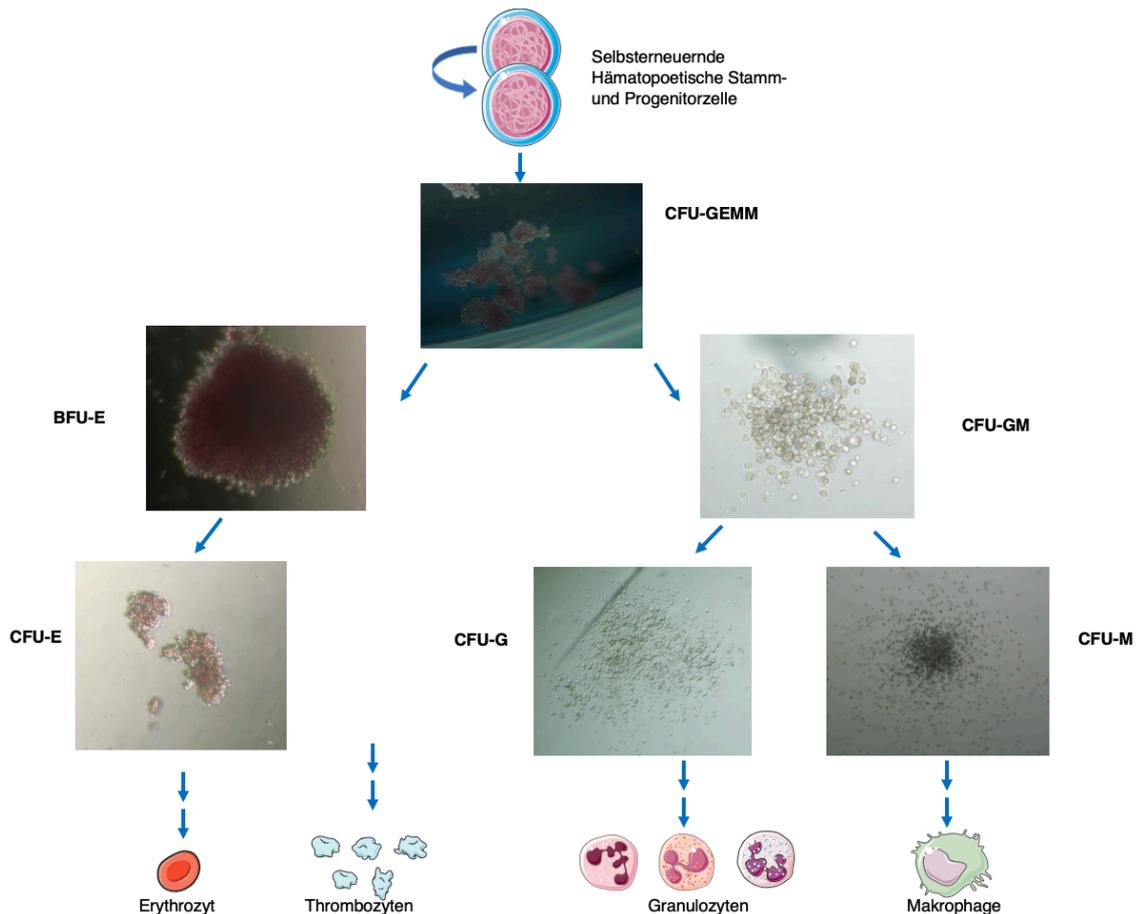


Abb. 9 - Übersicht über die Kolonie-Arten des *Colony-Forming-Unit-Assays*

Aus den sich selbst erneuernden HSPC gehen einzelne Kolonien an gemischten Granulozyten-, Erythrozyten-, Megakaryozyten- und Makrophagenkolonien, die CFU-GEMM hervor. Diese entwickeln sich entlang der erythrozytären Linie zunächst zu BFU-E, danach CFU-E. Als Vorläuferkolonien der Granulozyten und Makrophagen bilden sich zunächst CFU-GM, danach CFU-G bzw. CFU-M. Entlang der megakaryozytären Linie, aus der die Thrombozyten hervorgehen, bilden sich aus der CFU-GEMM keine von anderen unterscheidbaren Kolonien. Abbildung erstellt mit Servier Medical Art [7] und eigenen lichtmikroskopischen Aufnahmen (Axiovert 25, Zeiss, Jena 5x/0,12 Ph0).

Je nach Verhältnis der einzelnen Kolonien zueinander konnten Rückschlüsse auf die spezifische Differenzierungskapazität der HSPC gezogen werden, welche nicht nur im

Gesundheitsstatus (AML / hämatologisch gesunde Kontrolle) sondern auch in der Kulturkonstellation (mit MSC_{AML} / mit MSC_{hc} / Monokultur) verschieden waren.

Es wurden pro Ansatz 1000 Zellen in 1 mL eines semisoliden Methylcellulose-haltigen Gels (MethoCult #GF-H4434, Stemcell Technologies) aufgenommen. Im Anschluss wurde pro Ansatz ein Duplikatpaar in zwei Wells einer 24-Well-Platte (Cellstar) ausplattiert. Nach 14-tägiger Inkubation wurden die Kolonien dann phänotypisch eingeteilt und lichtmikroskopisch analysiert (s. oben).

Es wurde nicht nur die Differenzierungskapazität an sich untersucht, sondern insbesondere analysiert, welche Unterschiede sich bei den HSPCs nach Manipulation durch Kokultivierung mit sowohl hämatologisch gesunden als auch leukämischen MSCs zeigten. Die Ansätze wurden analog zum Zellkulturexperiment mit Ansätzen aus allen Konstellationen verschiedener Kokulturen durchgeführt. Da die MSCs adhärente Zellen sind und nicht zu myeloischen oder granulozytären Zellen ausdifferenzieren können, wurden lediglich HSPCs verwendet und die Experimente mit 6 statt mit 8 verschiedenen Proben durchgeführt (vgl. Abb. 7).

Die Ergebnisse der CFU-Assays wurden durch Varianzanalyse nach ANOVA mit nachgeschaltetem Tukey-Vergleichstest bestimmt.

2.3.3 Statistik

Die statistische Datenauswertung erfolgte mit den Softwareprogrammen Microsoft Excel (Microsoft, WA, USA) und Prism 8 (GraphPad Software, CA, USA).

Die Datensätze der Matrisomanalyse wurden durch den Kollegen Dr. Felix Bormann von *Bioinformatics.Expert* ausgewertet mit den Programmen *MaxQuant* 2.4.7.0 unter Verwendung von Standardparametern sowie dem R-Paket *artMS* (Version 1.20.0). Hierfür wurden die Rohdaten mit MaxQuant analysiert, um Spektren zu extrahieren und auf Peptide zurückzuschliessen. Es wurden LFQ-Intensitäten (*label free quantitation*, relative Quantifizierung von Proteinproben) und iBAQ-Werte (*intensity based absolute quantification*, absolute Quantifizierung der Proben nach Intensität) berechnet. In der Folge wurden die Daten von *MaxQuant* mittels *artMS* verarbeitet zur Berechnung der normalisierten Expressionswerte und der differentiellen Proteinexpression in verschiedenen Kokulturvergleichen.

Statistische Signifikanz wurde ab einem p-Wert von $< 0,05$ angenommen und mit „*“ dargestellt, statistische Hochsignifikanz ab $p < 0,01$ und mit „***“. Dargestellt sind die Daten als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes.

3 Ergebnisse

3.1 Colony-Forming-Unit-Assays

Parallel zu den Kokulturrexperimenten wurde in CFU-Assays die Ausdifferenzierungskapazität von HSPCs durch zweiwöchige Kultivierung in einem Differenzierungsmedium und anschließende Mikroskopie beurteilt.

In den CFUs zeigte sich, dass sich sowohl in der Gesamtmenge aller Kolonien als auch in den Unterkategorien der „roten“, also erythroiden, sowie der „weißen“ granulozytären Zellreihe die hämatologisch gesunden, monokultivierten HSPCs (34_{hc} Mono) am stärksten ausdifferenzierten (Abb. 10). Im Vergleich zu den monokultivierten 34_{hc} zeigten die 34_{AML} -HSPC aus Monokulturen beispielhaft ein signifikant schlechteres Differenzierungspotential für alle Kolonien (32,6 vs. 3,5 Kolonien, $p < 0,001$). Es zeigte sich lediglich in einem von vier Ansätzen der monokultivierten 34_{AML} überhaupt eine Koloniebildung.

Auch die durch Kokulturen manipulierte 34_{AML} -HSPC waren signifikant weniger bis überhaupt nicht fähig, Kolonien zu bilden. So zeigte die $MSC_{AML}/34_{AML}$ ein signifikant vermindertes Differenzierungspotential für weiße Kolonien im Vergleich zur $MSC_{AML}/34_{hc}$ (0,5 vs. 7 weiße Kolonien, $p < 0,05$).

In allen Vergleichen zeigte sich ein signifikant vermindertes Differenzierungspotential der 34_{hc} durch Hinzugabe von MSC_{AML} .

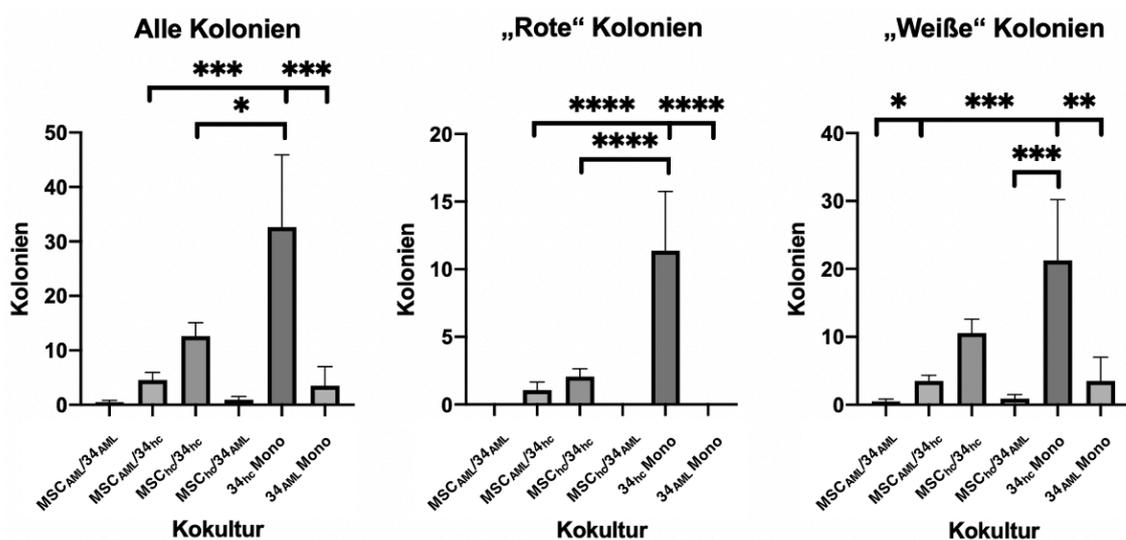


Abb. 10 - Ausdifferenzierungskapazität von Mono- und Kokulturen im Colony-Forming-Unit-Assay

Die hämatologisch gesunden monokultivierten HSPC zeigten in allen Vergleichen die größte Kapazität zur Ausdifferenzierung in Zellkolonien. Leukämische HSPC konnten sowohl in der Mono- als auch in der Kokultur wenig bis keine Kolonien hervorbringen. Dargestellt sind

Mittelwerte \pm SEM. Signifikanzen: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$.
Kokulturen $n = 8$, Monokulturen $n = 4$.

3.2 Massenspektrometrische Analyse der extrazellulären Matrix

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der in 2.3.1 beschriebenen massenspektrometrischen Analyse der extrazellulären Matrix im Rahmen der Genese einer AML in einem *ex vivo*-Modell. In diesem Rahmen wurden die erhobenen Daten mit bioinformatischer Hilfe ausgewertet und interpretiert.

Auch wenn die Vergleiche der Monokulturen der gesunden und leukämisch veränderten MSC bzw. HSPC aufgrund der physiologisch gegebenen Interaktionen zwischen MSC und HSPC bei der Interpretation einer entsprechenden Einschränkung unterliegen, wurde zuerst durch den Vergleich dieser Konstellationen die Annahme geprüft, ob bereits grundsätzliche Matrisomveränderungen in den entsprechenden Zellarten beobachtet werden konnten, die auch unter den artifiziellen Bedingungen einer *ex-vivo*-Monokultur Bestand haben.

Im Weiteren wurde durch die Kokultivierung von HSPC und MSC von sowohl leukämischen (MSC_{AML} und 34_{AML}) als auch hämatoonkologisch gesunden Patientinnen und Patienten (MSC_{hc} und 34_{hc}) in verschiedenen Konstellationen verschiedene Phasen der Leukämogenese abgebildet (Abb. 7). Hierbei stehen die drei Kokulturbedingungen $MSC_{hc}/34_{hc}$, $MSC_{hc}/34_{AML}$ und $MSC_{AML}/34_{AML}$ modellhaft für ein gesundes Knochenmarkmilieu, die Beeinflussung nicht-transformierter MSC durch leukämische HSPC und schließlich für ein gänzlich transformiertes Knochenmarkmilieu.

Auf Grundlage der Ziele dieser Arbeit werden dabei folgende Vergleiche beschrieben:

- A. Vergleich der hämatologisch gesunden Kokultur $MSC_{hc}/34_{hc}$ mit der gesund-leukämischen Mischkultur $MSC_{hc}/34_{AML}$
- B. Vergleich der gesund-leukämischen Mischkultur $MSC_{hc}/34_{AML}$ mit der leukämischen Kokultur $MSC_{AML}/34_{AML}$
- C. Vergleich der hämatologisch gesunden Kokultur $MSC_{hc}/34_{hc}$ mit der leukämischen Kokultur $MSC_{AML}/34_{AML}$

In einer weiteren Auswertung wurde die Proteine ermittelt, die durchgehend in beiden Analysen, die modellhaft den vollausgeprägten leukämischen Zustand (Kokultur $MSC_{AML}/34_{AML}$) als Vergleichspartner betrafen, exprimiert waren.

Neben der tabellarischen Auflistung der signifikant in ihren Abundanzen verschiedenen Proteine wurden zur visuellen Darstellung der Ergebnisse Volcano-Plot-Darstellungen verwendet. Für diese Darstellungsweise wurden der dekadische Logarithmus des ermittelten p-Wertes und der binäre Logarithmus des *fold change* eines jeden Proteins gegeneinander aufgetragen. Der *fold change* berechnet sich aus der Division der Mittelwerte massenspektrometrisch erfasster Abundanzen. Die sich signifikant unterscheidenden Proteine ($p > 0,05$) werden dabei als blau markierte Datenpunkte, die nicht signifikant erhöht als graue Datenpunkte dargestellt. Ein positiver binärer Logarithmus des *fold change* (\log_2FC) bedeutet eine höhere Expression in der zweiten Vergleichsbedingung (in der Regel die stärker transformierte Bedingung), ein negativer \log_2FC eine höhere Expression in der ersten Bedingung (in der Regel die weniger transformierte Bedingung).

Zu jedem Vergleich erfolgt eine Analyse der Zugehörigkeit der entsprechenden Proteine zu Funktionsklassen und extrazellulären Netzwerken. Hierzu wurden die detektierten Proteine hinsichtlich ihrer Funktionsweise und Eigenschaften mit der MatrisomeDB abgeglichen [68].

Aufgrund der verwendeten Methode zur Gewinnung der unlöslichen Bestandteile der extrazellulären Matrix (vgl. 2.2.5), ist zu erwarten, dass auch Reste sehr stark exprimierter intrazellulärer Proteine detektiert werden. Diese werde im Folgenden der Vollständigkeit halber bei vorhandener statistischer Signifikanz aufgeführt, aber nicht für die sich anschließenden Analysen der Zugehörigkeit der detektierten Proteine zu Netzwerken und Systemen des Matrisoms herangezogen. Gleichzeitig stellt das hier analysierte Proteinspektrum methodenbedingt kein vollständiges Matrisom dar, sondern besteht aus den unter den jeweiligen Bedingungen am stärksten exprimierten Proteinen.

3.2.1 Vergleich der hämatologisch gesunden und der leukämischen MSC-Monokultur

Beim Vergleich der Monokulturen von gesunden Spenderinnen und Spendern gewonnenen MSC (MSC_{hc}) mit den aus AML-Patientinnen und Patienten gewonnenen MSC (MSC_{AML}) wiesen nur wenige der massenspektrometrisch detektierten Proteine eine signifikant differenzielle Expression auf (Abb. 11, blaue Datenpunkte). In einer Volcano Plot Darstellung zeigen sich die blau markierten als die signifikant erhöhten Proteine, alle Datenpunkte unterhalb der Grenze von $p < 0,05$ sind nicht signifikant erhöht und in grau hinterlegt. Ein positiver \log_2FC bedeutet in diesem Vergleich eine Expression in der MSC_{AML} -Monokultur, ein negativer \log_2FC eine Expression in der MSC_{hc} .

MSC_{hc}-Monokultur vs. MSC_{AML}-Monokultur

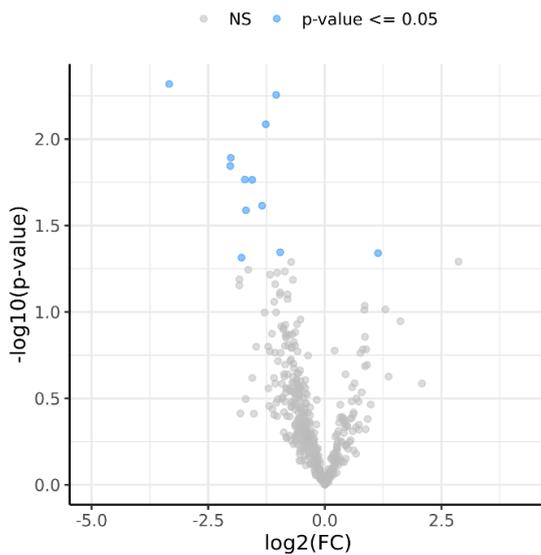


Abb. 11 - Volcano Plot differenziell exprimierter Proteine in leukämischer und hämatologisch gesunder MSC-Monokultur

Die meisten Proteine waren in der MSC_{hc}-Monokultur im Vergleich zur MSC_{AML}-Monokultur nicht signifikant differenziell exprimiert. Von den signifikant regulierten Proteinen zeigten 11 von 12 in der MSC_{hc}-Monokultur eine höhere Expression, entsprechend einem negativen log₂FC; mit positiven log₂FC (d.h. höhere Expression in MSC_{AML}) und trotzdem oberhalb der Signifikanzgrenze zeigte sich lediglich ein Datenpunkt.

