

Aus der  
Medizinischen Klinik  
Klinische Kooperationseinheit Translationale Immunologie (KKE)  
in Zusammenarbeit mit dem  
Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ)

**Die Rolle von RANK in der akuten myeloischen Leukämie**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Weber, Lisa Marie**

**2025**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. R. Salih

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Gawaz

Tag der Disputation: 26.05.2023

**Meinen Eltern**

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	1
Tabellenverzeichnis .....	1
Abkürzungsverzeichnis .....	2
1 Einleitung.....	5
1.1 Hämatopoese.....	5
1.2 Akute myeloische Leukämie (AML).....	6
1.2.1 Definition und Epidemiologie .....	6
1.2.2 Ätiologie und Pathogenese .....	7
1.2.3 Klassifikation.....	8
1.2.4 Diagnostik und klinische Symptomatik.....	9
1.2.5 Therapie .....	9
1.2.6 Tumorstammzellen .....	10
1.3 Tumornekrosefaktor-Superfamilie .....	12
1.3.1 Receptor activator of NF- $\kappa$ B (RANK) und sein Ligand (RANKL) ..	13
1.4 Fragestellung .....	16
2 Material und Methoden .....	18
2.1 Material .....	18
2.1.1 Verbrauchsmaterial.....	18
2.1.2 Reagenzien und Chemikalien .....	19
2.1.3 Geräte und Zubehör .....	20
2.1.4 Antikörper und Fusionsproteine .....	21
2.1.5 Zelllinien .....	22
2.1.6 Primer.....	23
2.1.7 Kits .....	23
2.1.8 Programme.....	24
2.2 Methoden .....	25
2.2.1 Zellbiologische Methoden .....	25
2.2.2 Genexpressionsanalyse .....	26
2.2.3 Primäre AML-Zellen.....	27

2.2.4	Durchflusszytometrie (FACS) .....	28
2.2.5	LEGENDplex™ Multiplex Assay .....	31
2.2.6	Colony-Forming Unit Assay (CFU Assay) .....	31
2.2.7	CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (CTG Assay).....	32
2.2.8	WST-1 Assay.....	32
3	Ergebnisse .....	33
3.1	Expression von RANK bei AML-Zelllinien.....	33
3.2	RANK in primären AML-Zellen .....	34
3.2.1	Patientenkollektiv.....	34
3.2.2	RANK-Expression primärer AML-Zellen.....	36
3.2.3	Rolle von RANK für Stammzeleigenschaften in der AML .....	40
3.3	Funktionelle Relevanz von RANK in der AML .....	45
3.3.1	RANK-Signalübertragung in primären AML-Zellen.....	45
3.3.2	Effekte von RANK-Signalübertragung auf AML-Zellen unter Chemotherapie .....	48
3.3.3	Einfluss von Denosumab auf die durch RANK-Signaling medierten Effekte in AML .....	57
3.3.4	RANK-Expression als prognostischer Marker .....	58
4	Diskussion .....	60
5	Zusammenfassung .....	66
6	Literaturverzeichnis .....	68
7	Erklärung zum Eigenanteil.....	79
8	Veröffentlichungen.....	80
9	Danksagung .....	81

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Darstellung der Hämatopoese. ....	5
Abbildung 2 Leukämogenese. ....	11
Abbildung 3 Expression von RANK bei AML-Zelllinien. ....	33
Abbildung 4 Expression von RANK bei primären AML-Zellen. ....	37
Abbildung 5 Korrelationen der RANK-Expression in der AML. ....	39
Abbildung 6 Schematische Darstellung der Gatingstrategie zur Analyse des Zusammenhangs zwischen RANK-Expression und Stammzellphänotyp. ....	40
Abbildung 7 Analyse der RANK-Expression auf AML-Blasten nach Stammzell- oder Differenzierungsphänotyp. ....	42
Abbildung 8 RANKL-Expression und Koexpression von RANK und RANKL auf AML-Blasten nach Stammzell- oder Differenzierungsphänotyp. ....	43
Abbildung 9 Klonogenitätstest der RANK <sup>pos</sup> RANKL <sup>pos</sup> und RANK <sup>neg</sup> RANKL <sup>neg</sup> AML-Zellen. ....	44
Abbildung 10 RANK-Signalübertragung führt zu gesteigerter metabolischer Aktivität in AML- Zellen. ....	45
Abbildung 11 Produktion und Sekretion von Zytokinen nach Stimulation von RANK auf AML- Zellen. ....	47
Abbildung 12 Einfluss von RANK-Stimulation auf AML-Zelllinien unter Chemotherapie im WST-1 Assay. ....	49
Abbildung 13 Effekte von RANK-Stimulation auf die Viabilität von AML-Zelllinien. ....	50
Abbildung 14 Kinetik der RANK-Oberflächenexpression auf der AML-Zelllinie HL-60. ....	51
Abbildung 15 Titrationskurven für Doxorubicin und Cytarabin mit primären AML-Zellen. ....	52
Abbildung 16 Analyse des Effekts von RANK-Stimulation auf die metabolische Aktivität primärer AML-Proben im CTG. ....	54
Abbildung 17 Durchflusszytometrische Analyse des Effekts von RANK-Stimulation auf die Viabilität primärer AML-Zellen. ....	56
Abbildung 18 Analyse der Viabilität primärer AML-Zellen nach RANK-Stimulation unter Chemotherapie und Modulation durch RANK-RANKL-Blockade. ....	57
Abbildung 19 Prognostische Relevanz der RANK-Expression in der AML. ....	59

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 FAB-Klassifikation der AML nach Bennet JM 1976, 1985, 1991 <sup>36-38</sup> .....	8
Tabelle 2 Kultivierung von Zelllinien .....	24
Tabelle 3 Patientenkollektiv .....	35

## Abkürzungsverzeichnis

ADCC	Antikörper-vermittelte Zytotoxizität
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	<i>Allophycocyanin</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAFF	<i>B-cell activating factor</i>
BAFF-R	<i>B-cell activating factor receptor</i>
Bcl2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCMA	<i>B-cell maturation antigen</i>
BRCA	<i>BReast CAncer gene</i>
cDNA	komplementäre DNA
CEBPA	<i>CCAAT Enhancer Binding Protein Alpha</i>
CFU	<i>Colony-Forming Unit</i>
CLL	Chronisch lymphathische Leukämie
CR	komplette Remission
CRD	cysteinreiche Domäne
CTG-Assay	CellTiter-Glo® <i>Luminescent Cell Viability Assay</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FAB	<i>French-American-British</i>
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
FCS	Fötales Kälberserum
FLT3	<i>fms like tyrosine kinase 3</i>
GITRL	<i>Glucocorticoid-induced TNFR-related protein Ligand</i>
FSC	Vorwärtsstreulicht
HR	<i>Hazard Ratio</i>
HSZ	hämatopoetische Stammzelle
IAP	<i>inhibitors of apoptosis</i>

---

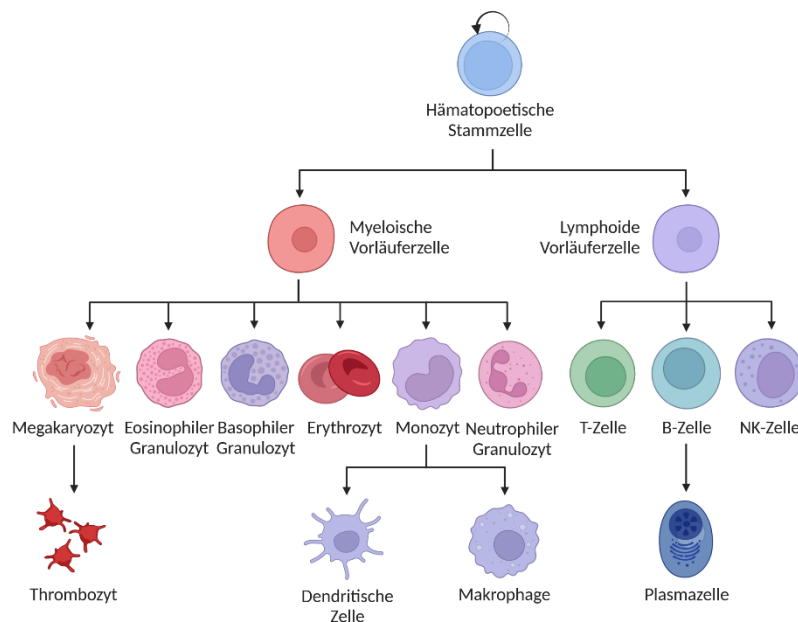
IL	Interleukin
KMT2A	<i>Histone-lysine N-methyltransferase 2A</i>
K-RAS	<i>Kirsten rat sarcoma virus</i>
LC50	halbmaximal letale Konzentration
LGR4	<i>Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 4</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LSZ	leukämische Stammzelle
mAb	monoklonaler Antikörper
MDR1	<i>Multidrug-Resistance Protein</i>
MDS	myelodisplastisches Syndrom
MFI	durchschnittliche Fluoreszenzintensität
MM	Multiplles Myelom
MRD	minimale Resterkrankung
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n	Anzahl
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK-Zelle	Natürliche Killer-Zelle
NPM1	<i>Nucleophosmin 1</i>
N-RAS	<i>Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog</i>
OD	Optische Dichte
OPG	<i>Osteoprogenin</i>
p	p-Wert
pAb	polyklonaler Antikörper
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	<i>R-Phycoerythrin</i>
qPCR	quantitative Polymerasenkettenreaktion
RANK	<i>Receptor activator of NF-<math>\kappa</math>B</i>
RANKL	<i>Receptor activator of NF-<math>\kappa</math>B-Ligand</i>
rhRANKL	lösliches rekombinantes RANKL
RNA	Ribonukleinsäure
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>

RRN18S	18S ribosomale RNA
Rs	<i>Spearman</i> -Korrelationskoeffizient
sAML	sekundäre AML
SFI	Spezifische Fluoreszenzintensität
SSC	Seitwärtsstreulicht
TACI	<i>Transmembrane activator and CAML interactor</i>
tAML	therapieinduzierte AML
THD	TNF Homologie Domäne
TMRE	<i>Tetramethylrhodamine, ethyl ester</i>
TMU	Tumormikroumgebung
TNF	Tumornekrose-Faktor
TNF(R)SF	Tumornekrosefaktor-(Rezeptor)-Superfamilie
TRAF	TNF-Rezeptor-assoziiertes Faktor
WHO	<i>World Health Organisation</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 Hämatopoese

Zur Erhaltung einer konstanten Zusammensetzung des Blutes mit seinen zellulären und azellulären Bestandteilen ist aufgrund der begrenzten Lebensdauer der einzelnen Blutzellen eine kontinuierliche Neubildung dieser nötig. Die Hämatopoese beschreibt diesen hierarchisch strukturierten Prozess, bei dem aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) im Knochenmark differenziertere Zellen entstehen.<sup>1,2</sup> Reguliert wird die Hämatopoese beispielsweise durch das Zusammenspiel von Wachstumsfaktoren, welche proliferationsfördernd wirken, und Transkriptionsfaktoren, deren Aktivierung zur Differenzierung zu einer Blutzelllinie führt.<sup>3,4</sup> Zu unterscheiden sind die Myelopoese, bei der aus myeloischen Stammzellen Erythrozyten, Monozyten bzw. Makrophagen, Granulozyten, Mastzellen, dendritische Zellen und Thrombozyten entstehen, und die Lymphopoese, bei der B- und T-Lymphozyten sowie Natürliche Killer (NK)-Zellen gebildet werden.<sup>5</sup>



**Abbildung 1 Schematische Darstellung der Hämatopoese.** Aus pluripotenten Stammzellen entstehen im Rahmen der Hämatopoese differenzierte Effektorzellen, welche entweder der myeloischen oder der lymphoiden Zellreihe zugeordnet werden können. Erstellt mit *Biorender.com*. Modifiziert nach Tan et al. 2006<sup>6</sup>

Anhand morphologischer und zytochemischer Charakteristika ist es möglich, die verschiedenartig spezialisierten Zellen zu unterscheiden.<sup>7</sup> Während die Erythrozyten beispielsweise für den Transport der Atemgase und die Säure-Base-Pufferung des Blutes verantwortlich sind und zirkulierende Thrombozyten unter anderem wesentliche Mediatoren der Gerinnungskaskade sind, sind Leukozyten (Monozyten, Granulozyten, Mastzellen, dendritische Zellen und Lymphozyten) als Bestandteil des Immunsystems an der Abwehr von Krankheitserregern beteiligt.<sup>1,8-10</sup>

## **1.2 Akute myeloische Leukämie (AML)**

### **1.2.1 Definition und Epidemiologie**

Der Begriff *Leukämie* (griechisch: „weißes Blut“) umfasst eine heterogene Gruppe hämatologischer Erkrankungen, welche durch eine Störung im Prozess der Hämatopoese entstehen und zu einer abnormalen Proliferation aberranter Zellklone führen.<sup>11,12</sup> Anhand des Krankheitsverlaufs und der betroffenen Zellreihe unterscheidet man vier Subtypen: die beiden akuten Leukämieformen akute myeloische Leukämie (AML) und akute lymphatische Leukämie, sowie die beiden chronischen Leukämieformen chronisch myeloische Leukämie und chronisch lymphatische Leukämie (CLL).

Die vorliegende Arbeit fokussiert auf die AML, eine heterogene Erkrankung mit klonaler Neoplasie hämatopoetischer Vorläuferzellen der myeloischen Reihe. Die maligne Transformation bedingt, dass die Zellen abnorm proliferieren und ihre Fähigkeit zur Differenzierung verlieren.<sup>13,14</sup> Dies resultiert in einer Akkumulation funktionsloser Blasten im Knochenmark<sup>13,15</sup> und zumeist auch in einer Ausschwemmung der Blasten in das periphere Blut sowie, weniger häufig, in extramedulläre Organe.<sup>16</sup> Mit einer Inzidenz von 3,7 Erkrankungen pro 100 000 Einwohner\* pro Jahr in Deutschland ist die AML die häufigste akute Leukämieform bei Erwachsenen, wobei Männer etwas häufiger betroffen sind als Frauen (4,55 bzw. 3,04 / 100 000 Einwohner).<sup>12,16</sup> Die altersspezifische Inzidenz

---

\* In dieser Arbeit wird aus Gründen der besseren Lesbarkeit das generische Maskulinum verwendet. Soweit erforderlich beziehen sich die Aussagen jedoch ausdrücklich auf beide Geschlechter.

zeigt einen ausgeprägten Hochpunkt im Alter.<sup>17</sup> Bei Patienten mit einem Alter von 70 Jahren und älter steigt sie auf über 100 Erkrankungen pro 100 000 Einwohner.<sup>18</sup> Prognostisch geht man aufgrund der steigenden Lebenserwartung von einem weiteren Anstieg der Inzidenz und ihrem Anteil an allen Leukämieformen aus.<sup>19,20</sup> Das mediane Erkrankungsalter liegt derzeit bei 68 Jahren.<sup>21</sup> Global war die AML im Jahr 2018 mit 437 033 Fällen der 15. häufigste Krebs und mit 309 006 Todesfällen die 11. häufigste Todesursache durch maligne Erkrankungen, wobei Prävalenz und Gesamtsterblichkeit in den Industriestaaten höher sind als in weniger entwickelten Ländern.<sup>22,23</sup>

### **1.2.2 Ätiologie und Pathogenese**

Hämatologische Neoplasien entstehen durch genetische Mutationen, welche die Regulation des hämatopoetischen Zellwachstums, der Differenzierung und der Apoptose beeinträchtigen.<sup>24</sup> Eine AML kann entweder *de novo* in zuvor gesunden Personen, sekundär (sAML) beispielsweise aus einem myelodysplastischen Syndrom (MDS) oder durch die Therapie maligner Erkrankungen mittels ionisierender Strahlung oder zytotoxischer Medikamente (tAML) entstehen.<sup>13,25,26</sup> Nach der *two-hit Hypothese* der Leukämogenese sind sowohl Mutationen der Klasse I als auch solche der Klasse II nötig, damit es zu einer malignen Entartung kommt.<sup>13,27</sup> Mutationen der Klasse I wirken proliferationsfördernd und umfassen z.B. *fms like tyrosine kinase 3* (FLT3), *Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog* (N-RAS) oder *Kirsten rat sarcoma virus* (K-RAS), während Mutationen der Klasse II blockierend auf die normale hämatopoetische Differenzierung wirken (z.B. *CCAAT Enhancer Binding Protein Alpha* (CEBPA), *Nucleophosmin 1* (NPM1), *Histone-lysine N-methyltransferase 2A* (KMT2A)).<sup>27,28</sup> Eine AML weist durchschnittlich 13 Mutationen auf, wobei die Anzahl an Mutationen bei tAMLs zumeist höher ist.<sup>29,30</sup> Die Zahl der Mutationen korreliert mit dem Fortschreiten der Erkrankung.<sup>31</sup> Dies zeigt sich unter anderem darin, dass Patienten in klinischer Remission häufig weiterhin eine klonale Hämatopoese besitzen, welche durch präleukämische Stammzellen hervorgerufen wird, die nur eine proliferationssteigernde Mutation erworben haben.<sup>32-34</sup> Außerdem werden Schädigungen der Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Mutationen in

therapierefraktären Zellen als eine Ursache für das Wiederauftreten der Erkrankung angesehen.<sup>35</sup>

### 1.2.3 Klassifikation

Die *French-American-British* (FAB)-Klassifikation war der erste Versuch, die heterogene Erkrankung basierend auf morphologischen und zytochemischen Eigenschaften zu klassifizieren. Sie unterscheidet sechs Subtypen (M1-M6), die unter der Zunahme von immunologischen Markern um die zwei Subtypen M0 und M7 ergänzt wurden (**Tabelle 1**). Ziel dieser Klassifikation war es, Aussagen über die Behandelbarkeit und Prognose der Erkrankung treffen zu können.<sup>36-39</sup>

**Tabelle 1** FAB-Klassifikation der AML nach Bennet JM 1976, 1985, 1991<sup>36-38</sup>

M0	Akute myeloische Leukämie mit minimaler Differenzierung
M1	Akute myeloische Leukämie ohne Ausreifung
M2	Akute myeloische Leukämie mit Ausreifung
M3	Akute Promyelozyten-Leukämie
M4	Akute myelomonozytäre Leukämie
M5a	Akute Monozyten-Leukämie ohne Ausreifung
M5b	Akute Monozyten-Leukämie mit Ausreifung
M6	Akute Erythroleukämie
M7	Akute Megakaryoblastenleukämie

Fortschritte in der Diagnosestellung und Methodik führten zur neueren Klassifikation der *World Health Organisation* (WHO), welche neben den morphologischen und zytochemischen Eigenschaften auch die Ätiologie (*de novo*, sAML, tAML), sowie den immunologischen Phänotyp, genetische und klinische Eigenschaften berücksichtigt. Ziel dieser neuen Klassifikation war es, die molekularen Signalwege und damit die Pathophysiologie der AML abzubilden und folglich die Grundlage für künftige Therapien zu schaffen.<sup>40-44</sup> Das *European LeukemiaNet* veröffentlichte darüber hinaus drei auf genetischen Anomalien beruhende, für die Therapiesteuerung relevante Prognosegruppen (günstige, intermediäre, ungünstige Prognose).<sup>45</sup>

### **1.2.4 Diagnostik und klinische Symptomatik**

Die Diagnose AML ist bei einem Anteil der Blasten im peripheren Blut oder Knochenmark von mindestens 20 % oder dem zyto- oder molekulargenetischen Nachweis des Vorhandenseins von AML-definierenden genetischen Anomalien entsprechend der Definition der WHO-Klassifikation zu stellen.<sup>18,40</sup> Durch klonale Expansion der leukämischen Zellen kommt es zu einer Hemmung des Übergangs der HSZ in Vorläuferzellen.<sup>46</sup> Dies resultiert in einer progredienten Knochenmarksinsuffizienz und folglich in einer Unterdrückung der normalen Hämatopoese aller Zellreihen, wodurch häufig eine Zytopenie entsteht.<sup>47</sup> Es kommt zu einer Anämie mit Blässe, Müdigkeit und verminderter Leistungsfähigkeit, einer Neutropenie mit erhöhter Infektneigung und einer Thrombozytopenie z.B. mit Petechien oder Epistaxis.<sup>13,18</sup> Die meisten Patienten präsentieren sich mit einer laborchemischen Leukozytose bis hin zur Leukostase, wobei dennoch ein Mangel an immunkompetenten Leukozyten besteht.<sup>48</sup> Insbesondere bei myelomonozytären Formen der AML werden oftmals extramedulläre Manifestationen, insbesondere die Infiltration von Milz und Leber, mit dem klinischen Korrelat der Hepatosplenomegalie beobachtet.<sup>18</sup>

### **1.2.5 Therapie**

Trotz vielfältiger Entwicklungen in der Therapie bleibt die AML auch heute schlecht behandelbar. Die Einführung der sogenannten Induktionstherapie im Jahr 1973 brachte erste Therapieerfolge und ist seitdem der Goldstandard für Patienten mit Eignung für eine intensive chemotherapeutische Behandlung.<sup>49-51</sup> Die Induktionstherapie, bestehend aus dreitägiger Gabe eines Anthrazyklins, beispielsweise Daunorubicin oder Idarubicin, und siebentägiger Gabe von hochdosiertem Cytarabin (7 + 3 Schema), führt bei jungen Patienten (<60 Jahre) zu einer kompletten Remissions- (CR)-Rate von 60 - 85 %. Ältere Patienten, die entsprechend der Epidemiologie einen Großteil der AML-Patienten ausmachen, profitieren hingegen weniger von dieser Therapie und erreichen nur in 40 – 60 % der Fälle eine CR.<sup>52,53</sup> Die Prognose für diese Patienten wird zusätzlich dadurch limitiert, dass die Anwendung dieser intensiven Therapiestrategie durch das Vorliegen von Komorbiditäten und das vermehrte Auftreten von Organtoxizitäten in diesem Patientenkollektiv oft nicht möglich ist.<sup>54,55</sup> Häufig liegen zudem

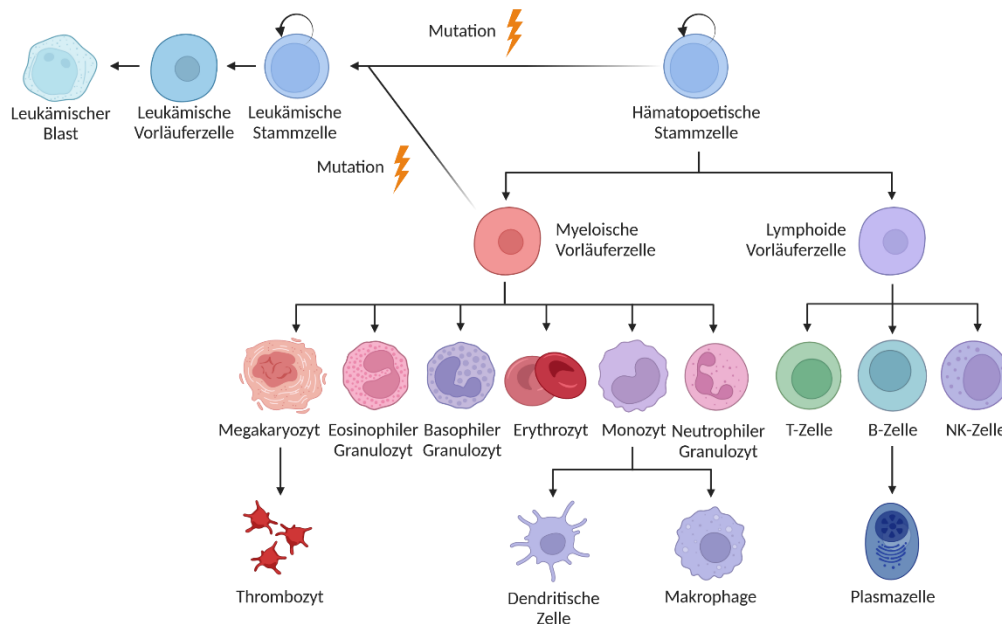
weniger chemotherapiesensitive Formen der Erkrankung vor.<sup>56</sup> Zusammen führt das zu einer schlechten Prognose mit mittlerem Überleben dieser Gruppe von 6 bis 9 Monaten.<sup>57</sup> Die seit 2020 für die AML zugelassene Kombinationstherapie aus Azacitidin, einem Nukleotid-Analogon und DNA-Methyltransferase-Inhibitor und Venetoclax, einem *B-cell lymphoma 2* (Bcl2)-Inhibitor, führte bei diesen Patienten zu einer deutlichen Zunahme der Remissionsraten und einer Verlängerung des Gesamtüberlebens.<sup>58-60</sup> Zur Optimierung der Therapie haben sich mehrere AML-Studiengruppen und multizentrische Studien gebildet. So wird derzeit beispielsweise untersucht, ob die Ergänzung der Induktionstherapie um ein drittes Medikament die Prognose der AML-Patienten verbessern kann. In einer Studie konnte durch die zusätzliche Gabe von Midostaurin das Überleben von AML-Patienten mit FLT3-Mutation von 25,6 Monaten auf 74,7 Monate fast verdreifacht werden.<sup>61</sup>

Bei Therapieansprechen und Erreichen der CR folgt in Abhängigkeit des individuellen Risikoprofils und des Vorhandenseins eines Stammzellenspenders entweder eine chemotherapeutische Konsolidierungstherapie oder eine allogene Stammzelltransplantation.<sup>18,62</sup> Trotz diesem intensiven Therapieregime stellt die sehr hohe Rückfallquote ein bedeutsames Problem in der Behandlung der AML dar.<sup>48</sup> Rückfälle gehen häufig mit einer gesteigerten molekularen Komplexität mit neuen Subklonen und Mutationen einher, wodurch die leukämischen Zellen vermehrt resistent gegenüber der Behandlung werden.<sup>30,63,64</sup> Für Patienten mit Krankheitsrückfall bleibt die allogene Stammzelltransplantation weiterhin die einzige kurative Therapieoption.<sup>18,65</sup> All diese Faktoren führen zu einem mittleren 5-Jahres-Überleben in Deutschland von nur 24,1 %.<sup>66</sup>

### **1.2.6 Tumorstammzellen**

Von besonderer Bedeutung für die Initiierung und Aufrechterhaltung von Tumorerkrankungen sind sogenannte Tumorstammzellen. Analog zur gesunden Hämatopoese handelt es sich bei der *Leukämogenese* um einen hierarchisch strukturierten Prozess, bei dem aus einer leukämischen Stammzelle (LSZ) über Vorläuferzellen leukämische Blasten mit einer niedrigen Zellteilungskapazität entstehen.<sup>67,68</sup> LSZ erwerben durch die maligne Transformation Überlebens- und

Proliferationsvorteile gegenüber gesunden hämatopoetischen Zellen, wodurch es zu einer Verdrängung der normalen Hämatopoese kommt.<sup>69</sup> Die Heterogenität der AML legt nahe, dass auch die Ursprungszelle und die Entwicklung zur Leukämie heterogen sind.<sup>68,70</sup> Der zytomorphologische Phänotyp und die funktionellen Eigenschaften der LSZ ähneln denen der HSZ, weshalb vermutet wird, dass präleukämische Mutationen in HSZ auftreten.<sup>71</sup> Die Transformation in eine Leukämie kann aber auch erst in den direkt nachgeschalteten Vorläuferzellen stattfinden.<sup>6,68</sup> Dies ist vereinbar mit dem *Two-Hit Modell der Leukämogenese*.<sup>13,29</sup> Die lange Lebenszeit der HSZ begünstigt zudem das Auftreten mehrerer Mutationen.<sup>6</sup>



