

**Die Blockierung der Immuncheckpoint-Achse  
TIGIT-PVR/PVRL2 als neuer therapeutischer Ansatz zur  
Behandlung der akuten myeloischen Leukämie**

***Immune Checkpoint Blockade of the TIGIT-PVR/PVRL2 Axis as Novel  
Therapeutic Strategy for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia***

**Dissertation**

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

im Fachbereich Biologie,  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Hauke Heyo Stamm**

Hamburg 2017

**1. Gutachter: Prof. Dr. Walter Fiedler**

**2. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Ganzhorn**

**Diese Arbeit wurde am 25.07.2017 erfolgreich verteidigt.**

**Mitglieder der Prüfungskommission:**

**Prof. Dr. Julia Kehr (Vorsitzende der Prüfungskommission)**

**Prof. Dr. Walter Fiedler**

**Prof. Dr. Boris Fehse**

**PD Dr. Hartwig Lüthen**

# INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung.....	I
Abstract .....	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Krebs und das Immunsystem.....	1
1.2 Das menschliche Immunsystem.....	1
1.2.1 Die Aktivierung der adaptiven Immunantwort im Cancer Immunity Cycle .....	3
1.2.2 Die Regulation der T-Zellaktivierung und die Kontrolle von Effektorfunktionen.....	6
1.2.3 Dysfunktionale T-Zellen.....	11
1.3 Die Immuncheckpoint-Achse TIGIT-PVR/PVRL2 .....	13
1.4 Die akute myeloische Leukämie (AML).....	19
1.4.1 Die Therapie der AML.....	22
1.5 Zielsetzung .....	28
2 Material und Methoden.....	29
2.1 Materialien.....	29
2.1.1 Geräte.....	29
2.1.2 Chemikalien .....	30
2.1.3 Kits, Reagenzien und Lösungen .....	30
2.1.4 Enzyme .....	31
2.1.5 DNA-Standards .....	31
2.1.6 Oligonukleotide .....	32
2.1.7 Vektoren.....	32
2.1.8 Antikörper.....	32
2.1.9 Software .....	33
2.2 Methoden .....	34
2.2.1 Kultivierung von Zellen .....	34
2.2.2 Kryokonservierung von Zellen .....	35
2.2.3 Auftauen von kryokonservierten Zellen.....	35
2.2.4 Zellzählung.....	36
2.2.5 Proliferationsassay .....	36
2.2.6 Zytotoxizitätsassay .....	36
2.2.7 Konzentrationsbestimmung von humanem Granzym B .....	37
2.2.8 Durchflusszytometrie .....	38
2.2.9 Bakterielle Transformation.....	39
2.2.10 Agarosegelelektrophorese .....	39
2.2.11 Genetischer <i>knockout</i> durch CRISPR/Cas9 .....	40