						Funktion oder Zugehörigkeit zu zellulären Netzwerken												
						Proteine mit Verbindungen zur extrazellulären Matrix					Andere Funktionen							
Zellkultur	Protein	Proteinname	Gen	log ₂ FC	p-Wert	MatrixDB	Supramolekulare Protein-Assemblierung (GO:0071439)	Organisation des Zytoskeletts (GO:0071010)	Zelladhäsion (GO:0071559)	Zellverbindungen (GO:0034330)	EZM Organisation (GO:0030198)	Membrane raft (GO:0045121)	Abbau von extrazellulären Verbindungen (GO:0034655)	Nukleolus-Metabolismus (GO:0096304)	Ribonukleoproteinbiosynthese (GO:0025113)	Proteinstoffwechsel (GO:0019538)	Chaperonabhängige Proteinstoffwechslung (GO:0051077)	
MSC _{AML} Mono	P48061	C-X-C motif chemokine ligand 12	CXCL12	1,14	0,046	MatrixDB-associated - Secreted Factors												
MSC _{hc} Mono	O00299	chloride intracellular channel 1	CLIC1	-0,96	0,045													
	Q95084	serine protease 23	PRSS23	-1,04	0,006													
	P50991	chaperonin containing TCP1 subunit 4	CCT4	-1,26	0,008													
	P51570	galactokinase 1	GALK1	-1,35	0,024													
	P27658	collagen type VIII alpha 1 chain	COL8A1	-1,56	0,017	Core matrixome - Collagens												
	P68366	tubulin alpha 4a	TUBA4A	-1,59	0,026													
	P06737	glycogen phosphorylase L	PYGL	-1,71	0,017													
	P62995	transformer 2 beta homolog	TRA2B	-1,79	0,049													
	P16104	H2A.X variant histone	H2AX	-2,02	0,013													
	Q71U36	tubulin alpha 1a	TUBA1A	-2,03	0,014													
P98095	fibulin 2	FBLN2	-3,34	0,005	Core matrixome - ECM Glycoproteins													

Abb. 12 – Netzwerkzugehörigkeit signifikant unter- oder überrepräsentierter Proteine in leukämischer und hämatologisch gesunder MSC-Monokultur

Im Vergleich der monokultivierten MSC zeigten sich 11 Proteine bei der MSC_{hc} und 1 Protein bei der MSC_{AML} signifikant differenziell reguliert. Hiervon wiesen insgesamt 6 Proteine einen bekannten Bezug zu einem EZM-Netzwerk auf (fettgedruckt).

Im Signifikanzniveau $p < 0,05$ wurden 12 Proteine signifikant in einer der Monokulturen vermehrt gebildet, davon 11 in der MSC_{hc} (Abb. 12); von diesen wiesen 6 Proteine einen bekannten Bezug zur EZM auf. So waren unter anderem Fibulin-2 (FBLN2), Tubulin Alpha 1A (TUBA1A) sowie das Kollagen COL8A1 seitens der hämatologisch gesunden MSCs vermehrt repräsentiert, während die leukämischen MSCs in der Monokultur signifikant mehr C-X-C-Motif Chemokin-Ligand 12 (CXCL12) ausschütteten.

Zusammenfassend zeigt dieser Vergleich, dass unter den Bedingungen der Monokultur nur wenige differenziell exprimierte Proteine identifiziert werden konnten, von denen nur

ein kleiner Anteil eine bekannte Verbindung zur EZM aufweist; die überwiegende Anzahl dieser Proteine wurde von den hämatologisch gesunden MSC stärker exprimiert, was auf eine mögliche Funktion im Rahmen der Aufrechterhaltung der physiologischen Bedingungen in der Knochenmarksnische hinweisen könnte.

3.2.2 Vergleich hämatologisch gesunder und leukämischer HSPC-Monokultur

Im Vergleich der hämatologisch gesunden mit den leukämischen HSPC zeigten sich 33 Proteine von der 34_{hc} signifikant überrepräsentiert, während in der 34_{AML} 5 Proteine überrepräsentiert vorlagen (Abb. 13).

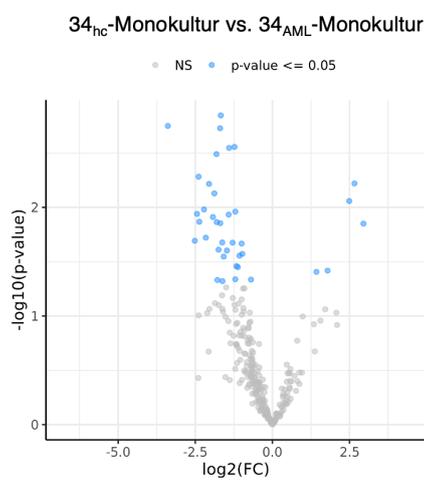


Abb. 13 - Volcano Plot dysregulierter Proteine im Vergleich der 34_{hc} mit der 34_{AML}

Es zeigten sich 33 Proteine in der 34_{hc} signifikant erhöht (negative log₂FC und oberhalb der Signifikanzgrenze p < 0,05). Mit positivem log₂FC repräsentierte die 34_{AML} insgesamt nur 5 Proteine, die signifikant mehr gebildet wurden als in der Vergleichskultur

Unter den detektierten Proteinen der 34_{hc} hatten 17 nachweisbare Zugehörigkeiten zu Netzwerken der EZM (Abb. 14).

		Funktion oder Zugehörigkeit zu zellulären Netzwerken														
		Proteine mit Verbindungen zur extrazellulären Matrix					Andere Funktionen									
Zellkultur	Protein	Proteinname	Gen	log2FC	p-Wert	MatriconDI	Syngammodulare Zellkompression (GO:0030246)	Chaperonin-ähnliche Zyklusaktin (GO:0070710)	Zusammenbau des Zellinneren (GO:0030230)	ECM-Organisation (GO:0030188)	Membranerf. (GO:0045121)	Albumin von nukleobindenden Proteinen (GO:0030246)	Nukleobind. (GO:0030246)	Metabolismus (GO:0030246)	Ribonukleoprotein-Problemlabelismus (GO:0030246)	Chaperon-abhängige (GO:0030246)
34AML Mono	Q07955	Serine And Arginine Rich Splicing Factor 1	SRSF1	2,95	0,014											
	P01024	Komplementkomponente C3	C3	2,66	0,006											
	P05743	Keratin 18	KRT18	2,49	0,009											
	Q8U929	Pepsinogen/lysozymase E	RPE	1,79	0,038											
	P49207	Ribosomal Protein L34	RPL34	1,43	0,039											
34hc Mono	P28641	eukaryotic translation elongation factor 1 gamma	EEF1G	-0,69	0,046											
	P04004	Vitreonectin	VTN	-0,98	0,027											
	P00238	Heat Shock Protein 90 Alpha	HSP90A1	-1	0,022											
	Q00299	Chloride Intracellular Channel 1	CLIC1	-1,07	0,028											
	P22626	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	HNRNPA2B1	-1,12	0,035											
	P50991	chaperonin containing TCP1 subunit 4	CCT4	-1,17	0,035											
	P62913	60S ribosomal protein L11	RPL11	-1,2	0,011											
	P12111	Collagen	COL5A3	-1,2	0,046											
	Q15366	poly(C) binding protein 2	PCBP2	-1,23	0,003											
	O75083	WD Repeat Domain 1	WDR1	-1,29	0,021											
	P17056	heat shock protein	HSP96	-1,4	0,003											
	P52907	Capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 1	CAPZA1	-1,42	0,012											
	P12109	Collagen	COL6A1	-1,48	0,025											
	Q15505	microtubule associated protein RP/EB family member 2	MAPRE2	-1,58	0,028											
	Q86UX7	FERM Domain Containing Kindin 3	FERMT3	-1,62	0,048											
	Q9NRW1	member RAS oncogene family [(human)]	RASGE1	-1,63	0,021											
	P14625	heat shock protein	HSP90B1	-1,67	0,001											
	Q00839	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein	HNRNPU	-1,69	0,014											
	P11021	heat shock protein family A (Hsp70) member 5	HSPA5	-1,7	0,002											
	P35579	Myosin Heavy Chain 9	MYH9	-1,75	0,025											
	Q92522	Linker Histone	H1-10	-1,78	0,047											
	P17844	DEAD-box helicase 5	DDX5	-1,8	0,014											
	P12236	schleife carrier family 25 member 6	SLC25A6	-1,81	0,003											
	P06576	Mitochondrial ATP synthase	ATP5F1B	-1,88	0,007											
	Q15385	Poly(C) Binding Protein 1	PCBP1	-1,93	0,012											
	Q02388	Collagen	COL1A1	-2,05	0,006											
	P31146	Coronin 1A	CORO1A	-2,16	0,019											
P21233	Filamin A	FLNA	-2,22	0,010												
P84098	60S ribosomal protein L19	RPL19	-2,37	0,014												
P20705	ATP synthase F1 subunit alpha	ATP5F1A	-2,39	0,005												
Q15144	Actin Related Protein 2/3 Complex Subunit 2	ARPC2	-2,44	0,011												
O75390	citrate synthase	CS	-2,52	0,020												
P19105	myosin light chain 12A	MYL12A	-3,29	0,002												

Abb. 14 - Übersicht signifikant differenziell regulierter Proteine im Vergleich 34_{hc} mit 34_{AML}

Im Vergleich der monokultivierten HSPC zeigten sich 33 Proteine bei der 34_{hc} und 5 Proteine bei der 34_{AML} signifikant differenziell reguliert. Insgesamt 19 Proteine (fettgedruckt) zeigten nach dieser Auswertung einen Bezug zur EZM (2 in der hämatologisch kranken, 17 in der hämatologisch gesunden Kultur).

Diese Ergebnisse zeigen, dass es – zumindest in dem hier verwendeten Modell – größere Unterschiede zwischen malignen und hämatologisch gesunden HSPC zu geben scheint als bei den entsprechenden MSC im vorhergehenden Vergleich der Fall war. Entsprechend konnten auch mehr Proteine mit Bezug zur EZM identifiziert werden. Auch in diesem Vergleich wird der größere Anteil der signifikant unterschiedlichen Proteine durch die hämatologisch gesunden Zellen exprimiert. Es ist keine Überlappung mit den im vorhergehenden Vergleich gefundenen Proteinen zu erkennen, was auf eine komplementäre Protein-Produktion dieser Zellarten hindeuten könnte.

3.2.3 Vergleich der hämatologisch gesunden Kokultur MSC_{hc}/34_{hc} mit der Kokultur aus gesunden MSC und leukämischen HSPC (MSC_{hc}/34_{AML})

Als nächstes wurde die Kokultur MSC_{hc}/34_{hc} mit der Kokultur MSC_{hc}/34_{AML} verglichen. Wie bereits in Kapitel 1.6 beschrieben, stehen diese beiden Kokulturen modellhaft für ein hämatologisch gesundes Milieu einerseits und – unter der Annahme, dass die AML von der HSPC ausgeht – für den ersten Schritt in der Leukämogenese.

In diesem Vergleich zeigten sich wie schon im ersten Vergleich der MSC-Monokulturen weiter nur wenige Proteine signifikant differenziell repräsentiert. Der Volcano Plot zeigt, dass insgesamt 7 Proteine in der MSC_{hc}/34_{hc} signifikant differenziell überrepräsentiert waren, in der MSC_{hc}/34_{AML} nur eines (Abb. 15).

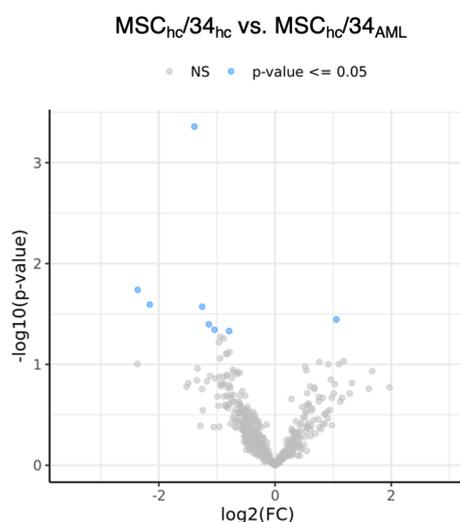


Abb. 15 - Volcano Plot differenziell regulierter Proteine im Vergleich der MSC_{hc}/34_{hc} mit der MSC_{hc}/34_{AML}

Es zeigten sich 7 Proteine in der MSC_{hc}/34_{hc} signifikant erhöht (negativer log₂FC). Die MSC_{hc}/34_{AML} wies insgesamt nur ein Protein auf, das signifikant mehr gebildet wurden als in der MSC_{hc}/34_{hc} (positiver log₂FC).

Bei der genaueren Analyse zeigte sich, dass 3 der 7 in der MSC_{hc}/34_{hc} signifikant höher exprimierten Proteine (PRG2, ACTN4, HSP90B1) eine Netzwerkzugehörigkeit zur EZM zeigten (Abb.16). In der MSC_{hc}/34_{AML} war lediglich das *SET nuclear proto oncogene* signifikant überrepräsentiert.

Funktion oder Zugehörigkeit zu zellulären Netzwerken								
Zellkultur	Protein	Proteinname	Gen	log2FC p-Wert	Proteine mit Verbindungen zur extrazellulären Matrix		Andere Funktionen	
					Matrix	Andere Funktionen	Matrix	Andere Funktionen
MSC _{hc} -34 _{AML}	Q01105	SET nuclear proto-oncogene	SET	1,05 0,036				
MSC _{hc} -34 _{hc}	P01857	immunoglobulin heavy constant gamma 1	IGHG1	-0,79 0,047				
	P14625	heat shock protein 90 beta family member 1	HSP90B1	-1,04 0,045				
	D43707	actin alpha 4	ACTN4	-1,14 0,040				
	P27635	ribosomal protein L10	RPL10	-1,25 0,027				
	Q15366	poly(C) binding protein 2	PCBP2	-1,39 0,000	Core matrisome - Proteoglycans			
P13127	proteoglycan 2, biglycan major basic protein	PRG2	-2,16 0,026					
P04424	argininosuccinate lyase	ASL	-2,36 0,018					

Abb.16 – Netzwerkzugehörigkeit signifikant differenziell regulierter Proteine im Vergleich der Kokulturen MSC_{hc}/34_{hc} mit MSC_{hc}/34_{AML}

In der Kokultur MSC_{hc} mit 34_{hc} zeigten sich 7 Proteine signifikant erhöht exprimiert, in der Kokultur von MSC_{hc} mit 34_{AML} lag nur ein Protein signifikant erhöht exprimiert vor. Insgesamt 3 Proteine (fettgedruckt, alle in der hämatologisch gesunden Kultur) zeigten nach dieser Auswertung einen Bezug zur EZM.

Auch hier zeigte sich, dass die hämatologisch gesunde Bedingung die größere Anzahl an differenziell überexprimierten Proteinen aufwies. Ausgehend von den Vergleichen der Monokulturen wäre durch die Änderung der HSPC-Komponente eine höhere Anzahl differenziert exprimierter Proteine zu erwarten gewesen.

3.2.4 Vergleich der leukämischen Kokultur MSC_{AML}/34_{AML} mit der Kokultur aus gesunden MSC und leukämischen HSPC (MSC_{hc}/34_{AML})

Im Folgenden wurde verglichen, wie sich die Kokultur MSC_{hc}/34_{AML} von der vollständig leukämischen Situation, repräsentiert durch die Kokultur MSC_{AML}/34_{AML}, unterschied. Modellhaft wurde so der bereits zuvor verwendete Zwischenschritt in der Leukämogenese mit der vollausgeprägten, beide Zellarten betreffenden Leukämie verglichen.

Zunächst fiel im Volcano Plot auf, dass in diesem Kokulturvedgleich insgesamt 78 und somit wesentlich mehr Proteine signifikant differenziell reguliert vorlagen als in den vorangegangenen Zellkulturvergleichen. Von diesen 78 wurden mit 74 detektierten Proteinen ca. 95% von der MSC_{AML}/34_{AML} vermehrt produziert (Abb. 17). Dies steht im Gegensatz zu den vorhergehenden Analysen, bei denen immer die hämatologisch gesunde Kulturbedingung die höhere Anzahl an differenziell exprimierten Proteinen aufwies.

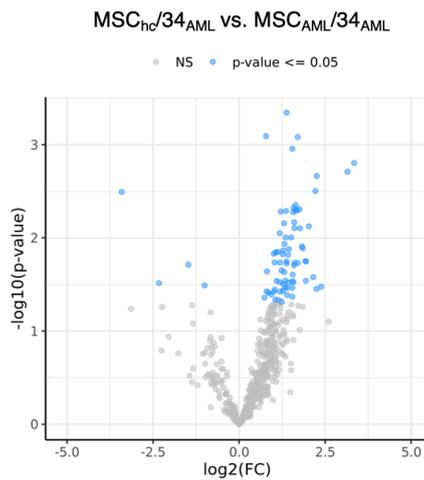


Abb. 17 – Volcano Plot differenziell exprimierter Proteine aus MSC_{hc}/34_{AML} und MSC_{AML}/34_{AML}

74 und damit 95% der Proteine, die signifikant überrepräsentiert waren, stammten von der Kokultur MSC_{AML}/ 34_{AML} (positive log₂FC-Werte), nur 4 Proteine waren in der Kokultur MSC_{hc}/ 34_{AML} überrepräsentiert. Auch unterhalb der Signifikanzgrenze (p < 0,05) ergab sich ein ähnliches Bild.

Die weitergehende Analyse zeigte, dass ca. 57% der in der Kokultur MSC_{AML}/34_{AML} im Vergleich zur MSC_{hc}/34_{AML} signifikant höher exprimierten Proteine einen Bezug zur EZM aufwiesen (Abb. 18).

