

Silvia Basilico und Berthold Göttgens

3.4 Fehlregulierung der regulatorischen Programme von Blutstammzellen bei akuter myeloischer Leukämie (AML)¹⁷

Zusammengefasst und aus dem Englischen übersetzt von Lilian Marx-Stölting

Im menschlichen Blut kommen mehr als zehn verschiedene Blutzelltypen vor, die im Knochenmark ständig nachgebildet werden. Dort angesiedelte Blutstammzellen ermöglichen die Blutbildung (Hämatopoese) und werden deshalb als hämatopoetische Stammzellen bezeichnet. Hämatopoetische Stammzellen liefern einerseits einen lebenslangen Vorrat an reifen Blutzellen und dienen andererseits auch als Reservoir, um das Blutsystem bei einem akuten Blutverlust zu regenerieren. Die Blutstammzellen stehen dabei als noch relativ undifferenzierte Zellen an der Spitze einer hämatopoetischen Differenzierungshierarchie, die über immer stärker differenzierte langlebige Vorläuferzellen bis hin zu ausdifferenzierten Blutzellen führt. Dabei können sich hämatopoetische Stammzellen auf asymmetrische Weise teilen, sodass aus den Tochterzellen sowohl wieder Blutstammzellen hervorgehen (die sich demnach selbst erneuern) als auch etwas differenziertere Vorläuferzellen der verschiedenen Blutzelltypen, aus denen dann nach weiteren Teilungen gereifte Blutzellen entstehen. Um eine ausgewogene Produktion aller reifen Zelllinien sicherzustellen und gleichzeitig ein Stammzellreservoir vorzuhalten, haben sich komplexe und miteinander verschlungene regulatorische Programme entwickelt, die die Differenzierung und Selbsterneuerung in diesen hämatopoetischen Stamm-/Vorläuferzellen steuern. Leukämische Mutationen stören diese regulatorischen Programme, indem sie einerseits die Differenzierung blockieren und andererseits gleichzeitig die Zellteilung und -vermehrung anregen und dadurch eine Krebserkrankung (Leukämie) auslösen.¹⁸

Hämatopoetische Stammzellen sind sehr seltene Zellen. Trotzdem gibt es inzwischen sehr effiziente Protokolle für ihre Isolierung aus dem Knochenmark. Dennoch

¹⁷ Dieser Beitrag ist eine deutsche Zusammenfassung des Review-Artikels „Dysregulation of haematopoietic stem cell regulatory programs in acute myeloid leukaemia“ von Silvia Basilico und Berthold Göttgens, der eine umfangreiche Darstellung des wissenschaftlichen Sachstands und der aktuellen Literatur zum Thema (Stand Frühjahr 2017) bietet. Der Artikel ist im Juli 2017 im *Journal of Molecular Medicine* (95/7: 719–727) erschienen und kostenfrei öffentlich zugänglich unter: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00109-017-1535-3> [19.10.2017].

¹⁸ Bei der Krebsentstehung erlangen Zellen die Fähigkeit, sich unkontrolliert und von der Umgebung unabhängig zu teilen ohne sich dabei auszudifferenzieren.

ist ihre Seltenheit eine große Hürde für die detaillierte Erforschung der regulatorischen Programme in hämatopoetischen Stammzellen, da viele klassische biochemische Untersuchungen tausende oder gar hunderttausende Zellen benötigen, die bei hämatopoetischen Stammzellen nicht verfügbar sind. Hier eröffnet sich mit neuen Methoden der Einzelzellanalyse neue Perspektiven zur Erforschung von hämatopoetischen Stammzellen.