**Abbildung 2 Leukämogenese.** Mutationen in HSZ und Vorläuferzellen führen zur Entstehung leukämischer Stammzellen. Diese produzieren leukämische Blasts ohne Teilungskapazität. Erstellt mit *Biorender.com*. Modifiziert nach Tan et al. 2006.<sup>6</sup>

Goldstandard zur Identifizierung leukämischer Stammzellen ist die Leukämieinitiierung im Xenograft-Modell.<sup>72</sup> Erstmals gelang dies im Jahr 1994 durch die Transplantation humaner CD34<sup>pos</sup>CD38<sup>neg</sup>-Populationen in Mäuse.<sup>73</sup> Daneben ist ein hoher Anteil CD34<sup>pos</sup>CD38<sup>neg</sup>-Zellen mit einer ungünstigen

Prognose assoziiert.<sup>74,75</sup> Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass LSZ ausschließlich in dieser Zellpopulation zu finden sind. Neuere Erkenntnisse zeigten jedoch, dass LSZ auch in CD34<sup>pos</sup>CD38<sup>pos</sup> und sogar in CD34<sup>neg</sup>Populationen enthalten sein können.<sup>76,77</sup> Darüber hinaus wurden weitere mit Stammzeleigenschaften assoziierte Gene und Oberflächenmoleküle identifiziert.<sup>78</sup> Beispielsweise ist die Abwesenheit von NKG2D-Liganden (NKG2DL) in der AML mit Stammzeleigenschaften und Immunevasionsmechanismen assoziiert.<sup>79</sup>

LSZ stellen eine besondere Herausforderung für die Therapie der AML dar.<sup>80</sup> Sie befinden sich meist in einem Ruhezustand (Quieszenz), in dem es nur selten zur Zellteilung kommt, wodurch sie den Einflüssen zellzyklusabhängiger Zytostatika entgehen.<sup>81</sup> Auch ihr Residuum in der Knochenmarknische wirkt protektiv auf die LSZ.<sup>82</sup> Dies begünstigt das Bestehen von LSZ in der minimalen Resterkrankung (MRD) und wird für die hohe Rückfallquote verantwortlich gemacht.<sup>83</sup>

### 1.3 Tumornekrosefaktor-Superfamilie

Bereits im 19. Jahrhundert entdeckte *William Coley*, dass die Tumore von Sarkompatienten durch eine Injektion von Bakterien oder deren Produkte nekrotisieren.<sup>84</sup> Dieser 1975 durch *Carswell et al.*<sup>85</sup> charakterisierte „Tumornekrose-Faktor“ (TNF) ist der Begründer der heutigen Tumornekrosefaktor-(Rezeptor)-Superfamilie (TNFSF/TNFRSF) mit ihren 21 Liganden und 29 Rezeptoren.<sup>86,87</sup> Diese Liganden und Rezeptoren werden auf der Zelloberfläche und intrazellulär exprimiert und bilden ein komplexes Kommunikationsnetzwerk zwischen verschiedenartigen Zellen und Geweben und modulieren dadurch wichtige zelluläre Funktionen wie Differenzierung, Überleben, Proliferation oder den programmierten Zelltod.<sup>86,88-91</sup> Besonders hervorzuheben ist, dass bei der Rezeptor-Liganden Interaktion vieler TNF(R)SF sowohl über den Rezeptor (*forward signaling*) als auch über die Liganden (*reverse signaling*) Signale in das Zellinnere vermittelt werden können.<sup>86,91,92</sup> Die durch ein TNF(R)SF-Mitglied vermittelten Effekte können dabei, je nach Kontext, durchaus kontrovers sein.<sup>92-94</sup> Strukturanalysen zeigten, dass die Liganden als Typ II Transmembranproteine C-Terminal mit der sogenannten *TNF Homologie*

*Domäne* (THD) an eine *cysteinreiche Domäne* (CRD) im N-Terminus der entsprechenden Rezeptoren binden.<sup>95</sup> Die THD ist darüber hinaus für die Trimerisierung der Liganden und deren Bindung an den trimerisierten Rezeptorkomplex verantwortlich.<sup>96</sup> Die Rezeptoren der TNFRSF gehören entweder zu den Transmembranproteinen Typ I oder Typ III.<sup>95</sup> Auf der Zelloberfläche exprimierte Rezeptoren und Liganden können durch sogenannte Metalloproteasen von der Zelloberfläche abgeschnitten werden.<sup>86</sup> Mitglieder der TNFR-Familie können entweder als Todesrezeptoren fungieren und über die Aktivierung von Caspasen Apoptose auslösen, oder über die Rekrutierung von TNF-Rezeptor-assoziierten Faktoren (TRAF1-6) Signalwege zur Steigerung von Proliferation, Zytokinproduktion und Überleben von Zellen aktivieren.<sup>97</sup> Dabei kommt es innerhalb der Proteinfamilie zum *crossstalk* zwischen verschiedenen Rezeptor-Liganden-Paaren. So kann *B-cell activating factor* (BAFF) neben der Interaktion mit *B-cell activating factor receptor* (BAFF-R) auch *Transmembrane activator and CAML interactor* (TACI) und *B-cell maturation antigen* (BCMA) stimulieren.<sup>86</sup> Die meisten Mitglieder der TNF(R)SF werden von Zellen des Immunsystems exprimiert und durch Immunreaktionen induziert.<sup>98</sup> Sie sind unter anderem zentral an den Prozessen der Inflammation, Autoimmunerkrankungen und Krebsentstehung beteiligt.<sup>99</sup>

### **1.3.1 Receptor activator of NF- $\kappa$ B (RANK) und sein Ligand (RANKL)**

In dieser Arbeit wird das TNFRSF Mitglied *Receptor activator of NF- $\kappa$ B* (RANK, TNFRSF11A) untersucht. RANK wurde ursprünglich als Faktor beschrieben, der in Interaktion mit seinem Liganden (RANKL, TNFSF11) das Überleben dendritischer Zellen und deren Interaktion mit T-Zellen reguliert.<sup>100</sup> Spätere Arbeiten identifizierten das Rezeptor-Liganden Paar als wichtige Regulatoren des Knochenmetabolismus sowie der Lymphknoten- und Thymusentwicklung.<sup>101-103</sup> RANK ist ein Typ-I-Transmembranprotein, welches über die zytoplasmatische Rekrutierung von TRAF Signale in die exprimierende Zelle vermittelt. Dabei ist die Expression von RANK für verschiedenste Zelltypen beispielsweise im Skelettmuskel, Thymus, in der Brustdrüse und Osteoklasten beschrieben.<sup>100,104,105</sup> Wie auch die anderen Mitglieder der TNFRSF trimerisiert RANK nach Bindung an seinen Liganden RANKL, der ebenfalls als Trimer

vorliegt.<sup>106</sup> RANKL ist bislang der einzige beschriebene Ligand für RANK und kommt durch proteolytische Prozessierung und alternatives *Splicing* in drei Isoformen vor.<sup>107</sup> In seiner membrangebundenen Form wird RANKL unter anderem von Osteoblasten, lymphatischen Geweben und Blutgefäßen exprimiert.<sup>108,109</sup> Über reverse Signalübertragung kann RANKL Signale in die den Liganden exprimierende Zelle übertragen und so zum Beispiel die Produktion von Zytokinen stimulieren.<sup>110</sup> Die Trimerisierung von RANKL und Bindung an RANK aktiviert über *forward signaling* einen Rekrutierungsprozess von TRAF1,2,3,5 oder 6 und in dessen Folge die Aktivierung verschiedenster Signalkaskaden, unter anderem der kanonischen und nicht-kanonischen Aktivierung von NF- $\kappa$ B sowie die Transkription von Effektorgenen.<sup>111</sup> Im Knochenmetabolismus kommt es durch Interaktion von auf Osteoklastenvorläuferzellen exprimiertem RANK mit auf Osteoblasten exprimiertem oder von diesen proteolytisch abgespaltenem RANKL vor allem zur Rekrutierung von TRAF6.<sup>112</sup> Dies führt zu einer kanonischen Aktivierung des NF- $\kappa$ B Signalwegs und zur Transkription der für die Differenzierung der Osteoklasten notwendigen Gene.<sup>111</sup> Der Prozess des Knochenumbaus, bestehend aus der konstanten Resorption von Knochen durch Osteoklasten, sowie der Bildung neuen Knochenmaterials durch Osteoblasten wird in der Homöostase durch Hormone und inflammatorische Zytokine eng kontrolliert.<sup>113</sup> Dieser Prozess wird durch die Bindung von RANKL an weitere Proteine wie das von Osteoblasten produzierte Glykoprotein *Osteoprogenin* (OPG, TNFRSF11B) oder den *Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 4* (LGR4) reguliert.<sup>114-116</sup> Die Bedeutung von RANK und seinem Liganden ist jedoch nicht auf den Knochenmetabolismus beschränkt. In Mausmodellen wurde eine Rolle der RANK-RANKL Interaktion in der Lymphknotenentwicklung beobachtet.<sup>102</sup> Außerdem ist die Signalübertragung über RANK für die Entwicklung medullärer Thymusepithelzellen von großer Bedeutung, welche für die negative Selektion von T-Zellen und damit das Verhindern der Entstehung von Autoimmunerkrankungen relevant sind.<sup>117</sup>

### **RANK-RANKL Signalübertragung und Pathologien**

Neben der Expression auf verschiedenen gesunden Geweben wurde RANK auf den Zellen verschiedenster Tumorentitäten nachgewiesen, während RANKL auf

Zellen der Tumormikroumgebung (TMU) und Tumorzellen nachgewiesen wurde.<sup>118</sup> Tumorzellen nehmen über die Sekretion von löslichen Faktoren Einfluss auf die TMU, sodass ihre Bedingungen für Überleben, Proliferation, *Tumor Dormancy*, und Metastasierung optimiert werden.<sup>119,120</sup> Darüber hinaus wird der Interaktion zwischen TMU und Krebszelle auch hinsichtlich des Therapieansprechens und Resistenzentwicklung eine Bedeutung zugesprochen.<sup>121,122</sup> In verschiedenen Studien, die RANK als Prognosemarker für verschiedene Karzinome und Sarkome untersuchten, wurde RANK als negativ prognostischer Marker identifiziert<sup>123-125</sup>, während dies in den selben Entitäten für RANKL-Expression nicht gezeigt werden konnte.<sup>124,125</sup> Insbesondere auch in der Pathophysiologie hämatologischer Erkrankungen konnte die Relevanz des Molekülsystems gezeigt werden. So kommt es im Multiplen Myelom (MM) durch Dysregulation des RANK/RANKL/OPG Systems zu Osteolysen und über die Freisetzung von Zytokinen zu einem krankheitsassoziierten Milieu.<sup>126</sup> Zudem gibt es Hinweise auf eine Rolle des Molekülsystems in der AML. In einer Analyse von 78 Patientenproben wurde in ca. 70 % der untersuchten Fälle eine substantielle Oberflächenexpression von RANKL beschrieben. Dieses RANKL interagiert mit auf NK-Zellen exprimiertem RANK, wodurch die Stoffwechselaktivität und Zytokinproduktion der AML-Zelle stimuliert und gleichzeitig die NK-Zell-Zytotoxizität inhibiert wird.<sup>127</sup> Durch eine bidirektionale Signaltransduktionskaskade kommt es zu einer Steigerung der RANK-Expression auf den NK-Zellen und zur Verstärkung der RANKL-vermittelten inhibitorischen Effekte durch die AML-Zelle. Durch diesen Feedbackmechanismus entziehen sich die AML-Zellen der NK-Zell anti-Tumor-Reaktivität.<sup>128</sup> Weiterhin konnte eine hohe RANKL-Expression mit einer erhöhten Mortalität korreliert werden.<sup>129</sup>

### 1.3.1.1 Denosumab

Seit der monoklonale RANKL-neutralisierende IgG2 Antikörper Denosumab im Jahr 2010 zugelassen wurde, besteht die Möglichkeit, therapeutisch in die RANK-RANKL-Achse einzugreifen. Der ursprünglich zur Behandlung der Osteoporose, einer Erkrankung bei der es durch Dysregulation des Knochenbaus zu einer Abnahme der Knochendichte kommt, zugelassene

Antikörper findet mittlerweile auch Anwendung bei der Verhinderung von Frakturen im Rahmen metastasierender maligner Erkrankungen und in der Therapie des inoperablen Riesenzelltumors des Knochens.<sup>130-133</sup> Derzeit wird im Sinne von *Drug-repurposing*-Strategien zudem geprüft, ob *BReast CAncer gene* (BRCA) Mutationsträger mit Brustkrebs von einer Therapie mit Denosumab profitieren.<sup>134,135</sup> Ergebnisse einer Studie mit postmenopausalen Brustkrebspatientinnen zeigten bereits, dass die Gabe von Denosumab nicht nur vor Frakturen schützt, sondern auch das krankheitsfreie Überleben verlängert.<sup>136</sup> Für die AML konnte bereits gezeigt werden, dass durch spezifische Bindung von Denosumab an von AML-Zellen exprimiertem RANKL die Interaktion zwischen RANK und RANKL unterbunden werden kann. Hierdurch kommt es zu einer verringerten Freisetzung der Zytokine TNF, Interleukin(IL)-6, IL-8 und IL-10 durch die AML-Zellen und einer Verstärkung der antileukämischen Reaktivität der NK-Zellen.<sup>128</sup> In Studien beim MM und der CLL konnte durch die Verwendung eines Fc-optimierten RANK-Ig-Fusionsproteins die NK-Zell Anti-Tumor-Reaktivität durch Antikörper-vermittelte Zytotoxizität (*Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity*, ADCC) erreicht werden.<sup>126</sup>

#### 1.4 Fragestellung

Bis heute ist die AML eine schlecht behandelbare Erkrankung, nicht zuletzt, weil viele Patienten für die heutigen Therapien nicht eligibel sind oder kein adäquates Therapieansprechen zeigen. Daher ist es von besonderer Bedeutung, Wissen über die Pathophysiologie dieser Erkrankung und Einflussfaktoren auf ihre Behandelbarkeit zu gewinnen. Insbesondere die Untersuchung und Identifizierung von Oberflächenmarkern als potenzielle Zielstrukturen ist hierbei für (Immun-)Therapien von großer Relevanz. Bereits für verschiedene maligne Erkrankungen konnte die Rolle der RANK-RANKL-Signalübertragung in der Pathophysiologie gezeigt werden und erste Erkenntnisse in der AML deuten darauf hin, dass dies auch für die AML der Fall ist. Diese Arbeit fokussiert einerseits auf die Expression des TNFRSF-Mitglieds RANK in der AML. Zum anderen wird untersucht, ob RANK Signaltransduktion *in vitro* die Suszeptibilität der AML-Zellen gegenüber den Chemotherapeutika Cytarabin und Doxorubicin

beeinflusst und schließlich, wie diese Effekte durch Einsatz des therapeutischen Antikörpers Denosumab beeinflusst werden können.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterial

Cryoröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE Nunc, Roskilde, DK
<i>Bottletop</i> Filter (0,22 µm Porengröße)	Millipore, Schwalbach, DE
Cryoröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE Nunc, Roskilde, DK
Einmalpipetten	Corning Inc., Corning, NY, USA
Einmalspritzen	Braun, Wertheim, DE
FACS-Röhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Pipettenspitzen	VWR, Darmstadt, DE
Platten für CellTiterGlo™ ( <i>Nunc</i> lon <i>delta surface</i> )	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, DK
Platten für ELISA (96 well), <i>Maxisorp</i> <i>nunc-immuno plates</i>	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, DK
Platten für FACS (96 well, V- und U- Boden)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Platten für Incucyte (96 well)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Reaktionsgefäße (0,5; 1,5; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, DE
Zellkulturflaschen	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA Nunc, Roskilde, DK
Zellkulturplatten (96-Well)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA Corning Inc., Corning, NY, USA
Zentrifugenröhrchen (15 ml; 50 ml)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Zentrifugen-Filtereinheiten	Merck, Millipore, Billerica, MA, USA
Amicon Ultra 15	

### 2.1.2 Reagenzien und Chemikalien

7-Aminoactinomycin (7-AAD)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg, DE
Bicoll-Lösung	Biochrom AG, Berlin, DE
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roth, Karlsruhe, DE
Caspase 3/7™ Glo Reagent	Promega, Madison, WI, USA
ColonyGEL™ 1102	PELOBIOTECH GmbH, Planegg, DE
CountBright absolute counting beads	Life technologies, Carlsbad, CA, USA
Cytarabin	Selleck Chemicals LLC, Houston, TX, USA
Doxorubicin-HCl	Selleck Chemicals LLC, Houston, TX, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
EDTA Solution	Cambrex, Rockland, ME, USA
FACS-Clean, Flow, Rinse	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
FastGene Scriptase II cDNA 5x ReadyMix	NIPPON Genetics EUROPE, Düren, DE
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin, DE
Ficoll-Lösung	Biochrom AG, Berlin, DE
Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit	Gibco Invitrogen, Karlsruhe, DE
Lipopolysaccharid aus <i>Salmonella typhimurium</i> (LPS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Medium RPMI 1640	Gibco Invitrogen, Karlsruhe, DE
Pancoll human	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DE
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Lonza, Verviers, Belgien
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	PAA, Pasching, Österreich

qPCR BIO SyGreen Mix	PCR Biosystems Inc. Wayne, Pennsylvania, USA
rhRANKL	PeproTech Germany, Hamburg, DE
Staurosporin	Abcam, Cambridge, UK
Streptavidin ( <i>S. avidinii</i> )	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
TMB MicroWell Peroxidase Substrate	KPL, Gaithersburg, MD, USA
Trypan Blau Lösung, 0,4%	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Tween®20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
WST-1 Reagenz	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Zellproliferationsreagenz WST-1	Roche Diagnostics, Mannheim, DE

### 2.1.3 Geräte und Zubehör

Brutschrank Heracell	Heraeus, Hanau, DE
Durchflusszytometer BD FACS Canto™ II	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Durchflusszytometer BD FACS LSR Fortessa™	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Durchflusszytometer MA900	SONY Biotechnology, San Jose, CA, USA
Durchlichtmikroskop, Axiovert 25	Zeiss, Jena, DE
ELISA-Reader, Sunrise™	Tecan Trading AG, CH
Gefrierschränke (-80°C)	Binder, Tuttlingen, DE Sanyo, Somatco, Riad, K.S.A.
GLO-Max® <i>Microplate Luminometer</i>	Promega, Madison, WI, USA
Kühl-Gefrierkombinationen	Gram, Vojens, DK Liebherr, Bulle, CH
LightCycler® 480	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Mastercycler Personal	Eppendorf, Hamburg, DE
NanoDrop™1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim, DE

<i>Pipetteboy comfort</i>	Integra Biosciences, Fernwald, DE
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, DE
Sterilbank Herasafe	Heraeus, Hanau, DE
Tisch-Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg, DE
Vortexer	Heidolph, Schwabach, DE
Wasserbad	Köttermann, München, DE
Zentrifuge	Heraeus, Hanau, DE

#### 2.1.4 Antikörper und Fusionsproteine

Format	Klon	Isotyp/ Kontrolle	Hersteller
anti-hRANK-PE	FAB683	mIgG1	R&D Systems, Bio-Techne, Minneapolis, USA
anti-hRANK	N-1H8	mIgG1	Amgen, Thousand Oaks, California, USA
anti-hRANKL	2.1_3C12- 2D11	mIgG1	OriGene, Maryland, USA
anti-IL-6-PE	AS12	mIgG1	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
anti-IL-8-PE	AS14	mIgG1	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
anti-IL-10-PE	JES3-19F1	Rat IgG2	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
anti-TNF-PE	MAb11	mIgG1	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Caspase-3 AF647	C92-605	Rabbit IgG	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
CD117-PECy7	104D2	mIgG1	BioLegend, San Diego, CA, USA

CD33-BV421	WM53	mIgG1	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD33-BV510	WM53	mIgG1	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD34-BV421	581	mIgG1	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
CD38-FITC	HB7	mIgG1	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Denosumab, XGEVA®		hIgG2	Amgen, Thousand Oaks, California, USA
Fc-hRANKL	1465	hIgG1-Fc	P. Schneider (Universität Lausanne, CH)
hIgG2, KAPPA			Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
mIgG1-APC Isotyp			Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
mIgG1-PE Isotyp			Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
NKG2D Fc	1299-NK	hIgG1	R&D Systems, Bio-Techne, Minneapolis, USA
Rabbit IgG AF647			Cell Signaling Technologies
RANK-PE 04	80704	mIgG1	R&D Systems, Bio-Techne, Minneapolis, USA
rhIgG1 Fc			R&D Systems, Bio-Techne, Minneapolis, USA

### 2.1.5 Zelllinien

#### KG-1a (DSM ACC 421)

Subklon der AML Zelllinie KG-1 (DSM ACC 14). Etabliert aus dem Knochenmark eines 59-jährigen Patienten mit akuter Erythroleukämie.

**HL-60 (DSM ACC 3)**

Etabliert aus dem peripheren Blut einer 35-jährigen AML-Patientin, klassifiziert FAB M2.

**THP-1 (DSM ACC 16)**

Aus dem Blut eines 1-jährigen Jungen mit akuter monozytärer Leukämie bei einem Rückfall gewonnen.

**EOL-1 (DSM ACC 386)**

Gewonnen aus dem peripheren Blut eines 33-jährigen Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose mit AML aus hypereosinophilem Syndrom.

**Jurkat JOM2 hRANK:FAS-3349 (DSM ACC 282, modifiziert und zur Verfügung gestellt durch P.Schneider, Lausanne)**

T-Zelllinie ohne Fas-Expression, modifiziert um ein Rezeptor-Fas chimäres Protein, hRANK:FAS, zu exprimieren. Interaktion mit dem Liganden induziert eine Fas-abhängige Apoptose.

**2.1.6 Primer**

Gen	Vorwärtssequenz (5'-3')	Rückwärtssequenz (5'-3')
RANK	5'-CCCGTTGCAGCTCAA-3'	5'- GCATTTGTCCGTGGAGGAA- 3'

**2.1.7 Kits**

Fixation/Permeabilization Kit	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
High Pure RNA Isolation Kit	Roche Diagnostics, Mannheim, DE

---

LEGENDplex™ Human Essential Immune Response Panel Mix and Match Subpanel	BioLegend, San Diego, CA, USA
Lightning Link® Allophycocyanin (APC) Conjugation Kit	Abcam, Cambridge, UK
One-Step Antibody Biotinylation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
TMRE Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit	Abcam, Cambridge, UK

### **2.1.8 Programme**

BioRender	<a href="https://biorender.com">https://biorender.com</a> , Toronto, CAN
GraphPad Prism Version 8.4.0	GraphPad Software, LLC, San Diego, CA, USA
FlowJo Version 10.7.2	FlowJo, LLC, Ashland, OR, USA
LEGENDplex™ Data Analysis Software Suite Version 8.0	BioLegend, San Diego, CA, USA
LightCycler® 480 Software	Roche Diagnostics, Mannheim, DE

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellbiologische Methoden

Alle Zellen und Versuchsansätze wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5,0 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte unter Ausschluss toter Zellen durch Anfärbung mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer. Die Zellen wurden, sofern nicht anders vermerkt, bei einer Geschwindigkeit von 1500 rpm für 5 min zentrifugiert.

#### 2.2.1.1 Kultivierung von Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien wurden entsprechend der nachfolgenden Tabelle versorgt:

**Tabelle 2** Kultivierung von Zelllinien

Zelllinie	Zelldichte (Split)	Kulturmedium
KG-1a	5x10 <sup>5</sup> /mL (1:3)	RPMI + 20 % FCS + 1 % P/S
HL-60	5x10 <sup>5</sup> /mL (1:5)	RPMI + 10 % FCS + 1 % P/S
THP-1	0,5-1x10 <sup>6</sup> /mL (1:3)	RPMI + 20 % FCS + 1 % P/S
EOL-1	5x10 <sup>5</sup> /mL (1:3)	RPMI + 10 % FCS + 1 % P/S
JOM-2 hRANK:FAS-3349	0,5-1x10 <sup>6</sup> /mL (1:4)	RPMI + 10 % FCS + 1 % P/S

Die *RANK*-transfizierte Zelllinie JOM-2 hRANK:FAS-3349 wurde freundlicherweise von P. Schneider, Lausanne, CH bereitgestellt, die übrigen Zelllinien wurden über die *American Type Culture Collection* (ATCC) oder Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) erworben. Alle verwendeten Zelllinien sind Suspensionszelllinien. Zur Einstellung der entsprechenden Zelldichte wurden die Zellen alle 3-4 Tage passagiert (zentrifugiert und ein Medienwechsel vorgenommen).

#### 2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zelllinien und primäre AML-Zellen sowie Zellen gesunder Spender wurden zentrifugiert und entsprechend der Zellzahl in Einfriermedium (70 % RPMI, 20 % FCS, 10 % DMSO) resuspendiert. Dabei wurden Zelllinien in einer Konzentration

von  $5 \times 10^6$  Zellen/mL, primäre Proben entweder mit  $1 \times 10^7$  oder  $2 \times 10^7$  Zellen/mL in einem Volumen von je 1 mL in sterile Kryoröhrchen überführt und drei Tage bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert, bevor diese zur langfristigen Aufbewahrung in Flüssigstickstoff überführt wurden. Zur Verwendung der eingefrorenen Proben wurden diese im Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  aufgetaut, in 10 mL des entsprechenden Mediums überführt und zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in frischem Medium resuspendiert. Zelllinien wurden nach den Empfehlungen der DSMZ und ATCC entsprechend der Ausführungen in Tabelle 2 in einer Zellkulturflasche kultiviert. Patientenmaterial wurde nach Bestimmung der Zellzahl direkt im Experiment verwendet.

## **2.2.2 Genexpressionsanalyse**

### **2.2.2.1 RNA-Isolation**

Die Ribonukleinsäure (RNA) aus Zelllinien und AML-Patientenproben wurde mittels *High Pure RNA Isolation Kit* isoliert. Zur Vermeidung von Artefakten durch weitere Aufreinigung der Patientenproben, wurden nur Patienten mit einem Blastenanteil von  $\geq 85\%$  im Blutausschlag verwendet. Die zu untersuchenden Zellen wurden hierfür einmal mit PBS gewaschen, pelletiert und entsprechend des Herstellerprotokolls behandelt. Letzter Schritt beinhaltete die Elution der RNA in  $50\ \mu\text{L}$  RNase-freiem  $\text{H}_2\text{O}$ . Die Konzentration und Reinheit der RNA wurden mittels NanoDrop bestimmt. Die RNA wurde anschließend in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben oder bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

### **2.2.2.2 cDNA Synthese**

Die Synthese von cDNA wurde mittels *Fast Gene® Scriptase II cDNA 5x ReadyMix* durchgeführt. Hierfür wurden  $2\ \mu\text{g}$  RNA mit  $4\ \mu\text{L}$  Supermix gemischt und das Volumen mit RNase-freiem  $\text{H}_2\text{O}$  auf insgesamt  $20\ \mu\text{L}$  aufgefüllt. Anschließend wurde das nachstehende Programm entsprechend der Herstellerangaben im Mastercycler ausgeführt:

25 °C	10 min
42 °C	60 min
85 °C	5 min

cDNA Transkripte wurden bei -20 °C gelagert.