---

2.2.12	<i>In vivo</i> Mausmodell .....	41
2.2.13	Statistik und graphische Darstellung.....	42
3	Ergebnisse.....	44
3.1	Die Expression von PVR und PVRL2 repräsentiert einen unabhängigen prognostischen Faktor in der AML.....	44
3.2	Die Expression der TIGIT Liganden PVR und PVRL2 auf AML-Zelllinien sowie auf CD33 <sup>+</sup> primären AML-Blasten .....	46
3.3	Die Blockierung von TIGIT oder der Liganden PVR und PVRL2 führt zu einer signifikanten Erhöhung der Zytotoxizität .....	47
3.4	Die Blockierung der TIGIT-PVR/PVRL2-Achse in Kombination mit dem BiTE® Antikörperkonstrukt AMG 330 führt zu einer signifikanten Erhöhung der T-Zell-medierten Lyse .....	50
3.5	Die gesteigerte Lyse der AML-Zellen ist T-Zell-vermittelt.....	53
3.6	Die Blockierung der TIGIT-PVR/PVRL2-Achse steigert die Effektorfunktionen von Immunzellen gegenüber AML-Zelllinien .....	54
3.7	Die Blockade von PVR und PVRL2 verstärkt die Zytotoxizität gegen primäre AML Blasten..	57
3.8	MV4-11 PVR und PVRL2 Doppelknockout-Zellen rekapitulieren die beobachteten Antikörpereffekte .....	59
3.9	Der <i>knockout</i> von PVR und PVRL2 verleiht einen Überlebensvorteil im Mausmodell .....	64
4	Diskussion.....	68
4.1	Die Manipulation der TIGIT-PVR/PVRL2-Achse verstärkt die zytotoxischen Effekte gegenüber AML-Zellen alleine und in Kombination mit dem BiTE® AMG 330 .....	69
4.2	Die Immuncheckpoint Liganden PVR und PVRL2: Feind oder Freund? .....	75
4.3	Die Blockierung der TIGIT-PVR/PVRL2-Achse zur Therapie der AML .....	79
5	Schlusswort und Ausblick .....	86
6	Danksagung .....	88
7	Referenzen .....	90
8	Abkürzungsverzeichnis .....	115
9	Eidesstattliche Versicherung .....	118

## ZUSAMMENFASSUNG

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine maligne Erkrankung des blutbildenden Systems, bei der frühe hämatopoetische Vorläuferzellen durch die Akkumulation von Mutationen zu einer proliferativen Vorteile erlangen und zum anderen in ihrer hämatopoetischen Differenzierung gestört sind. Neue Technologien erlauben immer tiefere Einblicke in die Heterogenität und Komplexität der AML. Nichtsdestoweniger hat sich die generelle Therapiestrategie für die Patienten in den letzten 30 Jahren nicht maßgeblich verändert.

In vielen Krebsentitäten liegt eine immunsupprimierende Mikroumgebung vor, und die endogene Immunabwehr ist durch dysfunktionale immunologische Effektorzellen reduziert oder außer Kraft gesetzt. Eine neue Hoffnung in der Behandlung von Krebserkrankungen ist die Immuntherapie, die in verschiedenen Verfahren durch Manipulation des Immunsystems versucht, eine effektive Antwort gegen den Tumor wiederherzustellen. Immuncheckpoint Moleküle regulieren das sensible Gleichgewicht der Immunantwort und schützen den Körper vor überschüssigen inflammatorischen Prozessen. Tumorzellen haben sich diesen Mechanismus zu Eigen gemacht. Als Teil der Immunevasion kommt es auf Krebszellen häufig zu einer Heraufregulation von Immuncheckpoint Liganden, die an die korrespondierenden Rezeptoren auf dysfunktionalen Effektorzellen binden und eine Immunantwort gegen den Tumor unterdrücken. Die Blockierung der Immuncheckpoint Moleküle *cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4* (CTLA4) oder *programmed cell death 1* (PD-1) durch monoklonale Antikörper konnte in vielen Krebsentitäten bereits klinische Erfolge liefern, was unter anderem zur Zulassung der beiden Medikamente zur Therapie des Melanoms führte. Kürzlich konnte der auf Immunzellen exprimierte Rezeptor *T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains* (TIGIT) als ein wichtiger Regulator der antitumoralen Immunantwort identifiziert werden. Die Liganden *poliovirus receptor* (PVR) wie auch *poliovirus receptor-related 2* (PVRL2) werden einerseits physiologisch von einer Reihe von Geweben exprimiert, andererseits konnte eine Überexpression auf einer Vielzahl an Tumorentitäten gezeigt werden. Die Bindung der Liganden PVR und PVRL2 an den Rezeptor TIGIT auf Immunzellen führt neben der direkten Inhibierung zytotoxischer T- und NK-Zellen auf vielen Ebenen zu einer negativen Regulation der Immunantwort.