Trotz dieser Schwierigkeiten wurden in den letzten beiden Jahrzehnten bereits einige Schlüsselkonzepte der Funktion von hämatopoetischen Stammzellen herausgearbeitet. Erstens benötigt die Selbsterneuerung von hämatopoetischen Stammzellen extrazelluläre externe Signale (z. B. aus dem umgebenden Knochenmark), da hämatopoetische Stammzellen sich *in vitro* verstärkt differenzieren und aus diesem Grund nicht effizient vermehrt werden können. Die Neigung zur Differenzierung übertrifft dabei offenbar sämtliche inhärente Selbsterneuerungskapazitäten. Zweitens bestimmen spezifische Regelkreise von Transkriptionsfaktoren die Identität der Zellen, die durch Differenzierung und Spezialisierung aus hämatopoetischen Stammzellen hervorgehen, wie zum Beispiel Erythrozyten, Megakaryozyten oder Granulozyten¹⁹. Multipotente Vorläuferzellen (Zellen, die mehr als eine Zelllinie bilden können) sind hingegen von einer niedrigen Koexpression von Genen, die mit bestimmten Zelllinienprogrammen assoziiert werden, gekennzeichnet. Der klassische hämatopoetische Stammbaum (mit einer Abfolge binärer Entscheidungspunkte für die weitere Zelldifferenzierung) ist heutzutage wahrscheinlich kein geeignetes Modell der Beschreibung der Hämatopoiese, da beispielsweise hämatopoetische Stamm-/Vorläuferzellen mit begrenztem oder sogar nur auf eine Zelllinie beschränktem Differenzierungspotenzial identifiziert wurden, und es darüber hinaus auch mehrere Differenzierungsroute gibt, die zu reifen Blutzellen führen können.

Über hämatopoetische Stammzellen kann viel gelernt werden, indem man systemische Störungen der Blutbildung untersucht. Dabei bieten sich insbesondere Leukämien als Krankheitsmodelle systemweiter Störungen an. Die Forschung der letzten 15 Jahre hat zu der Annahme geführt, dass die Ursprungszelle, in der die initiale leukämische Mutation bei der Entstehung von akuter myeloischer Leukämie (AML) vorkommt, immer zu den hämatopoetischen Stamm-/Vorläuferzellen gehört. Diese initiale Mutation kommt wahrscheinlich in den Zellen vor, die am wenigsten gereift sind. Bei einer voll ausgebildeten Leukämie sind hingegen Oberflächenmarker exprimiert, die mit reiferen Vorläuferzellen assoziiert sind (wie etwa Granulozyten-Makrophagen-Vorläufer). Es

¹⁹ Bei den hier aufgeführten Zelllinien handelt es sich um verschiedene Blutbestandteile. Erythrozyten sind rote Blutzellen, Megakaryozyten und Granulozyten gehören zu den weißen Blutzellen und haben im Blut unterschiedliche Aufgaben.

konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit von Onkogenen²⁰, eine Zelllinie zu transformieren, bei zunehmend reifen hämatopoetischen Stammzellen onkogenspezifisch ist. Das bedeutet, dass verschiedene Onkogene unterschiedliche Stammzellstadien transformieren (können). Diese onkogenspezifischen Effekte sind vermutlich zumindest teilweise mit der Fähigkeit des Onkogens assoziiert, die Selbsterneuerung in reifenden Stamm-/Vorläuferzellen anzuregen, die sich in ihrem Entwicklungsgrad zunehmend entfernen von den unreifsten hämatopoetischen Stammzellen, die über die Fähigkeit der Selbsterneuerung noch intrinsisch verfügen.

Die offensichtlichen phänotypischen Variationen verschiedener Typen von AML gehen sowohl auf Onkogen- als auch Ursprungszellen-spezifische Effekte zurück. Es gibt jedoch auch Gemeinsamkeiten, die sich darauf beziehen, wie die regulatorischen Programme der HS-Zellen gestört werden müssen, um den Leukämie-AML-Phänotyp hervorzurufen. Dies führte zur Unterscheidung von AML-Onkogenen in Typ 1 und Typ 2. Zu Typ 1 werden diejenigen Onkogene gezählt, die die Zellteilung anregen, und zu Typ 2 solche, die die Differenzierung der Zellen blockieren. Da Tumorzellen sich sowohl unkontrolliert teilen, als auch undifferenziert bleiben, ist eine Kombination von Typ-1- und Typ-2-Onkogenen am geeignetsten, die Entwicklung einer Leukämie auszulösen, was auch experimentell bestätigt werden konnte. Allerdings führt die detaillierte molekulare Charakterisierung leukämischer Mutationen heute zu einem immer komplexeren Bild. Individuelle Mutationen lassen sich dadurch nicht mehr in klar abgegrenzte Kategorien unterteilen, weil sie sowohl die Zellteilung als auch die Differenzierung beeinflussen und das in Abhängigkeit davon, welcher Vorläufer und welche früheren Mutationen bereits vorliegen. Vor diesem Hintergrund ist das bisherige Modell daher möglicherweise zu stark vereinfacht und nicht mehr nützlich.