### 2.2.2.3 Quantitative Polymerasenkettenreaktion (qPCR)

Zur Analyse der Genexpression wurde eine quantitative Polymerasenkettenreaktion (qPCR) unter Einsatz von *SYBR® Green* durchgeführt. Die cDNA wurde auf 100 ng/Reaktion mit *RNase*-freiem H<sub>2</sub>O auf 9 µl je Reaktion verdünnt und in eine 96-Well PCR Platte vorgelegt. Hierzu wurde ein Gesamtvolumen von 11 µL bestehend aus 10 µL *qPCRBIO SyGreen Mix* und 1 µL Primermix (c = 100 µM je Primer) gegeben. Die Sequenzen der Primer sind dem Kapitel 2.1.6 zu entnehmen. Nach Verschluss der Platte wurde diese gevortext und anschließend bei 2000 rpm für 2 min zentrifugiert. Die Messung erfolgte im LightCycler® 480 mit dem nachstehenden Programm und wurde anschließend mit der zugehörigen LightCycler® 480 Software analysiert.

Initiale Denaturierung	2 min	95 °C	
Denaturierung	5 sek	95 °C	40 Zyklen
Amplifikation	25 sek	63 °C	
Schmelzkurven	1 sek	95 °C	
	1 sek	40 °C	
	auf	95 °C	0.11 °C/sek
Abkühlung	5 sek	37 °C	

### 2.2.3 Primäre AML-Zellen

#### 2.2.3.1 Spender primären Materials

Die Blut- und Knochenmarkproben von Leukämiepatienten und gesunden Spendern wurden nach den Richtlinien der Ethikkommission (13/2007V) und mit freiwilligem, informiertem Einverständnis der Spender zur Isolation der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear*

cells, PBMC) gewonnen. Bei Leukämiepatienten erfolgte die Probenentnahme zum Zeitpunkt der Diagnosestellung.

### **2.2.3.2 Isolation der PBMC**

Die Isolation von PBMC und Knochenmarkszellen aus Vollblut erfolgte unmittelbar nach Probenentnahme mittels Dichtegradientenzentrifugation. Hierfür wurde die Blutprobe 1:3 mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) verdünnt und 35 mL dieser Zellsuspension auf 15 mL Pancoll human Lösung in einem 50 mL Zentrifugenröhrchen aufgeschichtet. Pancoll human ist eine Lösung bestehend aus einem stark vernetzten und verzweigten, synthetischen Polymer (*Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer*) mit einer Dichte von 1,077 g/mL. Durch Zentrifugation (2000 rpm, 18 min, ohne Bremse) kommt es aufgrund der niedrigeren Dichte der mononukleären Zellen zu einer Anreicherung dieser in der sogenannten Interphase zwischen dem die Thrombozyten enthaltenden Plasma und der Pancoll human Lösung, an deren Grund sich ein Pellet der Zellen höherer Dichte, wie Erythrozyten, sammelt. Die Zellen der Interphase wurden abgenommen, in PBS resuspendiert und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen weitere zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde ein weiterer Zentrifugationsschritt (800 rpm, 10 min, mit Bremse) zur Entfernung der Thrombozyten durchgeführt, bevor die Zellzahl bestimmt wurde.

### **2.2.4 Durchflusszytometrie (FACS)**

#### **2.2.4.1 Oberflächenexpressionsanalyse**

Zur Analyse der Expression verschiedener Antigene auf der Zelloberfläche wurde Durchflusszytometrie mit Fluoreszenzmolekülen markierten antigenspezifischen Antikörpern durchgeführt. Die Analyse erfolgte in einem BD FACS Canto™ II oder BD FACS LRSFortessa™. Durch hydrodynamische Fokussierung der Zellen werden diese im Durchflusszytometer vereinzelt und anschließend durch einen Laserstrahl geleitet. Die antikörpergebundenen Fluoreszenzfarbstoffe werden dabei angeregt und emittieren ein Lichtsignal, welches über einen Detektor aufgenommen wird. Neben Informationen über die Oberflächenexpression spezifischer Moleküle können über das Vorwärtsstreulicht (FSC = *Forward Scatter*) bzw. das Seitwärtsstreulicht

(SSC = *Side Scatter*) Aussagen über die Größe bzw. Granularität der untersuchten Zellen getroffen werden. Die Daten wurden mittels FlowJo (Version 10.7.2) ausgewertet. Die Färbung erfolgte in einer 96-Well V-Boden Platte. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden je  $5 \times 10^5$  Zellen/Well in 100  $\mu$ L *Fluorescence-Activated Cell Sorting* (FACS)-Puffer mit humanem IgG (10  $\mu$ g/mL) aufgenommen und in die Wells verteilt. In diesem wurden die Zellen für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungen an Fc-Rezeptoren zu unterbinden. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (2000 rpm, 2 min, mit Bremse), der Überstand verworfen und das Zellpellet in je 25  $\mu$ L Antikörperlösung resuspendiert sowie für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Zur Entfernung ungebundener Antikörper wurden zwei Waschschrte mit FACS-Puffer durchgeführt, bevor die Zellen in je 100  $\mu$ L FACS-Puffer in FACS Tubes überführt wurden. Zur Identifikation toter Zellen wurde der DNA-interkalierende Farbstoff 7-AAD vor der Messung hinzugegeben. Die Spezifische Fluoreszenzintensität (*specific fluorescence intensity*, SFI) wurde wie folgt berechnet:

$$SFI = \frac{MFI_{probe}}{MFI_{Isotypenkontrolle}}$$

MFI, *Mean Fluorescence Intensity* = durchschnittliche Fluoreszenzintensität

#### **2.2.4.2 Analyse des mitochondrialen Transmembranpotenzials und aktiver Caspase-3**

Die Zellviabilität wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Unter Verwendung des *TMRE Mitochondrial Membrane Potential Assay Kits* erfolgte die Differenzierung zwischen apoptotischen und lebendigen Zellen. TMRE reichert sich aufgrund seiner positiven Ladung in der Membran intakter Mitochondrien an, während der Verlust des Membranpotenzials bei Apoptose eine Akkumulation des Farbstoffs verhindert. Zudem wurde die Aktivität der Effektorcaspase Caspase-3, ein Schlüsselenzym im programmierten Zelltod, intrazellulär bestimmt.

PBMC von AML-Patienten wurden in einer 96-Well U-Boden Platte ausgesät ( $5 \times 10^5$  Zellen/Well) und mit oder ohne stimulierendem Reagenz (15  $\mu$ g/mL Fc-hRANKL, 0,5  $\mu$ g/mL rhRANKL) für 24 h inkubiert, bevor sie mit Doxorubicin

(5  $\mu\text{M}$ , 24 h) bzw. Cytarabin (10  $\mu\text{M}$ , 72 h) behandelt wurden. Anschließend wurden die entsprechenden Färbungen wie nachfolgend beschrieben durchgeführt.

#### *TMRE-Färbung*

Nach Zentrifugation der Zellen (2000 rpm, 2 min, mit Bremse) wurden die leukämischen Zellen mittels spezifischer Blastenmarker angefärbt (30  $\mu\text{L}$  Antikörperlösung/*Well* in PBS für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln). Nach einem Waschschrift wurden die Zellpellets in 50  $\mu\text{L}$  TMRE-Lösung (50 nM in PBS) resuspendiert und für 20 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Auch hier wurde ungebundener Farbstoff in einem Waschschrift mit PBS entfernt und das Pellet abschließend in 110  $\mu\text{L}$  FACS-Puffer resuspendiert. Um trotz unterschiedlicher Behandlung der AML-Zellen vergleichbare Zellzahlen messen zu können, wurden Latex Beads (3  $\mu\text{M}$  1:4550 in FACS-Puffer verdünnt, 110  $\mu\text{L}$ ) verwendet.

Die Messung erfolgte im FACS LRSFortessa unter Nutzung des *High Throughput Samplers*.

#### *Aktive Caspase-3 Färbung*

Nach einem Zentrifugationsschritt (2000 rpm, 2 min, mit Bremse) wurden die leukämischen Zellen ähnlich der TMRE-Färbung angefärbt. Zudem wurde in diesem Färbeschritt eine Unterscheidung lebender und toter Zellen mit *Fixable Aqua* (1:1000 in PBS) durchgeführt. Hierfür wurden die Proben in 50  $\mu\text{L}$  Antikörper-Fixable Aqua-Lösung für 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Daraufhin folgte ein Waschschrift mit PBS und die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen mit 100  $\mu\text{L}$  *Cytofix/Cytoperm*. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 30 min auf Eis im Dunkeln folgte ein Waschschrift mit der Lösung *Perm/Wash*. Aktive Caspase-3 konnte intrazellulär mittels *anti-cleaved Caspase-3 Alexa Fluor 647* Antikörper (30  $\mu\text{L}$  einer 1:50 Antikörperlösung/*Well* in *Perm/Wash* für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln) gefolgt von einem Waschschrift mit *Perm/Wash* detektiert werden. Die Messung erfolgte im FACS LRSFortessa<sup>TM</sup> unter Nutzung des *High Throughput Samplers*.

### 2.2.5 LEGENDplex™ Multiplex Assay

Der LEGENDplex™ Multiplex Assay beschreibt eine Bead-basierte Nachweismethode zur durchflusszytometrischen Bestimmung der Konzentration eines Analyten. Hierbei werden Zytokine beispielsweise aus Kulturüberständen über sogenannte *capture*-Antikörper, welche auf Beads immobilisiert sind, analytspezifisch gebunden und anschließend mittels biotinylierter *detection*-Antikörper und Streptavidin-gekoppelten *R-Phycoerythrin* (PE) detektiert. Die analytenspezifischen Beadpopulationen können aufgrund von Unterschieden in der Größe und Granularität sowie der *Allophycocyanin* (APC)-Fluoreszenzintensität differenziert werden, sodass verschiedene Analyten im selben Ansatz analysiert werden können. Die Zytokinkonzentration ergibt sich aus der PE-Fluoreszenzintensität. Die Analyse der Zytokine IL-6, IL-8, IL-10 und TNF wurde mittels *LEGENDplex™ Human Essential Immune Response Panel Mix and Match Subpanel* (IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, TNF, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ ) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt, wobei jegliche Volumina auf 40 % reduziert wurden. Die Auswertung erfolgte mittels LEGENDplex™ Data Analysis Software Suite (Version 8.0).

### 2.2.6 Colony-Forming Unit Assay (CFU Assay)

Mit Hilfe des *Colony-Forming Unit* (CFU) Assay wird die Fähigkeit von Zellen zur *in vitro* Koloniebildung in semisolidem Medium quantitativ bestimmt. Zur Herstellung der CFUs wurde ColonyGEL™ 1102 über Nacht im Kühlschrank aufgetaut, gevortext und anschließend noch einmal für einige Stunden stehen gelassen. Mittels FACS MA900 wurden die viablen Zellen der Patienten anhand der Isotypenkontrollen (mIgG1-PE, mIgG1-APC) und anti-RANK-PE bzw. anti-RANKL-APC in RANK<sup>pos</sup>RANKL<sup>pos</sup>, RANK<sup>pos</sup>RANKL<sup>neg</sup>, RANK<sup>neg</sup>RANKL<sup>pos</sup> und RANK<sup>neg</sup>RANKL<sup>neg</sup>-Populationen sortiert. Die sortierten, doppelt positiven oder doppelt negativen Zellen wurden entsprechend der Zielkonzentration ( $2,5 \times 10^4$  Zellen/50  $\mu$ L) eingestellt und in IMDM + 10 % FCS resuspendiert. Die Zellen wurden in das ColonyGEL™ 1102 pipettiert und mittels Spritze vorsichtig resuspendiert, bevor das Gemisch in einer 35 mm Petrischale ausplattiert wurde. Je sechs CFU-Ansätze wurden in einer 15 cm Petrischale bei 37 °C für 14 Tage inkubiert. Um ein Austrocknen des ColonyGEL™ 1102 zu verhindern, wurden

zusätzlich zwei 35 mm Petrischalen mit je 3 mL PBS pro 15 cm Petrischale gegeben. Die Anzahl der Kolonien wurde mit einem Durchlichtmikroskop ermittelt.

### **2.2.7 CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (CTG Assay)**

Zur Ermittlung der Zellviabilität wurde der CellTiter-Glo® (CTG) *Luminescent Cell Viability Assay* verwendet. Hierzu wurden PBMC von AML-Patienten ( $5 \times 10^4$  Zellen/Well) für 24 h mit Fc-hRANKL (5 µg/mL, immobilisiert an die Oberfläche einer weißen 96-Well Flachboden Platte) oder löslichem rekombinanten RANKL (rhRANKL, 500 ng/mL) inkubiert. Lipopolysaccharide (LPS) diente als Positivkontrolle. Durch die Zugabe von Assay Reagenz wurden die Zellen lysiert und intrazelluläres Adenosintriphosphat (ATP) freigesetzt. ATP mediiert durch Monooxygenierung die Reaktion von Luciferin zu Oxyluciferin, wodurch die gemessene Lumineszenz direkt proportional zur Anzahl lebender Zellen ist.

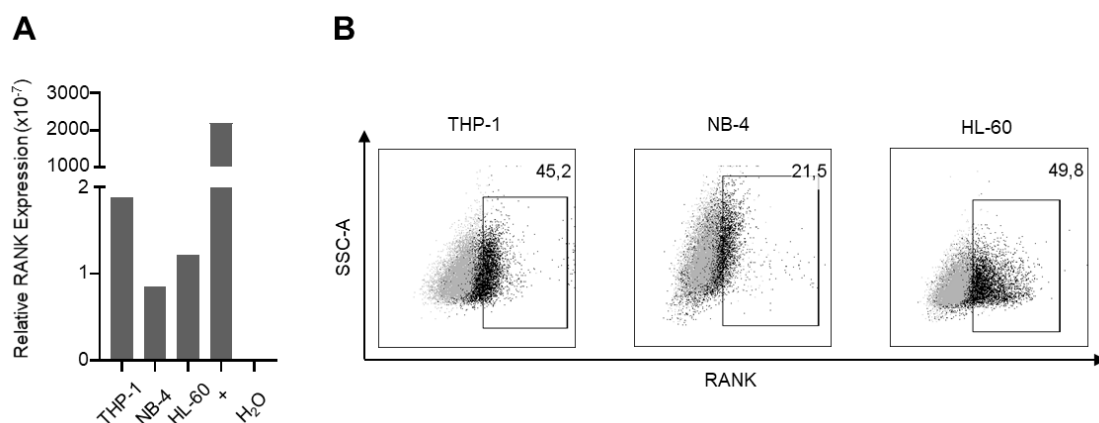
### **2.2.8 WST-1 Assay**

Zur Bestimmung der metabolischen Aktivität von AML-Zelllinien wurde der WST-1 Assay genutzt. Der Assay beruht auf der Umwandlung von Terazolium Salz WST-1 (4-[3-(4-Jodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-Tetrazolio]-1,3-Benzendisulfonat) in den löslichen Farbstoff Formazan. Die Menge des gebildeten Formazans kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 – 650 nm bestimmt werden und korreliert direkt mit der Anzahl der lebendigen Zellen. Zur Bestimmung der metabolischen Aktivität wurde die Zelllinie HL-60 in einer 96-Well Flachboden Platte ( $2 \times 10^4$  Zellen/Well) in An- oder Abwesenheit von rhRANKL oder dem Anti-RANKL Antikörper N1H8 für 24 h kultiviert und anschließend mit Doxorubicin (0,22 µM) oder Cytarabin (1,13 µM) für weitere 24 h behandelt. Nach Zugabe des WST-1 Reagenz (10 µl/Well) wurde die metabolische Aktivität zu den Zeitpunkten 0-0,5-1-2-3 und 4 h mit einem ELISA-Reader Sunrise™ bestimmt. Die im Ergebnisteil dargestellten Werte entsprechen dem Messwert 4 h nach Zugabe des WST-1 Reagenz.

### 3 Ergebnisse<sup>†</sup>

#### 3.1 Expression von RANK bei AML-Zelllinien

Um die Relevanz von RANK in der AML zu untersuchen, wurde zunächst evaluiert, ob die AML-Zelllinien THP-1, NB-4 und HL-60 eine relevante Gen- und Oberflächenexpression aufweisen. Mittels qPCR konnte *RANK* auf der Genebene bei allen untersuchten Zelllinien detektiert werden. Die Quantifizierung erfolgte mittels der delta-Ct-Methode relativ zum konstitutiv exprimierten Gen *18S ribosomale RNA* (RRN18S), wobei die Expression bei THP-1 im Vergleich zu den beiden Zelllinien HL-60 und NB-4 deutlich größer war (**Abbildung 3A**). Da es für die Interaktion des Rezeptors mit seinem Liganden wichtig ist, dass der Rezeptor auf der Zelloberfläche exprimiert wird, wurde anschließend das Vorhandensein von RANK auf der Zelloberfläche der Zelllinien durchflusszytometrisch untersucht. Alle analysierten Zelllinien exprimierten RANK auf ihrer Zelloberfläche. Der Anteil RANK positiver (RANK<sup>pos</sup>) Zellen war bei HL-60 mit 49,8 % am größten, während bei 21,5 % der NB-4 und 45,2 % der THP-1 Zellen eine Oberflächenpositivität gemessen werden konnte (**Abbildung 3B**). Zusammenfassend ist RANK bei allen untersuchten Zelllinien sowohl auf Gen- als auch Proteinebene vorhanden.



**Abbildung 3 Expression von RANK bei AML-Zelllinien. (A)** Analyse von RANK messenger RNA (mRNA)-Leveln in den AML-Zelllinien THP-1, NB-4 und HL-60 mittels

<sup>†</sup> Ein Großteil der gezeigten Ergebnisse wurde bereits in einer Publikation veröffentlicht (vergleiche Kapitel 7).<sup>136</sup> Inhaltliche Überschneidungen mit dem Ergebnis- und Abbildungstext der genannten Publikation sind daher unvermeidbar und sollen im Sinne der guten wissenschaftlichen Praxis hiermit gekennzeichnet werden.

qPCR. RNA wurde aus der jeweiligen Zelllinie isoliert und in cDNA transkribiert. Mithilfe der *delta-Ct*-Methode wurde die Menge der *RANK* mRNA relativ zu *RRN18S* berechnet. Als Positivkontrolle diente die *RANK*-transfizierte Zelllinie JOM-2 hRANK:Fas-3349 (+), Wasser diente als Negativkontrolle. **(B)** Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression von RANK auf den AML-Zelllinien THP-1, NB-4 und HL-60 mittels anti-RANK monoklonalen Antikörpers (mAb) FAB683P (schwarze Punkte) und mIgG1 als Isotypkontrolle (graue Punkte).

## 3.2 RANK in primären AML-Zellen

### 3.2.1 Patientenkollektiv

Die untersuchten Proben wurden von AML-Patienten des Universitätsklinikums Tübingen akquiriert und sind in **Tabelle 3** dargestellt. Die Patienten konnten entsprechend der FAB-Klassifikation den Subtypen M0-M5 mit folgender Verteilung zugeordnet werden: M0 = 5, M1 = 7, M2 = 7, M3 = 5, M4 = 13, M5 = 16. Entsprechend der Risikostratifikation des *LeukemiaNET* umfasst das Kollektiv  $n = 16$  AMLs mit günstiger,  $n = 23$  AMLs mit intermediärer und  $n = 4$  AMLs mit ungünstiger Prognose. Eine Probe konnte keiner Risikokategorie zugeordnet werden. Das Geschlechterverhältnis liegt bei ♂ : ♀ = 32:22, das mittlere Erkrankungsalter bei 59,28 Jahren.

Tabelle 3 Patientenkollektiv

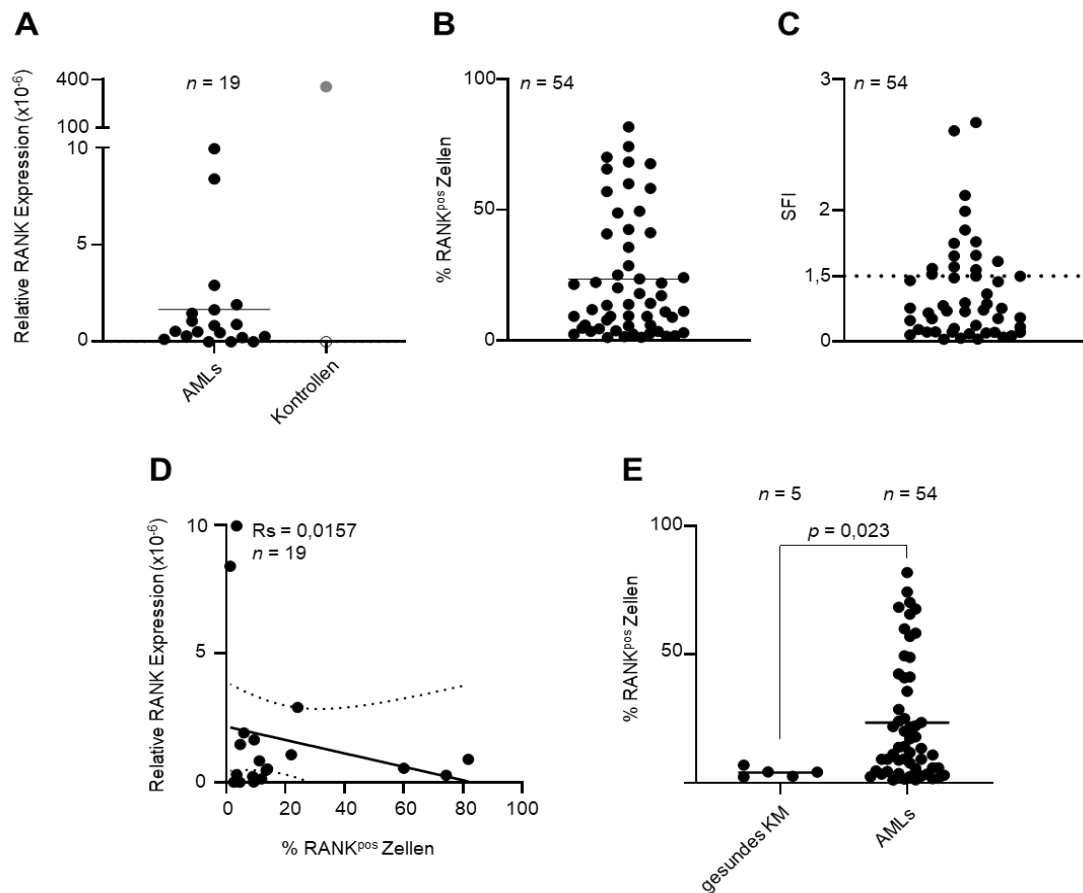
EPN	RANK		FAB	Alter [Jahre]	Geschlecht	Blasen [%]	Karyotyp
	[%]	[SFI]					
1	1,7	1,0	M0	46	M	97	46,XY
2	11,9	1,5	M0	83	M	90	48,XY,+X,+13
3	3,1	1,8	M0	68	M	93	NA
4	4,9	1,6	M0	65	M	85	46,XY
5	20,2	1,3	M0	90	W	97	Komplex
6	11,0	1,2	M1	40	M	100	Komplex
7	13,5	1,7	M1	69	M	86	46,XY
8	4,8	1,0	M1	21	W	95	46,XX; 46,XX,del(9)(q13q22)
9	2,6	1,1	M1	56	W	56	46,XX
10	3,0	1,1	M1	77	M	87	46,XY
11	9,0	1,5	M1	50	W	93	46,XX
12	1,3	1,1	M1	64	W	98	NA
13	1,6	1,1	M2	88	M	29	NA
14	18,0	1,1	M2	68	M	96	46,XY
15	9,3	1,2	M2	64	M	82	Komplex
16	5,9	1,1	M2	60	M	95	46,XY,+14
17	41,3	1,1	M2	71	W	89	47,XX+11
18	3,8	2,6	M2	79	W	69	46,XX
19	3,5	1,1	M2	67	W	94	Komplex
20	21,5	1,3	M3	46	M	87	46,XY,t(15;17)(q22;q11~21)
21	23,6	1,5	M3	65	M	70	46,XY,t(15;17)(q22;q12)
22	6,0	1,1	M3	29	M	93	46,XY,t(15;17)(q22;q12)
23	9,3	1,0	M3	58	W	96	46,XX,t(15;17)(q22;q12)
24	7,9	1,0	M3	46	W	42	46,XX,t(15;17)(q24,1;q21,2)
25	2,5	1,0	M4	30	W	90	Komplex
26	58,3	1,7	M4	64	W	91	46,XX
27	5,6	1,1	M4	71	M	97	47,XY,+11
28	9,4	1,0	M4	76	W	94	Komplex
29	9,3	1,2	M4	85	M	92	NA
30	11,2	1,1	M4	45	W	97	46,XX,t(1;3)(p36;q21)(22)
31	1,9	1,0	M4	62	M	91	Komplex
32	17,2	2,1	M4	83	W	95	46,XXadd(14)(p11); 46,XX
33	25,1	1,2	M4	36	M	95	46,XY
34	60,0	1,9	M4	67	W	86	NA
35	42,5	1,6	M4	57	M	87	NA
36	40,9	1,3	M4	54	W	91	46,XX
37	2,7	1,0	M4	57	M	14	45XY, inv(3)(q21,3q26,2),-7
38	57,0	1,6	M5	69	W	95	NA
39	3,5	1,1	M5	72	M	97	47,XY,+8; 46,XY
40	22,3	1,5	M5	65	M	91	NA
41	70,2	1,3	M5	76	M	93	Komplex
42	35,7	1,2	M5	54	M	89	46,XY,del(9)(q13q22)
43	74,3	2,0	M5	37	W	85	NA
44	81,8	1,2	M5	81	M	93	46,XY
45	14,3	1,2	M5	23	M	92	48,XY,+8,+13; 46,XY
46	28,7	1,2	M5	35	W	83	46,XX
47	65,7	1,5	M5	53	M	85	46,XY
48	49,5	1,5	M5	48	M	95	46,XY
49	22,0	1,3	M5	70	M	90	46,XY
50	48,9	1,4	M5	32	M	98	Komplex
51	24,1	1,5	M5	71	M	94	Komplex
52	68,4	1,8	M5	68	M	95	46,XY
53	13,9	1,0	M5	41	W	92	46,XX
54	67,7	2,7	ND	49	M	96	NA

Abkürzungen: EPN, Einheitliche Patientennummer; SFI, Spezifische Fluoreszenzintensität; FAB, *French-American-British* Klassifikation; W, weiblich; M, männlich; NA, nicht verfügbar. Komplex: Karyotyp mit 3 oder mehr Chromosomenaberrationen.

### 3.2.2 *RANK-Expression primärer AML-Zellen*

Da *in vitro* kultivierte Zelllinien einen artifiziell an die Zellkultur angepassten Zelltypen darstellen, wurden primäre AML-Zellen aus dem peripheren Blut von 54 AML-Patienten hinsichtlich der Expression von RANK auf Gen- und Proteinebene untersucht. Entsprechend des Vorgehens bei den AML-Zelllinien (*Kapitel 3.1*) wurde zunächst die Expression von *RANK*-mRNA mittels qPCR analysiert ( $n = 19$ ). Die untersuchten Patientenproben zeigten eine hohe Variabilität der *RANK*-mRNA Expressionslevel mit relativen Werten zwischen  $1,86 \times 10^{-9}$  –  $9,95 \times 10^{-6}$  (**Abbildung 4A**). Die Oberflächenexpression von RANK wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Bei Patienten mit Blastenanteil  $\leq 85$  % wurden diese mittels der jeweiligen spenderspezifischen Blastenmarker selektiert. Bei den 54 analysierten Patientenproben konnte eine spenderabhängige Heterogenität der RANK-Oberflächenexpression mit Werten zwischen 1,23 - 81,80 % (Mittelwert: 23,54 %, **Abbildung 4B**) positiver Zellen beobachtet werden. Eine Bestimmung der SFI-Level zur Analyse der Rezeptordichte zeigte für 35 % der analysierten Patienten Werte von 1,5 oder höher, welcher als Grenzwert für die Zelloberflächenpositivität festgelegt wurde (**Abbildung 4C**). Interessanterweise konnte kein Zusammenhang zwischen der *RANK*-Expression auf Genebene und dem Anteil  $\text{RANK}^{\text{pos}}$ -Zellen (Proteinebene) festgestellt werden ( $n = 19$ , Spearman-Korrelationskoeffizient ( $R_s$ ) = -0,0157, **Abbildung 4D**). Dies legt nahe, dass die *RANK*-Expression durch posttranskriptionelle oder posttranslationale Mechanismen reguliert wird.