		Funktion oder Zugehörigkeit zu zellulären Netzwerken														
		Proteine mit Verbindungen zur extrazellulären Matrix					Andere Funktionen									
Zellkultur	Protein	Proteinname	Gen	log2FC	p-Wert	MatrisomeDB	Bunarmolekulare Interaktion (EC00074,52)	Organisations Zyklen (EC00070,0)	Zellverbindungen (EC00071,55)	EZM Organisation (EC00081,33)	Membranraufbau (EC00048,12,1)	Ablau von Verbindungen (EC00041,05)	Molekulare Interaktion (EC00090,0,4)	Ribonukleoprotein (EC00090,0,1)	Proteinmodifikation (EC00110,3)	Chaperone-fähige Proteine (EC00110,3)
	P68032	actin alpha cardiac muscle 1	ACTC1	3,34	0,002											
	P50454	serpin family H member 1	SERPANH1	3,15	0,002	Matrisome-associated - ECM Regulators										
	Q14980	nuclear mitotic apparatus protein 1	NUMA1	2,38	0,033											
	Q14103	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D	HNRNP0	2,26	0,002											
	P26421	H3 clustered histone 1	HSC1	2,25	0,033											
	Q6NZ2	caveolin associated protein 1	CAVIN1	2,22	0,003											
	P12814	actinin alpha 1	ACTN1	2,16	0,028											
	P63261	actin gamma 1	ACTG1	2,03	0,068											
	Q00469	procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	PLOD2	1,94	0,018	Matrisome-associated - ECM Regulators										
	P11924	desmoglein	DSP	1,94	0,029											
	Q71U36	tubulin alpha 1a	TUBA1A	1,93	0,018											
	P60709	actin beta	ACTB	1,88	0,013											
	P62753	ribosomal protein S6	RPS6	1,82	0,012											
	Q8BSJ8	extended synaptotagmin 1	ESYT1	1,77	0,008											
	Q43707	actinin alpha 4	ACTN4	1,76	0,005											
	P09651	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	HNRNPA1	1,71	0,019											
	P02461	collagen type III alpha 1 chain	COL3A1	1,70	0,001											
	P07437	tubulin beta class 1	TUBB	1,69	0,005											
	P13674	prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 1	PH4A1	1,64	0,004	Matrisome-associated - ECM Regulators										
	P06872	collagen type IV alpha 2 chain	COL4A2	1,64	0,005	Matrisome-associated - Collagens										
	P02444	receptor for activated C kinase 1	RACK1	1,61	0,018											
	P50914	ribosomal protein L14	RPL14	1,61	0,008											
	P22866	peptidylprolyl isomerase B	PPIB	1,60	0,007											
	P11047	laminin subunit gamma 1	LAMC1	1,59	0,020	Core matrisome - ECM Glycoproteins										
	P18124	ribosomal protein L7	RPL7	1,58	0,005											
	Q15143	actin related protein 2/3 complex subunit 1B	ARPC1B	1,58	0,020											
	P14625	heat shock protein 90 beta family member 1	HSP90B1	1,57	0,005											
	Q02680	DNA topoisomerase II beta	TOP2B	1,56	0,025											
	P06748	nucleophosmin 1	NPM1	1,55	0,034											
	Q914K0	lysyl oxidase like 2	LOXL2	1,55	0,001	Matrisome-associated - ECM Regulators										
	P05850	myosin light chain 8	MYL8	1,55	0,029											
	P35579	myosin heavy chain 9	MYH9	1,55	0,043											
	Q01516	cyclase associated actin cytoskeleton regulatory protein 1	CAP1	1,51	0,010											
	P04505	glyceroldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	1,45	0,013											
	P50284	hydroxacyl-CoA dehydrogenase trifunctional multienzyme complex subunit beta	HADHB	1,44	0,030											
	Q15019	sepin-2	SEPT2	1,42	0,015											
	P08648	integrin subunit alpha 5	ITGA5	1,40	0,034											
	Q14192	four and a half LIM domains 2	FHL2	1,39	0,041											
	Q15395	poly(ADP-ribose) polymerase 2	PCBP2	1,38	0,000											
	P62987	ubiquitin A-S2 residue ribosomal protein fusion product 1	UBA52	1,38	0,018											
	P61313	ribosomal protein L15	RPL15	1,37	0,019											
	P02691	chaperenin containing TCP1 subunit 4	CCT14	1,37	0,005											
	Q75369	filamin B	FLNB	1,35	0,010											
	P07237	prolyl 4-hydroxylase subunit beta	PH4B	1,35	0,029											
	P23386	ribosomal protein S3	RPS3	1,34	0,034											
	P46821	microtubule associated protein 1B	MAP1B	1,32	0,012											
	Q17274	staphylococcal nuclease and factor domain containing 1	SNF1	1,31	0,020											
	P26038	moesin	MSN	1,31	0,007											
	P30101	protein disulfide isomerase family A member 3	PDI3	1,28	0,014											
	P46940	H2 med1 containing GTPase activating protein 1	GGA1	1,28	0,031											
	Q9H1J7	Wnt family member 5B	WNT5B	1,28	0,037	Matrisome-associated - Secreted Factors										
	P27025	ribosomal protein L10	RPL10	1,26	0,015											
	P62081	ribosomal protein S7	RPS7	1,24	0,049											
	P46778	ribosomal protein L21	RPL21	1,23	0,022											
	P05565	integrin subunit beta 1	ITGB1	1,21	0,005											
	P31843	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1	HNRNPH1	1,19	0,038											
	Q91698	chloride intracellular channel 4	CLIC4	1,19	0,020											
	Q43795	myosin IIb	MYO1B	1,18	0,018											
	Q00159	myosin IC	MYO1C	1,18	0,009											
	P06733	enolase 1	ENO1	1,14	0,046											
	P13639	eukaryotic translation elongation factor 2	EEF2	1,13	0,014											
	P08865	ribosomal protein SA	RPSA	1,09	0,029											
	P18609	phosphoglycerate kinase 1	PGKM1	1,07	0,014											
	Q8BY76	angiotensin like 4	ANGPTL4	1,05	0,046	Matrisome-associated - Secreted Factors										
	P05388	lactate dehydrogenase A	LDHA	1,04	0,026											
	P08238	heat shock protein 90 alpha family class B member 1	HSP90AB1	1,03	0,018											
	P78371	chaperenin containing TCP1 subunit 2	CCT2	1,01	0,038											
	Q95957	EGF-containing fibulin extracellular matrix protein 2	EFEMP2	0,97	0,015	Core matrisome - ECM Glycoproteins										
	Q92743	Hra serine peptidase 1	HTRA1	0,93	0,040	Matrisome-associated - ECM Regulators										
	P22626	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2B1	HNRNPA2B1	0,89	0,039											
	P26641	eukaryotic translation elongation factor 1 gamma	EEF1G	0,88	0,023											
	P02462	collagen type IV alpha 1 chain	COL4A1	0,80	0,037	Core matrisome - Collagens										
	P15811	versican	VCAN	0,78	0,001	Core matrisome - Proteoglycans										
	Q9V6C2	elastin microfibril interfacer 1	EMILIN1	0,73	0,044	Core matrisome - ECM Glycoproteins										
	Q01105	SET nuclear proto-oncogene	SET	-1,00	0,032											
	Q15247	high mobility group box 3	HMG3	-1,48	0,018											
	P98095	fibulin 2	FBLN2	-2,93	0,031	Core matrisome - ECM Glycoproteins										
	Q86UK5	EVC ciliary complex subunit 2	EVC2	-3,41	0,003											

Abb. 18 - Netzwerkzugehörigkeit signifikant differenziell repräsentierter Proteine in der Kokultur MSC_{AML}/34_{AML} im Vergleich zur Kokultur MSC_{hc}/34_{AML}

Es zeigten sich in der Kokultur MSC_{AML}/34_{AML} 74 Proteine signifikant im Vergleich zur MSC_{hc}/34_{AML} überrepräsentiert, von diesen wiesen 42 Proteine (57%) einen bekannten Bezug zur

EZM auf (fettgedruckt). In der MSC_{hc}/34_{AML} zeigten sich 4 Proteine signifikant überrepräsentiert, davon eines mit bekanntem Bezug zur EZM (fettgedruckt).

Aus Übersichtsgründen sollen hier einige Proteine hervorgehoben werden, die für den weiteren Inhalt dieser Arbeit relevant sind. So produzierte die MSC_{hc}/34_{AML} signifikant mehr Fibulin-2, in der MSC_{AML}/34_{AML} zeigte sich eine vermehrte Expression von u.a. Actin Beta und Gamma (ACTB, ACTG1), EMILIN-1, EGF-containing fibulin extracellular matrix Protein 2 (EFEMP2), Kollagene (COL3A1, -4A1, -4A2), LOXL2, Lactat-Dehydrogenase (LDHA), Nucleophosmin 1 (NPM1), ribosomale Proteine (RPL7, -10, -14, -15, -21, RPS3, -6, -7, -A), Serinprotease HTRA1 (HTRA1), Versican (VCAN).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Analyse, dass erst die Interaktion von leukämischen HSPC mit leukämischen MSC eine numerisch substanziell gesteigerte Expression von Proteinen zur Folge hat. Interessanterweise ist hier der Anteil an Proteinen mit Bezug zur EZM im Vergleich zu den vorhergehenden Versuchen sehr hoch.

3.2.5 Vergleich der hämatologisch gesunden Kokultur MSC_{hc}/34_{hc} mit der leukämischen Kokultur MSC_{AML}/34_{AML}

Im abschließenden Vergleich der Matrisomanalyse sollte die noch vollständig hämatologisch gesunde Kokultur MSC_{hc}/34_{hc} mit der vollständig transformierten „in-vitro-Leukämie“, der MSC_{AML}/34_{AML} verglichen werden.

Auch in dieser Analyse waren weitaus mehr Proteine in der „voll-leukämischen“ Kokultur zu beobachten (Abb.19). Von 57 gefundenen signifikant differenziell exprimierten Proteinen waren 48 vermehrt im leukämischen Milieu zu finden (84,2%), während die MSC_{hc}/34_{hc} lediglich 9 signifikante Proteine hervorbrachte.

wiesen 26 Proteine (54%) einen bekannten Bezug zur EZM auf (fettgedruckt), bei der Kokultur MSC_{hc}/34_{hc} waren es 3.

3.2.6 In der leukämischen Kokultur durchgehend überrepräsentierte Proteine

Von den 48 Proteinen, die in der MSC_{AML}/34_{AML} im Vergleich zur MSC_{hc}/34_{hc} signifikant waren, waren 27 bereits in der MSC_{AML}/34_{AML} im vorangegangenen Vergleich mit der MSC_{hc}/34_{AML} signifikant erhöht gewesen (Abb. 21).

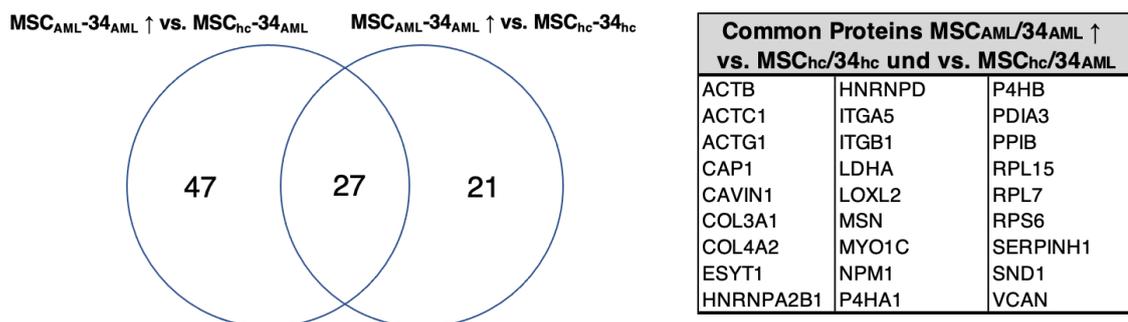


Abb. 21 - Venn Diagramm der signifikant überrepräsentierten Proteine in der Kokultur MSC_{AML}/34_{AML} im Vergleich mit den beiden Kokulturen MSC_{hc}/34_{hc} und MSC_{hc}/34_{AML}

Im Vergleich mit der MSC_{hc}/34_{AML} waren in der MSC_{AML}/34_{AML} 47 Proteine signifikant überrepräsentiert und 27 weitere, die auch im Vergleich zur MSC_{hc}/34_{hc} signifikant waren. Darüber hinaus waren 21 Proteine nur in der MSC_{AML}/34_{AML} im Vergleich zur MSC_{hc}/34_{hc}, nicht aber im Vergleich zur MSC_{hc}/34_{AML} signifikant. Die 27 gemeinsamen Proteine sind in der rechtsstehenden Tabelle zu finden.

Darüber hinaus zeigten sich in der MSC_{AML}/34_{AML} im Vergleich zur MSC_{hc}/34_{hc} und zur MSC_{hc}/34_{AML} drei Proteine unterrepräsentiert bzw. in der Vergleichskultur überrepräsentiert: *EvC ciliary complex subunit 2*, *Fibulin-2*, *high mobility group box 3*. Die insgesamt 30 mehrfach überrepräsentierten Proteine wurden in einer umfassenden Literaturrecherche mittels MatrisomeDB und GeneOntology analysiert und nach Funktionalität und Wirkmechanismen Gruppen zugeordnet [68, 69]. Hierbei ließen sich die Proteine in Gruppen einteilen, die in Abb. 22 dargestellt werden.

				Funktion oder Zugehörigkeit zu zellulären Netzwerken											
				Proteine mit Verbindungen zur extrazellulären Matrix					Andere Funktionen						
Regulation	Protein	Proteinname	Gen	MatrisomeDB	Supramolekulare Organisation (GO:0074351)	Organisation des Zellskeletts (GO:007010)	Zelladhäsion (GO:007155)	Zellverbindungen (GO:0034330)	EZM-Organisation (GO:0051189)	Membrane raft (GO:0045121)	Abbau von nukleotidhaltigen Verbindungen (GO:0034555)	Nukleinsäure-Metabolismus (GO:0050504)	Ribonucleoprotein-Komplexe (GO:0028131)	Proteinkatabolismus (GO:0119390)	Chaperon-schlechtige Proteindomäne (GO:0051077)
	P60709	actin beta	ACTB												
	P60832	actin alpha cardiac muscle 1	ACTC1												
	P63261	actin gamma 1	ACTG1												
	Q01518	cyclase associated actin cytoskeleton regulatory protein	CAP1												
	Q6N22	caveolae associated protein 1	CAVIN1												
	P02461	collagen type III alpha 1 chain	COL3A1	Core matrisome - Collagens											
	P08572	collagen type IV alpha 2 chain	COL4A2	Core matrisome - Collagens											
	Q9BSJ8	extended synaptotagmin 1	ESYT1												
	P22626	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	HNRNPA2B1												
	Q14103	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D	HNRNPD												
	P08648	integrin subunit alpha 5	ITGA5												
	P05556	integrin subunit beta 1	ITGB1												
	P00338	lactate dehydrogenase A	LDHA												
Höher in MSC _{AML} -34 _{AML}	Q8Y4K0	lysyl oxidase like 2	LOXL2	Matrisome-associated - ECM Regulators											
	P26038	mesin	MES												
	O00159	myosin IC	MYO1C												
	P06748	nucleophosmin 1	NPM1												
	P13674	prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 1	PHH1	Matrisome-associated - ECM Regulators											
	P07237	prolyl 4-hydroxylase subunit beta	PHH2												
	P01011	protein disulfide isomerase family A member 3	PDI3												
	P23284	peptidylprolyl isomerase B	PIPB												
	P61313	ribosomal protein L15	RPL15												
	P18124	ribosomal protein L7	RPL7												
	P62753	ribosomal protein S6	RPS6												
	P04054	serpin family H member 1	SERPINH1	Matrisome-associated - ECM Regulators											
	Q7KZF4	staphylococcal nuclease and tudor domain containing 1	SND1												
	P13611	versican	VCAN	Core matrisome - Proteoglycans											
Höher in MSC _{hc} -34 _{hc} und MSC _{hc} -34 _{AML}	O8BUK5	EvC ciliary complex subunit 2	EVC2												
	P98095	fibulin 2	FBLN2	Core matrisome - ECM Glycoproteins											
	O15347	high mobility group box 3	HMOX3												

Abb. 22 - Netzwerkzugehörigkeit der signifikant überrepräsentierten Proteine in der Kokultur MSC_{AML}/34_{AML} im Vergleich mit den beiden Kokulturen MSC_{hc}/34_{hc} und MSC_{hc}/34_{AML}

In diesem Vergleich zeigten sich 30 differenziell exprimierte Proteine. 27 davon waren in der MSC_{AML}/34_{AML} im Vergleich mit den beiden Kokulturen MSC_{hc}/34_{hc} und MSC_{hc}/34_{AML} überrepräsentiert, die weiteren 3 in den Vergleichskulturen überrepräsentiert. Die Proteine wurden wie zuvor mit der MatrisomeDB und den entsprechenden GO Gruppen abgeglichen.

Die hier gebildete Schnittmenge der Proteine, die durchgehend in der „vollmalignen“ Kokultur gegenüber den anderen Bedingungen überrepräsentiert, weist einen deutlichen Bezug zur Matrix auf und zeigt ein Set von Proteinen, die vom Anfang der Leukämogenese bis zur Vollaussprägung relevante Funktionen erfüllen könnten.

3.3 Gruppierung der signifikant überexprimierten Proteine nach Zugehörigkeit zu einem der drei Hauptsysteme der extrazellulären Matrix

Zur weiteren Charakterisierung der Proteine, die in der leukämischen MSC_{AML}/34_{AML} im Vergleich zur MSC_{hc}/34_{AML} und im Vergleich zur MSC_{hc}/34_{hc} überrepräsentiert waren, wurden diese auf Zugehörigkeit zu einem der drei Hauptsysteme der EZM überprüft: dem Kollagen-, dem Elastin- und dem Hyaluronsäure-Netzwerk. Diese Netzwerke werden in 4.2.3 ausführlich beschrieben. Hierzu wurden die Proteine mit der UniProt-Datenbank abgeglichen [70]. Die Proteine, die eine Zugehörigkeit zu oder Interaktion mit mindestens einem der Netzwerke zeigten, sind in der folgenden Abb. 23 aufgelistet.

Überrepräsentierte in MSC _{AML} /34 _{AML} vs. MSC _{hc} /34 _{AML} oder MSC _{hc} /34 _{hc}			
Proteine	Netzwerkzugehörigkeit nach Uniprot		
	Kollagen	Elastin	Hyaluronsäure
COL3A1	■	■	
COL4A1	■		
COL4A2	■		
EFEMP2	■	■	
EMILIN1		■	
HTRA1	■	■	
ITGA5		■	
ITGB1	■	■	
LOXL2	■	■	
P4HA1	■		
P4HB	■		
PLOD2	■		
SERPINH1	■		
VCAN		■	■

Abb. 23 - Zuordnung von signifikant überrepräsentierten Proteinen in der MSC_{AML}/34_{AML} zum Elastin-, Hyaluronsäure- oder Kollagennetzwerk

Die hier aufgeführten 14 Proteine waren im Vergleich der MSC_{AML}/34_{AML} mit der MSC_{hc}/34_{hc} oder mit der MSC_{AML}/34_{AML} signifikant überrepräsentiert und wiesen eine direkte Zugehörigkeit oder Interaktion mit einem der drei wichtigsten Systeme der EZM auf. Datenbankrecherche mittels UniProt [70].

In dieser Zuordnung zeigte sich, dass die detektierten Proteine vor allem zum Kollagen- und Elastin-Netzwerk zugehörig waren. Auffällig ist, dass vor allem Proteine, die eine Quervernetzung dieser beiden Strukturen vermitteln (LOXL2, P4HA1, P4HB, PLOD2) und Adapterproteine, die eine weitere Stabilisierung dieser Netzwerke bewirken, wie EFEMP2 und EMILIN1, beteiligt sind. Kollagen Typ III (COL3A1) weist eine direkte Verbindung zum Elastin-Netzwerk auf, während Kollagen Typ IV (u.a. COL4A1, COL4A2) in der Basalmembran vorkommt und dort u.a. mit Laminin interagiert.

4 Diskussion

Aus den in dieser Arbeit erhobenen Daten lassen sich vielversprechende Rückschlüsse auf die während der Entwicklung einer AML stattfindenden Veränderungen in der Knochenmarksnische ziehen. Im Folgenden sollen so die unter 1.6 formulierten Fragestellungen beantwortet werden.

Auf funktioneller Ebene soll analysiert werden, wie leukämische und nicht leukämische MSCs die physiologische Hämatopoese beeinflussen. In der nachfolgenden Matrisomanalyse soll den Kernfragen nachgegangen werden, welche Zellart maßgeblich für Synthese der EZM verantwortlich ist und wie die detektierten Veränderungen der EZM die physiologische Hämatopoese und die Leukämogenese beeinflussen. Außerdem wird erörtert, inwiefern MSCs in Monokultur Faktoren der EZM produzieren können oder ob sie für eine adäquate Proteinexpression auf den Stimulus der HSPCs angewiesen sind. Zum Abschluss sollen die Proteine der EZM, die in den Analysen als differenziell repräsentiert identifiziert wurden im Hinblick auf ihre klinische und wissenschaftliche Bedeutsamkeit im Rahmen der AML, sowie deren Funktionsweisen sowie Netzwerkzugehörigkeiten diskutiert werden.