Besonders gut zu erforschen sind in diesem Zusammenhang leukämogene Mutationen, die häufig mit Leukämien bei Kindern assoziiert sind, weil diese oft vergleichsweise weniger komplex sind. So reichen hier nur zwei oder sogar ein Ereignis auf genetischer Ebene aus, um eine bösartige Transformation herbeizuführen. Diese Erkrankungen liefern daher ein einfacher zu interpretierendes Modellsystem für die Analyse gestörter regulatorischer Programme in hämatopoetischen Stamm-/Vorläuferzellen.

Die Krankheitsentstehung ist ein dynamischer Prozess, der oft Jahre vor dem klinischen Krankheitssausbruch beginnt. Wenn genetische Änderungen Überlebensvorteile beinhalten, wächst vermehrt eine vorherrschende Population von Zellen mit diesen Änderungen. So führt die Akkumulation einer Serie von somatischen Mutationen in

²⁰ Onkogene sind Gene, die die Krebsentstehung fördern. Während der sog. Transformation einer Körperzelle zu einer Krebszelle beginnt die Zelle, sich unkontrolliert zu teilen und die Differenzierung ist gestört.

einem einzigen (oder einigen wenigen) Zellklon(en)²¹ zum Wachstum solcher Zellpopulationen. Bei vielen Tumorarten ist die Zielzelle des transformierenden Ereignisses noch unbekannt. Laut einer Hypothese können sogenannte Leukämie-Stammzellen sich vermehren und Leukämien hervorrufen. Mehrere Studien deuten jedoch darauf hin, dass normale hämatopoetische Stammzellen die Zielzellen des transformierenden Ereignisses sind und nicht bereits festgelegtere Leukämie-Stammzellen. Weil aber im Experiment auch nicht selbsterneuernde Zellen (Blutzellen) in Leukämie-Stammzellen transformiert werden konnten, geht man außerdem davon aus, dass es mehr als nur ein regulatorisches Programm gibt, das für leukämische Änderungen zugänglich ist.

Die Mehrheit der Rezidive (Rückfälle) bei verschiedenen Leukämien ist auf einen gemeinsamen Vorläufer zurückzuführen, von dem bereits bei der Diagnose eine kleine Anzahl Zellklone vorhanden ist, der jedoch erst nach zusätzlichen genetischen Aberrationen als Rezidiv erkennbar wird. Prä-leukämische Zellen sind nah verwandt mit normalen hämatopoetischen Stammzellen und bilden ein zelluläres Reservoir, in dem primäre Mutationen als „stille“ Mutationen (solche, die keine sichtbaren Auswirkungen zeigen) akkumulieren, bis sekundäre Events wie weitere Mutationen den Zellen einen Überlebensvorteil bieten, der dann zur Transformation dieser Zellen zu Tumorzellen und somit zum Ausbruch einer Leukämie führt. Die Störung der regulatorischen Programme während der Entstehung der Leukämie scheint daher ein vielstufiger Prozess zu sein. Die detaillierten molekularen Prozesse der schrittweisen Umwandlung von normalen über prä-leukämische hin zu leukämischen Zellen müssen folglich noch weiter erforscht werden, wenn man diese Zusammenhänge besser verstehen will.