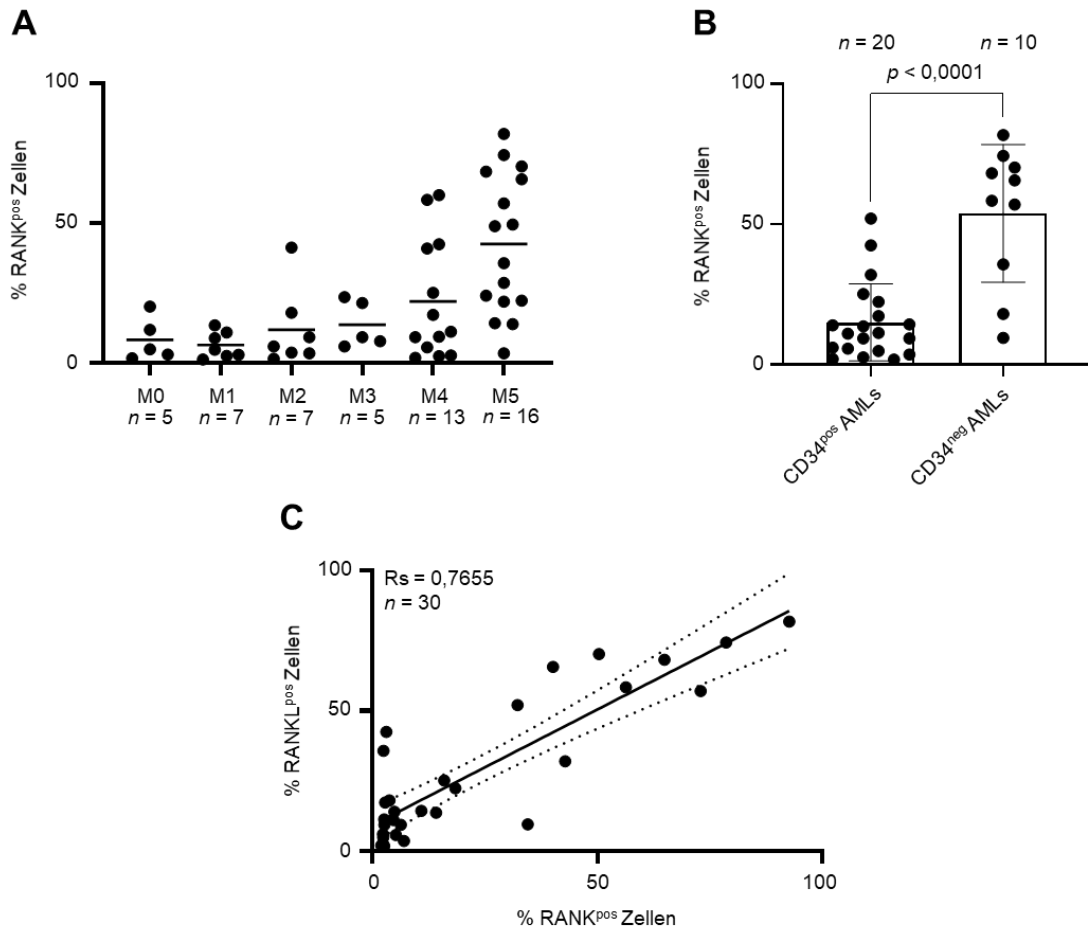
Um zu prüfen, ob auch gesunde hämatologische Vorläuferzellen *RANK* auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, wurden  $\text{CD34}^{\text{pos}}$  Zellen aus Knochenmarkproben von insgesamt fünf gesunden Spendern durchflusszytometrisch untersucht. Bei keiner der analysierten Proben konnte eine relevante *RANK*-Expression festgestellt werden (2,44 – 7,00 %, Mittelwert: 4,14 %, **Abbildung 4E**).



**Abbildung 4 Expression von RANK bei primären AML-Zellen. (A)** Analyse von  $n = 19$  Patientenproben auf *RANK*-mRNA mittels qPCR. Mithilfe der delta-Ct-Methode wurde die Menge der *RANK*-mRNA relativ zu *RRN18S* berechnet. Die Linie stellt den Mittelwert =  $1,663 \times 10^{-6}$  dar. Als Positivkontrolle diente die *RANK*-transfizierte Zelllinie JOM-2 hRANK:Fas-3349 (grau), Negativkontrolle Wasser (weiß). **(B)** Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression von RANK auf AML-Patientenproben ( $n = 54$ ) mittels anti-RANK mAb FAB683P. Die Linie stellt den Mittelwert = 23,86 % dar. **(C)** SFI-Level der durchflusszytometrischen Analyse. Gepunktete Linie entspricht SFI = 1,5 (Grenzwert für Zelloberflächenpositivität). **(D)** Darstellung der relativen *RANK*-mRNA Expression gegen den Anteil RANK<sup>pos</sup>-Blasten von  $n = 19$  AML-Proben. Spearman's Korrelation ( $R_s$ ) = 0,0157. Die gepunktete Linie entspricht dem 95 % Konfidenzintervall. **(E)** Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression von RANK auf dem Knochenmark gesunder Spender ( $n = 5$ ) auf deren Anteil RANK<sup>pos</sup>-Blasten mittels anti-RANK mAb FAB683P und mIgG1 als Isotypkontrolle im Vergleich zur Oberflächenexpression von RANK auf AML-Blasten ( $n = 54$ , Mann-Whitney-Test,  $p = 0,0231$ )

Für die Analyse eines Zusammenhangs zwischen dem Differenzierungsstadium der AML-Blasten und der RANK-Expression, wurde die Oberflächenexpression in Abhängigkeit der FAB-Typen der AML-Fälle untersucht. Interessanterweise zeigten insbesondere AMLs mit differenzierteren FAB-Typen (M4 und M5) einen hohen Anteil RANK<sup>pos</sup>-Blasten ( $n = 54$ , M0 = 8,36 %, M1 = 6,45 %, M2 = 11,91 %, M3 = 13,64 %, M4 = 22,04 %, M5 = 41,52 %, **Abbildung 5A**). Diese Ergebnisse konnten durch die Untersuchung der RANK-Expression in den weniger differenzierten CD34<sup>pos</sup>-AML-Fällen ( $n = 20$ ) und differenzierteren CD34<sup>neg</sup>-AML-Fällen ( $n = 10$ ) bestätigt werden. Es konnte eine signifikant reduzierte Anzahl RANK<sup>pos</sup>-Blasten bei den CD34<sup>pos</sup>- gegenüber den CD34<sup>neg</sup>-AMLs detektiert werden (14,98 % vs. 53,88 %,  $p < 0.0001$ , **Abbildung 5B**). Zusammenfassend wird RANK in etwa einem Drittel der untersuchten AML-Patienten auf den Leukämiezellen exprimiert und assoziiert mit einem differenzierten Phänotyp.

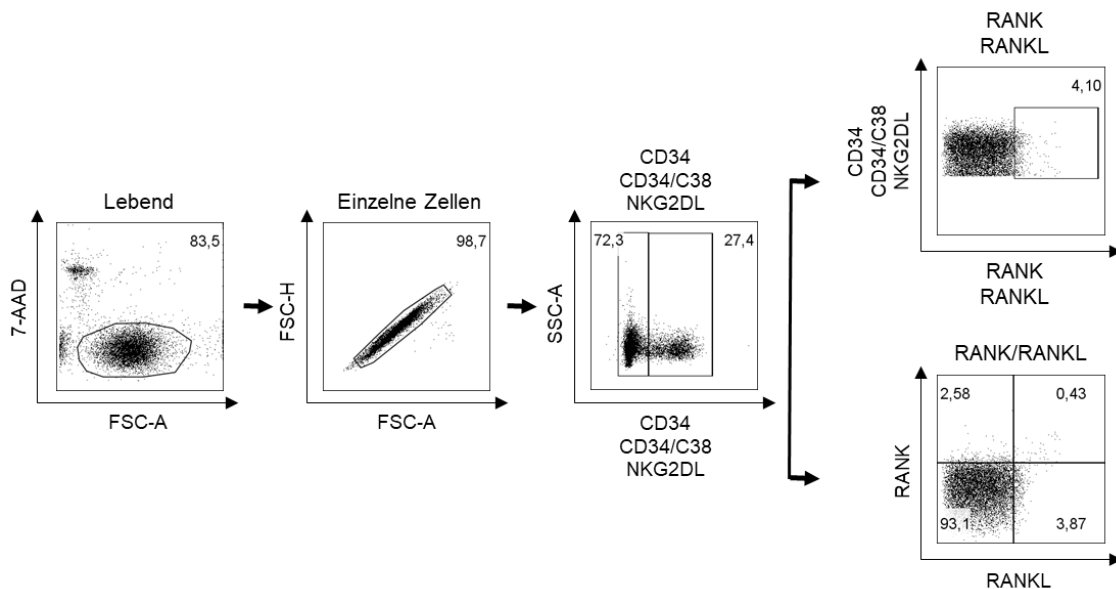
Da bereits bekannt ist, dass AML-Blasten RANKL exprimieren, wurde weiterhin ein Zusammenhang zwischen der Expression von RANK mit seinem Liganden untersucht. Es wurde ein FACS-Panel etabliert, welches simultan die Detektion von RANK und seinem Liganden auf der Oberfläche ermöglicht. Bei den  $n = 30$  analysierten AMLs korrelierte die Expression von RANK stark mit der Expression seines Liganden ( $R_s = 0,7655$ , **Abbildung 5C**), so dass die beiden Moleküle auf den AML-Blasten koexprimiert werden.



**Abbildung 5 Korrelationen der RANK-Expression in der AML. (A)** Korrelation der Expression von RANK ermittelt durch Durchflusszytometrie mittels anti-RANK mAb FAB683P nach Zuordnung entsprechend der FAB-Typen der untersuchten AMLs. Die Linien zeigen den Mittelwert der RANK-Oberflächenexpression (M0 = 8,36 %, M1 = 6,45 %, M2 = 11,91 %, M3 = 13,64 %, M4 = 22,04 %, M5 = 41,52 %,  $n = 53$ , Kruskal-Wallis Test,  $p = 0,0010$ ). **(B)** Korrelation der Expression von RANK ermittelt durch Durchflusszytometrie mittels anti-RANK mAb FAB683P nach CD34-Positivität ( $n = 20$ ) oder -Negativität ( $n = 10$ ) der AML (Mann-Whitney Test,  $p < 0,0001$ ). **(C)** Korrelation der Oberflächenexpression von RANK ermittelt durch Durchflusszytometrie mittels anti-RANK mAb FAB683P mit der RANKL-Oberflächenexpression mittels anti-RANKL mAb PM1211P ( $n = 30$ ,  $R_s = 0,7655$ ,  $p < 0,0001$ ).

### 3.2.3 Rolle von RANK für Stammzeleigenschaften in der AML

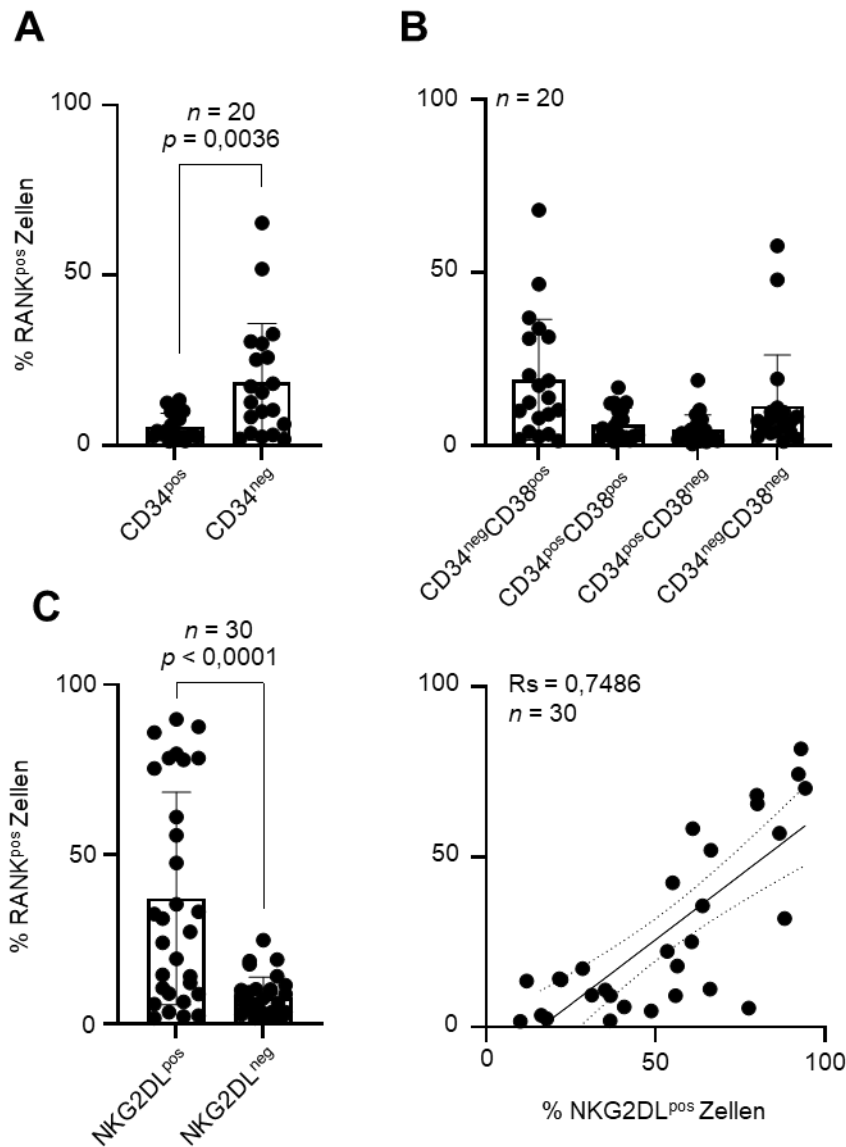
Aufgrund ihrer besonderen Rolle in der Pathophysiologie von Krebserkrankungen ist die Identifikation von Tumorstammzellen von großer Bedeutung. Auf Grundlage der Erkenntnisse, dass RANK in der AML als Differenzierungsmarker fungiert, wurde ein Zusammenhang zwischen der Expression von RANK mit einem Stammzellphänotypen analysiert. Hierfür wurde ein FACS-Panel etabliert, welches neben RANK und RANKL auch die Stammzell- und Differenzierungsmarker CD34, CD38 und NKG2DL beinhaltet. Mit diesem Panel wurden die leukämischen Zellen von  $n = 30$  AML-Patienten durchflusszytometrisch untersucht, wobei  $n = 20$  Patienten den CD34-positiven AML-Fällen und  $n = 10$  Patienten den CD34-negativen Fällen zugeordnet wurden. Die Auswertung erfolgte entsprechend der in **Abbildung 6** dargestellten Gatingstrategie. Da ausschließlich AML-Patienten mit einem Blastenanteil  $\geq 85\%$  im Blutausschlag analysiert wurden, entfiel die zusätzliche Selektion auf Blasten.



**Abbildung 6** Schematische Darstellung der Gatingstrategie zur Analyse des Zusammenhangs zwischen RANK-Expression und Stammzellphänotyp.

Als Oberflächenmarker für unreife HSZ wird CD34 auf den leukämischen Stammzellen vieler AML-Patienten exprimiert. Daher wurde zunächst analysiert, ob CD34<sup>pos</sup>-Zellen RANK exprimieren. Kohärent der Beobachtung, dass RANK auf differenzierten AML-Fällen exprimiert wird, konnte eine Expression des

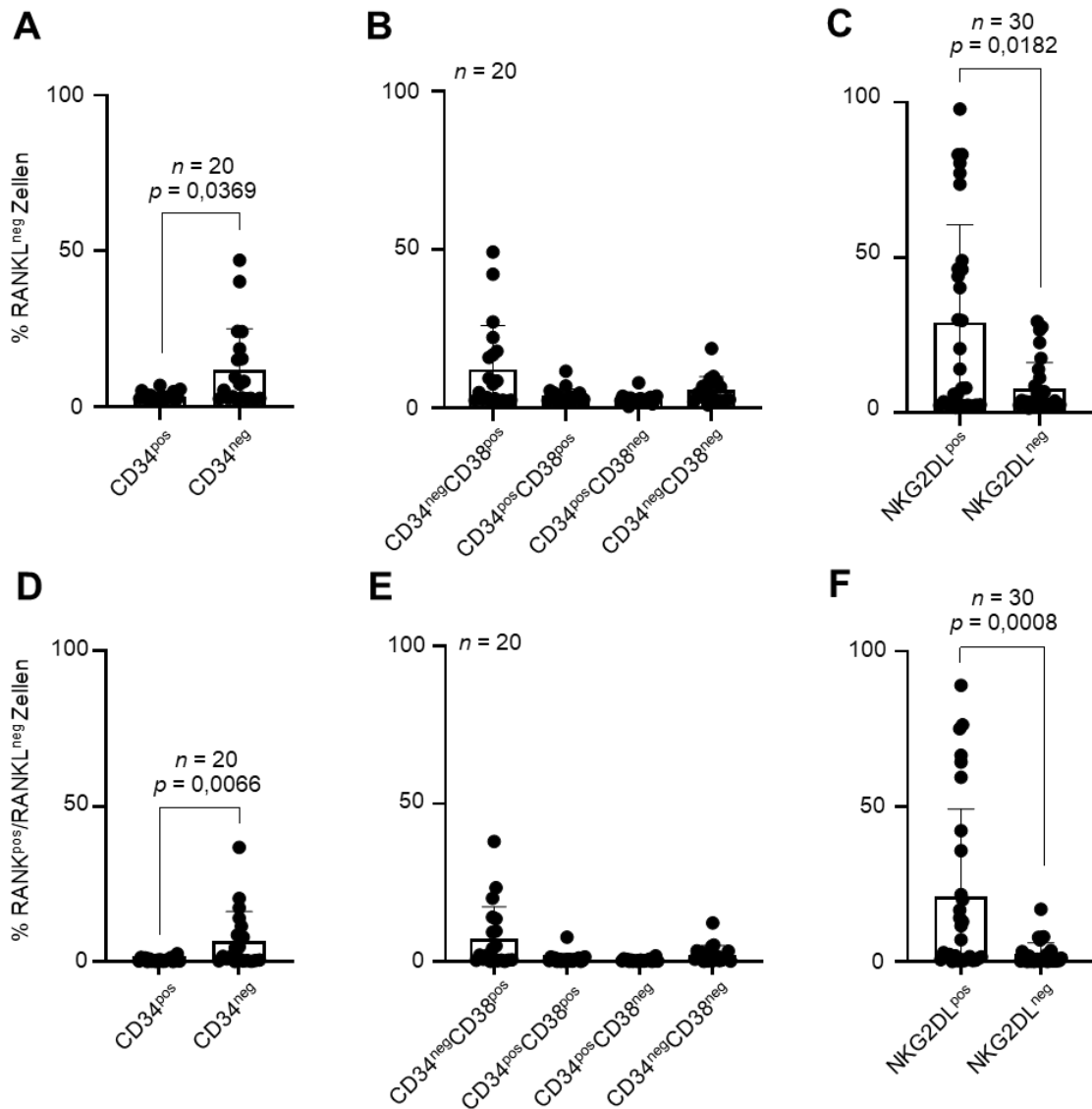
Rezeptors präferentiell auf CD34<sup>neg</sup>-Zellen detektiert werden (Mittelwert: 18,65 % vs. 5,54 %,  $p = 0,0036$ ,  $n = 20$ ; **Abbildung 7A**). Zur genaueren Identifikation leukämischer Stammzellen wurde weiterhin der Differenzierungsmarker CD38 hinzugenommen, wobei Stammzellen allgemein in der CD34<sup>pos</sup>CD38<sup>neg</sup>-Population zu finden sind. Auch hier zeigte sich, dass Zellen in dieser Population kaum RANK-exprimieren (Mittelwert: 4,49 %). Innerhalb der CD34<sup>pos</sup>CD38<sup>pos</sup>-Zellpopulation exprimierten im Mittel lediglich 6,09 % der analysierten Zellen RANK, während auf den differenzierteren CD34<sup>neg</sup>CD38<sup>neg</sup>-Zellen und CD34<sup>neg</sup>CD38<sup>pos</sup>-Zellen eine substantielle RANK-Expression gemessen werden konnte (Mittelwert: 11,34 % bzw. 18,97 %,  $n = 20$ ; **Abbildung 7B**). Um die CD34-negativen AML-Fälle in die Analyse zu inkludieren, wurden zudem die RANK-Expression in Abhängigkeit des NKG2DL-Expressionsstatus analysiert. Entsprechend der vorausgegangenen Ergebnisse wurde beobachtet, dass überwiegend NKG2DL<sup>pos</sup>-Zellen RANK exprimieren (36,99 % vs. 7,84 %) und die Abwesenheit von RANK mit einem Stammzellphänotypen korreliert ( $n = 30$ ;  $p < 0,0001$ ; **Abbildung 7C links**). Es konnte zudem eine Abhängigkeit zwischen dem Anteil der RANK-exprimierenden und NKG2DL-exprimierenden Zellen beobachtet werden ( $R_s = 0,7486$ , **Abbildung 7C rechts**).



**Abbildung 7 Analyse der RANK-Expression auf AML-Blasten nach Stammzell- oder Differenzierungsphänotyp.** Durchflusszytometrische Analyse der RANK-Expression auf den dargestellten Populationen **(A)** CD34<sup>pos/neg</sup> AML-Zellen ( $n = 20$ , Mann Whitney Test,  $p = 0,0036$ ). **(B)** CD34<sup>pos/neg</sup>CD38<sup>pos/neg</sup> AML-Zellen ( $n = 20$ ) **(C) links:** NKG2DL<sup>pos/neg</sup> AML-Zellen ( $n = 30$ , Mann-Whitney Test,  $p < 0,0001$ ); **rechts:** Anteil der RANK-Expression gegen Anteil der NKG2DL-Expression für  $n = 30$  AML-Patienten ( $R_s = 0,7486$ ,  $p < 0,0001$ )

Vergleichbare Daten wurden, entsprechend der zuvor identifizierten Koexpression von RANK und RANKL, auch für die Expression von RANKL sowie

für die Koexpression beider Moleküle beobachtet: AML-Zellen mit Stammzellphänotyp exprimieren kaum RANK oder RANKL (**Abbildung 8**).

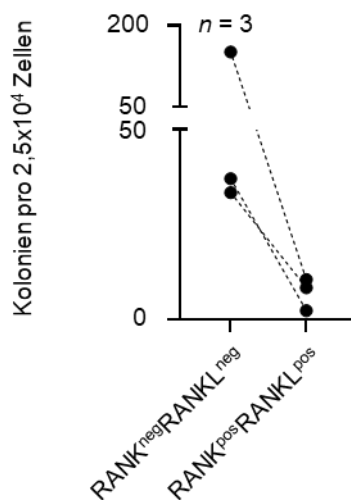


**Abbildung 8 RANKL-Expression und Koexpression von RANK und RANKL auf AML-Blasten nach Stammzell- oder Differenzierungsphänotyp.**

Durchflusszytometrische Analyse der (A-C) RANKL-Expression oder (D-F) Koexpression von RANK und RANKL auf den dargestellten Populationen (A) CD34<sup>pos/neg</sup> AML-Zellen ( $n = 20$ ; Mann-Whitney Test,  $p = 0,0369$ ) (B) CD34<sup>pos/neg</sup>-CD38<sup>pos/neg</sup> AML-Zellen ( $n = 20$ ) (C) NKG2DL<sup>pos/neg</sup> AML-Zellen ( $n = 30$ , Mann-Whitney Test,  $p = 0,0182$ ) (D) CD34<sup>pos/neg</sup> AML-Zellen ( $n = 20$ ; Mann-Whitney Test,  $p = 0,0066$ ) (E) CD34<sup>pos/neg</sup>-CD38<sup>pos/neg</sup> AML-Zellen ( $n = 20$ ) (F) NKG2DL<sup>pos/neg</sup> AML-Zellen ( $n = 30$ , Mann-Whitney Test,  $p = 0,0008$ )

### 3.2.3.1 Funktionelle Analyse in vitro

Um Erkenntnisse über die funktionelle Relevanz von RANK als Differenzierungsmarker zu gewinnen, wurde das klonogene Potenzial der leukämischen Zellen von AML-Patienten untersucht. Hierfür wurden die Blasten von  $n = 3$  Patienten (Blastenanteil im peripheren Blutausstrich  $\geq 85\%$ ) mittels FACS in  $\text{RANK}^{\text{pos}}\text{RANKL}^{\text{pos}}$ - und  $\text{RANK}^{\text{neg}}\text{RANKL}^{\text{neg}}$ -Populationen sortiert. Mit den sortierten Zellen wurden CFU Analysen angesetzt und die Anzahl der innerhalb von 14 Tagen gebildeten Kolonien analysiert. Bei allen Patienten bildete die  $\text{RANK}^{\text{neg}}\text{RANKL}^{\text{neg}}$ - im Vergleich zur  $\text{RANK}^{\text{pos}}\text{RANKL}^{\text{pos}}$ -Population eine wesentlich höhere Anzahl an Kolonien (Mittelwert: 73,94 Kolonien/ $2,5 \times 10^4$  Zellen vs. 7,06 Kolonien/ $2,5 \times 10^4$  Zellen, **Abbildung 9**).

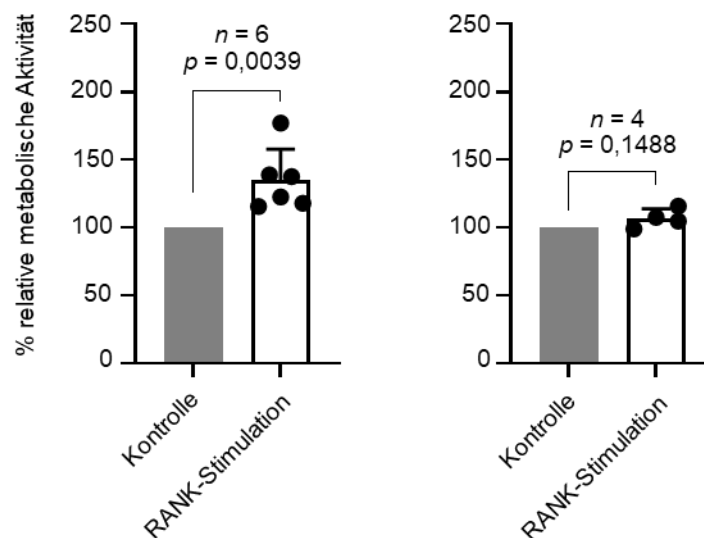


**Abbildung 9 Klonogenitätstest der  $\text{RANK}^{\text{pos}}\text{RANKL}^{\text{pos}}$  und  $\text{RANK}^{\text{neg}}\text{RANKL}^{\text{neg}}$  AML-Zellen.** Sortierung der leukämischen Blasten mittels FACS in Populationen entsprechend der RANK-RANKL-Koexpression ( $\text{RANK}^{\text{pos}}\text{RANKL}^{\text{pos}}$  und  $\text{RANK}^{\text{neg}}\text{RANKL}^{\text{neg}}$ ) und Analyse von CFUs ( $c = 2,5 \times 10^4$  Zellen/Petrischale). Dargestellt sind die Mittelwerte der nach 14 Tagen gebildeten Kolonien in technischen Replikaten von  $n = 3$  Patienten.