In dieser Arbeit wurden die Genexpressionsdaten von 290 Patienten mit neu diagnostizierter AML, zu denen klinische Daten zur Verfügung standen, auf die prädiktive Bedeutung der Expression der Immuncheckpoint Moleküle PVR, PVRL2, CTLA4, CD80, CD86 sowie der PD-1 Liganden PD-L1 und PD-L2 untersucht. Während eine hohe PVR- wie auch PVRL2-Expression in Log-Rank-Analysen mit einem signifikant verkürzten Gesamtüberleben der Patienten unter konventioneller Chemotherapie assoziiert war, zeigte die Expression der anderen Moleküle keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben

der Patienten. Das Überleben der Patienten nach Chemotherapie wurde zudem in einem multivariaten Cox-Regressionsmodell für die oben genannten Immuncheckpoint Moleküle sowie die Parameter Alter, Karyotyp und FLT3-Mutationsstatus untersucht. Eine hohe PVR-Expression sowie die FLT3-Mutation resultierten dabei als unabhängige prognostische Marker für das Überleben. In der vorliegenden Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass AML-Zelllinien und Blasten von AML-Patienten eine hohe Expression von PVR und PVRL2 aufweisen. Durch die Verwendung blockierender Antikörper gegen PVR und PVRL2 oder gegen den Rezeptor TIGIT konnte die zytotoxische Wirkung von mononukleären Zellen gesunder Spender (engl. *healthy donor peripheral blood mononuclear cells* (HD-PBMCs)) in einer Vielzahl von AML-Zelllinien im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen signifikant erhöht werden. Der bispezifische Antikörper (Bispecific T cell Engager (BiTE®)) AMG 330 verbindet CD33<sup>+</sup> AML-Blasten mit CD3<sup>+</sup> T-Zellen und führt zu einer effizienten Lyse der Zielzellen. Dennoch konnte gezeigt werden, dass diese Interaktion von Immuncheckpoint Molekülen beeinflusst wird. Die Kombination von PVR- und PVRL2-blockierenden Antikörpern oder eines TIGIT-blockierenden Antikörpers mit dem BiTE® Antikörperkonstrukt AMG 330 konnte die durch HD-PBMCs ausgelöste Lyse der untersuchten Zelllinien signifikant verstärken. Die Steigerung der Zytotoxizität von Immunzellen gegenüber AML-Zellen war zudem von einer verstärkten Ausschüttung des Effektormoleküls Granzym B gekennzeichnet. Die durch die Verwendung von Zelllinien erhaltenen Ergebnisse konnten in Zytotoxizitätsassays mit Blasten von unbehandelten AML-Patienten bestätigt werden. Die beobachteten Effekte waren spezifisch für eine Blockierung der TIGIT-PVR/PVRL2-Achse, T-Zell-mediert und unabhängig von Antikörper abhängiger zellulärer Zytotoxizität. Die erhaltenen Ergebnisse konnten *in vitro* durch die Verwendung eines durch die CRISPR/Cas9-Technik hergestellten genetischen Doppelknockouts für die Gene *PVR* und *PVRL2* in der AML-Zelllinie MV4-11 im Vergleich zu den parental Wildtyp-Zellen bestätigt werden. In einem Mausmodell wurde in immundefizienten Mäusen das Immunsystem durch humane T-Zellen rekonstituiert und den Tieren MV4-11 Wildtyp- oder PVR- und PVRL2-Doppelknockoutzellen transplantiert. Die Mäuse wurden darauffolgend entweder mit einem Placebo oder 10 µg/kg, 15 µg/kg bzw. 50 µg/kg AMG 330 behandelt. Es zeigte sich, dass die Mäuse, die mit den Doppelknockoutzellen transplantiert wurden, in allen Gruppen einen deutlichen Überlebensvorteil gegenüber den mit Wildtyp-Zellen transplantierten Tieren hatten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen die Relevanz der TIGIT-PVR/PVRL2-Achse zur Regulation der Immunantwort im Patienten als auch in präklinischen Modellen auf. Der Einsatz blockierender Antikörper gegen TIGIT oder PVR und PVRL2 in Monotherapie oder die Kombination mit bereits etablierten Chemotherapeutika wie auch neueren immuntherapeutischen Ansätzen, beispielsweise dem BiTE® Antikörperkonstrukt AMG 330, stellt deshalb eine aussichtsreiche Therapieoption zur Behandlung der AML dar.