4.1 Einfluss der Interaktion zwischen MSC und HSPC auf das Differenzierungspotential der HSPC

Aus den HSPCs der Kokulturrexperimente wurden die in 3.1 beschriebenen Colony-Forming-Unit-Assays (CFUs) durchgeführt. Hier zeigte sich, dass die monokultivierten HSPCs (34_{hc} Mono) sich in allen Vergleichen am besten ausdifferenzierten (Abb. 10). Leukämische HSPCs waren in Mono- und Kokulturen nur wenig bis überhaupt nicht fähig, sich zu ausdifferenzierten Zellen zu entwickeln. Außerdem bildeten die 34_{hc} Mono wesentlich mehr Kolonien als hämatologisch gesunde HSPCs in Kokulturen jeglicher Art. Sobald 34_{hc} mit MSC_{AML} kokultiviert wurden, bildeten sie ebenfalls signifikant weniger ausdifferenzierte Zellen als die monokultivierten Vergleichszellen. Die MSC_{AML} waren demnach nicht in der Lage, die 34_{hc} so gut zu unterstützen wie die MSC_{hc} . Dies erklärt auf funktioneller Ebene die hämatopoetische Insuffizienz bei der AML. Sowohl MSC als auch HSPC aus der AML sind funktionell so beeinträchtigt, dass sie nicht in der Lage sind, die physiologischen Differenzierungswege zu nutzen, auch nicht durch Kokultivierung mit hämatologisch gesunden Zellen der jeweils anderen Art.

Zur Interpretation dieser Ergebnisse gibt es verschiedene Ansatzpunkte. Dass hämatologisch gesunde, monokultivierte Zellen besser ausdifferenzieren, kann daran liegen, dass sowohl leukämische HSPCs als auch hämatologisch gesunde HSPCs in

der Kokultur gut an MSCs adhären und somit nur noch schlechter entwicklungsfähige HSPCs im Überstand verbleiben. In der Monokultur sind alle, d.h. auch die besser entwicklungsfähigen, HSPCs im Überstand vorhanden.

Eine weitere Erklärung ist, dass das Methylcellulosegel, in dem die HSPCs für zwei Wochen kultiviert werden, eine für die Ausdifferenzierung optimal abgestimmte Menge an Wachstumsfaktoren und Zytokinen beinhaltet. In der Monokultur nutzen die Zellen diese Faktoren, um sich bestmöglich auszdifferenzieren. Dahingegen haben die HSPCs in oder nach der Kokultur noch einen zusätzlichen Einfluss der MSCs, der auf sie wirkt bzw. gewirkt hat. Diese können ihrerseits durch Ausschüttung von beeinflussenden Faktoren und Molekülen die Ausdifferenzierung regulieren. Sie geben der HSPC sowohl Signale, die sie ausdifferenzieren lassen, als auch Signale, die sie zum Verbleib als Stammzelle anregen. In Summe ist es plausibel, dass die monokultivierte HSPC sich stärker ausdifferenziert, da sie lediglich zur Differenzierung angeregt wird und nicht wie die kokultivierte HSPC reguliert, also auch in der Differenzierung gehemmt, wird.

Dass die hämatologisch gesunden Kokulturen mehr Kolonien hervorbringen als die kranken, mag daran liegen, dass die Kultursuspension auf das Wachstum hämatologisch gesunder Zellen abgestimmt ist. Obwohl ein Tumor hochproliferativ und replikativ ist (Abb. 6) verwendet er hierfür nicht die klassischen Signalkaskaden über physiologische Wachstumsfaktoren, sondern moduliert die unmittelbare Umgebung, um einen Wachstumsvorteil zu erlangen.

Insgesamt lässt sich in diesem Versuch beobachten, dass es in den Ansätzen mit einer Beteiligung von leukämischen MSC und/ oder HSPC zu einer verringerten Ausdifferenzierung kommt. Gesunde MSC sind nicht in der Lage, die beeinträchtigte Ausdifferenzierung leukämischer Zellen suffizient zu unterstützen, was die Symptomatik von Patientinnen und Patienten mit AML erklärt, bei denen aufgrund von mangelnder Blutbildung eine Anämie, Neutropenie und Thrombozytopenie auftreten kann (s. 1.1.4). Andererseits können gesunde hämatopoetische Vorläuferzellen die physiologischen Differenzierungswege nicht mehr nutzen, sobald sie mit dem leukämischen Milieu in Form von leukämischen MSC in Kontakt treten. Nach der funktionellen Analyse dieser Ausgangssituation sollte im folgenden Schritt in der Massenspektrometrie untersucht werden, inwiefern in leukämischen Kokulturen Proteine exprimiert werden, die die EZM und die Hämatopoese beeinflussen.

4.2 Massenspektrometrische Analyse des Matrisoms

Die massenspektrometrischen Untersuchungen in dieser Arbeit zeigen zum ersten Mal anhand eines *ex-vivo*-Modells von aus dem Knochenmark gewonnenen humanen HSC und MSC, welchen Veränderungen die extrazelluläre Matrix im Verlauf der Leukämogenese der AML unterworfen ist. Neben der Betrachtung der Monokulturen liegt der Fokus dabei insbesondere auf der durch die Interaktion der beiden Zellarten entstehenden EZM-Veränderungen. Die Betrachtung der in diesem Zusammenhang differenziell regulierten einzelnen Proteine, ihrer Interaktionen und der beteiligten EZM-Netzwerke kann dazu beitragen, die zugrundeliegenden Prinzipien der Leukämogenese besser zu verstehen und neue Zielstrukturen für eine pharmakologische Therapie zu identifizieren. Dieses Kapitel ordnet die Ergebnisse vor dem Hintergrund ihrer wissenschaftlichen und klinischen Relevanz ein und bietet Schlussfolgerungen an.

Unter den signifikanten Proteinen, die in der $MSC_{AML}/34_{AML}$ überrepräsentiert waren, finden sich nicht nur „klassische“ Proteine der EZM oder des Zytoskeletts wie z.B. COL3A1 oder ACTB, sondern auch Proteine mit bekanntem Einfluss auf nukleäre Prozesse wie ribosomale Proteine RPL7, -15, oder das Zellkernprotein HNRNPD [70]. Hierfür gibt es mehrere Erklärungsansätze. Einerseits ist anzunehmen, dass im verwendeten Zellkulturmodell durch die Zelllyse immer ein gewisser Anteil an intrazellulären Proteinen in der Zellsuspension enthalten ist. Darüber hinaus ist denkbar, dass extrazelluläre Proteine auch die Expression von onkogenen, intrazellulären Proteinen stimulieren. Allen voran ist jedoch zu bedenken, dass bei einer sich stetig entwickelnden Zellforschung neue Funktionen und Wirkweisen jederzeit entdeckt werden können und somit vormals als „nukleär“ gewertete Proteine auch extrazelluläre Funktionen erfüllen und auch dort exprimiert oder durch extrazelluläre Vesikel (s. 1.3.3) in den Extrazellulärraum transportiert werden können.

4.2.1 Einflussfaktoren auf Veränderungen im Matrisom

Insgesamt zeigte sich, dass in der leukämischen Kokultur $MSC_{AML}/34_{AML}$ mehr Proteine signifikant oder hoch signifikant überrepräsentiert waren als in verschiedenen Vergleichskulturen. Dies ist vereinbar mit der hohen proliferativen Aktivität der leukämischen Zellen und mit einer aktiven Remodellierung ihrer Umgebung, die hier besonders im Zusammenspiel mit den supportiven MSC zu beobachten war. Da die MSC eine Hauptquelle für der Proteine der EZM darstellt, ist am ehesten von einer Verstärkung der Proteinexpression der MSC durch die leukämische HSPC auszugehen. Diese Annahme wird von den Analysen der monokultivierten MSC ($_{AML}/_{hc}$) gestützt, da auch die transformierten MSC unter Abwesenheit der HSPC im Vergleich nur wenige

Proteine mehr als die gesunde MSC-Monokultur exprimierten (vgl. 3.2.1). In den Vergleichen der Kokulturen im Rahmen des *ex-vivo*-Modells des leukämischen Transformationsprozesses zeigten sich hingegen mehr Unterschiede in der Proteinexpression, d.h. mehr signifikant überrepräsentierte Proteine in der jeweils „maligneren“ Kokultur (vgl. 3.2.3-3.2.5). Die stärksten Veränderungen zeigte die leukämische Kokultur MSC_{AML}-34_{AML} in Vergleich mit den anderen Kokulturen (3.2.5).

Im Vergleich aller signifikant differentiell regulierten Proteine zeigten sich einige gleich in mehreren Kokulturvergleichen überrepräsentiert. In den Vergleichen zwischen der MSC_{AML}/34_{AML} mit der MSC_{hc}/34_{hc} sowie der MSC_{hc}/34_{AML} waren es insgesamt 27 Proteine, die in beiden Vergleichen von der leukämischen Kultur überrepräsentiert wurden und 3 Proteine, die in beiden Vergleichen unterrepräsentiert vorlagen (Abb. 21). Die 30 Proteine wurden, wie in 2.3.1 beschrieben, anhand der Datenbanken MatrisomeDB und GeneOntology in vorab definierte Gruppen mit Bezug zum Matrisom eingeteilt. Hierbei fiel auf, dass Proteine mit Zugehörigkeit zu diesen Gruppen besonders in den Kokulturvergleichen differenziell exprimiert wurden. In den Vergleichen der monokultivierten Zellen miteinander waren wenige bis keine Proteine mit Gruppenzugehörigkeit zu finden, während im Vergleich der MSC_{hc}/34_{AML} mit der MSC_{AML}/34_{AML} 57% der in der MSC_{AML}/34_{AML} überrepräsentierten Proteine die Zugehörigkeit zu mindestens einer der EZM-assoziierten Gruppen zeigte (vgl. Abb. 18).

Somit lässt sich als Kernaussage aus den vorliegenden Ergebnissen schließen, dass im Rahmen der AML besonders die Zell-Zell-Interaktion zwischen transformierten HSPCs und MSCs – und nicht nur die Funktionen einzelner Zellen für sich – ein stabiles Matrixmilieu schaffen und so das Matrisom aktiv verändert wird.

Grundsätzlich sind bei experimentellen Versuchen Limitationen zu beachten. Diese beinhalten z.B. die artifizielle Umgebung bei *in-vitro*-, bzw. *ex-vivo*-Experimenten, die immer nur bedingt auf die *in-vivo*-Situation übertragbar sind. In der Zellkultur sind weitere physiologische Zellarten und somit Interaktionsmechanismen exkludiert, die Zellen erleben keine physiologische, dreidimensionale Struktur, sondern werden nur zweidimensional mit artifiziellen Medien angezchtet. Darüber hinaus werden Zellkulturexperimente zumeist nur über einen kurzen Zeitraum durchgeführt, womit längerfristige Effekte zwischen den Zellarten nicht analysiert werden können.

Außerdem werden in Zellkulturexperimenten nur vorbestimmte Anzahlen an Wiederholungen durchgeführt, wodurch ein Stichprobenbias entstehen kann, bei dem eine Stichprobe abweichende oder verzerrte Ergebnisse liefern kann. Insbesondere bei

einer derart heterogenen Erkrankung wie der AML können daher interindividuelle Unterschiede die Detektion statistisch signifikanter Unterschiede erschweren.

4.2.2 Charakterisierung der im Vergleich zu anderen Kokulturen in der MSC_{AML}/34_{AML} überrepräsentierten Proteine

4.2.2.1 Charakterisierung der Proteine mittels StringDB

Um die in der Massenspektrometrie gefundenen Proteine in Hinblick auf ihre klinische und wissenschaftliche Relevanz zu untersuchen sowie potentielle Netzwerkzugehörigkeiten oder Verbindungen unter ihnen aufzudecken, wurde eine umfassende Literatur- und Datenbankrecherche durchgeführt, u. a. mit der MatrisomeDB, GeneOntology und der String Database [68, 69, 71]. Mittels StringDB wurden die detektierten Proteine, die in Kokulturvergleichen in der MSC_{AML}-34_{AML} überrepräsentiert waren, auf in Datenbanken bekannte Verbindungen abgeglichen. Hier zeigte sich ein Netz aus diversen Interaktions- und Verbindungspunkten zwischen den entdeckten Proteinen (Abb. 24, Abb. 25), welches auf gemeinsame funktionelle Netzwerke hinweist. So zeigten sich besondere Interaktionen zwischen diversen extrazellulären Matrixproteinen untereinander sowie auch mit ribosomalen Proteinen und nukleären Proteinen, die im Zellkern Einfluss auf Zellproliferation und damit Tumorwachstum nehmen. Die Detektion von intrazellulären Proteinen kann, wie in 4.2 beschrieben, einerseits darauf zurückzuführen sein, dass die verwendete Methode intrazelluläre Proteine nicht vollständig entfernt hat. Andererseits ist es möglich, dass die als intrazellulär beschriebenen Proteine bisher unbekannte Funktionen in der EZM, entweder als sezernierte Proteine oder als Bestandteile von extrazellulären Vesikeln, haben (s. 1.3.3). Die funktionellen Verbindungen wurden besonders in Hinblick darauf, ob es übergeordnete Netzwerke gibt, in den Datenbanken von MatrisomeDB und GeneOntology analysiert und werden in 4.2.2.2 beschrieben.

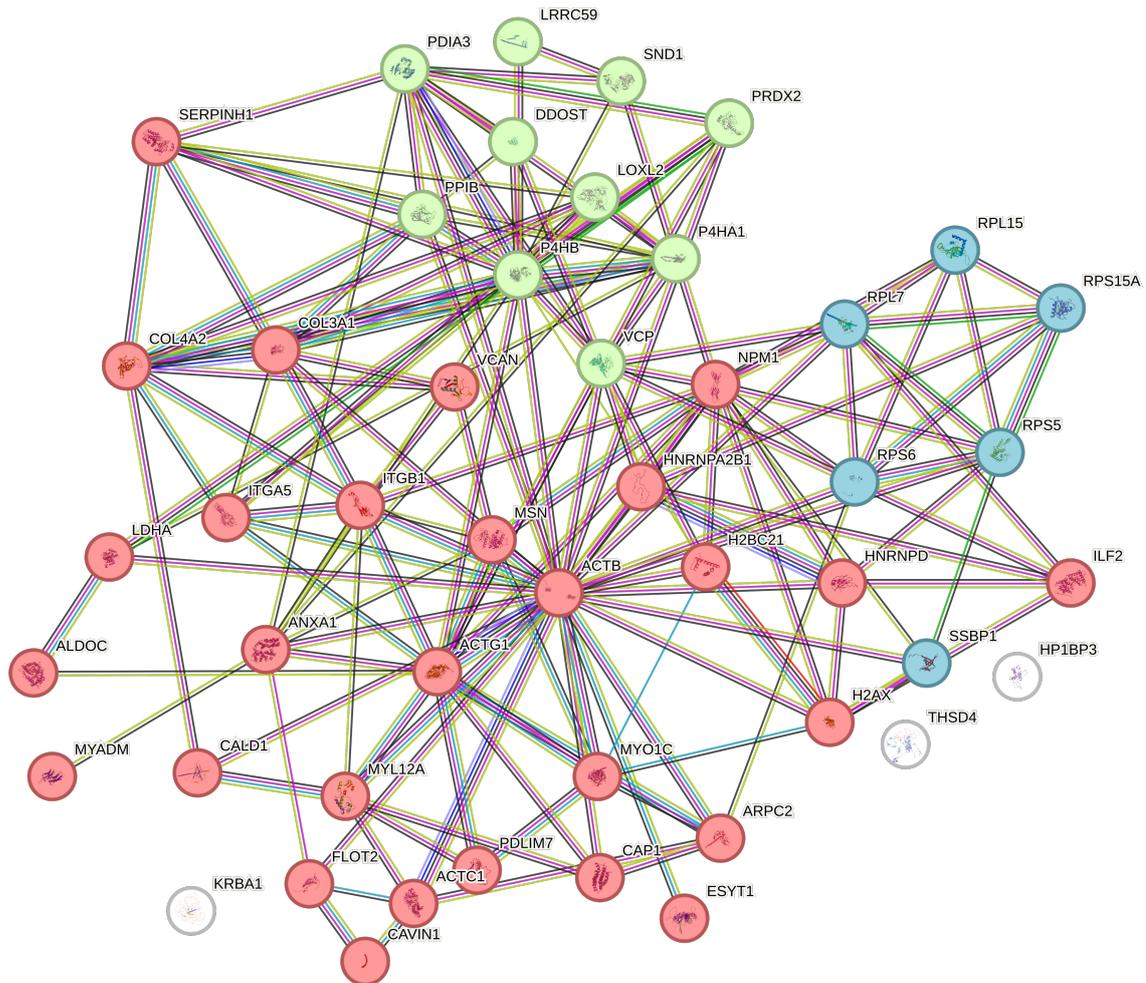


Abb. 25 – Interaktionen zwischen signifikant dysregulierten Proteinen in der MSC_{AML}/34_{AML} im Vergleich zur MSC_{hc}/34_{hc}

In der MSC_{AML}/34_{AML} zeigten sich im Vergleich zur MSC_{hc}/34_{hc} bei den signifikanten Proteinen diverse Interaktionen. In rot dargestellt sind Proteine der extrazellulären Matrix, in blau ribosomale Proteine und in hellgrün Proteine mit Funktionen im Zellkern. Verbindungen entstehen durch nachgewiesene Interaktion in Datenbanken. Abbildung erstellt mit String Database [71].

Durch Analyse mittels StringDB konnte dargestellt werden, dass zwischen den detektierten Proteinen strukturelle und funktionelle Netzwerke bestehen. Extrazelluläre Matrixproteine interagierten nicht nur miteinander, sondern auch mit Proteinen, die bisher als intrazelluläre Proteine beschrieben sind. Eine weiterführende Analyse erfolgte mittels MatrisomeDB und GeneOntology.

4.2.2.2 Charakterisierung der Proteine anhand der Zugehörigkeit zu Netzwerken der EZM mittels MatrisomeDB und GeneOntology

Viele der in der MSC_{AML}/34_{AML}-Kokultur im Vergleich zu anderen Bedingungen differenziell regulierten Proteine lassen sich definierten Netzwerken und Funktionsgruppen mit Bezug zum Matrisom zuweisen (s. u.a, Abb. 20).

Die Datenbank MatrisomeDB [68] teilt die zum Matrisom gehörigen Proteine in *Core Matrisome* (Kollagene, ECM-Glykoproteine, Proteoglykane) und *Matrisome-affiliated* Proteine (ECM-assoziierte Proteine, ECM-Regulatoren, sezernierte Faktoren) ein.

Eine funktionelle Einteilung kann nach GeneOntology (GO)-Gruppen [69] erfolgen (s. auch 2.3.1). Diese beinhalten einerseits Proteine der Zell-Matrix-Verbindungen wie die GO-Gruppen *Proteine der Zelladhäsion und der Zellverbindungsorganisation* (GO:0007155), Proteine der Bildung von *Membranrafts* (GO:0045121) und Proteine der Organisation des Zytoskeletts (GO:0007010). Eine weitere Gruppierung betrifft die Struktur und Organisation der EZM selbst: Proteine der EZM-Organisation (GO:0030198) und Proteine der supramolekularen Faserorganisation (GO:0097435).

Eine Untergruppe der Proteine der supramolekularen Faserorganisation stellen die Proteine der Assemblierung elastischer Fasern (GO Gruppe GO:0048251) dar. Eine GeneOntology *Enrichment* Analyse für die signifikanten Proteine aus dem Vergleich der MSC_{hc}/34_{AML} und der MSC_{AML}/34_{AML} ergab für diese Gruppe eine über 77-fache Anreicherung (*false discovery rate* 2,01E-03). Daher soll im Folgenden zuerst auf die Bedeutung dieses, im hämatonkologischen Kontext – speziell im Rahmen der AML – nur unzureichend beschriebenen, Netzwerkes eingegangen werden.