### 3.3 Funktionelle Relevanz von RANK in der AML

#### 3.3.1 RANK-Signalübertragung in primären AML-Zellen

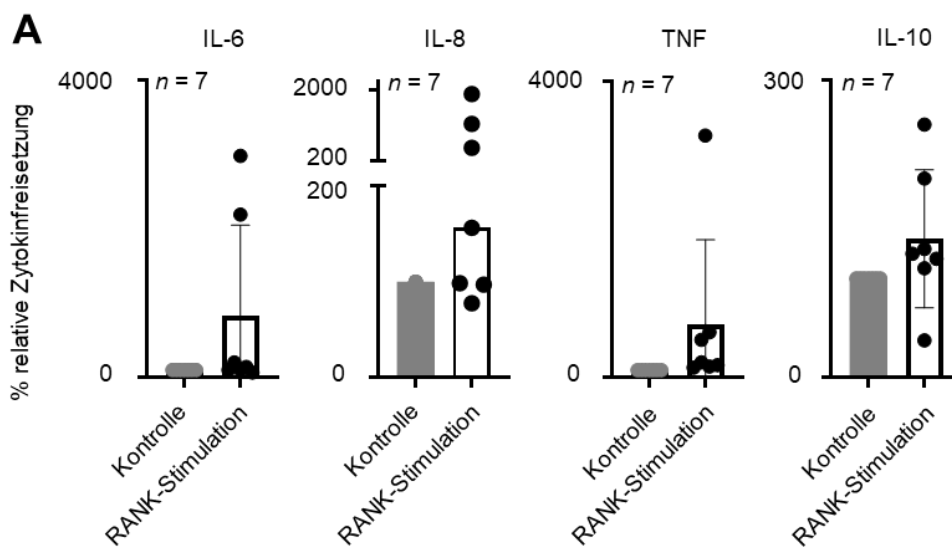
Da ein relevanter Anteil an AML-Patienten RANK exprimiert, wurde analysiert, ob eine Stimulation von RANK die metabolische Aktivität der AML-Zellen beeinflusst. Für die Analyse mittels CTG wurden primäre AML-Zellen mit immobilisiertem Fusionsprotein Fc-hRANKL, welches in Vorversuchen eine stimulierende Wirkung auf den Rezeptor zeigte, für 24 h inkubiert. Bei allen RANK<sup>pos</sup>-Proben ( $n = 6$ ) zeigte sich eine signifikante Steigerung der metabolischen Aktivität nach Stimulation des Rezeptors, während bei RANK<sup>neg</sup>-Proben keine Effekte beobachtet werden konnten (links: Mittelwert 134,8 %,  $p = 0,0039$ , rechts: Mittelwert 106,7 %,  $p = 0,1488$ , **Abbildung 10**).



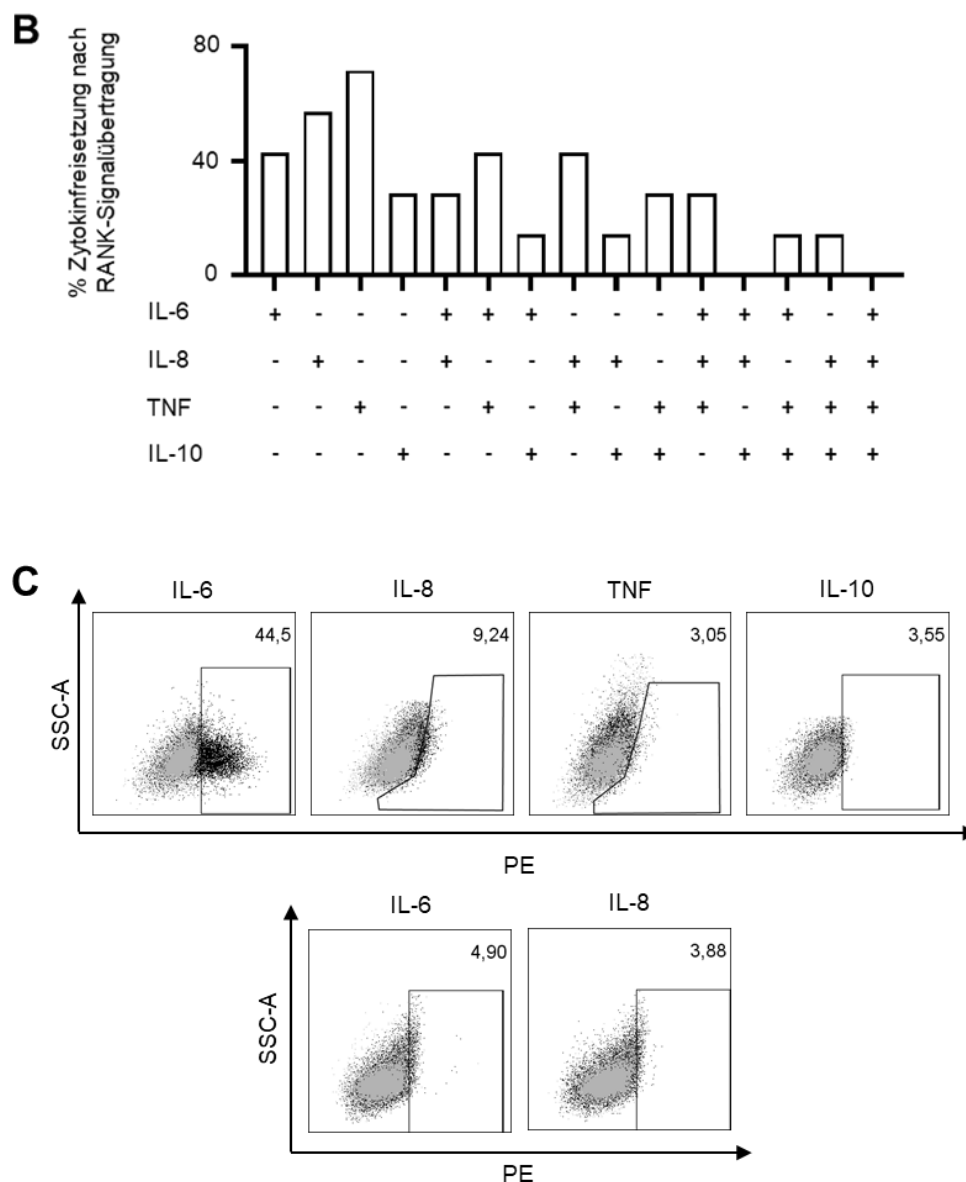
**Abbildung 10 RANK-Signalübertragung führt zu gesteigerter metabolischer Aktivität in AML-Zellen.** Analyse der metabolischen Aktivität der AML-Zellen nach Inkubation (24 h) mit oder ohne Fc-hRANKL (15 µg/mL) mittels CTG. Die Daten wurden auf die unbehandelte Kontrolle (= 100 %) normalisiert. **Links:** RANK<sup>pos</sup> AML-Zellen ( $n = 6$ , Mittelwert = 134,8 %, gepaarter T-Test,  $p = 0,0039$ ), **rechts:** RANK<sup>neg</sup> AML-Zellen ( $n = 4$ , Mittelwert = 106,7 %, gepaarter T-Test,  $p = 0,1488$ ).

Ein möglicher zugrundeliegender Mechanismus zur Steigerung der metabolischen Aktivität von AML-Zellen nach Stimulation von RANK könnte die Produktion, Freisetzung und der Einfluss von Zytokinen sein, welche für die

Pathophysiologie der Erkrankung relevant sind. So wurde das Niveau sekretierter Zytokine (IL-6, IL-8, IL-10 und TNF) mittels LEGENDplex™ evaluiert. Hierbei zeigte sich, dass RANK-Stimulation mittels immobilisiertem Fc-hRANKL zu einer gesteigerten Sekretion der analysierten Zytokine führt (**Abbildung 11A**), wobei eine interindividuelle Variabilität der sekretierten Zytokinkombination zu beobachten war. Bei keiner der untersuchten Patientenproben ( $n = 7$ ) wurden alle vier analysierten Zytokine freigesetzt (**Abbildung 11B**). Zur Überprüfung, ob diese Zytokine tatsächlich durch die AML-Blasten freigesetzt werden, wurden anschließend die Zytokinlevel in den Blasten mittels intrazellulärer Anfärbung der Zytokine IL-6, IL-8, TNF und IL-10 durchflusszytometrisch analysiert. Hierbei konnte nach Stimulation mit dem Fusionsprotein Fc-hRANKL ein deutlicher Anstieg der IL-6 und IL-8 Level sowie Tendenzen einer Steigerung der IL-10 und TNF-Produktion in den Blasten beobachtet werden (**Abbildung 11C, oben, exemplarische Daten**). Weniger ausgeprägte Tendenzen erhöhter Zytokinlevel von IL-6 und IL-8 konnten auch bei Stimulation mit löslichem rekombinantem humanem RANKL (rhRANKL) festgestellt werden (**Abbildung 11C, unten, exemplarische Daten**).



**Abbildung 11 fortgesetzt**

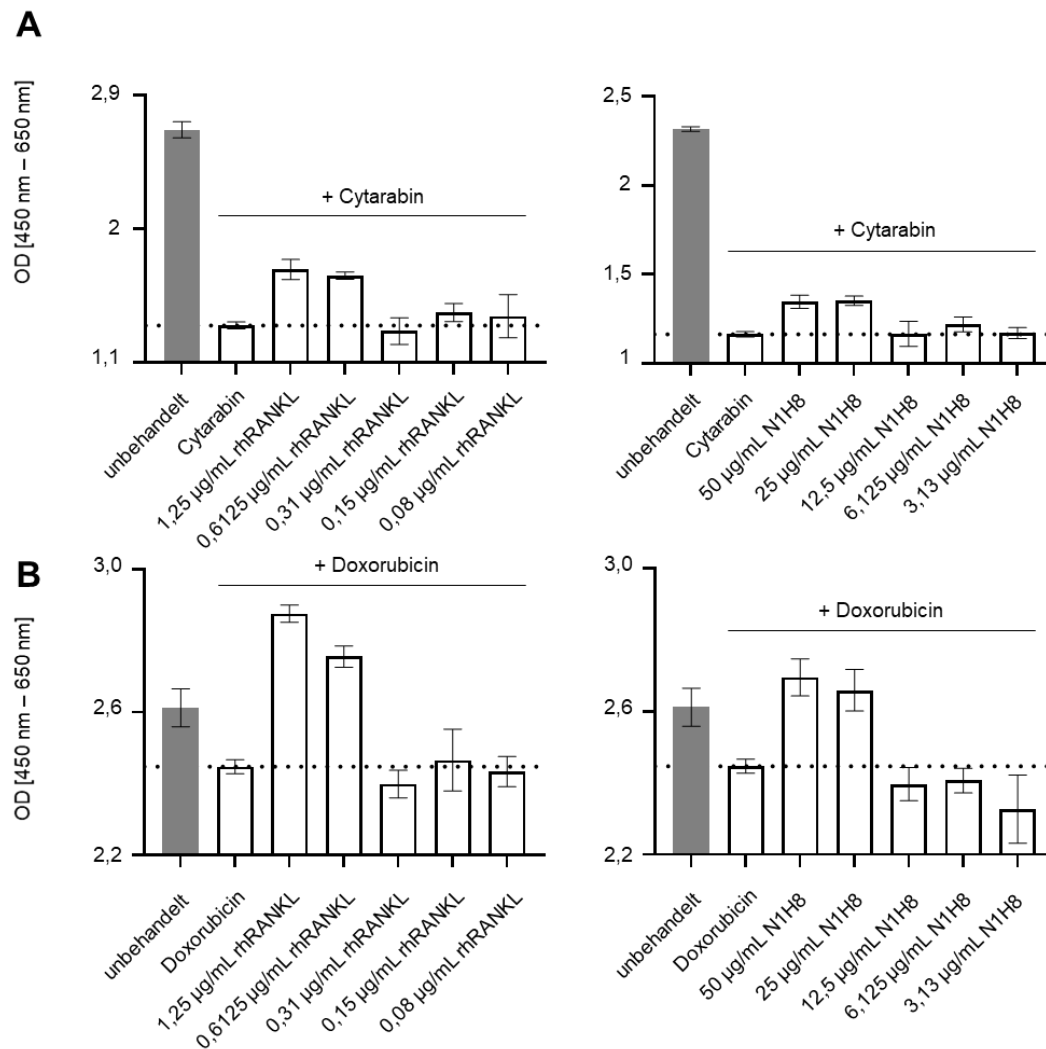


**Abbildung 11 Produktion und Sekretion von Zytokinen nach Stimulation von RANK auf AML-Zellen. (A)** LEGENDplex™ Analyse (IL-6, IL-8, TNF und IL-10) des Überstandes von  $n = 7$  AML-Patientenproben nach Inkubation mit Fc-hRANKL oder rhIgG1 Fc für 24 h, normalisiert auf die Kontrolle. **(B)** Analyse der freigesetzten Zytokinkombinationen. Eine positive Reaktion wurde als  $\geq 1,5$ -facher Anstieg des jeweiligen Zytokins nach RANK-Signalübertragung definiert. Dargestellt ist der Prozentsatz der Proben, welche die angegebene Kombination freigesetzt haben. **(C)** Durchflusszytometrische Analyse intrazellulärer Zytokinlevel (anti-IL-6 PE AS12, anti-IL-8-PE AS14, anti-IL-10-PE JES3-19F1, anti-TNF-PE MAb11) primärer AML-Zellen ( $n = 1$ ) nach Inkubation für 24 h mit RANK-stimulierenden Reagenzien **oben:** Fc-hRANKL (15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) **unten:** löslicher rhRANKL (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

### 3.3.2 Effekte von RANK-Signalübertragung auf AML-Zellen unter Chemotherapie

#### 3.3.2.1 Etablierungsprozess

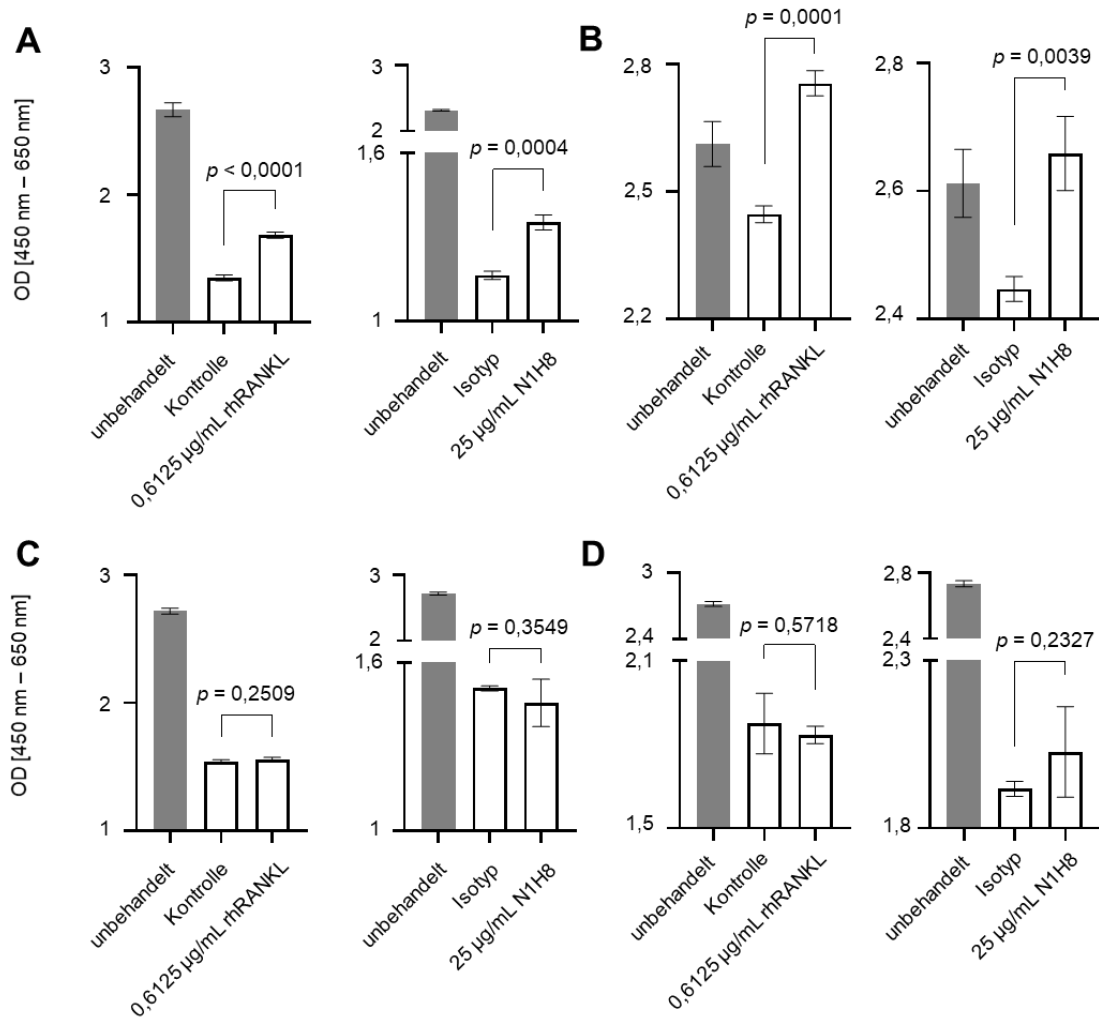
Im nächsten Schritt wurde ein Untersuchungssystem etabliert um zu prüfen, ob die durch RANK-Stimulation vermittelten überlebenssteigernden Effekte auch unter Chemotherapie-Behandlung zu beobachten sind. Da Zelllinien in Kultur eine bessere Viabilität als primäre AML-Zellen aufweisen und die Zellen für die Untersuchung mehrere Tage in Kultur gehalten werden müssen, wurden zunächst die Effekte einer RANK-Stimulation bei den AML-Zelllinien EOL-1, HL-60 und KG-1a untersucht. Die metabolische Aktivität der Zellen wurde mittels WST-1 Assay analysiert. Zunächst wurden die Zellzahlen ermittelt, bei welchen die optische Dichte nach der im Versuchsdesign vorgesehenen Inkubationszeit von 48 h die Untersuchung von Effekten ermöglicht. Entsprechend der Titrationen wurden für die drei getesteten Zelllinien folgende Zellzahlen festgelegt: EOL-1, KG-1a: 200 000/Well; HL-60: 20 000/Well (**nicht dargestellt**). Im nächsten Schritt wurde mittels Dosis Titration die halbmaximal letale Konzentration (LC50) der zwei Chemotherapeutika Cytarabin und Doxorubicin für die Zelllinien *in vitro* ermittelt. Die LC50 wurden mittels GraphPad Prism 8, unter Verwendung einer nicht-linearen Regressionsanalyse, berechnet. Die hieraus resultierende Dosis-Wirkungs-Kurve ergab eine LC50 für Doxorubicin von 0,26  $\mu\text{M}$  für die Zelllinie EOL-1, 0,21  $\mu\text{M}$  für HL-60 und 26,81  $\mu\text{M}$  für KG-1a sowie für die Behandlung mit Cytarabin von 0,37  $\mu\text{M}$  für die Zelllinie EOL-1, 1,13  $\mu\text{M}$  für HL-60 und 100  $\mu\text{M}$  für KG-1a (**nicht dargestellt**). Im nächsten Schritt wurden die Effekte der Stimulation von RANK auf AML-Zelllinien bei gleichzeitiger Behandlung mit Chemotherapie in Gegenwart zweier agonistischer Reagenzien (rhRANKL und anti-RANK N1H8 Antikörper) untersucht. Die Stimulation von RANK bei Inkubation mit mindestens 0,6125  $\mu\text{g/mL}$  rhRANKL bzw. 25  $\mu\text{g/mL}$  N1H8 resultierte in einer gesteigerten Viabilität der HL-60-Zelllinie, sowohl unter der Behandlung mit Cytarabin (rhRANKL: Optische Dichte (OD) 1,35 vs. 1,68 ; N1H8: OD 1,16 vs. 1,35; **Abbildung 12A**), als auch mit Doxorubicin (rhRANKL: OD 2,45 vs. 2,76; N1H8: OD 2,45 vs. 2,66; **Abbildung 12B**).



**Abbildung 12 Einfluss von RANK-Stimulation auf AML-Zelllinien unter Chemotherapie im WST-1 Assay.** Analyse der Zellviabilität der AML-Zelllinie HL-60 nach Inkubation für 24 h mit RANK-Agonisten (**links:** rhRANKL, **rechts:** anti-RANK Antikörper N1H8) in ansteigenden Konzentrationen mittels WST-1 Assay. Behandlung der Zellen mit **(A)** 1,13 µM Cytarabin für 72 h oder **(B)** 0,22 µM Doxorubicin für 24 h.

Unter diesen Bedingungen wurde der Effekt von RANK-Stimulation auf die Zellviabilität von HL-60 in unabhängigen Experimenten analysiert. Hierbei kam es zu inkonsistenten Ergebnissen. In einem Experiment kam es unter Behandlung mit Cytarabin zu einer signifikanten Steigerung der Zellviabilität nach Stimulation mit rhRANKL oder N1H8 (**Abbildung 13A**, **links** rhRANKL  $p < 0,0001$ , **rechts** N1H8  $p = 0,0004$ ). Auch unter der Behandlung mit Doxorubicin konnte durch beide Reagenzien die Zellviabilität signifikant

gesteigert werden (**Abbildung 13B, links** rhRANKL,  $p = 0,0001$ ; **rechts** N1H8,  $p = 0,0039$ ). In der Wiederholung konnten diese Ergebnisse nicht reproduziert werden: es konnte keine Auswirkung auf die Zellviabilität beobachtet werden, weder unter Behandlung mit Cytarabin (**Abbildung 13C, links** rhRANKL  $p = 0,2509$ , **(C, rechts)** N1H8:  $p = 0,3549$ ) noch unter Doxorubicin (**Abbildung 13D, links** rhRANKL:  $p = 0,5718$ ; **(D, rechts)** N1H8:  $p = 0,2327$ ).

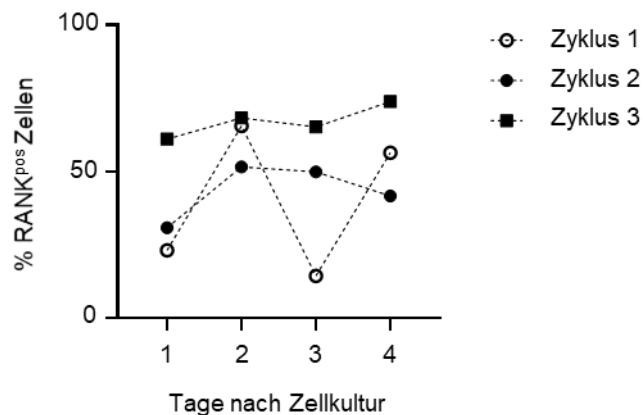


**Abbildung 13 Effekte von RANK-Stimulation auf die Viabilität von AML-Zelllinien.**

Analyse der Zellviabilität der AML-Zelllinie HL-60 nach 24 h Inkubation mit rhRANKL (0,6125 µg/mL) oder N1H8 (25 µg/mL). Behandlung (**A+C**) mit 1,13 µM Cytarabin für 72 h oder (**B+D**) 0,22 µM Doxorubicin für 24 h. Analyse mittels WST-1 Assay. (**A rechts**: Cytarabin, rhRANKL (ungepaarter T-Test,  $p < 0,0001$ ); **links**: Cytarabin, N1H8 (ungepaarter T-Test,  $p = 0,0004$ ). (**B rechts**: Doxorubicin, rhRANKL (ungepaarter T-Test,  $p = 0,0001$ ); **links**: Doxorubicin, N1H8 (ungepaarter T-Test,  $p = 0,0039$ ).

**(C) rechts:** Cytarabin, rhRANKL (ungepaarter T-Test,  $p = 0,2509$ ), **links:** Cytarabin, N1H8 (ungepaarter T-Test,  $p = 0,3549$ ). **(D) rechts:** Doxorubicin, rhRANKL (ungepaarter T-Test,  $p = 0,5718$ ), **links:** Doxorubicin, N1H8 (ungepaarter T-Test,  $p = 0,2327$ ). Dargestellt ist der Mittelwert dreier technischer Replikate aus zwei unabhängigen Experimenten.

Um einen Einfluss nicht kontrollierter Variablen auszuschließen, wurde die Kontinuität der RANK-Oberflächenexpression auf den HL-60-Zellen im zeitlichen Verlauf über vier Tage mit Beginn nach der Passage der Zelllinie untersucht. Die kinetische Analyse zeigte eine große Variabilität der Expression, wobei kein repetitives Muster in den untersuchten drei Zyklen identifiziert werden konnte. **(Abbildung 14).**

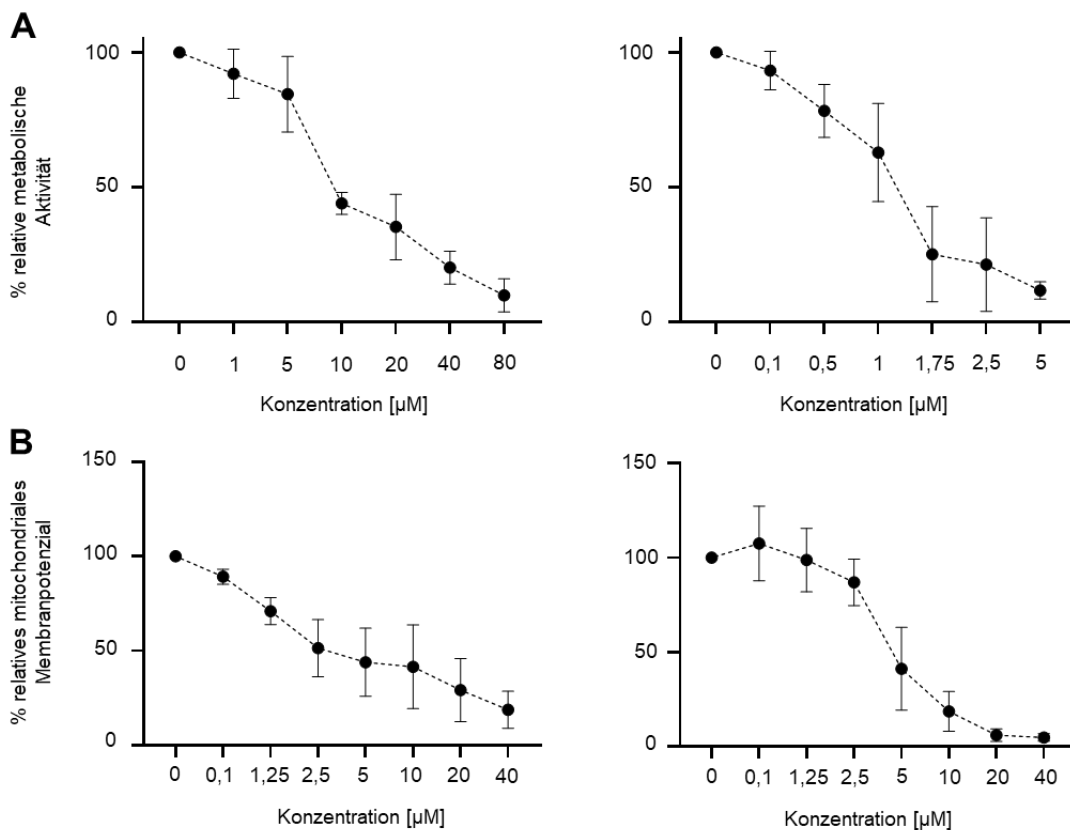


**Abbildung 14 Kinetik der RANK-Oberflächenexpression auf der AML-Zelllinie HL-60.** Analyse der RANK-Oberflächenexpression der Zelllinie HL-60 im zeitlichen Verlauf über vier Tage (x-Achse) mittels Durchflusszytometrie.