Da der zelluläre Kontext für die Transformation zentral ist, tragen Onkogene nur zu einem Teil zur Genese von Leukämien bei. Ein Onkogen, das in 70% der bei Kindern auftretenden Leukämien verantwortlich gemacht wird und mit einer schlechten Prognose einhergeht, ist MLL („mixed lineage leukemia“)²². MLL-Umlagerungen (MLL-r, für „rearrangement“) kommen sowohl bei myeloischer (AML) als auch bei lymphatischer (ALL) Leukämie²³ vor. Mittels verschiedener Mausmodelle (retrovirale und nicht retrovirale)²⁴ wird die Entstehung von MLL-r-Leukämien untersucht.

21 Ein Zellklon ist die Summe der (genetisch identischen) Nachfahren einer Zelle, die durch Zellteilung aus dieser hervorgegangen sind.

22 MLL kodiert für eine Methyltransferase ein Enzym, das bestimmte Histone (also Proteine, die im Komplex mit der DNA vorliegen und für deren Verpackung wichtig sind) methyliert.

23 Myeloische Leukämien sind durch die Störung der Myelogenese gekennzeichnet (also der Vorläufer von Granulozyten, Monozyten, Erythrozyten und Megakaryozyten). Bei lymphatischen Leukämien sind die unreifen Vorstufen der Lymphozyten betroffen.

24 Retroviren sind einzelsträngige RNA-Viren, deren Genom bei ihrer Vermehrung in doppelsträngige DNA umgeschrieben wird. Sie können genutzt werden, um bestimmte Gene in Mausembryonen

Dabei wurde bereits deutlich, dass die Ursprungszelle die Biologie und Prognose der Leukämie wesentlich beeinflusst. Daneben beeinflussen auch der Typ der MLL-Translokation und die zelluläre Umgebung das Ausbrechen und die Ausprägungsform der Leukämie. Die neue Methode des Genome Editings könnte auch hier neue Möglichkeiten der Erforschung erschließen.

Eine Schwierigkeit bei der Untersuchung dieser Interaktionen liegt darin, dass Unterschiede zwischen menschlichen Krankheiten und tierischen (meist Maus) Krankheitsmodellen bestehen. Die Ergebnisse aus Mausstudien sind deshalb nicht immer auf den Menschen übertragbar. Die Entwicklung passender Mausmodelle ist allerdings auch aufgrund unterschiedlicher mit In-vitro- und In-vivo-Studien assoziierten Variablen schwierig, etwa verschiedene Strategien zur Gewinnung und Aufreinigung von hämatopoetischen Stamm-/Vorläuferzellen sowie Unterschiede in der Art, wie Onkogene in die Zelle eingeführt werden. Außerdem hat die Mikroumgebung Einfluss auf die Assoziation von MLL-Fusionen mit spezifischen Leukämie-Subtypen. Beispielsweise beeinflusst das Auftreten von sekundären Mutationen, die mit MLL-Translokationen assoziiert sind, die Störung regulatorischer Programme und könnte möglicherweise mit der Aggressivität der Krankheit in Verbindung stehen.

Die regulatorischen Programme, die für die Stammzellfunktion sowohl während der Gewebeerhaltung als auch bei der Reparatur verantwortlich sind, müssen noch weiter erforscht werden. Das hämatopoetische System fördert das Verständnis, wie systemische Störungen zur Krankheitsentwicklung beitragen und wie normale hämatopoetische Stamm-/Vorläuferzellen in ein bösartiges Stadium übergehen können. Viele der dabei grundlegenden Prinzipien werden voraussichtlich aber auch auf Stammzellumwandlungsprozesse in nicht hämatopoetischem Gewebe übertragbar sein. Solche Umwandlungsprozesse werden besonders im hohen Alter mit Störungen bei Gewebeerhalt und -regeneration in Verbindung gebracht. Ein besseres Verständnis der Störungen von stammzellregulatorischen Programmen ist daher von großer therapeutischer Relevanz.

einzuschleusen und so Mausmodelle für Leukämien zu erzeugen. Dies kann jedoch auch mit anderen, nicht retroviralnen Methoden erreicht werden.