## ABSTRACT

Acute myeloid leukemia (AML) is a malign disease of the hematopoietic system. Here, an accumulation of early mutations in hematopoietic precursor cells on the one hand leads to a proliferative advantage of these cells and on the other hand hematopoietic cell differentiation is disturbed. Although new technologies have meanwhile enabled deeper insights into the heterogeneity and complexity of AML, therapeutical regimes for AML patients have not been improved decisively over the last 30 years.

For various cancer entities, an immune suppressive microenvironment has been described and the endogenous immune defense is diminished or even abrogated due to dysfunctional immunologic effector cells. Hence, immune therapy is a new therapeutic approach against cancer, which orchestrates the immune system to restore an effective immune response against the tumor. Immune checkpoint molecules basically regulate the immune response, thereby protecting the body from uncontrolled and exceeding inflammatory processes. To overcome and escape the immune equilibrium, tumor cells upregulate immune checkpoint molecules. In this context immune checkpoint ligands on tumor cells bind to their corresponding receptors on dysfunctional effector cells to suppress the antitumor immune response. Monoclonal antibodies targeting the immune checkpoint molecules *cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4* (CTLA4) or *programmed cell death 1* (PD-1) have been successfully used in the treatment of many tumor entities, which has led to the approval of those drugs for the therapy of melanoma. Recently, the receptor *T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains* (TIGIT) expressed on immune cells has been identified as an important regulator of the antitumor immune response. Its ligands *poliovirus receptor* (PVR) and *polivirus receptor-related 2* (PVRL2) are expressed physiologically by some tissues, contrariwise, an overexpression of those ligands could be shown for various tumor entities. Binding of PVR and PVRL2 to the immune cell-receptor TIGIT does not only lead to a direct inhibition of cytotoxic T- and NK-cells, but on many levels regulates the immune response negatively.

In this thesis, the gene expression data of 290 patients with newly diagnosed AML was analyzed in the context of the clinical course for the predictive significance of the expression of the immune checkpoint molecules PVR, PVRL2, CTLA4, CD80, CD86 and the PD-1 ligands PD-L1 and PD L2. Log-rank tests have shown that high PVR- as well as PVRL2 expression is associated with a significantly decreased overall survival of patients under conventional chemotherapy. The expression of the other molecules did not affect the overall survival of the patients. The survival of patients after chemotherapy was also investigated in a multivariate Cox regression model for the above mentioned immune checkpoint molecules as well as the parameters age, karyotype and FLT3 mutation status. A high PVR expression as well as the FLT3 mutation resulted as independent prognostic markers for survival. The presented

work also shows a high expression of PVR and PVRL2 on AML cell lines and blasts of AML patients. The application of blocking antibodies targeting PVR and PVRL2 or the receptor TIGIT significantly increased the cytotoxic effect of healthy donor peripheral blood mononuclear cells (HD-PBMCs) in a variety of AML cell lines compared to untreated controls. The Bispecific T cell Engager (BiTE<sup>®</sup>) antibody construct AMG 330 links CD33<sup>+</sup> AML blasts with CD3<sup>+</sup> T cells leading to an efficient lysis of target cells. Nevertheless, it has also been shown that this interaction is influenced by immune checkpoint molecules. The combination of PVR and PVRL2 blocking antibodies or a TIGIT blocking antibody with the BiTE<sup>®</sup> antibody construct AMG 330 significantly increased the lysis of investigated cell lines induced by HD-PBMCs. Moreover, the enhanced cytotoxicity of immune cells against AML cells was accompanied by an increased secretion of the effector molecule granzyme B. The results obtained from cell line experiments were confirmed in cytotoxicity assays with blasts from untreated AML patients. The observed effects were specific to the blockade of the TIGIT-PVR/PVRL2 axis, T cell mediated and independent of antibody-dependent cellular cytotoxicity. The obtained results were confirmed *in vitro* by the comparison of a CRISPR/Cas9 mediated genetic double knockout of *PVR* and *PVRL2* in the AML cell line MV4-11 with the parental wildtype counterpart. In immunodeficient NSG mice reconstituted with human T cells and transplanted with either MV4-11 PVR and PVRL2 double knockout or wildtype cells, prolonged survival was observed for mice transplanted with the knockout cells. Mice were treated with 10 µg/kg, 15 µg/kg or 50 µg/kg of the BiTE<sup>®</sup> antibody construct AMG 330 further extending the survival benefit of mice transplanted with double knockout cells in all groups.