Da AML-Zelllinien entsprechend der Variabilität der RANK-Oberflächenexpression nicht geeignet schienen, um die funktionelle Relevanz von RANK in der AML reliabel zu untersuchen, wurden in den nachfolgenden Analysen ausschließlich primäre AML-Zellen verwendet. Den AML-Patienten wurde Blut mittels Venenpunktion entnommen sowie die darin enthaltenen PBMC isoliert und eingefroren. Das bietet den Vorteil, dass unkontrollierte Störgrößen z.B. durch Kultivierung und Passagieren der Zellen verhindert werden, bringt allerdings die Herausforderung mit sich, dass primäre Zellen im Allgemeinen ein schlechteres Überleben in der Kultur aufweisen. Zunächst wurde die LC50 der

zwei konventionellen Chemotherapeutika Cytarabin und Doxorubicin mittels CTG bei primären AML-Zellen ( $n = 6$ ) bestimmt. Die LC50 wurde mittels GraphPad Prism 8 berechnet. Aus der resultierenden Dosis-Wirkungs-Kurve konnte eine LC50 *in vitro* für Cytarabin von 9,615  $\mu\text{M}$  sowie für Doxorubicin von 1,161  $\mu\text{M}$  ermittelt werden (**Abbildung 15A**).

Als weitere Methode sollten durchflusszytometrische Untersuchungen des mitochondrialen Membranpotenzials zur Bestimmung der Zellviabilität eingesetzt werden. Auch hier wurde mittels Titration der Chemotherapeutika die LC50 für Cytarabin (9,33  $\mu\text{M}$ ) und Doxorubicin (4,1  $\mu\text{M}$ ) ermittelt (**Abbildung 15B**).

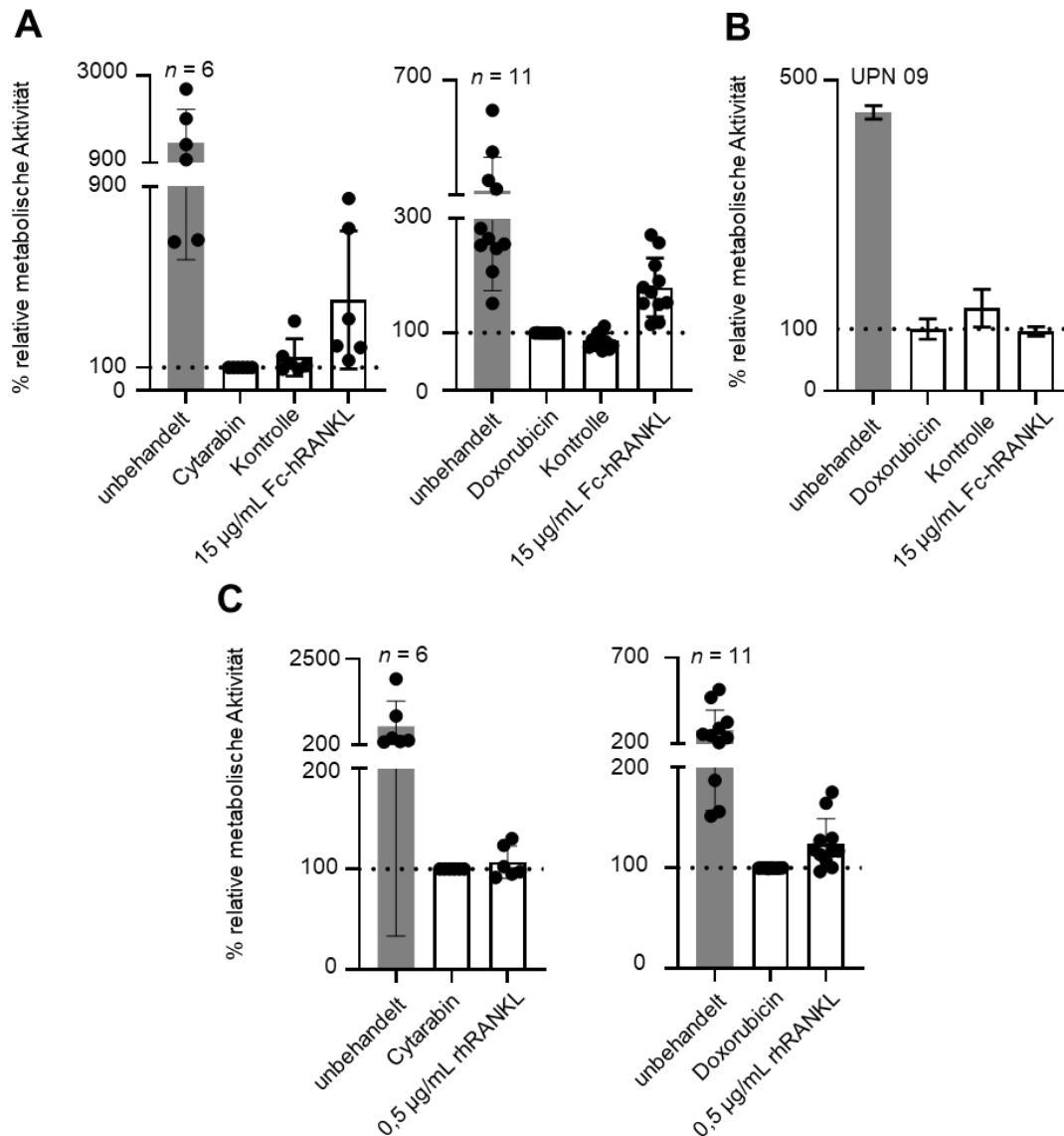


**Abbildung 15 Titrationskurven für Cytarabin und Doxorubicin mit primären AML-Zellen.** (A) CTG-Analyse nach Behandlung von PBMC von AML-Patienten mit Blastenanteil  $\geq 85\%$  mit ansteigenden Konzentrationen von Cytarabin ( $n = 4$ , links) und Doxorubicin ( $n = 6$ , links) und Inkubation für 72 h, respektive 24 h. Dargestellt sind kombinierte Daten, normalisiert auf das ATP-Level ohne chemotherapeutische Behandlung (= 100 %). (B) Durchflusszytometrische Analyse nach Behandlung von

PBMC von AML-Patienten mit ansteigenden Konzentrationen von Cytarabin ( $n = 3$ , links) und Doxorubicin ( $n = 6$ , rechts) nach Inkubation für 72 h, respektive 24 h. Die AML-Blasten wurden mittels spenderspezifischer Blastenmarker selektiert. Die Viabilität wurde mittels TMRE-Färbung ermittelt. Dargestellt sind kombinierte Daten, normalisiert die Viabilität ohne chemotherapeutische Behandlung (= 100 %).

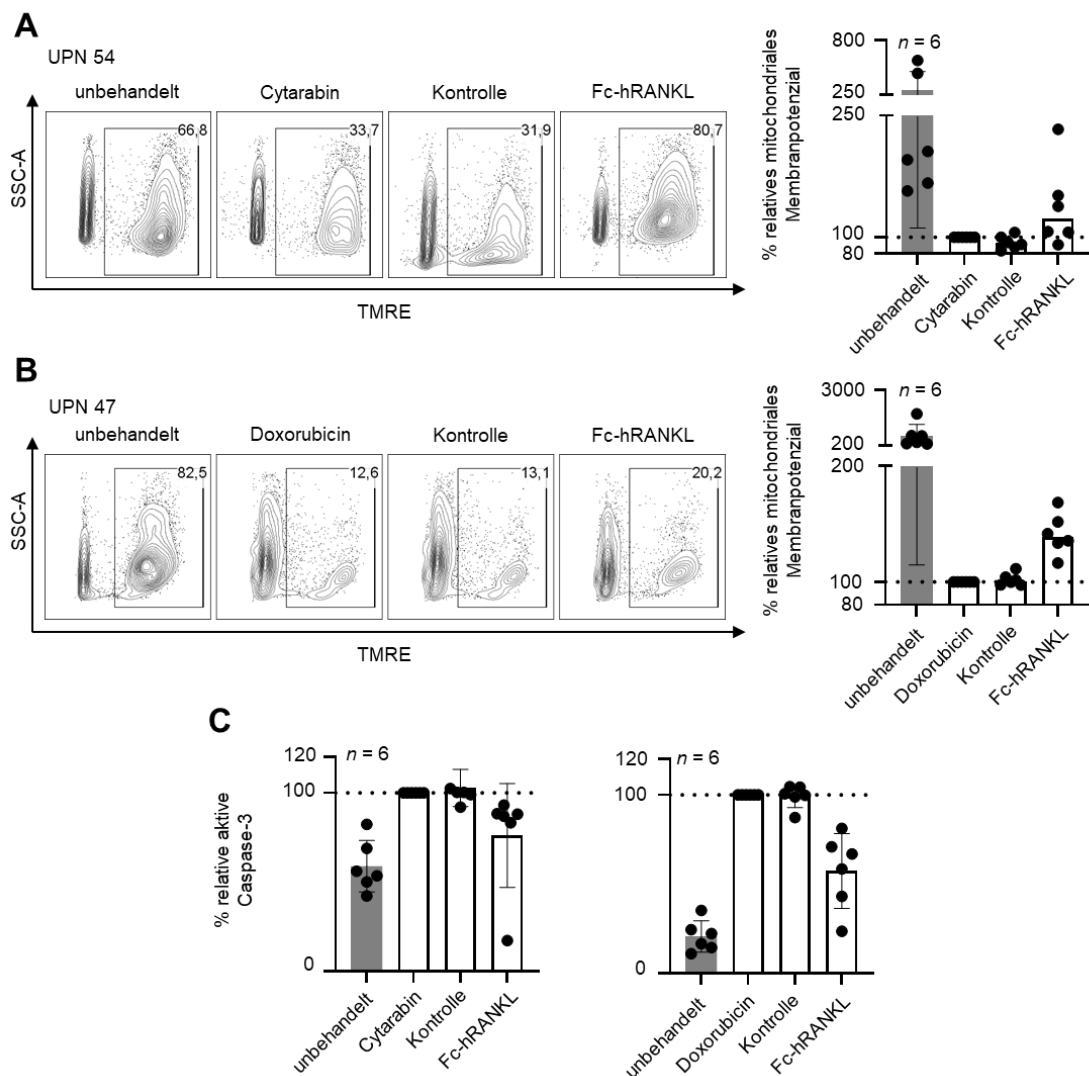
### 3.3.2.2 Analyse der Viabilität primärer AML-Zellen nach RANK-Stimulation unter Chemotherapie

Nachfolgend wurde unter den zuvor beschriebenen Bedingungen analysiert, ob sich eine RANK-Signalübertragung auf die Sensitivität der primären leukämischen Zellen gegenüber Cytarabin und Doxorubicin auswirkt. Mittels CTG-Analysen konnte eine deutliche Steigerung der Viabilität von AML-Zellen unter Behandlung mit Cytarabin detektiert werden, wenn die Zellen zusätzlich mit RANK-Stimulus (Fc-hRANKL, 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) inkubiert wurden ( $n = 6$ , mittlere relative metabolische Aktivität nach Stimulation 398,8 %, normalisiert auf Behandlung mit Cytarabin = 100 %; **Abbildung 16A, links**). Bei der Behandlung mit Doxorubicin war dieser Effekt weniger ausgeprägt ebenfalls zu beobachten ( $n = 11$ ; **Abbildung 16A, rechts**): die Stimulation von RANK führte hier zu einer mittleren relativen metabolischen Aktivität von 179,6 %, während bei der Analyse RANK<sup>neg</sup>-Patienten nach RANK-Stimulation unter Doxorubicin keine Steigerung der relativen metabolischen Aktivität gegenüber der Behandlung mit der Isotypkontrolle beobachtet werden konnte (**exemplarische Daten, Abbildung 16B**). Da neben der membrangebundenen Form in der Knochenmikroumgebung auch eine lösliche Form von RANKL existiert, wurde überprüft, ob eine Stimulation mit löslichem rhRANKL ebenfalls zu einer gesteigerten metabolischen Aktivität von primären AML-Zellen führt. Bei der Analyse von  $n = 6$  Patientenproben unter Cytarabin- und  $n = 11$  Patientenproben unter Doxorubicin-Behandlung konnte mittels CTG-Analysen eine Tendenz beobachtet werden, dass die Stimulation von RANK mittels löslichem Liganden positive Effekte auf die Zellviabilität hat (**Abbildung 16C, links** unter der Behandlung mit Cytarabin, **rechts** unter der Behandlung mit Doxorubicin).



**Abbildung 16 Analyse des Effekts von RANK-Stimulation auf die metabolische Aktivität primärer AML-Proben im CTG.** CTG-Analyse primärer AML-Zellen nach **(A)** Inkubation primärer AML-Zellen mit 15 µg/mL Fc-hRANKL oder Kontrolle. Behandlung der PMBC für 72 h mit Cytarabin (**links**) oder für 24 h mit Doxorubicin (**rechts**). **(B)** Inkubation primärer AML-Zellen eines RANK<sup>neg</sup> Patienten mit 15 µg/mL Fc-hRANKL oder Kontrolle für 24 h, behandelt mit Doxorubicin für 24 h. **(C)** CTG-Analyse primärer AML-Zellen nach Inkubation mit 0,5 µg/mL rhRANKL **links**: unter Behandlung mit Cytarabin, **rechts**: unter Behandlung mit Doxorubicin. Daten normalisiert auf die Behandlung mit Chemotherapie (= 100 %).

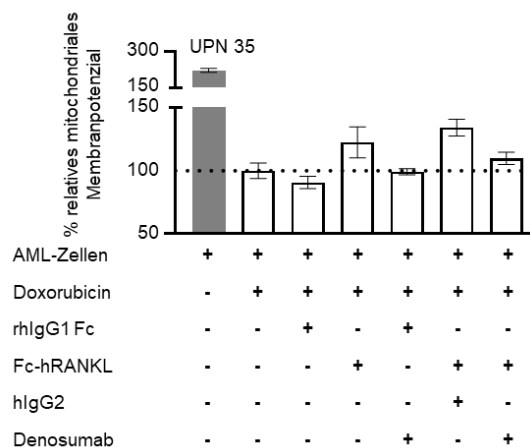
Zur Validierung dieser Ergebnisse und um weitere Einblicke in den RANK vermittelten Resistenzmechanismus zu erhalten, wurde die Viabilität mittels einer weiteren Methode, der Durchflusszytometrie, untersucht. PBMC von AML-Patienten wurden mit und ohne RANK-Stimulus für 24 h inkubiert und anschließend mit den Chemotherapeutika Doxorubicin oder Cytarabin für weitere 24 h respektive 72 h inkubiert. Dann wurde das mitochondriale Membranpotential der AML-Zellen mittels TMRE-Färbung sowie die intrazelluläre Aktivität von Caspase-3 als Messgrößen für Apoptose durchflusszytometrisch analysiert. Dabei konnte ein gesteigertes mitochondriales Membranpotential (% TMRE<sup>pos</sup>-Zellen) und eine reduzierte Caspase-3-Aktivität nach RANK-Stimulation im Vergleich zur Behandlung mit der Kontrolle festgestellt werden. Die durchflusszytometrische Analyse nach TMRE-Färbung von  $n = 6$  Patienten nach RANK-Signalübertragung zeigte unter Cytarabin einen durchschnittlichen Anstieg der TMRE<sup>pos</sup>-Zellen um 22,44 % (**Abbildung 17A**, links: exemplarische Daten eines Patienten rechts: *gepoolte* Daten). Unter Doxorubicin-Behandlung war dieser Effekt sogar stärker ausgeprägt ebenfalls zu beobachten (**Abbildung 17B**, links: exemplarische Daten eines Patienten, rechts: *gepoolte* Daten. Mittlerer Anstieg der TMRE<sup>pos</sup>-Zellen: 38,53 %). Die Aktivierung der Caspase-3 sank unter Cytarabin und Doxorubicin konkludent auf 76,09 % bzw. 57,28 % (normalisiert auf Kontrolle = 100 %), was darauf hindeutet, dass AML-Zellen nach RANK-Stimulation weniger apoptotisch waren (**Abbildung 17C**). Insgesamt deuten die mittels Zellviabilitätsassay und Durchflusszytometrie gewonnen Erkenntnisse auf Resistenzmechanismen von Leukämiezellen gegenüber Doxorubicin und Cytarabin hin, welche über RANK vermittelt werden.



**Abbildung 17 Durchflusszytometrische Analyse des Effekts von RANK-Stimulation auf die Viabilität primärer AML-Zellen.** Analyse der Viabilität der AML-Zellen nach Inkubation mit 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Fc-hRANKL oder Kontrolle für 24 h mittels Durchflusszytometrie. **(A+B)** Durchflusszytometrische Analyse des mitochondrialen Membranpotenzials durch Färbung mit TMRE nach **(A)** Behandlung mit Cytarabin für 72 h. **Links:** exemplarische Daten, **rechts:** gepoolte Daten ( $n = 6$ ) aus unabhängigen Experimenten. **(B)** Behandlung mit Doxorubicin für 24 h. **Links:** exemplarische Daten, **rechts:** gepoolte Daten ( $n = 6$ ) aus unabhängigen Experimenten. **(C)** Durchflusszytometrische Analyse der aktiven Caspase-3 **links:** nach Behandlung mit Cytarabin für 72 h, **rechts:** nach Behandlung mit Doxorubicin für 24 h. Dargestellt sind kombinierte Daten ( $n = 6$ ) aus unabhängigen Experimenten, normalisiert auf die Behandlung mit Chemotherapie (= 100 %).

### 3.3.3 Einfluss von Denosumab auf die durch RANK-Signaling mediierten Effekte in AML

Aus translationaler Sicht war von besonderem Interesse, ob der RANK-vermittelte Effekt durch den bereits zugelassenen monoklonalen RANKL-neutralisierenden Antikörper Denosumab moduliert werden kann und AML-Zellen folglich gegenüber den beiden Chemotherapeutika Doxorubicin und Cytarabin sensitiviert werden können. Entsprechend des experimentellen Designs zur Untersuchung der Chemotherapieresistenz im TMRE-FACS wurde das Fusionsprotein Fc-hRANKL auf einer Oberfläche immobilisiert. Vor der Zugabe der primären AML-Zellen wurde Denosumab zur Neutralisierung des Liganden verabreicht. In einem ersten Experiment konnten die durch RANK mediierten Resistenzmechanismen durch die Zugabe von Denosumab neutralisiert werden. RANK-Stimulation steigerte die Viabilität der AML-Blasten im Vergleich zur Kontrolle um 22,4 % ( $p = 0,00477$ ). Die Blockade der RANK-RANKL-Signalübertragung konnte diesen Effekt revertieren: AML-Zellen, welche zusätzlich zur RANK-Stimulation mit Denosumab inkubiert wurden, zeigten keine signifikante Steigerung der relativen Zellviabilität (109,8 %,  $p = 0,0952$ , **Abbildung 18**). Diese vielversprechenden Ergebnisse gilt es in weiteren Untersuchungen zu validieren, um die Grundlage für eine Translation der Modulation von RANK-RANKL-Signalübertragung in der Therapie der AML zu schaffen.

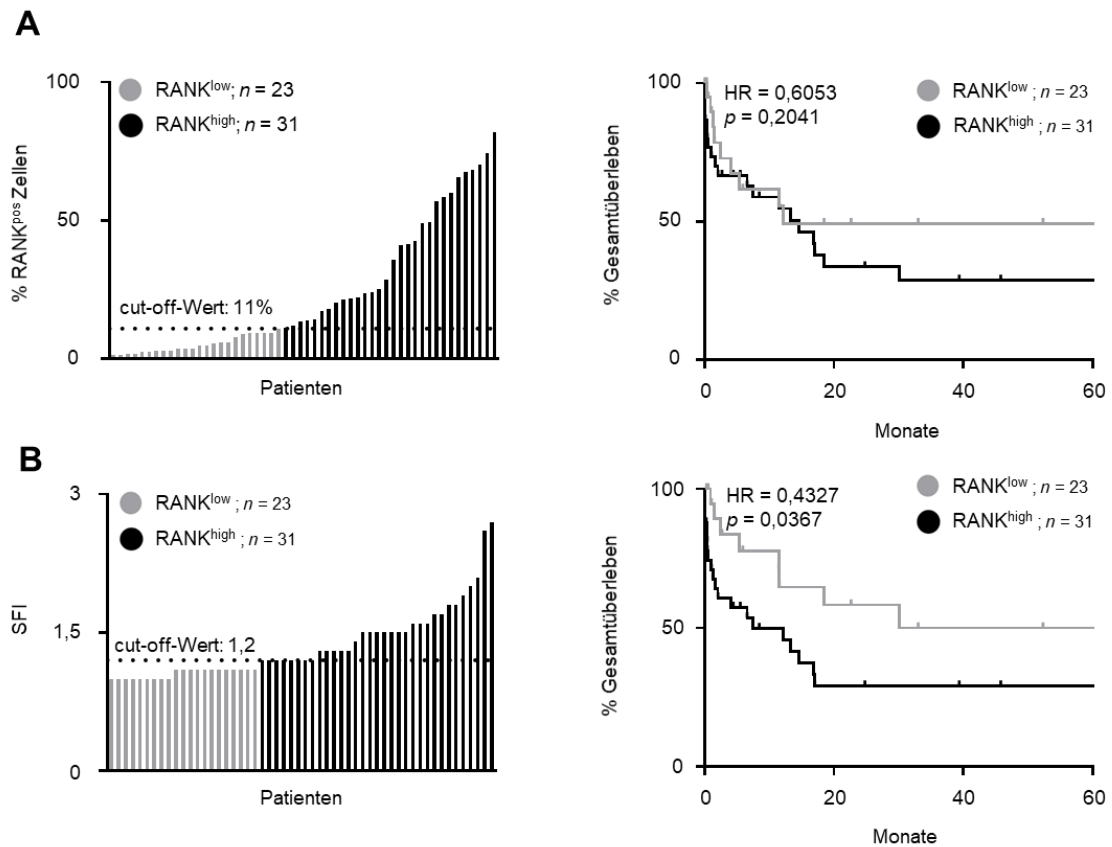


**Abbildung 18** Analyse der Viabilität primärer AML-Zellen nach RANK-Stimulation unter Chemotherapie und Modulation durch RANK-RANKL-Blockade. Inkubation

primärer AML-Zellen mit 15 µg/mL Fc-hRANKL oder Kontrolle und 50 µg/mL Denosumab respektive Isotypkontrolle für 24 h. Behandlung mit 5 µM Doxorubicin für 24 h. Durchflusszytometrische Analyse des mitochondrialen Membranpotenzials der AML-Zellen durch Färbung mit TMRE. Normalisiert auf das mitochondriale Membranpotenzial unter Behandlung mit Doxorubicin (= 100 %).

### **3.3.4 RANK-Expression als prognostischer Marker**

Eine durch RANK-Signale vermittelte Therapieresistenz von AML-Zellen würde naheliegenderweise zu einem geringeren Ansprechen auf die Therapie führen, weshalb letztlich noch eine mögliche Korrelation der RANK-Expression mit dem klinischen Verlauf der untersuchten AML-Patienten durchgeführt wurde. Aufgrund der großen interindividuellen Unterschiede der RANK-Expression in der AML erfolgte zunächst die Bestimmung von *cut-off*-Werten mittels *Receiver Operating Characteristic* (ROC)-Analyse. Entsprechend wurden für die Analyse des Gesamtüberlebens die *cut-off*-Werte 11 % und ein SFI von 1,2 zur Differenzierung zwischen niedrig und hoch exprimierenden Fällen festgelegt (**Abbildung 19A und B links**). Die Analyse des Gesamtüberlebens zeigte bei Differenzierung nach Anteil der RANK-exprimierenden Zellen ein tendenziell längeres Überleben bei Patienten mit geringer RANK-Expression als bei Patienten mit hoher RANK-Expression (*Hazard Ratio* (HR) 0,6053,  $p = 0,2041$ ; **Abbildung 19A, rechts**). Bei Betrachtung der SFI-Werte verdeutlichte sich diese Tendenz zu einem statistisch signifikant längerem Gesamtüberleben für Patienten mit geringer RANK-Expression im Vergleich zu Patienten mit hoher RANK-Expression (HR 0,4327,  $p = 0,0367$ ; **Abbildung 19B, rechts**).



**Abbildung 19 Prognostische Relevanz der RANK-Expression in der AML. (A+B)**

ROC-Analyse zur Ermittlung von *cut-off* Werten zur Unterscheidung von AML-Patienten mit hohem Anteil RANK<sup>pos</sup>-Blasten (RANK<sup>high</sup>) und solchen mit geringem Anteil RANK<sup>pos</sup>-Blasten (RANK<sup>low</sup>) **(A) links:** nach dem Anteil RANK-exprimierender Zellen (*cut-off*: 11 %) und **(B) links:** nach dem SFI (*cut-off*: 1,2). Analyse des Gesamtüberlebens der RANK<sup>high</sup> vs. RANK<sup>low</sup>-exprimierenden Patienten **(A) rechts:** basierend auf dem Anteil der RANK<sup>pos</sup>-Zellen und dem ermittelten *cut-off*-Wert von 11 % (HR = 0,6053, Log-rank Test,  $p = 0,2041$ ). **(B) rechts:** basierend auf dem SFI und dem ermittelten *cut-off*-Wert von 1,2 (HR = 0,4327, Log-rank Test,  $p = 0,0367$ ).