Das Elastin-Netzwerk besitzt vielfältige Verknüpfungen zu zwei anderen wichtigen Netzwerken der EZM: dem Kollagen- und dem Hyaluronsäure-Netzwerk. In einer sich anschließenden Literaturrecherche konnten zusätzlich zu den in der GO-Gruppe „Assemblierung elastischer Fasern“ eingeschlossenen Proteinen weitere Proteine identifiziert werden, die in den verschiedenen Kokulturen signifikant überrepräsentiert waren und als klinisch relevante Matrixproteine (s. 3.2.6) eine Zugehörigkeit zum Elastin-Netzwerk zeigten. Die relevantesten, in der Kokultur MSC_{AML}/34_{AML} überrepräsentierten Proteine des Elastin-Netzwerks werden in Abb. 26 dargestellt und mit einem Aufwärtspfeil markiert.

4.2.3 Funktion und Effekte des Elastin-Netzwerks in der extrazellulären Matrix

Das Elastin-Netzwerk ist ein integraler Bestandteil der EZM und wichtig für die Struktur, Elastizität und Resilienz multipler Gewebe und Organe des menschlichen Körpers. Die EZM des Knochenmarks besteht größtenteils aus Kollagenen und Elastin sowie weiteren nicht-kollagen-haltigen Matrixproteinen wie Fibronectin, Laminin und Vitronectin [72]. Bisherige, das Elastin-System betreffende, Forschungsarbeiten widmeten sich meist kardiovaskulären Themengebieten. Elastin bzw. Teile des Elastin-Netzwerks sind von

Bedeutung als Bestandteile in Gefäßen, der Lunge, Haut und Knorpel und werden nach aktuellem Wissensstand beim Erwachsenen nicht repliziert. Lediglich im Uterus ist in adultem Gewebe noch eine Neusynthese von Elastin bekannt [73]. Nichtsdestotrotz konnten Elastin, sein Vorläufermolekül Tropoelastin und deren Abbauprodukte als Signalmoleküle identifiziert werden, die eine Rolle in der Zellmitogenese und -migration spielen [74]. Insbesondere Tropoelastin zeigte in Zellkulturmodellen mit MSCs deutliche die Zellproliferation steigernde Effekte, die die Potenz anderer Wachstumsfaktoren und Matrixmoleküle übersteigen kann [75]. Zudem schreibt die aktuelle Forschung Elastin eine Schlüsselrolle in der Entwicklung und Progression von kolorektalen Karzinomen [76] sowie Osteosarkomen [77] zu.

Die zellulären Effekte des Elastin-Netzwerks werden auf verschiedene Mechanismen zurückgeführt. So alteriert eine veränderte Zusammensetzung des Elastingehalts die Elastizität der EZM, welche unmittelbar mechanische Auswirkungen auf die Zellen hat. Im Knochenmark zeigte sich bei einem hohen Elastingehalt ein verstärktes Wachstum von Stammzellen und MSCs [78]. Bei der Zellalterung oder im Tumormilieu wird Elastin zu Peptiden abgebaut (sog. *elastin derived peptides*), die über den Elastin-Rezeptorkomplex verschiedene zellbiologische Funktionen wie Tumorwachstum durch die Steigerung von Zellproliferation oder Invasion, Überleben und Angiogenese des Tumors vermitteln [79]. Außerdem beherbergt das Elastin-Netzwerk eine Vielfalt an Zytokinen und Proteinen wie Fibrillin-Subtypen, EMILIN, Fibronectin, Proteoglykanen und latent TGF- β -bindenden Proteinen (LTBP), die wiederum mit der EZM interagieren und einen Einfluss auf die Zellmorphologie und das funktionelle Zellverhalten haben [80]. Das Proteoglykan Versican spielt zudem eine verbindende Rolle zwischen dem Elastin- und dem Hyaluronsäurenetzwerk und wird in 4.2.4.2 ausführlicher besprochen. Eine Funktion, die zunehmende Bedeutung gewinnt, ist die Regulation der Steifheit des Gewebes, die Auswirkungen auf die Tumorprogression haben kann (s. 4.2.3.2).

Die Effekte des Elastin-Netzwerks können somit ein Milieu schaffen, welches Tumoren und damit auch die in dieser Arbeit beschriebene AML unterstützt. Dazu gehört unter anderem die Proliferation, die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und die unmittelbar biologischen und mechanischen Einflüsse auf Zellen. Schon jetzt sind Elastin und Elastin-Abbauprodukte Angriffspunkte in der Erforschung neuer Medikamente gegen Tumoren [81]. Bisher ist das Elastin-Netzwerk in hämatologischen Erkrankungen noch nicht beschrieben und bedarf daher dringend weiterer Forschungsanstrengungen.

4.2.3.1 Interaktionen des Elastin-Netzwerks mit dem Hyaluronsäure-Netzwerk

Eine weitere grundlegende Komponente der EZM ist die Hyaluronsäure (HA), welche der Klasse der Glykosaminoglykane angehört. Analog zum Elastin bildet HA extrazelluläre Netzwerke mit Proteinen und interagiert mit Rezeptoren wie CD44, RHAMM, LYVE1, TLR2/4 und HARE (Stabilin-2). Diese Netzwerke können von Tumorzellen verwendet und zur Unterstützung der Tumorprogression verwendet werden [82]. Somit wird HA eine große Rolle in der Entwicklung und der Progression von Tumoren zugeschrieben. Insbesondere die von Hanahan und Weinberg zusammengefassten tumorfördernden Eigenschaften (s. Abb. 6) werden zum großen Teil vom HA-Metabolismus beeinflusst [83]. Durch seine Polysaccharidstruktur ist die Synthese von HA und damit ihr tumorfördernder Effekt stark abhängig vom Zellmetabolismus und der Interaktion mit der EZM [84, 85].

HA wird von Hyaluronidasen (HYAL1-3) gespalten, wodurch pro-proliferative, inflammatorische, angiogene und immunmodulatorische HA-Fragmente hervorgebracht werden. Die aktuelle Forschung hat zudem mit dem *cell migration-inducing and hyaluronan-binding protein* (CEMIP) ein neues HA-spaltendes Protein entdeckt, welches besonders im Kontext der Tumorprogression für Aufmerksamkeit gesorgt hat [86-88]. Es spaltet die HA in niedermolekulare Fragmente, welche dann über CD44 und TLR2/4 *Downstream*-Kaskaden aktivieren können. Fragmentierte HA aktiviert in Form von Oligomeren die Elastinsynthese und macht somit CEMIP zu einem weiteren Regulator der EZM [89, 90]. CEMIP ist in den vergangenen Jahren zunehmend als Onkogen in Erscheinung getreten und wurde bereits in einer Vielzahl von Entitäten beschrieben. So reguliert es klassische Eigenschaften eines Tumors wie Proliferation, Apoptose, Invasion und Metastasierung über diverse Signalwege wie die epithelial-mesenchymale Transition, Wnt- β -Catenin, MEK/ERK oder PI3k/Akt [86, 91]. In den vorliegenden Versuchen war CEMIP nicht signifikant erhöht nachweisbar, in einigen Kulturvergleichen zeigte sich jedoch eine eindeutige Tendenz zu einer erhöhten Abundanz in den malignen Kokulturen ($MSC_{AML} \text{ Mono} > MSC_{hc} \text{ Mono}$, p-Wert 0,097; $MSC_{AML}/34_{AML} > MSC_{hc}/34_{AML}$, p-Wert 0,054). Die durch HA-Fragmente ausgeübten tumorsupportiven Effekte könnten also auch im Verlauf einer AML eine Rolle spielen. Dies bedarf allerdings weiterer experimenteller Bestätigung.

HA hat auch einen bedeutenden Einfluss auf das hämatopoetische System und Mikromilieu. So reguliert es Interaktionen zwischen MSCs, Osteoblasten, Fibroblasten, Makrophagen und Endothelzellen im Knochenmark [92]. Viele dieser Effekte werden

durch den HA-Rezeptor CD44 reguliert, der von Zellen des hämatopoetischen Systems vermehrt exprimiert wird [93]. Es wurden erhöhte HA-Konzentrationen im Knochenmark und im Serum [94] von AML-Patientinnen und Patienten gefunden. Weiterhin reguliert CD44 in AML-Blasten verschiedene Differenzierungsprozesse [95]. Darüber hinaus ist noch wenig über HA und CD44 im Zusammenhang mit der AML bekannt.

Bisher konnten einige Verbindungspunkte zwischen der HA und dem Elastin-Netzwerk identifiziert werden. So fungiert das Proteoglykan Versican als Verbindung und Regulator zwischen HA-Ketten und Fibrillin-1, welches als Teil des Elastin-Netzwerks an der Struktur der EZM beteiligt ist [96]. Da das Protein ein wichtiger Bestandteil dieser Arbeit ist, werden die Funktionen von Versican in 4.2.4.2 gesondert und ausführlicher beschrieben.

Eine weitere Verbindung der HA mit dem Elastin-Netzwerk ist deren direkte Interaktion. HA-Fragmente können direkt die Elastinsynthese stimulieren. In glatten Muskelzellen zeigte sich, dass HA- und TGF- β 1-Oligomere synergistisch die Kollagen- sowie Elastinsynthese und die Quervernetzung durch Hochregulierung von Lysyl-Oxidasen und Desmosin steigern können [97]. In der vorliegenden Arbeit wurde eine signifikante Überrepräsentation der *lysyl oxidase homolog 2* (LOXL2) in leukämischen Kokulturen entdeckt. Diese Beobachtung wird in 4.2.4.3 detaillierter besprochen.

Obwohl das Elastin-Netzwerk bereits in Grundzügen hinsichtlich der Wirkweise im onkologischen Milieu untersucht ist und die HA als wichtiger Baustein der Tumor-EZM identifiziert wurde, ist zu beiden Systemen in der Hämatookologie, insbesondere bei der AML, noch wenig bekannt. Beide Systeme zeigen wichtige Verbindungspunkte und Interaktionsmechanismen untereinander und liefern starke Hinweise, auch hier eine wichtige Rolle in Ausbruch, Progression und Überleben des Tumors zu spielen. Auch das dritte essenzielle System der EZM, das Kollagen-Netzwerk, welches ebenfalls hoch relevant für die Funktion und Stabilisierung der Matrix ist, interagiert mit dem Elastin-Netzwerk.

4.2.3.2 Interaktionen des Elastin-Netzwerks mit dem Kollagen-Netzwerk und Steifheit der Matrix

Wie anfänglich schon besprochen, stellt die Steifheit der Matrix ein neues, vielversprechendes Gebiet der Matrixforschung dar. Hier spielt die Interaktion zwischen dem Elastin- und dem Kollagen-Netzwerk eine große Rolle, da sie neben zellulären Bestandteilen und der HA die wesentlichen Bausteine für eine dichte EZM und somit die Widerstandsfähigkeit bzw. Steifheit sind. Die Steifheit der Matrix wurde 2022 als

potenzielles therapeutisches Ziel und in Referenz auf Hanahan und Weinberg (s. 1.4) als neue *hallmark of cancer* vorgeschlagen [98].

Forschungsergebnisse der vergangenen Jahre haben gezeigt, dass die Steifheit der Matrix mechanische Auswirkungen auf Stromazellen, prä-maligne und maligne transformierte Zellen sowie diverse Signalkaskaden wie die epithelial-mesenchymale Transition, die Zellmigration und -invasion hat [99, 100]. So wird die Fibrosierung des Tumors unterstützt, eine für den Tumor progressiv wirkende Hypoxie geschaffen und die Zellaktivität hoch gehalten [101]. In einer Arbeit von 2016 wurde in einem *in-vitro*-Experiment gezeigt, dass in myeloischen Leukämien die Steifheit der Matrix die Zellproliferation, das Wachstum und die Sensibilität auf Chemotherapeutika beeinflusst und der spezifische Effekt vom Subtyp der Leukämie abhängig ist [55]. Es ist naheliegend, dass die physikalischen Eigenschaften der Knochenmarksnische relevant für die Entstehung und Progression der AML, insbesondere aber auch für das Therapieansprechen sind. Daher müssen diese Eigenschaften bei der Entwicklung neuer Therapien dringend berücksichtigt werden, um mögliche Resistenzmechanismen, die durch die Steifheit gefördert werden, zu umgehen.

Als wichtigste regulatorische Proteine der EZM wurden in diesem Zusammenhang Kollagene und Elastin beschrieben. Eine Erhöhung der Dichte und eine gesteigerte Quervernetzung von Kollagen und Elastin scheinen dabei die wichtigsten Determinanten der Matrix-Steifheit darzustellen [102]. Als regulatorische Enzyme insbesondere dieser Quervernetzung wurden die Lysinoxidasen beschrieben, die zur Stabilisierung der Kollagen- und Elastinfasern beitragen sowie diese vernetzen [103, 104]. Außerdem waren wichtige Bestandteile der Quervernetzung EMILIN-1 [105] und EFEMP2 [106], die wie die Lysinoxidasen in den vorliegenden Ergebnissen signifikant erhöht waren und in den folgenden Abschnitten besprochen werden sollen. Darüber hinaus waren mit Serpin H1, P4HA1 und P4HB drei weitere Proteine der Quervernetzung von Kollagenfasern signifikant in leukämischen Kokulturen überrepräsentiert. Weitere Regulatoren von Kollagen und Elastin waren in Bezug auf die Steifheit u.a. die HA durch Einflussnahme auf die Quervernetzung [97], Transkriptionsfaktoren wie ZEB1 [107], bidirektional auch MSCs [108, 109] und Signalkaskaden sowie TGF- β und PI3k/Akt [110].

Die Steifheit der Matrix ist ein vielversprechender Teilbereich der Matrixforschung. Sie hat einen Einfluss auf die Entstehung, die Progression und das Therapieansprechen von myeloischen Leukämien. In den vorliegenden Ergebnissen zeigen sich wichtige Proteine mit Einfluss auf die Regulation der Steifheit der Matrix in leukämischen Kokulturen überrepräsentiert. Die Ergebnisse zeigen, welche Proteine in der Leukämie eine

Schlüsselrolle im Elastin- bzw. Kollagen-Netzwerk und damit in der Modulation der Matrix-Steifheit spielen. Dies macht die Proteine selbst, darüber hinaus das Elastin- und das Kollagen-Netzwerk sowie die Steifheit der Matrix zu interessanten, potenziell therapeutisch relevanten Faktoren in der Entstehung der AML. In einer Arbeit aus dem Jahr 2022 fassen Jiang *et al.* eine Auswahl von gegen die EZM-Steifheit gerichtete therapeutische Maßnahmen zusammen, die einen potenziellen Nutzen in der Tumorthherapie darstellen könnten. Hier fanden sich Antagonisten gegen einige Proteine, die auch in der vorliegenden Arbeit signifikant in leukämischen Kulturen überrepräsentiert waren, z.B. gegen LOXL2 und ITGA5/B1. Inhibitoren der LOXL2 werden in 4.2.4.3 näher diskutiert, für gegen Integrin A5 und B1 gerichtete Substanzen wie ATN-161 oder Volociximab zeigt sich bisher eine unklare Datenlage. Darüber hinaus wurde der Einsatz von Kollagenasen diskutiert, wobei Sicherheitsbedenken bei systemischer Anwendung geäußert wurden.

4.2.3.3 Zusammenspiel des Elastin-Netzwerks mit dem Kollagen- und dem Hyaluronsäurenetzwerk

Aus der Literaturrecherche ging Abb. 26 zur schematischen Darstellung des Elastin-Netzwerks und dessen Interaktionspunkten mit dem Hyaluronsäure- und dem Kollagenetzwerk hervor. Zur übersichtlicheren Darstellung wurden insbesondere die Proteine dargestellt, die in mindestens einem der Kokulturvergleiche in der leukämischen MSC_{AML}/34_{AML} signifikant überrepräsentiert waren und eine Zugehörigkeit zu oder bekannte Interaktion mit einem der drei Matrixnetzwerke zeigten (vgl. Abb. 23). Dies waren COL3A1, -4A1, -4A2, EFEMP-2, EMILIN-1, HTRA1, ITGA5, ITGB1, LOXL2 (dargestellt als LOX), Lysylhydroxylase PLOD2, P4HA1, P4HB, SERPINH1, Versican und das oben beschriebene, in unseren Versuchen nicht signifikant, aber doch tendenziell erhöhte CEMIP.

Die Abbildung stellt dar, wie eng verknüpft die drei wichtigen extrazellulären Matrixsysteme sind. Die Proteine, die in leukämischen Kokulturen überrepräsentiert waren, sind integrale Bestandteile der Systeme, können aber auch an der Verknüpfung der Systeme beteiligt sein.