The work presented here shows a clear relevance for the TIGIT-PVR/PVRL2 axis in regulating the immune response both in preclinical models and patients diagnosed with AML. The use of blocking agents against the TIGIT-PVR/PVRL2 axis in monotherapy or the combination with established chemotherapeutics as well as novel immunotherapeutic approaches, e.g. the BiTE<sup>®</sup> antibody construct AMG 330, represents a promising therapeutic option for the treatment of AML.

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 KREBS UND DAS IMMUNSYSTEM

Das Immunsystem schützt unseren Körper vor eindringenden Pathogenen und verhindert Infektionen. Schon frühe Arbeiten konnten jedoch darlegen, dass der Körper neben der Abwehr körperfremder Erreger in der Lage ist, abnormale zelluläre Entwicklungen, wie neoplastische Läsionen und Krebszellen, zu erkennen und zu eliminieren (Ehrlich, 1899; Burnet, 1967). Die letzten Jahre wissenschaftlicher Forschung haben gezeigt, dass Tumore sich zum einen durch eine Vielzahl an Mechanismen einer effizienten Kontrolle durch das Immunsystem entziehen und zum anderen direkt von der Beteiligung des Immunsystems profitieren. Nicht zuletzt fanden diese beiden Charakteristika Einzug in die neue Generation der *Hallmarks of Cancer* (Hanahan und Weinberg, 2011). Das stetig wachsende Verständnis von den Interaktionen des Immunsystems mit entarten Zellen gibt neue Hoffnung auf die Entwicklung immunotherapeutischer Verfahren, welche effiziente und langfristige Heilungschancen für Patienten ermöglichen könnten. Diese Entwicklung wurde als Meilenstein des Jahres 2013 in der Krebstherapie von der Zeitschrift *Science* gekürt (Cousin-Frankel, 2013).

## 1.2 DAS MENSCHLICHE IMMUNSYSTEM

In den folgenden Abschnitten wird eine Übersicht über das Immunsystem des Menschen gegeben. Soweit nicht anders vermerkt sind diese Informationen aus Lehrbuchwissen oder aus der Übersichtspublikation zur adaptiven Immunität von Bonilla und Oettgen zusammengetragen (Murphy u. a., 2012; Bonilla und Oettgen, 2010).

Das Immunsystem lässt sich in die angeborene und die adaptive Immunantwort unterteilen. Alle Zellen des Immunsystems entstehen aus hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark und wandern von dort entweder zur weiteren Reifung in sekundäre lymphoide Organe aus oder migrieren in Lymphe oder peripheres Blut. Als Teil der angeborenen oder auch unspezifischen Immunantwort verhindern aber schon physikalische Barrieren, wie die Haut oder Schleimhäute, das Eindringen von Erregern und Schadstoffen. Zusätzlich lassen sich die unspezifische zelluläre Antwort von Monozyten, neutrophiler Granulozyten, Makrophagen, dendritischer Zellen und NK-Zellen, wie auch lösliche Faktoren, wie Zytokine und Chemokine, Serumproteine und das Komplementsystem, zu der angeborenen Immunantwort zählen. Die Antigen-unspezifische Immunantwort wird größtenteils über Rezeptoren auf den Zellen ausgelöst, welche Pathogen-assoziierte Strukturen erkennen (engl. *pathogen associated*