## 4 Diskussion

Trotz intensiver Bemühungen verläuft die AML immer noch oftmals tödlich. Bei jungen Patienten konnte die Prognose mit der Einführung der Kombinationstherapie aus Cytarabin mit einem Anthrazyklin sowie allogener Stammzelltransplantation signifikant verbessert werden<sup>138</sup>, während ältere Patienten aufgrund von Komorbiditäten und relevanter Organtoxizität meist nicht eligibel für dieses intensive Therapieregime sind.<sup>56</sup> Aufgrund des hohen medianen Erkrankungsalters bleibt die Prognose damit für eine wesentliche Patientengruppe schlecht.<sup>54,55</sup> Das Ansprechen auf die Induktionstherapie stellt dabei einen prognostischen Marker dar.<sup>139</sup> Insbesondere die hohe Rezidivrate und darunter steigende molekulare Komplexität und Therapieresistenz limitieren die Therapieoptionen bei Patienten.<sup>31,49</sup> Dies verdeutlicht die Notwendigkeit, bessere Behandlungsmöglichkeiten zu entwickeln. Die Basis hierfür bildet die Identifizierung neuer therapeutischer Zielstrukturen. In dieser Arbeit wurde das TNFRSF RANK in der AML untersucht. RANK spielt eine zentrale Rolle im Knochenmetabolismus, wobei von Osteoklasten exprimiertes RANK mit von Osteoblasten produziertem RANKL interagiert. Diese Interaktion resultiert in einer über TRAF6 vermittelten Aktivierung von NF- $\kappa$ B und folglich Differenzierung sowie Aktivierung der Osteoklastenvorläuferzellen.<sup>140,141</sup> Insbesondere für die beiden Adapterproteine TRAF2 und 5 konnten im Knochenmetabolismus keine Funktion identifiziert werden, obwohl die entsprechenden Bindungsstellen am Rezeptor nachgewiesen wurden<sup>118</sup>, was eine Bedeutung außerhalb des Knochenstoffwechsels nahelegt. RANK und sein korrespondierender Ligand wurden weiter auf verschiedenen gesunden und malignen Geweben nachgewiesen sowie über den Knochenmetabolismus hinausgehende, zelluläre Funktionen herausgearbeitet, beispielsweise in der Thermoregulation oder Metastasierung.<sup>142,143</sup> Seit 2013 ist bekannt, dass AML-Blasten RANKL exprimieren, welcher durch Inhibierung von NK-Zellen zur Immunevasion beiträgt.<sup>127</sup> In einer Analyse von 90 AML-Patienten wurde zudem ein Zusammenhang zwischen niedriger RANKL-Expression und einem verlängerten Gesamtüberleben beschrieben.<sup>129</sup> In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch der zugehörige Rezeptor RANK auf AML-Zelllinien und primären AML-

Zellen vorhanden ist, wobei die Expression einer spenderabhängigen Variabilität unterliegt, während hämatopoetische Vorläuferzellen gesunder Spender keine Expression von RANK aufwiesen. Insbesondere AML-Fälle der FAB-Typen M4/M5 zeigten eine ausgeprägte RANK-Expression, während weniger differenzierte AML-Fälle (FAB M0-M2) tendenziell weniger RANK exprimierten, sodass RANK als Differenzierungsmarker in der AML angesehen werden kann. Auch für andere Mitglieder der TNF(R)SF konnte bereits ein Zusammenhang zwischen der Oberflächenexpression und dem Differenzierungsstadium in der AML festgestellt werden. So ist beispielsweise die Expression von GITRL in der AML ebenfalls mit einem differenzierten FAB-Typen assoziiert.<sup>144</sup> Im Gegensatz hierzu konnten Schmiedel et al. in ihrer Publikation keine Korrelation zwischen der RANKL-Expression und bestimmten FAB-Typen zeigen.<sup>127</sup> Dies ist insbesondere erstaunlich, da wir auf den von uns analysierten AML-Blasten eine Koexpression von RANK und RANKL beobachteten. Möglicherweise ist diese Diskrepanz darauf zurückzuführen, dass Schmiedel et al. die Korrelation mit der Expressionshöhe (SFI-Wert) untersuchten, während in dieser Arbeit die FAB-Typen mit dem Anteil der RANK<sup>pos</sup>-Zellen korreliert wurden. Zur endgültigen Klärung dieses Sachverhaltes ist eine Erweiterung der Patientenkohorte nötig. Interessanterweise konnte kein Zusammenhang zwischen der Gen- und der Oberflächenexpression von RANK auf AML-Zellen der Patienten beobachtet werden. Dies könnte auf posttranskriptionelle oder posttranslationale Mechanismen zurückzuführen sein, welche die Oberflächenexpression beeinflussen, wie auch bereits für andere Mitgliedern der TNF(R)SF gezeigt.<sup>126,145-147</sup> Die Koexpression des Rezeptor-Liganden-Paars macht auch eine autokrine oder parakrine Interaktion der Moleküle auf AML-Zellen denkbar. In der TMU des Knochenmarks ist RANKL weiterhin auf Osteoblasten und den Stromazellen exprimiert.<sup>148</sup> Die Abwesenheit von RANK und seinem Liganden auf den AML-Zellen selbst scheint mit einem Stammzellphänotyp assoziiert zu sein. LSZ sind für die Entstehung und Progression der AML von besonderer Bedeutung. Ihre ausgeprägte Therapieresistenz begünstigt die Entstehung von Rückfällen und limitiert die Prognose, weshalb ihre Identifizierung und zielgerichtete Therapie für die kurative Behandlung der AML entscheidend

sind.<sup>69,149</sup> Die Assoziation eines Stammzellphänotyps mit der Abwesenheit von RANK ist deshalb besonders interessant, da RANK vorwiegend auf CD34-negativen AML-Fällen exprimiert wird, bei denen die gängigen Stammzellmarker CD34 und CD38 nicht zur Identifikation von Leukämienstammzellen eingesetzt werden können. Bislang gibt es, unabhängig von der Tumorentität, keine Daten, welche den RANK-Expressionsstatus von Zellen mit Stammzeleigenschaften verbinden. Mehrere Studien haben jedoch gezeigt, dass die Expression von RANK auf Tumorzellen die Stammzellbildung und epithelial-mesenchymale Transition induziert und somit die Tumorprogression sowie Metastasierung begünstigt.<sup>150-152</sup> Erste funktionelle *in vitro* Experimente dieser Arbeit legen zusätzlich Stammzeleigenschaften in RANK<sup>neg</sup>RANKL<sup>neg</sup>-AML-Zellen nahe. So bildeten diese Zellen in Klonogenitätstests eine wesentlich größere Anzahl an Kolonien als die RANK<sup>pos</sup>RANKL<sup>pos</sup>-Subpopulation. Da die sichere Identifikation von Stammzeleigenschaften allerdings den Nachweis einer AML-Initiierung in Xenograftmodellen erfordert, bedarf es zusätzlicher Experimente, insbesondere auch *in vivo*, um diese präliminären Erkenntnisse zu bestätigen.

Zur Untersuchung des Einflusses einer RANK-Signalübertragung auf AML-Zellen wurde aufgrund starker Schwankungen der Oberflächenexpression auf AML-Zelllinien ein stabiles System mit primären Leukämiezellen etabliert. Die funktionelle Untersuchung des Einflusses von Signalen über RANK auf die primären AML-Zellen mittels LEGENDplex<sup>TM</sup> zeigte, dass die Stimulation unter anderem zu einer Freisetzung der Zytokine IL-6, IL-8, IL-10 sowie TNF führt. Zytokine üben als immunologische Botenstoffe eine Vielzahl an Funktionen im menschlichen Organismus aus. Unter anderem bilden sie ein AML-assoziiertes Zytokinmilieu, welches in der TMU zur Onkogenese beiträgt.<sup>118</sup> Für alle dieser Zytokine wurden bereits krankheitsfördernde Funktionen in der AML identifiziert. So wurde beispielsweise für IL-6 und IL-8 gezeigt, dass sie in der AML mit einer verminderten Sensitivität gegenüber Chemotherapien assoziiert sind.<sup>153, 154</sup> Auch IL-10 wirkt sich positiv auf das Überleben von leukämischen Zellen aus, während TNF vor allem mit dem Fortschreiten der Erkrankung in Verbindung gebracht wird.<sup>155,156</sup> Ein weiterer Wirkmechanismus der Zytokine ist die Verhinderung des medikamenteninduzierten Zelltodes.<sup>153,154,157</sup> Dies resultiert beispielsweise durch

eine zytokinabhängig verstärkte Expression des *Multidrug-Resistance-Proteins* (MDR1).<sup>122</sup> Die Expression dieses Proteins ist insbesondere bei älteren AML-Patienten häufig erhöht, was zu einer verringerten Chemotherapiesensitivität und damit zu einer schlechteren Prognose dieses Patientenkollektivs beiträgt.<sup>56</sup> Die Analyse der nach RANK-Stimulation freigesetzten Zytokinkombinationen zeigte eine hohe Variabilität, wobei keine der untersuchten Patientenproben alle vier Zytokine freisetzte. Demzufolge trägt RANK-Signalübertragung in interindividuellem Ausmaß zu einem mit der AML-assoziierten Zytokinmilieu bei. Dies ist vereinbar mit der Heterogenität der Erkrankung und konnte bereits bei weiteren Mitgliedern der TNF(R)SF beobachtet werden.<sup>127,146,158</sup> In der vorliegenden Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Stimulation von RANK die Zellviabilität von AML-Zellen erhöht. Die Effektstärke variierte hierbei in Abhängigkeit des eingesetzten Stimulans: das multimere Fusionsprotein Fc-hRANKL medierte ausgeprägte Effekte, während die Stimulation mittels löslichen Liganden sich weniger stark auf die metabolische Aktivität auswirkte. Dies ist im Einklang mit vorliegenden Ergebnissen, dass für eine optimale Signalübertragung durch TNF-Familienmitglieder und so auch RANK eine Multimerisierung relevant ist.<sup>159,160</sup> Auch unter einer Behandlung mit Chemotherapie wirkte die Stimulation von RANK protektiv für die metabolische Aktivität der AML-Zellen. Durchflusszytometrische Analysen des mitochondrialen Membranpotenzials und der Caspase-3-Aktivität validierten diese Ergebnisse und bestätigten zudem, dass die Effekte spezifisch auf die leukämischen Blasten zurückzuführen sind. Bei der Bewertung unserer Daten ist zu beachten, dass in den funktionellen Analysen Patienten mit einem sehr hohem Blastenanteil von  $\geq 85$  % im peripheren Blut inkludiert wurden, um auf eine Anreicherung der AML-Zellen durch Aufreinigung der Patientenproben zu verzichten. Bei den entsprechenden Analysen des Effektes auf die Chemotherapiesensitivität wurde eine größere *in vitro*-Zytotoxizität von Doxorubicin im Vergleich zu Cytarabin beobachtet, weshalb in den durchgeführten Experimenten unterschiedliche Inkubationszeiten für die beiden Therapeutika (24 h für Doxorubicin, 72 h für Cytarabin) angewendet wurden. Cytarabin ist als Pyrimidinanalogon im Wesentlichen in der S-Phase des Zellzyklus zytotoxisch.<sup>161</sup> Nach intrazellulärer

Phosphorylierung zu Cytosinarabinsidtriphosphat wird der Antimetabolit anstelle von Cytosintriphosphat in die DNA eingebaut und durch Enzyminhibition die DNA-Reparaturmechanismen blockiert, wodurch Zelltod induziert wird.<sup>162,163</sup> Dem gegenüber interkaliert das Anthrazyklin Doxorubicin sequenzspezifisch in die DNA und wird dort über zwischenmolekulare Kräfte stabilisiert.<sup>164</sup> Dies führt zu einer Inhibition von Helikasen und zu einer Störung der Nukleinsäuresynthese.<sup>165</sup> Zusätzlich hemmt Doxorubicin die Topoisomerase II $\alpha$ , wodurch DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche induziert werden.<sup>166</sup> Weiter ist bekannt, dass Doxorubicin zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führt, was unter anderem für die Doxorubicin-induzierte Kardiotoxizität verantwortlich gemacht wird.<sup>167</sup> Für die Resistenzentwicklung kommen neben einer möglichen Hochregulation des MDR1 auch die Aktivierung des für seine überlebensfördernde Wirkung bekannten Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B über TRAF-Moleküle als mögliche Erklärung der in dieser Arbeit gezeigten Daten in Frage. In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass NF- $\kappa$ B beispielsweise die Expression von Caspase-Inhibitoren (*inhibitors of apoptosis*, IAP) induziert<sup>91,168</sup> was mit den Beobachtungen, dass die Stimulation von RANK in der AML zu einer Reduktion der aktiven Caspase-3 führt, übereinstimmt. Ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung von NF- $\kappa$ B und der Therapieresistenz konnte für die AML in Studien mit neuen Multikinase-Inhibitoren gezeigt werden.<sup>91,169</sup> Passend zu den funktionellen Daten hinsichtlich der überlebensfördernden Rolle von RANK konnte trotz der relativ kleinen Patientenkohorte, eine Korrelation zwischen RANK-Expression und einem ungünstigen Krankheitsverlauf der untersuchten AML-Patienten mit reduziertem Gesamtüberleben festgestellt und RANK als negativ-prognostischer Marker identifiziert werden. Auch für einige solide Tumorentitäten wurde RANK-Expression bereits als prognostischer Marker identifiziert. So ist eine hohe RANK-Expression bei Patientinnen mit Brustkrebs mit einer höheren Rückfallquote und Sterblichkeit assoziiert.<sup>124,170</sup> Auch beim Kolorektalem Karzinom konnten gesteigerte Tumorprogression, Metastasierung und eine erhöhte Sterblichkeit bei Patienten mit einer hohen RANK-Expression beobachtet werden.<sup>171</sup> Mittels des monoklonalen anti-RANKL Antikörpers Denosumab,

welcher u.a. zur Reduktion des Frakturrisikos bei der Osteoporose bei postmenopausalen Frauen sowie bei Männern mit Prostatakarzinom unter Hormonablationstherapie eingesetzt wird, wäre mit geringem Aufwand ein medikamentöser Eingriff in das RANK-RANKL System möglich.<sup>172,173</sup> Exemplarisch konnte in einem *in vitro* Experiment gezeigt werden, dass Denosumab die Sensitivität der AML-Zellen gegenüber Chemotherapie wiederherstellt. Für Brustkrebspatientinnen mit BRCA-Mutation wird derzeit evaluiert, ob eine adjuvante Denosumab-Behandlung die Karzinogenese hemmen kann.<sup>134</sup> Eine Analyse postmenopausaler Frauen zeigte darüber hinaus ein unter Denosumab um 13 % reduziertes Risiko, an Brustkrebs zu erkranken.<sup>174</sup> Basierend auf den in dieser Arbeit vorgestellten initialen Ergebnisse wäre entsprechend ein *Drug-repurposing* zur Optimierung des Therapieansprechens in der AML denkbar.

## 5 Zusammenfassung

Die AML ist die häufigste akute Leukämieform bei Erwachsenen. Als Erkrankung des höheren Lebensalters ist eine relevante Anzahl der Patienten nicht für die aktuellen, intensiven kurativen Therapiestrategien eligibel. Auch trotz erheblicher Verbesserung der Prognose junger Patienten in den letzten Jahren liegt die 5-Jahres-Überlebensrate in Deutschland insgesamt immer noch bei nur 24,1 %, was den Bedarf für Entwicklung und Optimierung der Therapieansätze und neuen Markern zur Prognoseabschätzung verdeutlicht. Von großer Relevanz ist hierbei die Identifizierung und Charakterisierung von Oberflächenmarkern auf den Leukämiezellen. Im Zentrum dieser Arbeit steht das TNFR-Superfamilienmitglied RANK, dessen Expression und funktionelle Rolle bei AML-Patienten untersucht wurden. RANK ist bislang als zentraler Regulator des Knochenmetabolismus bekannt. Insbesondere in den letzten Jahren wurde RANK darüber hinaus als Akteur in der Pathophysiologie verschiedener maligner Erkrankungen identifiziert. Für die AML waren solche Daten bisher nicht verfügbar.

Zunächst wurde die Gen- und Oberflächenexpression von RANK auf AML-Zelllinien und primären AML-Zellen nachgewiesen. Bei der Analyse der primären AML-Zellen fiel auf, dass Gen- und Oberflächenexpression von RANK nicht korrelieren. Dies legt eine Regulation durch posttranskriptionelle oder posttranslationale Mechanismen nahe. Außerdem zeigte sich ein Zusammenhang von hoher RANK-Expression mit einem differenzierten Phänotyp, was RANK als Differenzierungsmarker in der AML identifiziert. Darüber hinaus wurde eine Koexpression des Rezeptors mit seinem Liganden auf den AML-Blasten beobachtet, und die Abwesenheit von RANK und seinem Liganden konnte mit einem Stammzellphänotyp assoziiert werden. Erste *in vitro* Analysen des klonogenen Potenzials legen zudem das Vorhandensein von Stammzeleigenschaften in der RANK<sup>neg</sup>RANKL<sup>neg</sup>-Subpopulation nahe. Die Stimulation von RANK führte zur Freisetzung der Zytokine IL-6, IL-8, TNF und IL-10 durch die AML-Zellen und zu einer Steigerung von deren metabolischer Aktivität. Auch unter der Behandlung mit den Chemotherapeutika Cytarabin und Doxorubicin vermittelten Signale über RANK einen Überlebensvorteil für die

AML-Blasten und reduzierten deren Chemotherapiesensitivität. Der Einsatz des bereits zur Therapie der Osteoporose zugelassenen mAb Denosumab revertierte in einem ersten Experiment diese Effekte und sensitivierte die Leukämiezellen gegenüber den Chemotherapeutika. Passend zu den erhobenen funktionellen Ergebnissen konnten wir schließlich zeigen, dass eine hohe RANK-Expression auf Leukämiezellen mit einem reduzierten Gesamtüberleben der Patienten assoziiert.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit RANK als potentieller neuer prognostischer Marker und vielversprechendes Zielmolekül für mögliche Therapiestrategien in der AML identifiziert. Weiterhin zeigen RANK<sup>neg</sup>RANKL<sup>neg</sup>-AML-Blasten einen Stammzellphenotyp, den es in funktionellen Untersuchungen näher zu analysieren und zu validieren gilt. Eine Unterbrechung der RANK-RANKL-Signalübertragung könnte die Effizienz von Chemotherapeutika steigern und so zu einer Verbesserung der Prognose der Patienten beitragen. Dies zu validieren und breitere Erkenntnisse zu erhalten ist Gegenstand aktuell laufender Arbeiten.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Brandes R, Lang F, Schmidt RF. *Physiologie des Menschen : mit Pathophysiologie*. 32. Auflage ed. Springer; 2019.
2. Ogawa M. *Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells*. *Blood*. Jun 1 1993;81(11):2844-53.
3. Orkin SH. *Transcription factors and hematopoietic development*. *J Biol Chem*. Mar 10 1995;270(10):4955-8.
4. Briddell RA, Brandt JE, Leemhuis TB, et al. *Role of cytokines in sustaining long-term human megakaryocytopoiesis in vitro*. *Blood*. Jan 15 1992;79(2):332-7.
5. Naegeli O. *Blutkrankheiten und Blutdiagnostik*. Springer Berlin Heidelberg; 2013.
6. Tan BT, Park CY, Ailles LE, et al. *The cancer stem cell hypothesis: a work in progress*. *Lab Invest*. Dez 01 2006;86(12):1203-1207.
7. Ehrlich P. *Über die spezifischen Granulationen des Blutes*. *Arch Anat Physiol*. 1879;20(9):571
8. Blumenreich MS. *The White Blood Cell and Differential Count*. In: Walker HK, Hall WD, Hurst JW. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. 3. Auflage ed Butterworths 1990
9. Periyah MH, Halim AS, Mat Saad AZ. *Mechanism Action of Platelets and Crucial Blood Coagulation Pathways in Hemostasis*. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res*. Oct 1 2017;11(4):319-327.
10. Pretini V, Koenen MH, Kaestner L, et al. *Red Blood Cells: Chasing Interactions*. *Front Physiol*. Jul 31 2019;10:945.
11. Korn C, Mendez-Ferrer S. *Myeloid malignancies and the microenvironment*. *Blood*. Feb 16 2017;129(7):811-822.
12. Shallis RM, Wang R, Davidoff A, et al. *Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges*. *Blood Rev*. Jul 2019;36:70-87.
13. De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. *'Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update'*. *Blood Cancer J*. Jul 1 2016;6(7):e441.
14. Olsson I, Bergh G, Ehinger M, Gullberg U. *Cell differentiation in acute myeloid leukemia*. *European Journal of Haematology*. Jul 01 1996;57(1):1-16.
15. Bonnet D, Dick JE. *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. *Nat Med*. Jul 1 1997;3(7):730-7.
16. Herold G. *Innere Medizin 2021*. De Gruyter; 2021.
17. Groves FD, Linet MS, Devesa SS. *Patterns of occurrence of the leukaemias*. *Eur J Cancer*. Jun 01 1995;31A(6):941-9.
18. Röllig C, Beelen DW, Braess J, et al. *Akute Myeloische Leukämie (AML)*. DGHO. Updated 01.2021. Accessed 2021-08-30, 2021. <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/akute-myeloische-leukaemie-aml/@@guideline/html/index.html>

19. Dong Y, Shi O, Zeng Q, et al. *Leukemia incidence trends at the global, regional, and national level between 1990 and 2017. Exp Hematol Oncol.* Jun 1 2020;9:14.
20. Foreman KJ, Marquez N, Dolgert A, et al. *Forecasting life expectancy, years of life lost, and all-cause and cause-specific mortality for 250 causes of death: reference and alternative scenarios for 2016-40 for 195 countries and territories. Lancet.* Nov 10 2018;392(10159):2052-90.
21. Bethesda M. *SEER Cancer Stat Facts: Acute Myeloid Leukemia.* 04.08.2021, 2021. Accessed 04.08.2021, 2021. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html>
22. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin.* Nov 2018;68(6):394-424.
23. Miranda-Filho A, Piñeros M, Ferlay J, Soerjomataram I, Monnereau A, Bray F. *Epidemiological patterns of leukaemia in 184 countries: a population-based study. The Lancet Haematol.* Jan 1 2018;5(1):e14-e24.
24. Christ O, Feuring-Buske M, Hiddemann W, et al. *Pathogenese und Biologie der akuten myeloischen Leukämie. Med Klin (Munich).* Apr 15 2007;102(4):290-5.
25. Le Beau MM, Albain KS, Larson RA, et al. *Clinical and cytogenetic correlations in 63 patients with therapy-related myelodysplastic syndromes and acute nonlymphocytic leukemia: further evidence for characteristic abnormalities of chromosomes no. 5 and 7. J Clin Oncol.* Mar 1 1986;4(3):325-45.
26. Levine EG, Bloomfield CD. *Leukemias and myelodysplastic syndromes secondary to drug, radiation, and environmental exposure. Semin Oncol.* Feb 1 1992;19(1):47-84.
27. Gilliland DG. *Hematologic malignancies. Curr Opin Hematol.* Jul 1 2001;8(4):189-91.
28. Lagunas-Rangel FA, Chavez-Valencia V, Gomez-Guijosa MA, Cortes-Penagos C. *Acute Myeloid Leukemia-Genetic Alterations and Their Clinical Prognosis. Int J Hematol Oncol Stem Cell Res.* Oct 1 2017;11(4):328-339.
29. Cancer Genome Atlas Research N, Ley TJ, Miller C, et al. *Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. N Engl J Med.* May 30 2013;368(22):2059-74.
30. Ding L, Ley TJ, Larson DE, et al. *Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. Nature.* Jan 11 2012;481(7382):506-10.
31. Wang RQ, Chen CJ, Jing Y, et al. *Characteristics and prognostic significance of genetic mutations in acute myeloid leukemia based on a targeted next-generation sequencing technique. Cancer Med.* Nov 15 2020;9(22):8457-67.
32. Fearon ER, Burke PJ, Zehnbauser BA, et al. *Differentiation of blast cells in acute nonlymphocytic leukemia. N Engl J Med.* Dec 4 1986;315(23):1488.
33. Fialkow PJ, Janssen JW, Bartram CR. *Clonal remissions in acute nonlymphocytic leukemia: evidence for a multistep pathogenesis of the malignancy. Blood.* Apr 1 1991;77(7):1415-7.

34. Busque L, Gilliland DG. *Clonal evolution in acute myeloid leukemia*. *Blood*. Jul 15 1993;82(2):337-42.
35. Parkin B, Ouillette P, Li Y, et al. *Clonal evolution and devolution after chemotherapy in adult acute myelogenous leukemia*. *Blood*. Jan 10 2013;121(2):369-77.
36. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. *Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group*. *Br J Haematol*. Aug 1 1976;33(4):451-8.
37. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. *Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group*. *Ann Intern Med*. Oct 1 1985;103(4):620-5.
38. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. *Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO)*. *Br J Haematol*. Jul 1 1991;78(3):325-9.
39. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. *Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). A report of the French-American-British Cooperative Group*. *Ann Intern Med*. Sep 1 1985;103(3):460-2.
40. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. *The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia*. *Blood*. May 19 2016;127(20):2391-405.
41. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. *The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes*. *Blood*. Jul 30 2009;114(5):937-951.
42. Jaffe E, Swerdlow SHCE, Campo E, et al. *WHO Classification of Tumours of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. vol 2. 2008.
43. Bennett JM. *Changes in the Updated 2016: WHO Classification of the Myelodysplastic Syndromes and Related Myeloid Neoplasms*. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. Nov 1 2016;16(11):607-9.
44. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. *The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms*. *Blood*. Oct 1 2002;100(7):2292-302.
45. Dohner H, Estey E, Grimwade D, et al. *Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel*. *Blood*. Jan 26 2017;129(4):424-47.
46. Miraki-Moud F, Anjos-Afonso F, Hodby KA, et al. *Acute myeloid leukemia does not deplete normal hematopoietic stem cells but induces cytopenias by impeding their differentiation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 13 2013;110(33):13576-81.
47. Jha A, Sayami G, Adhikari RC, et al. *Bone marrow examination in cases of pancytopenia*. *JNMA J Nepal Med Assoc*. Jan-Mar 2008;47(169):12-7.
48. Kaushansky KLMAPJTLMBLJLDC. *Williams hematology*. 2021;
49. Yates JW, Wallace HJ, Jr., Ellison RR, et al. *Cytosine arabinoside (NSC-63878) and daunorubicin (NSC-83142) therapy in acute nonlymphocytic leukemia*. *Cancer Chemother Rep*. Nov-Dec 1973;57(4):485-8.