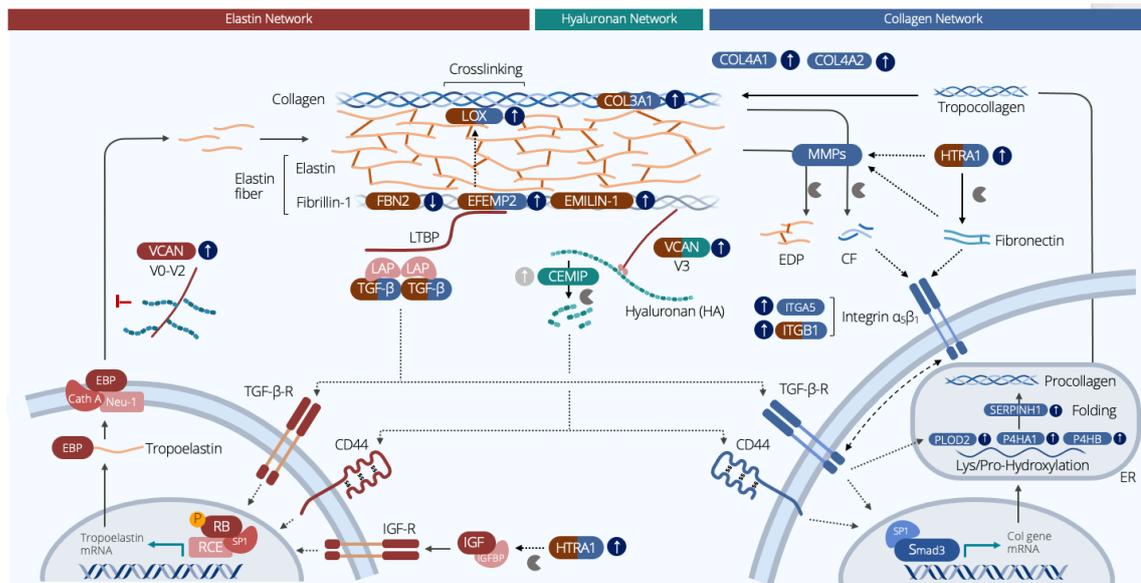


Abb. 26 - Überblick über die am Elastin-, Hyaluronsäure- und Kollagen-Netzwerk beteiligten in der leukämischen Kokultur überexprimierten Proteine in der Matrisomanalyse

Links (Elastin-Netzwerk, rot): Proteine, die an der Elastogenese und an der Entstehung, Quervernetzung und Stabilisierung von Elastinfasern beteiligt sind. Nach seiner Transkription interagiert Tropoelastin intrazellulär mit dem Elastin-bindenden Protein (EBP) und wird durch den Elastin-Rezeptor-Komplex (ERC), gebildet aus EBP, Cathepsin A (Cath A) und Neuraminidase-1 (Neu-1) in den Extrazellulärraum transportiert. Durch Lysyloxidasen (LOX) quervernetztes Elastin bildet zusammen mit Fibrillin-1 die elastischen Fasern. Die Adapterproteine EFEMP2 (Fibulin-4) und EMILIN lagern sich an Fibrillin-1 an. EFEMP2 bindet und aktiviert LOX, die eine Quervernetzung von Elastin und Kollagen bewirkt; über das an EFEMP2 gebundene *latent TGF- β binding protein* (LTBP) und das *latency-associated peptide* (LAP) wird der *transforming growth factor β* (TGF- β) in der EZM sequestriert. TGF- β kann über die Bindung an die entsprechenden Rezeptoren steigernd auf die Tropoelastin- und Prokollagensynthese wirken. **Mitte (Hyaluronsäure-Netzwerk, grün):** Hyaluronsäure (HA) steht in Verbindung zu anderen Matrixmolekülen wie Fibrillin-1, z.B. über Versican (VCAN). Die Isoform V3 von Versican stabilisiert die Verbindung von HA und elastischen Fasern. Die Isoformen V0-V2 interferieren hingegen mit der Freisetzung von Tropoelastin. HA kann durch verschiedene Enzyme gespalten werden. Eine Fragmentierung durch das *cell migration inducing and hyaluronan binding protein* (CEMIP), das in der Matrisomanalyse nur tendenziell erhöht vorlag ($p=0,054$ im Vergleich MSC_{hc34hc} vs. $MSC_{AML34AML}$, Aufwärtspfeil im grauen Kreis) lässt niedermolekulare HA entstehen, die über Bindung an den HA-Rezeptor CD44 die Tropoelastin- und Prokollagensynthese aktivieren können. **Rechts (Kollagen-Netzwerk, blau):** Nach seiner Transkription wird Preprokollagen im endoplasmatischen Retikulum (ER) durch PLOD2, P4HA1 und P4HB an den Aminosäuren Lysin und Prolin hydroxyliert und unter dem Einfluss des Chaperons Serpin H1 zu Prokollagen weiterprozessiert. Nach Sezernierung in den

Extrazellulärraum bildet sich durch Zusammenlagerung erst Tropokollagen und dann Kollagenfibrillen, die durch die Aktivität der LOX quervernetzt werden. Die Serinprotease HTRA1 setzt einerseits Insulin-like growth factor (IGF) aus seinem Bindeprotein (IGFBP) frei und kann so indirekt die Elastinsynthese stimulieren. HTRA1 kann zusätzlich auch direkt oder indirekt über Spaltung von Fibronectin Matrix-Metalloproteasen (MMPs) stimulieren, die den Abbau von Elastin und Kollagen katalysieren. Fibronectin und Kollagen binden an Integrin $\alpha 5\beta 1$ und können sie eine Vielzahl intrazellulärer Prozesse aktivieren. Wie in Kapitel 4.2 näher diskutiert wird, könnten die in unserer Analyse detektierten endoplasmatische Proteine entweder während der verwendeten EZM-Aufreinigung, physiologisch in Form von Vesikeln oder durch eine bisher nur unzureichend untersuchte Sekretion in den Extrazellulärraum gelangt sein. In blau eingekreiste Pfeile zeigen Proteine, die in der Matrisomanalyse in mindestens einem Kokulturvergleich in der MSC_{AML}/34_{AML} signifikant überrepräsentiert vorlagen. Die Verwendung dieser Abbildung erfolgt mit freundlicher Genehmigung vom Urheber, Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Sören Twarock, Institut für Translationale Pharmakologie, Düsseldorf.

4.2.4 Einfluss von überrepräsentierten Matrixproteinen auf onkologische Entitäten und bekannte Tumorsignalkaskaden

Die als wissenschaftlich oder klinisch relevant erachteten Proteine haben alle einen bedeutsamen Einfluss, den sie nicht nur auf die Tumorentstehung, sondern auch auf die Progression, Metastasierung und tumorsupportive Faktoren wie die Angiogenese oder Transformierung hämatologisch gesunder Zellen nehmen können. Der Fokus der hämatoonkologischen Forschung lag in den letzten Jahrzehnten auf der Untersuchung der HSPC als Ursprung von Erkrankungen. Durch neue Methoden und dem dadurch gewonnenen Verständnis über das Knochenmark-Mikromilieu gewinnt die Knochenmarksnische zunehmend an Bedeutung.

Interessanterweise ist sowohl über die Proteine selbst als auch das übergeordnete Elastin-Netzwerk im Rahmen hämatoonkologischer Erkrankungen, insbesondere der AML, wenig bekannt. Eine Hypothese zur Pathogenese ist, dass die HSPC die physiologische Knochenmarksnische und das Elastin-Netzwerk dahingehend manipuliert, dass sich ein neuartiges Netzwerk formiert, welches den Tumor durch die oben genannten Mechanismen unterstützt.

Die folgenden Literaturrecherchen fokussieren sich auf eine mögliche Involvierung in maligne Transformationsprozesse der detektierten Proteine und den damit in Zusammenhang stehenden bekannten Signalkaskaden in Tumoren. Es zeigte sich, dass diverse Proteine der oben beschriebenen extrazellulären Netzwerke, allen voran des Elastinnetzwerks, wichtige Bestandteile diverser potenziell onkogener Signalwege sind. Auf die Zugehörigkeiten und weitere wissenschaftliche sowie klinische Besonderheiten

wird im folgenden Abschnitt eingegangen. Hierbei wird mit Fibulin-2 auch ein in leukämischen Kokulturen verringert exprimiertes Protein besprochen. Im Anschluss werden die Proteine hervorgehoben, die nach aktuellem Wissensstand die wichtigsten Verknüpfungsstellen zwischen Elastin-, Kollagen- und Hyaluronsäurenetzwerk sind.

4.2.4.1 Fibulin-2

Als wichtigstes vermehrt in hämatologisch gesunden statt in leukämischen Zellen aufzufindendes Protein soll zunächst Fibulin-2 Erwähnung finden. Insgesamt wurden im Vergleich der MSC_{hc}/34_{hc} mit der MSC_{AML}/34_{AML} neun Proteine gefunden, die in der hämatologisch gesunden Kultur signifikant erhöht waren, darunter das Fibulin-2. Das Fibulin-2 zeigte sich in multiplen Kokulturvergleichen jeweils in der „gesünderen“ Probe erhöht (Abb. 12, Abb. 18, Abb. 20).

Diese Konstellation ist insofern relevant, dass nicht nur für den Tumor supportive Faktoren als Biomarker oder therapeutische Interventionsmöglichkeit entscheidend sein können. Genau so wäre ein Protein, welches dem Tumor entgegenwirkt, eine Option, die als therapeutischer Ansatz verstärkt werden könnte.

Fibulin-2 wurde bereits als regulatorisches Protein in Tumoren erforscht, jedoch sind bis heute nicht vollständig konklusive Daten vorhanden, ob es tumorsupportiv oder -inhibierend agiert. In einer Übersichtsarbeit wurde von einer kontextabhängig onkogenen Wirkweise ausgegangen, die jedoch nicht allgemein gelte [111]. So konnte im Mammakarzinom bei verminderter Expression von Fibulin-2 auch eine vermehrte Migration und Invasion von Tumorzellen beobachtet werden [112]. Analog dazu zeigte eine vermehrte Expression von Fibulin-2 im Mammakarzinom eine gute Prognose, insbesondere bei Koexpression mit der Metalloprotease ADAMTS-12 [113].

In der Hämatookologie ist Fibulin-2 noch nicht beschrieben. Die vorliegenden Ergebnisse lassen durch die Hochregulierung in gesünderen Zellkulturen vermuten, dass das Matrixprotein hier eher eine tumorinhibierende Wirkung zeigt. Insgesamt ist weitere Forschung essenziell, um das Fibulin-2 in der AML zu analysieren und als Leukämie-inhibierendes Protein zu bestätigen. Als therapeutisches Konzept wären hier Wirkstoffe denkbar, die über die Aktivierung von Signalkaskaden eine verstärkte Expression von Fibulin-2 hervorrufen könnten. Auch als Biomarker für den Verlauf der AML könnte es eine Rolle spielen, dann jedoch negativ korreliert zum Verlauf der Tumorerkrankung.

4.2.4.2 Versican

Versican ist ein essenzieller Regulator des Elastin-Netzwerks [114]. Als Interaktionsprotein zwischen HA und Elastin verknüpft es die EZM und verstärkt die Elastogenese sowie die strukturelle und funktionelle Stabilität des Netzwerks [115]. Je nach Isoform reguliert es die Elastinsynthese durch Stimulation von TGF- β und damit Integration von Tropoelastin in die Elastinfasern [116]. Während die Isoformen V0-2 diesen Prozess inhibieren (s. Abb. 26), verstärkt ihn die Isoform V3. Somit stabilisiert Versican nicht nur die Elastinfasern, es reguliert je nach Isoform auch die Freisetzung von Elastin in die EZM. In den massenspektrometrischen Analysen in dieser Arbeit konnte nicht sicher zwischen den Isoformen von Versican unterschieden werden. Beim Nachweis einer Überexpression der Versican-Variante V3 wäre davon auszugehen, dass es auch in der Leukämie zu einer verstärkten Vernetzung zwischen HA und Elastin sowie zu einer allgemeinen Stabilisierung des Elastin-Netzwerks kommt. Diese beiden Effekte könnten wiederum die oben erwähnten onkogenen Prozesse fördern.

Zusätzlich hindert die Isoform V3 die Monozytenadhäsion und nimmt Einfluss auf die im Kontext von Tumoren gut dokumentierten Signalwege über den *epidermal growth factor receptor* (EGFR) und den Transkriptionsfaktor NF-KB [116]. Die verminderte Monozytenadhäsion ist für eine Immunevasion des Tumors relevant und kann ein wertvoller Faktor für das Überleben des Tumors sein.

Im Mikromilieu des Tumors hat Versican noch eine Vielfalt an weiteren Interaktionspartnern. Es spielt in diversen bekannten Tumorsignalkaskaden, u.a. dem Wnt- β -Catenin-Signalweg, dem PI3K-/Akt-, sowie dem TGF- β -Signalweg eine Rolle [117-119]. Darüber hinaus hat es einen nachgewiesenen Einfluss auf die Tumorangiogenese, die Proliferation und die Metastasierung von Tumoren [118, 120]. Ein hoher Plasmagehalt an Versican korreliert mit einer schlechten Ansprechrate auf die Induktionschemotherapie bei AML-Patientinnen und Patienten [121]. In der Hämatookologie, insbesondere bei der AML, ist darüber hinaus über Versican und seine Wirkungen noch wenig bekannt.

Außerdem kommuniziert Versican mit Kollagenen, Fibulin-1 und -2, Fibrillin-1 und dem Fibronectin [122]. Diese Proteine weisen auf weitere Stellen hin, an und mit denen Versican im Tumormilieu für eine dichte, stabile EZM sorgt – also die Steifheit der Matrix erhöht (s. 4.2.3.2) – und so den Tumor unterstützt.

Diese Ergebnisse werden von der Matrisomanalyse gestützt, in der sich Versican in der MSC_{AML}/34_{AML} im Vergleich zur MSC_{hc}/34_{hc} und der MSC_{hc}/34_{AML} signifikant erhöht zeigte.

In Zusammenschau der Ergebnisse und dem bisherigen Wissensstand zum Versican scheint dies eindeutig ein vielversprechender Angriffspunkt für neue Therapieansätze bei AML und möglicherweise weiteren hämatoonkologische Tumoren zu sein. Bei einer möglichen Entwicklung dieser muss jedoch besondere Rücksicht auf jeweilige Isoformen und deren spezifische Wirkung genommen werden, da diese sehr unterschiedliche Effekte auf Tumoren und deren Umgebung haben [123].

4.2.4.3 Lysyl Oxidase homolog 2

Die *lysyl oxidase homolog 2* (LOXL2) ist als Lysinoxidase ein wichtiger Bestandteil des Elastin- und des Kollagen-Netzwerks (s. 4.2.3.1). Nach Stimulation durch EFEMP-2 sowie HA und TGF- β vernetzt sie Elastinfasern (*Crosslinking*) und führt somit zu einem stabileren Netzwerk [103, 124]. Ein steiferes extrazelluläres Elastin-Netzwerk (s. 4.2.3.2) vermag dem Tumor dabei zu helfen, in umliegendes Gewebe zu expandieren und resilienter gegen die physiologische Immunabwehr vorzugehen [125]. Lysinoxidasen, insbesondere die LOXL2, wurden bereits in diversen Tumoren beschrieben. Sie sind bei erhöhter Expression mit Progression und Migration von Tumoren sowie einer schlechten Prognose assoziiert [126]. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass LOXL2 in bekannten Tumorsignalkaskaden eine relevante, stimulierende Rolle spielt, z.B. im PI3k-Akt-Signalweg in Ösophagustumoren [127], der epithelial-mesenchymalen Transition [128] oder der Stimulierung von VEGF (vgl. 3.2.6).

In ihrer Funktion als tumorsupportive Faktoren wurden Lysinoxidasen bereits als therapeutische Angriffspunkte in Erwägung gezogen [129, 130]. Kontrovers diskutiert werden Lysinoxidasen als Tumorsuppressoren, da sie bzw. ihre Propeptide auch antikanzerogene Signalkaskaden aktivieren können [131].

Wie Versican war die LOXL2 im Vergleich der MSC_{AML}/34_{AML} mit der hämatologisch gesunden MSC_{hc}/34_{hc} wie auch der MSC_{hc}/34_{AML} signifikant erhöht (Abb. 21). Im Vergleich der MSC_{hc}/34_{hc} mit der MSC_{hc}/34_{AML} wurde die LOXL2 ähnlich stark in beiden Kulturen exprimiert. Dies könnte darauf hindeuten, dass die LOXL2 in der Transformation von hämatologisch gesunden Zellen zur Leukämie hin noch eine kleinere Rolle spielt und erst von der vollausgeprägten Leukämie besonders stark exprimiert wird, um dann durch das oben beschriebene *Crosslinking* das bestehende Milieu zu stabilisieren.

Zusammenfassend ist die LOXL2 ein äußerst vielversprechendes, eindeutig mit Tumoren und onkogener Funktion assoziiertes Protein, welches in der AML noch nicht beschrieben ist und einen möglichen Therapieansatz bieten könnte. Wie bereits in 4.2.3.2 beschrieben, werden Inhibitoren der LOXL2 bereits in der Tumorthapie erprobt. So wurde der monoklonale Antikörper Simtuzumab bereits in klinischen Studien getestet, zeigt allerdings keinen klinisch-relevanten Erfolg. Der selektive LOXL2-Inhibitor PAT-1251 zeigte sich in einer klinischen Phase-I-Studie gut verträglich und wird aktuell in weiteren Studien getestet. Darüber hinaus werden weitere Inhibitoren wie CCT365623 oder PXS-51020A untersucht [98].

Als eines der grundlegenden Ziele der Arbeit ist für unsere Forschungsgruppe außerdem interessant, welche Proteine im Rahmen der AML und in der Folge möglicherweise noch weiteren hämatoonkologischen Erkrankungen als Biomarker oder Verlaufsparemeter verwendet werden können. Proteine wie die LOXL2, die bereits in anderen Entitäten beschrieben sind und als Zielstrukturen erprobt werden, können ein Ansatz zum Erreichen dieses Ziels sein.

4.2.4.4 Kollagen

Ein nächster wichtiger Bestandteil der EZM ist das von der LOXL2 quervernetzte Kollagen. Als Stützprotein stabilisiert es mit seinen verschiedenen Unterformen die EZM, analog zum Elastin-Netzwerk. In der vorliegenden Arbeit werden besonders die Unterformen Collagen alpha-1 (III)-chain (COL3A1), Collagen alpha-1 (IV)-chain (COL4A1) und Collagen alpha-2 (IV)-chain (COL4A2) besprochen, da sie sich in der statistischen Auswertung in mehreren Kokulturvedgleichen signifikant erhöht zeigten (Abb. 21).

Für Tumoren ist eine dichte EZM überlebensnotwendig. Durch eine Hochregulation der Kollagene kann der Tumor ein Netz schaffen, das es für physiologische Immunzellen schwer bis unmöglich macht, ihn zu erreichen und zu bekämpfen. So wurde nachgewiesen, dass die Kollagene einen Einfluss auf die T-Zell-Migration und Immunantwort haben [132]. Diese These wird von den vorliegenden Ergebnissen gestützt.

Über die Interaktion mit anderen Proteinen, Integrinen und Rezeptoren können Kollagene den Tumor auf verschiedene Arten weiter unterstützen (Abb. 27). So wird die Fibrosierung des Tumors unterstützt, eine für den Tumor progressiv wirkende Hypoxie geschaffen und die Zellaktivität hoch gehalten [101]. Auch die Metastasierung von Tumoren scheint von Kollagenen beeinflusst zu werden [133].

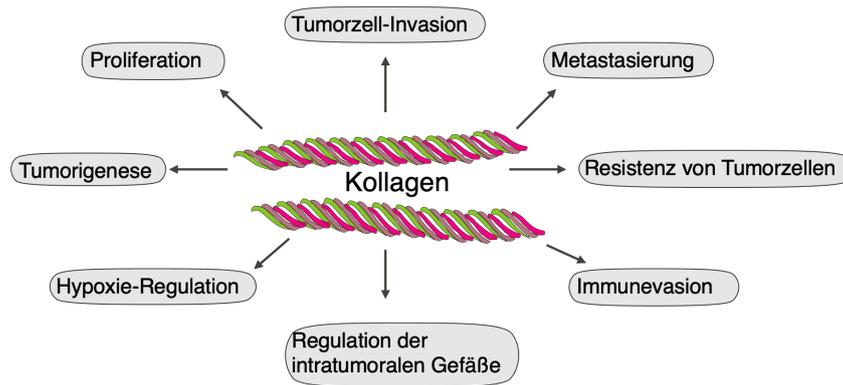


Abb. 27 - Übersicht über tumorsupportive Funktionen von Kollagen

Kollagen führt über viele Mechanismen zu einer Unterstützung des Tumors und seines Milieus. Abbildung modifiziert nach Xu et al [101].

Liang et al schlugen neben COL3A1 und COL1A2 noch COL4A3 und COL4A6 als potenzielle Biomarker bei Kolorektalkarzinom vor [134]. In dieser Arbeit und somit bezogen auf die AML zeigten sich die Unterformen COL3A1, COL4A1 und COL4A2 differentiell reguliert. All dies legt einen Einfluss der Kollagene auch auf hämatoonkologische Entitäten wie die AML sehr nahe. Besonders in Hinblick auf Kollagene als möglichen therapeutischen Angriffspunkt ist es wichtig, die genauen Unterformen und ihre spezifischen Wirkmechanismen weiter zu untersuchen.

4.2.4.5 Serinprotease HTRA1

Die EZM beinhaltet eine Reihe verschiedener Wachstumsfaktoren wie TGF- β [135] oder Insulin-like growth factor (IGF), welche die Synthese von Tropoelastin, dem Vorläufermolekül von Elastin, stimulieren [136]. Durch Herauslösen von IGF aus dem IGF-Bindeprotein aktiviert die Serinprotease HTRA1 (HTRA1) auf indirektem Wege die Tropoelastinsynthese. Außerdem ist die HTRA1 ein wichtiger Regulator von Wachstumsfaktoren in der EZM [137, 138]. Im Magenkarzinom wurde zudem ein maligne transformierender Einfluss der HTRA1 auf Fibroblasten nachgewiesen [139], welcher bei Hochregulation in der AML auch eine Transformation der MSCs vermuten lassen könnte.