*molecular patterns* (PAMPs)). Dadurch ist eine schnelle Erkennung und Beseitigung der Pathogene gewährleistet. Die angeborene Immunantwort schließt damit die Brücke zur antigen-spezifischen, adaptiven Immunantwort, welche zur ersten Aktivierung eine Latenzzeit von drei bis fünf Tagen besitzt. Eine erneute Aktivierung der adaptiven Immunantwort gegen den gleichen Erreger verläuft auf Grund des immunologischen Gedächtnisses jedoch erheblich schneller.

Die adaptive Immunantwort lässt sich in die von B-Zellen vermittelte humorale- und von T-Zellen ausgelöste zelluläre Immunität unterteilen und ist in vielen Mechanismen mit der angeborenen Immunantwort verknüpft. Beide Immunantworten werden über Antigen-spezifische Rezeptoren vermittelt, deren hohe Variabilität durch somatische V(D)J-Rekombination gewährleistet wird. Als Antigen werden dabei jegliche Moleküle verstanden, welche in der Lage sind, eine Immunantwort auszulösen. Neben fremdartigen bakteriellen oder viralen Proteinen, Lipiden oder Kohlehydraten können auch mutierte Proteine von Tumoren als Antigene fungieren. Naive B-Zellen exprimieren eine membrangebundene Form eines Immunglobulins als B-Zell-Rezeptor (BZR). Durch die Bindung eines spezifischen Antigens an den BZR gefolgt von der Internalisierung dieses Antigens und Präsentation auf Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes-II (engl. *major histocompatibility complex* (MHC)) gegenüber T-Helferzellen wird die B-Zelle in eine Plasmazelle oder Gedächtniszelle aktiviert. Die Sekretion verschiedener Immunglobulinklassen und die Bindung der Antikörper an Pathogene oder infizierte Zellen bewirken darauffolgend unterschiedliche Abwehrmechanismen, wie die Aktivierung des Komplementsystems, die Opsonierung von Pathogenen für die Phagozytose oder die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (engl. *antibody dependent cellular cytotoxicity* (ADCC)). Der Effekt der ADCC wird hauptsächlich durch natürliche Killer (NK) Zellen aber auch durch Makrophagen, neutrophile- und eosinophile Granulozyten sowie dendritischen Zellen als Effektorzellen ausgelöst. Die NK-Zellen binden dabei die durch spezifische Antikörper markierte Zielzelle über den Fc-Teil der Immunglobuline mit ihren Fc-Rezeptoren (CD16 oder CD32). Dies hat die Aktivierung der NK-Zellen und eine Freisetzung von beispielsweise INF- $\gamma$ , sowie die Elimination der Zielzelle durch Perforin und Granzym zur Folge.

Die zelluläre Immunität durch T-Zellen unterscheidet sich in mehreren Punkten von der humoralen Immunität. Wo der BZR spezifische Anteile eines intakten Antigen erkennt, muss das Antigen für die Erkennung durch den T-Zellrezeptor (TZR) als Peptid prozessiert sein und auf MHC-I oder MHC-II präsentiert werden. Die Entwicklung der T-Zellen ist ein mehrstufiger, stark kontrollierter Prozess, der die Entstehung einer enormen Anzahl an T-Zellen bedingt, die gegen unterschiedlichste Antigenstrukturen reagieren können, dabei aber hocheffizient fremd oder bösartig von eigen oder gutartig unterscheiden können. Die Reifung der im Knochenmark gebildeten T-Zellen findet im Thymus statt. Durch das vorherrschende Zytokinmilieu proliferieren die T-Zellvorläuferzellen stark und lösen