50. Yates J, Glidewell O, Wiernik P, et al. *Cytosine arabinoside with daunorubicin or adriamycin for therapy of acute myelocytic leukemia: a CALGB study.* *Blood.* Aug 1 1982;60(2):454-62.
51. Rowe JM. *The "7+3" regimen in acute myeloid leukemia.* *Haematologica.* Jan 1 2022;107(1):3-3.
52. Dohner H, Estey EH, Amadori S, et al. *Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet.* *Blood.* Jan 21 2010;115(3):453-74.
53. Yanada M, Naoe T. *Acute myeloid leukemia in older adults.* *Int J Hematol.* Aug 1 2012;96(2):186-93.
54. Ossenkoppele G, Lowenberg B. *How I treat the older patient with acute myeloid leukemia.* *Blood.* Jan 29 2015;125(5):767-74.
55. Shah A, Andersson TM, Racht B, et al. *Survival and cure of acute myeloid leukaemia in England, 1971-2006: a population-based study.* *Br J Haematol.* Aug 2013;162(4):509-16.
56. Erba HP. *Prognostic factors in elderly patients with AML and the implications for treatment.* *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2007:420-8.
57. Klepin HD, Rao AV, Pardee TS. *Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes in older adults.* *J Clin Oncol.* Aug 20 2014;32(24):2541-52.
58. DiNardo CD, Jonas BA, Pullarkat V, et al. *Azacitidine and Venetoclax in Previously Untreated Acute Myeloid Leukemia.* *New England Journal of Medicine.* 2020;383(7):617-29.
59. Flotho C, Claus R, Batz C, et al. *The DNA methyltransferase inhibitors azacitidine, decitabine and zebularine exert differential effects on cancer gene expression in acute myeloid leukemia cells.* *Leukemia.* Feb 5 2009;23(6):1019-28.
60. DiNardo CD, Jonas BA, Pullarkat V, et al. *Azacitidine and Venetoclax in Previously Untreated Acute Myeloid Leukemia.* *N Engl J Med.* Aug 13 2020;383(7):617-29.
61. Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, et al. *Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation.* *N Engl J Med.* Aug 3 2017;377(5):454-64.
62. Schlenk RF. *Post-remission therapy for acute myeloid leukemia.* *Haematologica.* Nov 2014;99(11):1663-70.
63. Estey E, Keating MJ, Pierce S, Stass S. *Change in karyotype between diagnosis and first relapse in acute myelogenous leukemia.* *Leukemia.* Jun 1995;9(6):972-6.
64. Kropp EM, Li Q. *Mechanisms of resistance to targeted therapies for relapsed or refractory acute myeloid leukemia.* *Experimental Hematology.* Jul 1 2022;111:13-24.
65. Appelbaum FR. *Hematopoietic cell transplantation beyond first remission.* *Leukemia.* Feb 2002;16(2):157-9.
66. Nennecke A, Wienecke A, Kraywinkel K. *[Leukemia incidence and survival in Germany according to current standardized categories].*

- Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. Jan 2014;57(1):93-102.
67. Bonnet D, Dick JE. *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. *Nat Med*. Jul 1 1997;3(7):730-7.
  68. Chopra M, Bohlander SK. *The cell of origin and the leukemia stem cell in acute myeloid leukemia*. *Genes, Chromosomes and Cancer*. Aug 31 2019;58(12):850-8.
  69. Marchand T, Pinho S. *Leukemic Stem Cells: From Leukemic Niche Biology to Treatment Opportunities*. *Front Immunol*. Okt 15 2021;12:775128.
  70. Fisher JN, Kalleda N, Stavropoulou V, Schwaller J. *The Impact of the Cellular Origin in Acute Myeloid Leukemia: Learning From Mouse Models*. *Hemasphere*. Feb 1 2019;3(1):e152.
  71. Misaghian N, Ligresti G, Steelman LS, et al. *Targeting the leukemic stem cell: The Holy Grail of leukemia therapy*. *Leukemia*. Sep 18 2008;23:25-42.
  72. Hanekamp D, Cloos J, Schuurhuis GJ. *Leukemic stem cells: identification and clinical application*. *Int J Hematol*. Mai 1 2017;105(5):549-57.
  73. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, et al. *A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice*. *Nature*. Feb 17 1994;367(6464):645-8.
  74. van Rhenen A, Feller N, Kelder A, et al. *High stem cell frequency in acute myeloid leukemia at diagnosis predicts high minimal residual disease and poor survival*. *Clin Cancer Res*. Sep 15 2005;11(18):6520-7.
  75. Zeijlemaker W, Grob T, Meijer R, et al. *CD34(+)CD38(-) leukemic stem cell frequency to predict outcome in acute myeloid leukemia*. *Leukemia*. May 1 2019;33(5):1102-12.
  76. Zeijlemaker W, Kelder A, Oussoren-Brockhoff YJ, et al. *A simple one-tube assay for immunophenotypical quantification of leukemic stem cells in acute myeloid leukemia*. *Leukemia*. Feb 1 2016;30(2):439-46.
  77. Taussig DC, Vargaftig J, Miraki-Moud F, et al. *Leukemia-initiating cells from some acute myeloid leukemia patients with mutated nucleophosmin reside in the CD34(-) fraction*. *Blood*. Nov 3 2010;115(10):1976-84.
  78. Ng SW, Mitchell A, Kennedy JA, et al. *A 17-gene stemness score for rapid determination of risk in acute leukaemia*. *Nature*. Dec 15 2016;540(7633):433-7.
  79. Paczulla AM, Rothfelder K, Raffel S, et al. *Absence of NKG2D ligands defines leukaemia stem cells and mediates their immune evasion*. *Nature*. Aug 2019;572(7768):254-59.
  80. Zhou J, Chng WJ. *Identification and targeting leukemia stem cells: The path to the cure for acute myeloid leukemia*. *World J Stem Cells*. Sep 26 2014;6(4):473-84.
  81. O'Reilly E, Zeinabad HA, Szegezdi E. *Hematopoietic versus leukemic stem cell quiescence: Challenges and therapeutic opportunities*. *Blood Rev*. Nov 1 2021;50:100850.
  82. Lane SW, Gilliland DG. *Leukemia stem cells*. *Semin Cancer Biol*. Apr 1 2010;20(2):71-6.

83. Ngai LL, Kelder A, Janssen J, et al. *MRD Tailored Therapy in AML: What We Have Learned So Far. Front Oncol.* Jan 15 2021;10:603636.
84. Nauts HC, Swift WE, Coley BL. *The treatment of malignant tumors by bacterial toxins as developed by the late William B. Coley, M.D., reviewed in the light of modern research. Cancer Res.* Apr 1 1946;6:205-16.
85. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, et al. *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. Proc Natl Acad Sci USA.* Sept 1 1975;72(9):3666-70.
86. Lee WH, Seo D, Lim SG, Suk K. *Reverse Signaling of Tumor Necrosis Factor Superfamily Proteins in Macrophages and Microglia: Superfamily Portrait in the Neuroimmune Interface. Front Immunol.* Jan 30 2019;10:262.
87. Bodmer J-L, Schneider P, Tschopp J. *The molecular architecture of the TNF superfamily. Trends in Biochemical Sciences.* Jan 1 2002;27(1):19-26.
88. Aggarwal BB. *Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. Nat Rev Immunol.* Sep 1 2003;3(9):745-56.
89. Eck MJ, Sprang SR. *The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 A resolution. Implications for receptor binding. J Biol Chem.* Okt 15 1989;264(29):17595-605.
90. Cha SS, Kim MS, Choi YH, et al. *2.8 A resolution crystal structure of human TRAIL, a cytokine with selective antitumor activity. Immunity.* Aug 1 1999;11(2):253-61.
91. Clar KL. *Die Rolle von RANK und seinem Liganden bei Immunevasion und Chemotherapie-Resistenz von Tumorzellen. Dissertationsschrift. Universität Tübingen, 2022*
92. Wiley SR, Goodwin RG, Smith CA. *Reverse signaling via CD30 ligand. J Immunol.* Okt 15 1996;157(8):3635-9.
93. Suzuki I, Fink PJ. *The dual functions of fas ligand in the regulation of peripheral CD8+ and CD4+ T cells. Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb 2 2000;97(4):1707-12.
94. Saraiva M, Smith P, Fallon PG, et al. *Inhibition of type 1 cytokine-mediated inflammation by a soluble CD30 homologue encoded by ectromelia (mousepox) virus. J Exp Med.* Sep 16 2002;196(6):829-39.
95. Bodmer JL, Schneider P, Tschopp J. *The molecular architecture of the TNF superfamily. Trends in Biochemical Sciences.* Jan 1 2002;27(1):19-26.
96. Vanamee ES, Faustman DL. *Structural principles of tumor necrosis factor superfamily signaling. Sci Signal.* Jan 2 2018;11(511)
97. Dostert C, Grusdat M, Letellier E, Brenner D. *The TNF Family of Ligands and Receptors: Communication Modules in the Immune System and Beyond. Physiol Rev.* Jan 1 2019;99(1):115-60.
98. Gaur U, Aggarwal BB. *Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. Biochem Pharmacol.* Oct 15 2003;66(8):1403-8.
99. Aggarwal BB, Shishodia S, Ashikawa K, Bharti AC. *The role of TNF and its family members in inflammation and cancer: lessons from gene deletion. Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* Dec 1 2002;1(4):327-41.

100. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, et al. *A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function.* *Nature.* Nov 13 1997;390(6656):175-9.
101. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al. *Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL.* *Proc Natl Acad Sci USA.* Mar 31 1998;95(7):3597-602.
102. Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, et al. *RANK is essential for osteoclast and lymph node development.* *Genes Dev.* Sep 15 1999;13(18):2412-24.
103. Mouri Y, Yano M, Shinzawa M, et al. *Lymphotoxin signal promotes thymic organogenesis by eliciting RANK expression in the embryonic thymic stroma.* *J Immunol.* May 1 2011;186(9):5047-57.
104. Theill LE, Boyle WJ, Penninger JM. *RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution.* *Annu Rev Immunol.* Apr 2002;20:795-823.
105. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. *Osteoclast differentiation and activation.* *Nature.* May 15 2003;423(6937):337-42.
106. Liu C, Walter TS, Huang P, et al. *Structural and functional insights of RANKL-RANK interaction and signaling.* *J Immunol.* Jun 15 2010;184(12):6910-9.
107. Ikeda T, Kasai M, Utsuyama M, Hirokawa K. *Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and their differential expression in bone and thymus.* *Endocrinology.* Apr 1 2001;142(4):1419-26.
108. Kartsogiannis V, Zhou H, Horwood NJ, et al. *Localization of RANKL (receptor activator of NF kappa B ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskeletal tissues.* *Bone.* Nov 1 1999;25(5):525-34.
109. Collin-Osdoby P, Rothe L, Anderson F, et al. *Receptor activator of NF-kappa B and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis.* *J Biol Chem.* Jun 8 2001;276(23):20659-72.
110. Chen NJ, Huang MW, Hsieh SL. *Enhanced secretion of IFN-gamma by activated Th1 cells occurs via reverse signaling through TNF-related activation-induced cytokine.* *J Immunol.* Jan 1 2001;166(1):270-6.
111. Darnay BG, Besse A, Poblenz AT, et al. *TRAFs in RANK signaling.* In: Wu, H. (eds) *TNF Receptor Associated Factors (TRAFs).* In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 597. Springer. 2007;597:152-9.
112. Ono T, Hayashi M, Sasaki F, Nakashima T. *RANKL biology: bone metabolism, the immune system, and beyond.* *Inflamm Regen.* Feb 7 2020;40:2.
113. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, et al. *Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families.* *Endocr Rev.* Juni 1 1999;20(3):345-57.
114. Boyce BF, Xing L. *The RANKL/RANK/OPG pathway.* *Curr Osteoporos Rep.* Sep 1 2007;5(3):98-104.
115. Luo J, Yang Z, Ma Y, et al. *LGR4 is a receptor for RANKL and negatively regulates osteoclast differentiation and bone resorption.* *Nat Med.* May 11 2016;22(5):539-46.

116. Ordaz-Ramos A, Rosales-Gallegos VH, Melendez-Zajgla J, et al. *The Role of LGR4 (GPR48) in Normal and Cancer Processes*. *Int J Mol Sci*. Apr 29 2021;22(9)
117. Akiyama T, Shimo Y, Yanai H, et al. *The tumor necrosis factor family receptors RANK and CD40 cooperatively establish the thymic medullary microenvironment and self-tolerance*. *Immunity*. Sep 19 2008;29(3):423-37.
118. Renema N, Navet B, Heymann MF, et al. *RANK-RANKL signalling in cancer*. *Biosci Rep*. Aug 5 2016;36(4)
119. Lu X, Mu E, Wei Y, et al. *VCAM-1 promotes osteolytic expansion of indolent bone micrometastasis of breast cancer by engaging alpha4beta1-positive osteoclast progenitors*. *Cancer Cell*. Dec 13 2011;20(6):701-14.
120. Shiozawa Y, Berry JE, Eber MR, et al. *The marrow niche controls the cancer stem cell phenotype of disseminated prostate cancer*. *Oncotarget*. Jul 5 2016;7(27):41217-32.
121. Meads MB, Hazlehurst LA, Dalton WS. *The bone marrow microenvironment as a tumor sanctuary and contributor to drug resistance*. *Clin Cancer Res*. May 1 2008;14(9):2519-26.
122. Jones VS, Huang RY, Chen LP, et al. *Cytokines in cancer drug resistance: Cues to new therapeutic strategies*. *Biochim Biophys Acta*. Apr 1 2016;1865(2):255-65.
123. Trieb K, Windhager R. *Receptor activator of nuclear factor kappaB expression is a prognostic factor in human osteosarcoma*. *Oncol Lett*. Sep 1 2015;10(3):1813-5.
124. Pfitzner BM, Branstetter D, Loibl S, et al. *RANK expression as a prognostic and predictive marker in breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*. Jun 1 2014;145(2):307-15.
125. Bago-Horvath Z, Schmid K, Rossler F, et al. *Impact of RANK signalling on survival and chemotherapy response in osteosarcoma*. *Pathology*. Aug 2014;46(5):411-5.
126. Schmiedel BJ, Scheible CA, Nuebling T, et al. *RANKL Expression, Function, and Therapeutic Targeting in Multiple Myeloma and Chronic Lymphocytic Leukemia*. *Cancer Res*. Jan 15 2013;73(2):683-94.
127. Schmiedel BJ, Nuebling T, Steinbacher J, et al. *Receptor Activator for NF-kappaB Ligand in Acute Myeloid Leukemia: Expression, Function, and Modulation of NK Cell Immunosurveillance*. *J Immunol*. Jan 1 2013;190(2):821-31.
128. Schmiedel BJ, Grosse-Hovest L, Salih HR. *A "vicious cycle" of NK-cell immune evasion in acute myeloid leukemia mediated by RANKL?* *Oncoimmunology*. 5/2013 2013;2(5)
129. Schmohl JU, Nuebling T, Wild J, et al. *Expression of RANK-L and in part of PD-1 on blasts in patients with acute myeloid leukemia correlates with prognosis*. *Eur J Haematol*. Dec 1 2016;97(6):517-27.
130. Casimiro S, Vilhais G, Gomes I, Costa L. *The Roadmap of RANKL/RANK Pathway in Cancer*. *Cells*. Aug 4 2021;10(8)
131. Lipton A, Goessl C. *Clinical development of anti-RANKL therapies for treatment and prevention of bone metastasis*. *Bone*. Jan 1 2011;48(1):96-9.

132. Lipton A, Fizazi K, Stopeck AT, et al. *Effect of denosumab versus zoledronic acid in preventing skeletal-related events in patients with bone metastases by baseline characteristics*. *Eur J Cancer*. Jan 1 2016;53:75-83.
133. Chawla S, Blay J-Y, Rutkowski P, et al. *Denosumab in patients with giant-cell tumour of bone: a multicentre, open-label, phase 2 study*. *The Lancet Oncology*. Mär 1 2019;20(12):1719-29.
134. Deligiorgi MV, Panayiotidis MI, Trafalis DT. *Repurposing denosumab in breast cancer beyond prevention of skeletal related events: Could nonclinical data be translated into clinical practice?* *Expert Rev Clin Pharmacol*. Nov 2020;13(11):1235-52.
135. Peters S, Clezardin P, Marquez-Rodas I, et al. *The RANK-RANKL axis: an opportunity for drug repurposing in cancer?* *Clin Transl Oncol*. Aug 12 2019;21(8):977-91.
136. Gnant M, Pfeiler G, Dubsy PC, et al. *The impact of adjuvant denosumab on disease-free survival: Results from 3,425 postmenopausal patients of the ABCSG-18 trial*. *Cancer Research*. Feb 15 2016;76, Abstr. S2-02
137. Clar KL, Weber LM, Schmied BJ, et al. *Receptor Activator of NF-kappaB (RANK) Confers Resistance to Chemotherapy in AML and Associates with Dismal Disease Course*. *Cancers (Basel)*. Dec 4 2021;13(23)
138. Meyers J, Yu Y, Kaye JA, Davis KL. *Medicare fee-for-service enrollees with primary acute myeloid leukemia: an analysis of treatment patterns, survival, and healthcare resource utilization and costs*. *Appl Health Econ Health Policy*. Jun 2013;11(3):275-86.
139. Tasaki T, Yamauchi T, Matsuda Y, et al. *The response to induction therapy is crucial for the treatment outcomes of elderly patients with acute myeloid leukemia: single-institution experience*. *Anticancer Res*. Oct 1 2014;34(10):5631-6.
140. Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, et al. *Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mär 30 1999;96(7):3540-5.
141. Hofbauer LC, Neubauer A, Heufelder AE. *Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin: potential implications for the pathogenesis and treatment of malignant bone diseases*. *Cancer*. Aug 1 2001;92(3):460-70.
142. Hanada R, Leibbrandt A, Hanada T, et al. *Central control of fever and female body temperature by RANKL/RANK*. *Nature*. Nov 26 2009;462(7272):505-9.
143. Tan W, Zhang W, Strasner A, et al. *Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signalling*. *Nature*. Feb 24 2011;470(7335):548-53.
144. Krusch M, Baltz KM, Baessler T, et al. *Role of Glucocorticoid-Induced TNF-Related Protein (GITR) Ligand in the Interaction of Acute Myeloid Leukemia with NK Cells*. *Blood*. Nov 16 2007;110(11):18-18.
145. Buechele C, Baessler T, Wirths S, et al. *Glucocorticoid-induced TNFR-related protein (GITR) ligand modulates cytokine release and NK cell*

- reactivity in chronic lymphocytic leukemia (CLL). Leukemia. Nov 8 2011;26(5):991-1000.*
146. Nuebling T, Schumacher CE, Hofmann M, et al. *The Immune Checkpoint Modulator OX40 and Its Ligand OX40L in NK-Cell Immunosurveillance and Acute Myeloid Leukemia. Cancer Immunol Res. Feb 1 2018;6(2):209-221.*
  147. Mihalcik SA, Tschumper RC, Jelinek DF. *Transcriptional and post-transcriptional mechanisms of BAFF-receptor dysregulation in human B lineage malignancies. Cell Cycle. Dec 15 2010;9(24):4884-92.*
  148. Sato K, Lee J-W, Sakamoto K, et al. *RANKL Synthesized by Both Stromal Cells and Cancer Cells Plays a Crucial Role in Osteoclastic Bone Resorption Induced by Oral Cancer. The American Journal of Pathology. Mai 1 2013;182(5):1890-9.*
  149. van Gils N, Denkers F, Smit L. *Escape From Treatment; the Different Faces of Leukemic Stem Cells and Therapy Resistance in Acute Myeloid Leukemia. Front Oncol. 2021;11:659253.*
  150. Jones DH, Nakashima T, Sanchez OH, et al. *Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. Nature. Mai 30 2006;440(7084):692-6.*
  151. Casimiro S, Mohammad KS, Pires R, et al. *RANKL/RANK/MMP-1 molecular triad contributes to the metastatic phenotype of breast and prostate cancer cells in vitro. PLoS One. Mai 16 2013;8(5):e63153.*
  152. Armstrong AP, Miller RE, Jones JC, et al. *RANKL acts directly on RANK-expressing prostate tumor cells and mediates migration and expression of tumor metastasis genes. Prostate. Jan 1 2008;68(1):92-104.*
  153. Hou D, Wang B, You R, et al. *Stromal cells promote chemoresistance of acute myeloid leukemia cells via activation of the IL-6/STAT3/OXPHOS axis. Ann Transl Med. Nov 1 2020;8(21):1346.*
  154. Vijay V, Miller R, Vue GS, et al. *Interleukin-8 blockade prevents activated endothelial cell mediated proliferation and chemoresistance of acute myeloid leukemia. Leuk Res. Sep 2019;84:106180.*
  155. Nishioka C, Ikezoe T, Pan B, et al. *MicroRNA-9 plays a role in interleukin-10-mediated expression of E-cadherin in acute myelogenous leukemia cells. Cancer Sci. Jan 20 2017;108(4):685-95.*
  156. Kagoya Y, Yoshimi A, Kataoka K, et al. *Positive feedback between NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  promotes leukemia-initiating cell capacity. J Clin Invest. Jan 2 2014;124(2):528-42.*
  157. Conze D, Weiss L, Regen PS, et al. *Autocrine Production of Interleukin 6 Causes Multidrug Resistance in Breast Cancer Cells1. Cancer Res. Dez 15 2001;61(24):8851-8.*
  158. Sanchez-Correa B, Bergua JM, Campos C, et al. *Cytokine profiles in acute myeloid leukemia patients at diagnosis: Survival is inversely correlated with IL-6 and directly correlated with IL-10 levels. Cytokine. Mar 3 2013;61(3):885-891.*
  159. Kucka K, Wajant H. *Receptor Oligomerization and Its Relevance for Signaling by Receptors of the Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily. Review. Frontiers in Cell and Developmental Biology. Feb 11 2021*

160. Schneider P, Holler N, Bodmer J-L, et al. *Conversion of Membrane-bound Fas(CD95) Ligand to Its Soluble Form Is Associated with Downregulation of Its Proapoptotic Activity and Loss of Liver Toxicity. Journal of Experimental Medicine.* 1998;187(8):1205-1213.
161. Momparler RL. *Optimization of cytarabine (ARA-C) therapy for acute myeloid leukemia. Exp. Hemato. Oncol.* Aug 6 2013;2(1):20.
162. Lamba JK. *Genetic factors influencing cytarabine therapy. Pharmacogenomics.* Oct 20 2009;10(10):1657-74.
163. Kufe DW, Major PP, Egan EM, Beardsley GP. *Correlation of cytotoxicity with incorporation of ara-C into DNA. J Biol Chem.* Okt 10 1980;255(19):8997-9000.
164. Jain M, Barthwal SK, Barthwal R, Govil G. *Restrained molecular dynamics studies on complex of adriamycin with DNA hexamer sequence d-CGATCG. Arch. Biochem. Biophys.* Jul 1 2005;439(1):12-24.
165. Bachur NR, Yu F, Johnson R, Hickey R, Wu Y, Malkas L. *Helicase inhibition by anthracycline anticancer agents. Molecular Pharmacology.* Jun 1 1992;41(6):993.
166. Taymaz-Nikerel H, Karabekmez ME, Eraslan S, Kırdar B. *Doxorubicin induces an extensive transcriptional and metabolic rewiring in yeast cells. Scientific Reports.* Sept 12 2018;8(1):13672.
167. Kim S-Y, Kim S-J, Kim B-J, et al. *Doxorubicin-induced reactive oxygen species generation and intracellular Ca<sup>2+</sup> increase are reciprocally modulated in rat cardiomyocytes. Experimental & Molecular Medicine.* Okt 1 2006;38(5):535-45.
168. Gyrd-Hansen M, Meier P. *IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer. Nat Rev Cancer.* Aug 2010;10(8):561-74.
169. Melgar K, Walker MM, Jones LM, et al. *Overcoming adaptive therapy resistance in AML by targeting immune response pathways. Sci Transl Med.* Sep 4 2019;11(508)
170. Ciscar M, Trinidad EM, Perez-Montoyo H, et al. *RANK is an independent biomarker of poor prognosis in estrogen receptor-negative breast cancer and a therapeutic target in patient-derived xenografts. bioRxiv.* Dez 14 2021;470911.
171. Liang Q, Wang Y, Lu Y, et al. *RANK promotes colorectal cancer migration and invasion by activating the Ca(2+)-calcineurin/NFATC1-ACP5 axis. Cell Death Dis.* Apr 1 2021;12(4):336.
172. Cummings SR, San Martin J, McClung MR, et al. *Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. N Engl J Med.* Aug 20 2009;361(8):756-65.
173. Fizazi K, Carducci M, Smith M, et al. *Denosumab versus zoledronic acid for treatment of bone metastases in men with castration-resistant prostate cancer: a randomised, double-blind study. The Lancet.* Mär 5 2011;377(9768):813-22.
174. Giannakeas V, Cadarette SM, Ban JK, et al. *Denosumab and breast cancer risk in postmenopausal women: a population-based cohort study. British Journal of Cancer.* Nov 1 2018;119(11):1421-7.

## 7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinischen Kooperationseinheit Translationale Immunologie des Deutschen Konsortiums für Translationale Krebsforschung (DKTK) am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) am Partnerstandort Medizinische Klinik Tübingen unter der Leitung von Prof. Dr. Helmut R. Salih und Betreuung durch Frau Dr. rer. nat. Kim L. Clar durchgeführt.

Die Versuche wurden von mir nach Einarbeitung durch Frau Dr. rer. nat. Kim L. Clar durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgt durch Frau Dr. rer. nat. Kim L. Clar und mich. Die Daten in Abbildung 18 wurden durch Herrn Dr. med. Jonas Heitmann zur Verfügung gestellt.

Einige der in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse sind in eine bereits veröffentlichte Publikation eingeflossen. Der Beitrag von weiteren Co-Autoren an der Publikation ist im Folgenden im Sinne der *CRediT contribution taxonomy guidelines 237* dargestellt:

Clar KL\*, **Weber LM\***, Schmied BJ, Heitmann JS, Marconato M, Tandler C, Schneider P, Salih HR. *Receptor Activator of NF- $\kappa$ B (RANK) Confers Resistance to Chemotherapy in AML and Associates with Dismal Disease Course*. *Cancers* (Basel) 2021; 13:6122.

\* Diese Autoren haben gleichermaßen zu dieser Arbeit beigetragen.

Konzeptualisierung: Salih HR, Clar KL, Schmied BJ

Projektleitung: Clar KL

Supervision: Salih HR

Methodologie: Clar KL, Schmied BJ, Tandler C, Schneider P

Software: Clar KL, Weber LM, Heitmann JS

Durchführung der Forschungs- und Untersuchungsprozesse: Clar KL, Weber LM, Schmied BJ, Heitmann JS, Marconato M, Tandler C

Formelle Analyse: Clar KL, Weber LM, Heitmann JS

Validierung: Clar KL, Weber LM

Datenkuratierung: Clar KL, Weber LM, Heitmann JS, Schneider P

Visualisierung: Clar KL, Weber LM

Schreiben – Erstellung des Originalentwurfs: Clar KL, Weber LM

Schreiben – Revision und Editieren: Salih HR, Heitmann JS, Schneider P

Ressourcen: Salih HR, Heitmann JS, Schneider P

Akquisition von Fördermitteln: Salih HR, Schneider P

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 07.11.2022

## 8 Veröffentlichungen

Clar KL\*, **Weber LM\***, Schmied BJ, Heitmann JS, Marconato M, Tandler C, Schneider P, Salih HR. *Receptor Activator of NF- $\kappa$ B (RANK) Confers Resistance to Chemotherapy in AML and Associates with Dismal Disease Course*. *Cancers* 2021; 13(23):6122.

Heitmann JS\*, Bilich T\*, Tandler C\*, Nelde A, Maringer Y, Marconato M, Reusch J, Jäger S, Denk M, Richter M, Anton L, **Weber LM**, Roerden M, Bauer J, Rieth J, Wacker M, Hörber S, Peter A, Meisner C, Fischer I, Löffler MW, Karbach J, Jäger E, Klein R, Rammensee HG, Salih HR, Walz JS. *A COVID-19 peptide vaccine for the induction of SARS-CoV-2 T cell immunity*. *Nature* 2022; 601(7894):617-622.

\* Diese Autoren haben gleichermaßen zu dieser Arbeit beigetragen.

## 9 Danksagung

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Helmut Salih für das Ermöglichen dieser Arbeit. Vielen Dank für die vorbildliche Betreuung. Die vergangenen zwei Jahre waren eine Inspiration für mich und ich habe nicht nur auf fachlicher Ebene viel von Ihnen gelernt. Danke, für die wertvollen Einblicke in die wunderbare Welt der Wissenschaft und Ihren Einsatz zur Verbesserung der Krebstherapie.

Ein besonderer Dank geht auch an Kim, für die engagierte Einarbeitung, die vielen Stunden, die wir gemeinsam im Labor verbracht haben und Deine hervorragende Betreuung meiner Doktorarbeit. Danke, für Deine Unterstützung.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitgliedern der AG Salih und der KKE Translationale Immunologie bedanken. Die freundschaftliche Atmosphäre in der Arbeitsgruppe hat meine Zeit im Labor besonders angenehm gemacht und zu unzähligen Erinnerungen geführt. Danke Euch allen für diese unvergessliche Zeit und die gute Zusammenarbeit.

Ebenfalls danke ich dem *Interdisziplinären Promotionskolleg Medizin* für die finanzielle und fachliche Förderung und Begleitung meines Promotionsprojektes.

Außerhalb meiner Dissertation konnte und kann ich mich immer auf den Rückhalt meiner Familie und meiner Freunde stützen. Eure stetige Hingabe und Begleitung während meines gesamten Lebens haben mich zu der Person gemacht, die ich heute bin. Dafür bin ich Euch sehr dankbar.