In der Massenspektrometrie zeigte sich die HTRA1 in der MSC_{AML}/34_{AML} signifikant erhöht im Vergleich zur MSC_{hc}/34_{AML}. Die MSC_{hc}/34_{hc} produzierte auch weniger HTRA1 als die MSC_{AML}/34_{AML}, allerdings knapp außerhalb der Signifikanzgrenze (p-Wert 0,078). Bei der HTRA1 handelt es sich somit ebenfalls um einen aussichtsreichen Kandidaten als Zielprotein für medikamentöse Therapien oder als Biomarker.

4.2.4.6 EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 2

Ein weiterer Bestandteil des oben erwähnten Elastinnetzwerks ist das *EGF-containing fibulin-like extracellular matrix Protein 2* (EFEMP2). 2015 wurde beschrieben, dass EFEMP2 die Spaltung eines Propeptids von Procollagen-Endopeptidase-Enhancer beeinflusst, womit es auch Einfluss auf den Kollagenstoffwechsel nimmt [140].

EFEMP2 ist ein Fibulin und als solches durch Interaktion mit Lysinoxidasen (4.2.4.3), Tropoelastin und Fibrillin-1 Teil der Elastinquervernetzung [106, 141]. Es wurde zunächst hauptsächlich in der Entwicklung der Aorta verortet [142], jedoch wurde auch ein Einfluss auf das Osteosarkom über den Wnt- β -Catenin-Signalweg und die PI3K/Akt/mTOR-Kaskade beschrieben [143, 144]. Mittlerweile ist EFEMP2 in vielen Krebserkrankungen beschrieben, jedoch noch nicht in der Hämatookologie. Es reguliert das TGF- β -Signalweg über die latenten TGF- β -Bindeproteine (LTBP) [145]. Hinsichtlich hämatologischer Tumorerkrankungen veröffentlichte unsere Forschungsgruppe eine Arbeit über die TGF- β -vermittelte Entwicklung funktioneller Defizite und der AML ähnlichen phänotypischen Alterationen in hämatologisch gesunden MSCs [146].

EFEMP2 war ebenfalls in leukämischen Kulturen im Vergleich zur MSC_{hc}/34_{AML} signifikant überrepräsentiert, im Vergleich mit der MSC_{hc}/34_{hc} nahezu signifikant (p-Wert 0,063).

Als noch weitestgehend, insbesondere in der AML, unerforschtes Protein ist EFEMP2 ein interessanter Kandidat für weitere wissenschaftliche Forschung.

4.2.4.7 EMILIN-1

Das Elastin *microfibril interface-located protein 1* (EMILIN-1) ist ein wichtiger Kommunikationspartner von EFEMP2 [80], womit es auch für das Elastin-Netzwerk eine tragende Funktion in der Faservernetzung hat. Außerdem ist EMILIN-1 wichtig für intra- und extrazelluläre Funktionen wie Zelladhäsion, Migration und Proliferation sowie die Auslösung extrazellulärer Signalkaskaden. Wie EFEMP2 hat auch EMILIN-1 einen Einfluss auf TGF- β , weiterhin ist es für die Zell-Zell-Kommunikation über Integrine essenziell.

Die genannten Funktionen weisen auf EMILIN-1 als onkogenes Protein hin, was sich in der Auswertung der Matrisomanalyse bestätigt. Hier war es ebenfalls in der MSC_{AML}/34_{AML} signifikant erhöht im Vergleich zur MSC_{hc}/34_{AML}.

Als Bestandteil des Elastin-Netzwerks und Interaktionspartner weiterer, den Ergebnissen dieser Arbeit nach für den Tumor wichtigen, extrazellulären Proteine stellt auch EMILIN-1 eine potenzielle therapeutische Angriffsmöglichkeit dar.

4.2.5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde den in 1.6 formulierten Fragen nachgegangen. Es wurde in einem funktionellen Assay gezeigt, dass insbesondere MSC_{AML} über dysfunktionale Regulationsmechanismen die physiologische Differenzierungskapazität beeinflussen. Nach Abbildung verschiedener Phasen der Leukämogenese durch *ex-vivo*-Zellkulturen und massenspektrometrischer Analyse des Matrisoms dieser konnte eine Vielfalt an Veränderungen der Zusammensetzung der EZM dargestellt werden. Diese wurde in einen klinischen und wissenschaftlichen Kontext eingebettet. Es zeigten sich insbesondere Proteine des Elastin-, des Kollagen- und des Hyaluronsäurenetzwerks bzw. wichtige Regulatoren dieser Netzwerke signifikant in leukämischen Zellkulturen überrepräsentiert. Insbesondere sind hier zu nennen: COL3A1, COL4A1, COL4A2, EFEMP2, EMILIN-1, HTRA1, ITGA5, ITGB1, LOX2, P4HA1, P4HB, PLOD2, Serpin H1, Versican. Die genannten Proteine sind nicht nur als Bestandteile und Verknüpfungspunkte der drei Matrixsysteme relevant, sie nehmen hierdurch auch Einfluss auf die Steifheit der Matrix, die einen weiteren neuen Aspekt der Matrixforschung darstellt und eine Rolle für die Leukämogenese und gestörte Hämatopoese im Rahmen der AML spielen können. Diese Veränderungen in der Zusammensetzung der EZM in der Knochenmarknische im Verlauf einer AML bilden vielversprechende Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen.

In Zusammenschau der vorliegenden Ergebnisse und dem aktuellen Forschungsstand stellen die in diesem Kapitel detaillierter besprochenen Proteine eine Auswahl dar, die am ehesten eine Basis für therapeutische Angriffsmöglichkeiten bieten und so eine Grundlage für weitere Forschung in diesem Feld bieten. Darüber hinaus haben aber grundlegend alle Proteine, die in Zellkulturvergleichen in den leukämischen Kulturen überrepräsentiert waren, das Potential, vielversprechende Kandidaten für weitere Forschungsbemühungen zu sein.

Auch können die oben beschriebenen und weitere Proteine durch Anschlussforschung möglicherweise als Biomarker validiert werden. Weitere signifikant überrepräsentierte Proteine können den Übersichtstabellen in 3.1, z.B. Abb. 20 entnommen werden.

5 Schlussfolgerung

Durch die genaue Analyse der EZM in einem Modell der AML-Entstehung konnte massenspektrometrisch eine Vielfalt an Proteinen detektiert werden, die für Tumorentstehung und -entwicklung relevant sein könnten, da sie einen Einfluss auf die Zusammensetzung und Steifheit der EZM, auf Zell-Zell-Interaktion und auf die Differenzierungsfähigkeit von gesunden und leukämischen HSPC haben können. Hiermit konnte ein profunderes Verständnis der molekularbiologischen Charakteristika hämatoonkologischer Entitäten, insbesondere der AML, gewonnen werden. Die meisten der identifizierten Proteine sind teilweise im onkologischen Umfeld beschrieben, insbesondere in bekannten Tumorsignalkaskaden wie Wnt- β -Catenin, PI3k-Akt oder TGF- β und in den drei wesentlichen Systemen der EZM: dem Elastin-, dem HA- und dem Kollagen-Netzwerk. In der Hämatoonkologie sind viele dieser Proteine, ihre Interaktion untereinander und mit den zellulären Bestandteilen der Knochenmarksnische sowie ihre Funktion im Rahmen der Leukämogenese jedoch noch weitestgehend unerforscht. Daher bieten sie neue Ansätze für weiterführende Untersuchungen mit dem Ziel, die vorhandenen Therapieoptionen zu ergänzen oder zu verbessern. Insbesondere das Elastin-Netzwerk als übergeordnete Regulationseinheit der gefundenen Proteine sollte durch weitere Bemühungen genauer charakterisiert und mit Blick auf Komponenten und Interaktionsmechanismen innerhalb des Netzwerks, z.B. mit dem HA- und dem Kollagensystem oder der Steifheit der Matrix, analysiert werden.

Durch ihre unterstützende Funktion in der Leukämie wäre es sinnvoll zu untersuchen, inwiefern die in der leukämischen Kokultur überrepräsentierten Proteine durch niedermolekulare Substanzen oder Interferenz-RNA in ihrer Funktion eingeschränkt werden können und inwiefern so Tumoren in ihrer replikativen, proliferativen, invasiven oder metastasierenden Fähigkeit pharmakologisch inhibiert werden können. Analog dazu ließe sich beispielhaft für das in gesünderen Zellkulturen erhöhte Fibulin-2 analysieren, inwiefern eine Stimulierung des Proteins Tumorzellen (inhibierend) beeinflussen würde und ob es vielleicht als therapeutische Option in Erwägung gezogen werden könnte.

Auch können die Proteine einen neuen Ansatz als Biomarker für die AML und möglicherweise in der Folge auch für andere Entitäten bieten. Somit können prognostische Informationen gewonnen und verbessertes Therapiemonitoring sichergestellt werden. Einige der beschriebenen Proteine wie Versican, die Lysinoxidasen, insbes. LOXL2 sowie COL3A1 und EFEMP2 werden schon in anderen Krebserkrankungen erforscht und teilweise als Biomarker diskutiert. Hier erscheint die

vergleichende Forschung in Hinblick auf Verwendbarkeit und Relevanz der Proteine als Biomarker auch für leukämische Erkrankungen in der Zukunft sinnvoll.

6 Literaturverzeichnis

1. Virchow, R., *Weißes Blut*, in *Gebiete der Natur- und Heilkunde*, F. Froriep and R. Froriep, Editors. 1845, Verlage des Landes-Industrie-Comptoirs Weimar: Weimar. p. 151-156.
2. Global Cancer Observatory. *Cancer Fact Sheet Leukemia*. 2018 03.2019 [cited 2019 31.07.2019]; Available from: <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/36-Leukaemia-fact-sheet.pdf>.
3. Zentrum für Krebsregisterdaten. *Leukämien, ICD10 C91-C95*. 2017 [cited 2019 12.08.2019]; Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Leukaemien/leukaemien_node.html.
4. Kraywinkel, K. and C. Spix, *Epidemiologie akuter Leukämien in Deutschland*. *Der Onkologe*, 2017. **23**(7): p. 499-503.
5. Röllig, C., et al. *Leitlinie Akute Myeloische Leukämie (AML)*. 2018 April [cited 2019 17.05.2019]; Available from: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/akute-myeloische-leukaemie-aml/@@guideline/html/index.html>.
6. Cartledge Wolf, D.M. and S.A. Langhans, *Moving Myeloid Leukemia Drug Discovery Into the Third Dimension*. *Front Pediatr*, 2019. **7**: p. 314.
7. Servier. *Servier Medical Art*. [Web Page] [cited 2019 12.05.2019]; licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>). Available from: <https://smart.servier.com>.
8. Fircanis, S., et al., *The relation between cigarette smoking and risk of acute myeloid leukemia: an updated meta-analysis of epidemiological studies*. *Am J Hematol*, 2014. **89**(8): p. E125-32.
9. Döhner, H., D.J. Weisdorf, and C.D. Bloomfield, *Acute Myeloid Leukemia*. *N Engl J Med*, 2015. **373**(12): p. 1136-52.
10. Cancer Genome Atlas Research, N., et al., *Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia*. *N Engl J Med*, 2013. **368**(22): p. 2059-74.
11. Arber, D.A., et al., *The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia*. *Blood*, 2016. **127**(20): p. 2391-405.
12. Corces-Zimmerman, M.R., et al., *Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(7): p. 2548-53.
13. Krönke, J., et al., *Clonal evolution in relapsed NPM1-mutated acute myeloid leukemia*. *Blood*, 2013. **122**(1): p. 100-8.
14. Shlush, L.I., et al., *Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia*. *Nature*, 2014. **506**(7488): p. 328-33.
15. Bullinger, L., K. Dohner, and H. Dohner, *Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways*. *J Clin Oncol*, 2017. **35**(9): p. 934-946.
16. Rollig, C. and G. Ehninger, *How I treat hyperleukocytosis in acute myeloid leukemia*. *Blood*, 2015. **125**(21): p. 3246-52.
17. Estey, E. and H. Döhner, *Acute myeloid leukaemia*. *The Lancet*, 2006. **368**(9550): p. 1894-1907.
18. Morrison, S.J., et al., *Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors*. *Development*, 1997. **124**(10): p. 1929-1939.
19. Medyouf, H., et al., *Myelodysplastic cells in patients reprogram mesenchymal stromal cells to establish a transplantable stem cell niche disease unit*. *Cell Stem Cell*, 2014. **14**(6): p. 824-37.
20. Osawa, M., et al., *Long-Term Lymphohematopoietic Reconstitution by a Single CD34-Low/Negative Hematopoietic Stem Cell*. *Science*, 2000. **273**(Issue 5272): p. 242-245.

21. Seita, J. and I.L. Weissman, *Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation*. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2010. **2**(6): p. 640-53.
22. Akashi, K., et al., *A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages*. Nature, 2000. **404**: p. 193-197.
23. Kondo, M., I.L. Weissman, and K. Akashi, *Identification of Clonogenic Common Lymphoid Progenitors in Mouse Bone Marrow*. Cell, 1997. **Vol. 91**: p. 661–672.
24. Moore, K.A. and I.R. Lemischka, *Stem cells and their niches*. Science, 2006. **311**(5769): p. 1880-5.
25. Morrison, S.J. and D.T. Scadden, *The bone marrow niche for haematopoietic stem cells*. Nature, 2014. **505**(7483): p. 327-34.
26. Pedersen, E., et al., *Structure and function of the solid tumor niche*. Frontiers in Bioscience, 2012. **4**: p. 1-15.
27. Katayama, Y., et al., *Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow*. Cell, 2006. **124**(2): p. 407-21.
28. Zhang J, N.C., Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L, *Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size*. Nature, 2003. **425**(6960): p. 836-841.
29. Goulard, M., C. Dosquet, and D. Bonnet, *Role of the microenvironment in myeloid malignancies*. Cell Mol Life Sci, 2018. **75**(8): p. 1377-1391.
30. Calvi LM, A.G., Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringhurst FR, Milner LA, Kronenberg HM, Scadden DT, *Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche*. Nature, 2003. **425**(6960): p. 841-846.
31. Sugiyama, T., et al., *Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches*. Immunity, 2006. **25**(6): p. 977-88.
32. Arai, F., et al., *Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche*. Cell, 2004. **118**(2): p. 149-61.
33. Yang, K.E., et al., *Differential expression of extracellular matrix proteins in senescent and young human fibroblasts: a comparative proteomics and microarray study*. Mol Cells, 2011. **32**(1): p. 99-106.
34. Byron, A., J.D. Humphries, and M.J. Humphries, *Defining the extracellular matrix using proteomics*. Int J Exp Pathol, 2013. **94**(2): p. 75-92.
35. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-7.
36. Kumar, R., P.S. Godavarthy, and D.S. Krause, *The bone marrow microenvironment in health and disease at a glance*. J Cell Sci, 2018. **131**(4).
37. Jing, D., et al., *Hematopoietic stem cells in co-culture with mesenchymal stromal cells--modeling the niche compartments in vitro*. Haematologica, 2010. **95**(4): p. 542-50.
38. Mendez-Ferrer, S., et al., *Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche*. Nature, 2010. **466**(7308): p. 829-34.
39. Ayala, F., et al., *Contribution of bone microenvironment to leukemogenesis and leukemia progression*. Leukemia, 2009. **23**(12): p. 2233-41.
40. Schroeder, T., et al., *Mesenchymal stromal cells in myeloid malignancies*. Blood Res, 2016. **51**(4): p. 225-232.
41. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.

42. Kuželová, K., et al., *Integrin expression and adhesivity to fibronectin in primary acute myeloid leukemia cells: Impact of NPM1 and FLT3 mutations*. European Journal of Haematology, 2020. **105**(5): p. 578-587.
43. Kuett, A., et al., *IL-8 as mediator in the microenvironment-leukaemia network in acute myeloid leukaemia*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 18411.
44. Buggins, A., et al., *Microenvironment Produced by Acute Myeloid Leukemia Cells Prevents T Cell Activation and Proliferation by Inhibition of NF- B, c-Myc, and pRb Pathways*. Journal of Immunology, 2001. **167**(10): p. 6021-6030.
45. Bakhtiyari, M., et al., *The role of bone marrow microenvironment (BMM) cells in acute myeloid leukemia (AML) progression: immune checkpoints, metabolic checkpoints, and signaling pathways*. Cell Commun Signal, 2023. **21**(1): p. 252.
46. Chen, L., et al., *A Single-Cell Taxonomy Predicts Inflammatory Niche Remodeling to Drive Tissue Failure and Outcome in Human AML*. Blood Cancer Discov, 2023. **4**(5): p. 394-417.
47. Kim, J.A., et al., *Microenvironmental remodeling as a parameter and prognostic factor of heterogeneous leukemogenesis in acute myelogenous leukemia*. Cancer Res, 2015. **75**(11): p. 2222-31.
48. Geyh, S., et al., *Insufficient stromal support in MDS results from molecular and functional deficits of mesenchymal stromal cells*. Leukemia, 2013. **27**(9): p. 1841-51.
49. Geyh, S., et al., *Functional inhibition of mesenchymal stromal cells in acute myeloid leukemia*. Leukemia, 2016. **30**(3): p. 683-91.
50. Kremer, K., et al., *Osteoblasts protect AML cells from SDF-1-induced apoptosis.pdf*. J Cell Biochem., 2014. **115**(6): : p. 1128–1137.
51. Wu, C.-H., et al., *Biology and Therapeutic Properties of Mesenchymal Stem Cells in Leukemia*. International Journal of Molecular Sciences, 2024. **25**(5).
52. Cominal, J.G., et al., *Emerging Role of Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles in Pathogenesis of Haematological Malignancies*. Stem Cells Int, 2019. **2019**: p. 6854080.
53. Kandarakov, O., A. Belyavsky, and E. Semenova, *Bone Marrow Niches of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(8).
54. Batsali, A.K., et al., *The Role of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Derived Extracellular Vesicles (MSC-EVs) in Normal and Abnormal Hematopoiesis and Their Therapeutic Potential*. J Clin Med, 2020. **9**(3).
55. Shin, J.-W. and D.J. Mooney, *Extracellular matrix stiffness causes systematic variations in proliferation and chemosensitivity in myeloid leukemias*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2016. **113**(43): p. 12126-12131.
56. Soto, C.A., et al., *From the niche to malignant hematopoiesis and back: reciprocal interactions between leukemia and the bone marrow microenvironment*. JBMR Plus, 2021. **5**(10): p. e10516.
57. Aasebo, E., et al., *The Constitutive Extracellular Protein Release by Acute Myeloid Leukemia Cells-A Proteomic Study of Patient Heterogeneity and Its Modulation by Mesenchymal Stromal Cells*. Cancers (Basel), 2021. **13**(7).
58. Selheim, F., et al., *Monocytic Differentiation of Human Acute Myeloid Leukemia Cells: A Proteomic and Phosphoproteomic Comparison of FAB-M4/M5 Patients with and without Nucleophosmin 1 Mutations*. Int J Mol Sci, 2024. **25**(10).
59. Izzi, V., et al., *An extracellular matrix signature in leukemia precursor cells and acute myeloid leukemia*. Haematologica, 2017. **102**.
60. Naba, A., et al., *The matrisome: in silico definition and in vivo characterization by proteomics of normal and tumor extracellular matrices*. Mol Cell Proteomics, 2012. **11**(4): p. M111 014647.