ein Differenzierungsprogramm aus, welches die genomische Reorganisation zur Bildung von funktionellen Genen für die  $\alpha$ - und  $\beta$ - sowie  $\gamma$ - und  $\delta$ -Ketten des TZR induziert. Durch das randomisierte Spleißen unterschiedlicher Allele im TZR Loci durch den V(D)J-Rekombinasekomplex, durch die Reparatur der DNA-Doppelstrangbrüche mithilfe der nicht homologen Rekombination und die durch die Desoxyribonukleotidyltransferase katalysierte zusätzliche funktionale Diversifizierung wird eine sehr hohe Diversität an unterschiedlichen T-Zellrezeptoren erreicht. Der  $\alpha$ : $\beta$  TZR erkennt im klassischen Sinne Peptide, welche auf MHC-I oder MHC-II präsentiert werden. In der weiteren Entwicklung werden die TZR mit dem Co-Rezeptor CD3 zum T-Zellrezeptorkomplex an der Zellmembran assembliert. Dabei bildet sich ein nicht kovalenter Komplex mit den nicht polymorphen CD3 $\epsilon$ -CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ -CD3 $\gamma$  und CD3 $\zeta$ -CD3 $\zeta$  Dimeren. Die prä-T-Zellen differenzieren im Weiteren zu doppelt positiven T-Zellen aus, welche sowohl den Co-Rezeptor CD4 als auch CD8 exprimieren. In einer positiven sowie negativen Selektion werden die Aviditäten der unterschiedlichen TZR der T-Zellen zu Peptiden und MHC-Molekülen überprüft. Als ersten wichtigen Schritt der Regulation werden in diesem Prozess der zentralen Toleranz autoreaktive T-Zellen aussortiert. Dabei wird durch den Transkriptionsfaktor *autoimmune regulator* (AIRE) eine sehr große Anzahl im Körper auftretender Peptide im Thymusepithel exprimiert. Die doppelt positiven T-Zellen, welche sowohl die positive als auch die negative Selektion durchlaufen haben, differenzieren im Folgenden durch Interaktion mit entweder MHC-I oder MHC-II zu CD8<sup>+</sup> bzw. CD4<sup>+</sup> einfach positiven T-Zellen aus und verlassen als naive T-Zellen über die Medulla den Thymus in die Blutzirkulation. Die Aktivierung dieser nun völlig ausdifferenzierten T-Zellen folgt ebenfalls einem hochregulierten Prozess, auf welchen im Folgenden am Beispiel der Krebserkrankung detaillierter eingegangen werden soll.

### 1.2.1 DIE AKTIVIERUNG DER ADAPTIVEN IMMUNANTWORT IM CANCER IMMUNITY CYCLE

Die Manifestation eines soliden Tumors oder die Ausbildung einer malignen proliferativen Erkrankung des hämatopoetischen Systems wie der AML ist begleitet von der Akkumulation einer Vielzahl von genetischen Veränderungen und dem Verlust der physiologischen Regulation der Zelle (Hanahan und Weinberg, 2011). Die Transformation der Zellen in einen malignen Phänotyp ist dabei begleitet vom Auftreten sogenannter Neoantigenen, welche entweder ausschließlich vom Tumor exprimiert werden (Tumor-spezifische Antigene (TSA)) oder vom Tumor im Vergleich zu gesundem Gewebe überexprimiert werden (Tumor-assoziierte Antigene (TAA)) (Wayteck u. a., 2014). Schon frühzeitig wurde deutlich, dass die daraus resultierenden krebsspezifischen Peptid-MHC-Komplexe von Immunzellen erkannt werden können (Boon u. a., 1994). Damit es zur Ausbildung einer Immunantwort gegen den Tumor kommt, welche im Folgenden zu einer effizienten Elimination der Tumorzellen führt,

braucht es jedoch einen stufenweise aufbauenden und fortlaufenden Prozess – den *Cancer Immunity Cycle* (Chen und Mellman, 2013) (siehe Abbildung 1).