61. Rolandsson Enes, S., et al., *Quantitative proteomic characterization of lung-MSC and bone marrow-MSC using DIA-mass spectrometry*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 9316.
62. Petersen, M.A., et al., *Proteomic Profiling Identifies Specific Leukemic Stem Cell-Associated Protein Expression Patterns in Pediatric AML Patients*. *Cancers (Basel)*, 2022. **14**(15).
63. Casado, P. and P.R. Cutillas, *Proteomic Characterization of Acute Myeloid Leukemia for Precision Medicine*. *Mol Cell Proteomics*, 2023. **22**(4): p. 100517.
64. Schrödel, A., *Zellzählung mittels Neubauer Zählkammer*. Vol. 40. 2010: Wiley-VCH-Verlag.
65. Ragelle, H., et al., *Comprehensive proteomic characterization of stem cell-derived extracellular matrices*. *Biomaterials*, 2017. **128**: p. 147-159.
66. Harris, G.M., I. Raitman, and J.E. Schwarzbauer, *Cell-derived decellularized extracellular matrices*. *Methods Cell Biol*, 2018. **143**: p. 97-114.
67. Biologisch-Medizinisches-Forschungszentrum. *Massenspektrometrie*. 2022 [cited 2022 30.06.2022]; HHU → Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum (BMFZ) → Zentrallaboratorien → Molecular Proteomics Laboratory (MPL) → Methoden → Massenspektrometrie]. Available from: <https://www.bmfz.hhu.de/zentrallaboratorien/molecular-proteomics-laboratory-mpl/methoden/massenspektrometrie>.
68. Shao, X., et al., *MatrisomeDB: the ECM-protein knowledge database*. *Nucleic Acids Research*, 2020. **48**: p. D1136–D1144.
69. Ashburner, M., et al., *Gene ontology: tool for the unification of biology*. *The Gene Ontology Consortium*. *Nat Genet*, 2000. **25**(1): p. 25-9.
70. UniProt, C., *UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023*. *Nucleic Acids Res*, 2023. **51**(D1): p. D523-D531.
71. Szklarczyk, D., et al., *The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets*. *Nucleic Acids Res*, 2021. **49**(D1): p. D605-D612.
72. Xiao, Y., et al., *Current insights into the bone marrow niche: From biology in vivo to bioengineering ex vivo*. *Biomaterials*, 2022. **286**: p. 121568.
73. Gunja-Smith, Z. and J. J. Frederick Woessner, *Content of the collagen and elastin cross-links pyridinoline and the desmosines in the human uterus in various reproductive states*. *Am J Obstet Gynecol*, 1985. **153**: p. 92-95.
74. Schmelzer, C.E.H., T. Hedtke, and A. Heinz, *Unique molecular networks: Formation and role of elastin cross-links*. *IUBMB Life*, 2020. **72**(5): p. 842-854.
75. Yeo, G.C. and A.S. Weiss, *Soluble matrix protein is a potent modulator of mesenchymal stem cell performance*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019. **116**(6): p. 2042-2051.
76. Li, J., et al., *Elastin is a key factor of tumor development in colorectal cancer*. *BMC Cancer*, 2020. **20**(1): p. 217.
77. Cui, J., et al., *The role of extracellular matrix in osteosarcoma progression and metastasis*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020. **39**(1): p. 178.
78. Holst, J., et al., *Substrate elasticity provides mechanical signals for the expansion of hemopoietic stem and progenitor cells*. *Nat Biotechnol*, 2010. **28**(10): p. 1123-8.
79. Scandolera, A., et al., *The Elastin Receptor Complex: A Unique Matricellular Receptor with High Antitumoral Potential*. *Front Pharmacol*, 2016. **7**: p. 32.
80. Schiavinato, A., et al., *Fibulin-4 deposition requires EMILIN-1 in the extracellular matrix of osteoblasts*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 5526.

81. Wang, Y., E.C. Song, and M.B. Resnick, *Elastin in the Tumor Microenvironment*. Adv Exp Med Biol, 2020. **1272**: p. 1-16.
82. Liu, M., C. Tolg, and E. Turley, *Dissecting the Dual Nature of Hyaluronan in the Tumor Microenvironment*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 947.
83. Caon, I., et al., *Revisiting the hallmarks of cancer: The role of hyaluronan*. Semin Cancer Biol, 2020. **62**: p. 9-19.
84. Twarock, S., et al., *Hyperglycaemia and aberrated insulin signalling stimulate tumour progression via induction of the extracellular matrix component hyaluronan*. Int J Cancer, 2017. **141**(4): p. 791-804.
85. Twarock, S., et al., *Inhibition of the hyaluronan matrix enhances metabolic anticancer therapy by dichloroacetate in vitro and in vivo*. Br J Pharmacol, 2019. **176**(23): p. 4474-4490.
86. Zhang, Y., S. Jia, and W.G. Jiang, *KIAA1199 and its biological role in human cancer and cancer cells (review)*. Oncol Rep, 2014. **31**(4): p. 1503-8.
87. Fink, S., et al., *Induction of KIAA1199/CEMIP is associated with colon cancer phenotype and poor patient survival*. Oncotarget, 2015. **6**: p. 30501-30515.
88. Kohi, S., et al., *KIAA1199 is induced by inflammation and enhances malignant phenotype in pancreatic cancer*. Oncotarget, 2017. **8**: p. 17156-17163.
89. Kothapalli, C. and A. Ramamurthi, *Biomimetic Regeneration of Elastin Matrices Using Hyaluronan and Copper Ion Cues*. Tissue Engineering, 2009. **15**: p. 103-113.
90. Kothapalli, C., et al., *Transforming Growth Factor Beta 1 and Hyaluronan Oligomers Synergistically Enhance Elastin Matrix Regeneration by Vascular Smooth Muscle Cells*. Tissue Engineering, 2009. **15**: p. 501-511.
91. Liu, J., et al., *The emerging role of KIAA1199 in cancer development and therapy*. Biomed Pharmacother, 2021. **138**: p. 111507.
92. Khaldoyanidi, S.K., et al., *Hyaluronan in the healthy and malignant hematopoietic microenvironment*. Adv Cancer Res, 2014. **123**: p. 149-89.
93. Zoller, M., *CD44, Hyaluronan, the Hematopoietic Stem Cell, and Leukemia-Initiating Cells*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 235.
94. Anagnostopoulou, E., et al., *Serum Hyaluronic Acid Levels Are Altered in Acute Leukemia Patients: Potential Prognostic Implications*. Acta Haematol, 2017. **138**(1): p. 44-51.
95. Charrad, R., et al., *Ligation of the CD44 adhesion molecule reverses blockage of differentiation in human acute myeloid leukemia*. Nature America, 1999. **5**: p. 669-676.
96. Isogai, Z., et al., *Versican interacts with fibrillin-1 and links extracellular microfibrils to other connective tissue networks*. J Biol Chem, 2002. **277**(6): p. 4565-72.
97. Kothapalli, C., C. Gacchina, and A. Ramamurthi, *Utility of Hyaluronan Oligomers and Transforming Growth Factor-Beta1 Factors for Elastic Matrix Regeneration by Aneurysmal Rat Aortic Smooth Muscle Cells*. Tissue Engineering, 2009. **15**.
98. Jiang, Y., et al., *Targeting extracellular matrix stiffness and mechanotransducers to improve cancer therapy*. J Hematol Oncol, 2022. **15**(1): p. 34.
99. Dong, Y., et al., *Higher matrix stiffness as an independent initiator triggers epithelial-mesenchymal transition and facilitates HCC metastasis*. J Hematol Oncol, 2019. **12**(1): p. 112.
100. Pankova, D., et al., *Cancer-Associated Fibroblasts Induce a Collagen Cross-link Switch in Tumor Stroma*. Mol Cancer Res, 2016. **14**(3): p. 287-95.
101. Xu, S., et al., *The role of collagen in cancer: from bench to bedside*. J Transl Med, 2019. **17**(1): p. 309.

102. Levental, K.R., et al., *Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling*. Cell, 2009. **139**(5): p. 891-906.
103. Vallet, S.D. and S. Ricard-Blum, *Lysyl oxidases: from enzyme activity to extracellular matrix cross-links*. Essays Biochem, 2019. **63**(3): p. 349-364.
104. Baker, A.M., et al., *Lysyl oxidase enzymatic function increases stiffness to drive colorectal cancer progression through FAK*. Oncogene, 2013. **32**(14): p. 1863-8.
105. Adamo, C.S., et al., *EMILIN1 deficiency causes arterial tortuosity with osteopenia and connects impaired elastogenesis with defective collagen fibrillogenesis*. Am J Hum Genet, 2022. **109**(12): p. 2230-2252.
106. Choudhury, R., et al., *Differential regulation of elastic fiber formation by fibulin-4 and -5*. J Biol Chem, 2009. **284**(36): p. 24553-67.
107. Peng, D.H., et al., *ZEB1 induces LOXL2-mediated collagen stabilization and deposition in the extracellular matrix to drive lung cancer invasion and metastasis*. Oncogene, 2017. **36**(14): p. 1925-1938.
108. Nwabo Kamdje, A.H., et al., *Tumor Microenvironment Uses a Reversible Reprogramming of Mesenchymal Stromal Cells to Mediate Pro-tumorigenic Effects*. Front Cell Dev Biol, 2020. **8**: p. 545126.
109. Ghosh, D., et al., *Senescent mesenchymal stem cells remodel extracellular matrix driving breast cancer cells to a more-invasive phenotype*. J Cell Sci, 2020. **133**(2).
110. Meng, X.M., D.J. Nikolic-Paterson, and H.Y. Lan, *TGF-beta: the master regulator of fibrosis*. Nat Rev Nephrol, 2016. **12**(6): p. 325-38.
111. Zhang, H., D. Hui, and X. Fu, *Roles of Fibulin-2 in Carcinogenesis*. Med Sci Monit, 2020. **26**: p. e918099.
112. Zhang, X., et al., *Correlation of Fibulin-2 expression with proliferation, migration and invasion of breast cancer cells*. Oncol Lett, 2020. **20**(2): p. 1945-1951.
113. Fontanil, T., et al., *Interaction between the ADAMTS-12 metalloprotease and fibulin-2 induces tumor-suppressive effects in breast cancer cells*. Oncotarget, 2014. **5**: p. 1253-1264.
114. Keire, P.A., et al., *Inhibition of versican expression by siRNA facilitates tropoelastin synthesis and elastic fiber formation by human SK-LMS-1 leiomyosarcoma smooth muscle cells in vitro and in vivo*. Matrix Biol, 2016. **50**: p. 67-81.
115. Keire, P., et al., *Expression of Versican Isoform V3 in the Absence of Ascorbate Improves Elastogenesis in Engineered Vascular Constructs*. Tissue Engineering, 2010. **16**.
116. Kang, I., et al., *Expression of versican V3 by arterial smooth muscle cells alters tumor growth factor beta (TGFbeta)-, epidermal growth factor (EGF)-, and nuclear factor kappaB (NFkappaB)-dependent signaling pathways, creating a microenvironment that resists monocyte adhesion*. J Biol Chem, 2014. **289**(22): p. 15393-404.
117. Yang, Y., et al., *Versican gene: regulation by the beta-catenin signaling pathway plays a significant role in dermal papilla cell aggregative growth*. J Dermatol Sci, 2012. **68**(3): p. 157-63.
118. Zhangyuan, G., et al., *VersicanV1 promotes proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma through the activation of EGFR-PI3K-AKT pathway*. Oncogene, 2020. **39**(6): p. 1213-1230.
119. Carthy, J.M., et al., *Versican V1 Overexpression Induces a Myofibroblast-Like Phenotype in Cultured Fibroblasts*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0133056.
120. Asano, K., et al., *Stromal Versican Regulates Tumor Growth by Promoting Angiogenesis*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 17225.

- 121.El Kramani, N., et al., *Clinical significance of the TNF-alpha receptors, TNFRSF2 and TNFRSF9, on cell migration molecules Fascin-1 and Versican in acute leukemia*. Cytokine, 2018. **111**: p. 523-529.
- 122.Wu, Y., et al., *The interaction of versican with its binding partners*. Cell Research, 2005. **15**: p. 483-494.
- 123.Hirani, P., et al., *Targeting Versican as a Potential Immunotherapeutic Strategy in the Treatment of Cancer*. Front Oncol, 2021. **11**: p. 712807.
- 124.Moon, H.J., et al., *Human lysyl oxidase-like 2*. Bioorg Chem, 2014. **57**: p. 231-241.
- 125.Ye, M., et al., *Evolving roles of lysyl oxidase family in tumorigenesis and cancer therapy*. Pharmacol Ther, 2020. **215**: p. 107633.
- 126.Wen, B., L.Y. Xu, and E.M. Li, *LOXL2 in cancer: regulation, downstream effectors and novel roles*. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2020. **1874**(2): p. 188435.
- 127.Fan, Z., et al., *Phosphorylation of AKT by lysyl oxidase-like 2 activates the PI3K/AKT signaling pathway to promote proliferation, invasion and metastasis in esophageal squamous carcinoma*. Clin Transl Oncol, 2023. **25**(8): p. 2487-2498.
- 128.Wu, L. and Y. Zhu, *The function and mechanisms of action of LOXL2 in cancer (Review)*. Int J Mol Med, 2015. **36**(5): p. 1200-4.
- 129.Chitty, J.L., Y.F.I. Setargew, and T.R. Cox, *Targeting the lysyl oxidases in tumour desmoplasia*. Biochem Soc Trans, 2019. **47**(6): p. 1661-1678.
- 130.Trackman, P.C., *Lysyl Oxidase Isoforms and Potential Therapeutic Opportunities for Fibrosis and Cancer*. Expert Opin Ther Targets, 2016. **20**(8): p. 935-45.
- 131.Wang, T.H., S.M. Hsia, and T.M. Shieh, *Lysyl Oxidase and the Tumor Microenvironment*. Int J Mol Sci, 2016. **18**(1).
- 132.Salmon, H., et al., *Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors*. J Clin Invest, 2012. **122**(3): p. 899-910.
- 133.Martins Cavaco, A.C., et al., *Collagen biology making inroads into prognosis and treatment of cancer progression and metastasis*. Cancer Metastasis Rev, 2020. **39**(3): p. 603-623.
- 134.Liang, Y., et al., *Prognostic significance of abnormal matrix collagen remodeling in colorectal cancer based on histologic and bioinformatics analysis*. Oncol Rep, 2020. **44**(4): p. 1671-1685.
- 135.Thomson, J., et al., *Fibrillin microfibrils and elastic fibre proteins: Functional interactions and extracellular regulation of growth factors*. Semin Cell Dev Biol, 2019. **89**: p. 109-117.
- 136.Qa'aty, N., et al., *Synthetic ligands of the elastin receptor induce elastogenesis in human dermal fibroblasts via activation of their IGF-1 receptors*. J Dermatol Sci, 2015. **80**(3): p. 175-85.
- 137.Kim, G.Y., et al., *Htra1 is a novel antagonist controlling fibroblast growth factor (FGF) signaling via cleavage of FGF8*. Mol Cell Biol, 2012. **32**(21): p. 4482-92.
- 138.Graham, J.R., et al., *Serine protease HTRA1 antagonizes transforming growth factor-beta signaling by cleaving its receptors and loss of HTRA1 in vivo enhances bone formation*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e74094.
- 139.Wu, H., et al., *HTRA1 promotes transdifferentiation of normal fibroblasts to cancer-associated fibroblasts through activation of the NF-kappaB/bFGF signaling pathway in gastric cancer*. Biochem Biophys Res Commun, 2019. **514**(3): p. 933-939.
- 140.Papke, C.L., et al., *Loss of fibulin-4 disrupts collagen synthesis and maturation: implications for pathology resulting from EFEMP2 mutations*. Hum Mol Genet, 2015. **24**(20): p. 5867-79.
- 141.Cirulis, J., et al., *Fibrillins, Fibulins, and Matrix-Associated Glycoprotein Modulate the Kinetics and Morphology of in Vitro Self-Assembly of a Recombinant Elastin-like Polypeptide*. Biochemistry, 2008. **47**: p. 12601-12613.

142. Papke, C.L. and H. Yanagisawa, *Fibulin-4 and fibulin-5 in elastogenesis and beyond: Insights from mouse and human studies*. Matrix Biol, 2014. **37**: p. 142-9.
143. Li, R. and L. Wang, *Fibulin-4 is a novel Wnt/beta-Catenin pathway activator in human osteosarcoma*. Biochem Biophys Res Commun, 2016. **474**(4): p. 730-735.
144. Zhang, D., et al., *Fibulin-4 promotes osteosarcoma invasion and metastasis by inducing epithelial to mesenchymal transition via the PI3K/Akt/mTOR pathway*. Int J Oncol, 2017. **50**(5): p. 1513-1530.
145. Burger, J., et al., *Fibulin-4 deficiency differentially affects cytoskeleton structure and dynamics as well as TGFbeta signaling*. Cell Signal, 2019. **58**: p. 65-78.
146. Geyh, S., et al., *Transforming growth factor beta1-mediated functional inhibition of mesenchymal stromal cells in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia*. Haematologica, 2018. **103**(9): p. 1462-1471.
147. Rabes, H.M., et al., *Pattern of radiation-induced RET and NTRK1 rearrangements in 191 post-chernobyl papillary thyroid carcinomas: biological, phenotypic, and clinical implications*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(3): p. 1093-103.
148. Lionni, L., *Frederick*. 1967: Middelhaue Verlag. 36.

Danksagung

Zunächst danke ich meinem Betreuer Prof. Dr. Dr. Sören Twarock, der mich mit humoristisch-wissenschaftlicher Kompetenz zunächst an die Pharmakologie und in der Folge an die Forschung herangeführt hat.

Dr. Stefanie Geyh möchte ich für ihre Hilfe bei der praktischen Umsetzung dieser Arbeit sowie für ihren Fleiß und ihre Hingabe danken, im Labor immer nach dem Rechten zu schauen, vor allem, ob der Schokoladentisch allzeit adäquat gefüllt ist.

Prof. Dr. Haas danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Der Düsseldorf School of Oncology möchte ich danken für die finanzielle Unterstützung in Form eines Promotionsstipendiums.

All meinen Freundinnen und Freunden möchte ich danken, dass sie mich konsequent samstagabends daran erinnern haben, mich am Folgemorgen wieder an die Dissertation zu setzen.

Meinem Großvater Bupapa möchte ich für den Rat zu dieser Arbeit und seine großen wissenschaftlichen Fußstapfen danken [147], in die ich mit Abschluss dieser Dissertation zumindest in Form einer kleinen Zehe treten darf.

Wutz und Cookie danke ich für den vierbeinigen Support und die mal emotionale, mal intellektuelle Bereicherung, die unsere Begegnungen zu Tage führen bzw. führten.

Zu guter Letzt und allen voran möchte ich meiner gesamten Familie danken, insbesondere meinen Eltern Pino und Basti sowie meiner Schwester Daria, die mich durch das Studium getragen haben, mir immer mit Rat und Tat zur Seite stehen, mich mit offenen Armen unterstützen und meine Ansprechpartner für alles sind. Egal ob in Tocopilla, Muscat, Rio oder Khao Lak, ihr seid meine 3 Fredericks [148] und ich genieße jede Sekunde mit euch!

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.