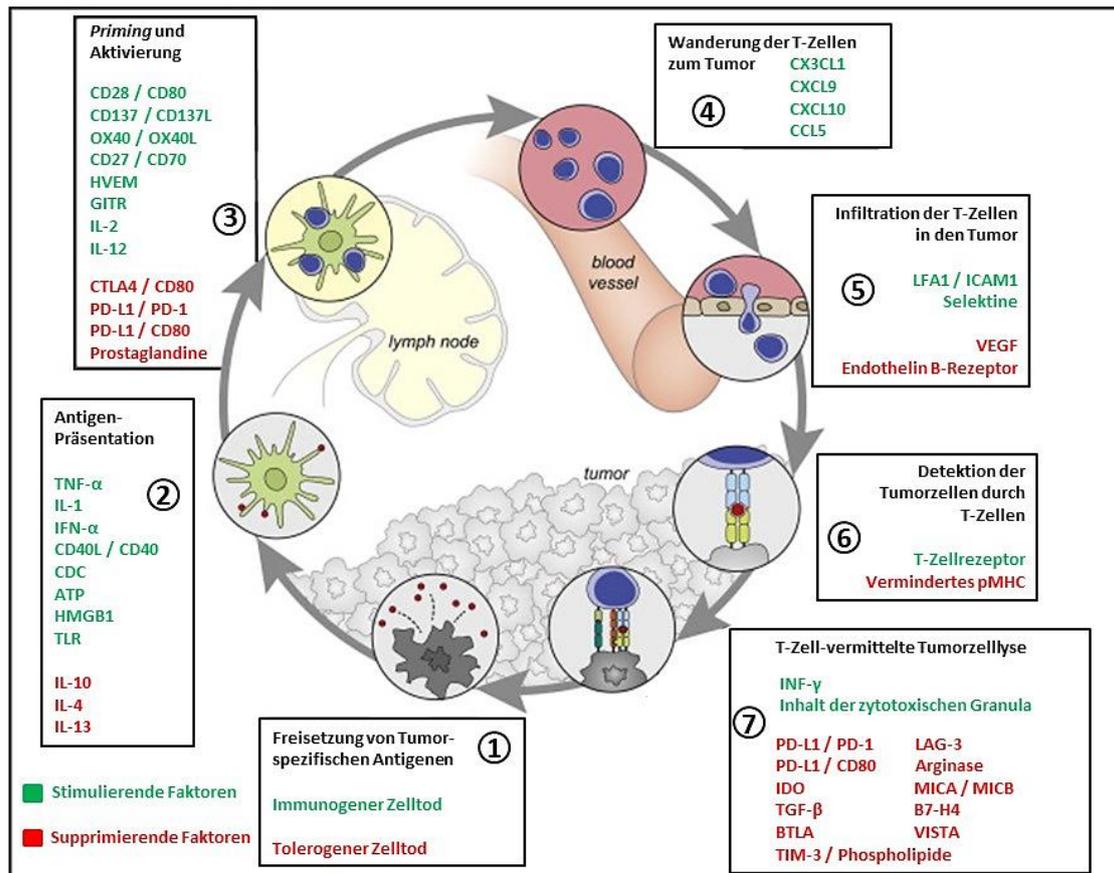
Durch die spontane Apoptose der Tumorzelle kommt es zu einer Freisetzung von Neoantigenen, welche von professionellen antigenpräsentierenden Zellen (engl. *antigen presenting cell* (APC)), wie dendritischen Zellen (engl. *dendritic cell* (DC)), durch Endozytose aufgenommen werden. Aktivierte APCs wandern daraufhin über das Netzwerk der Lymphgefäße zum drainierenden Lymphknoten, was zu einer Heraufregulation von MHC-I und MHC-II sowie co-stimulatorischen Rezeptoren führt, welche wichtig für die T-Zellaktivierung sind (siehe 1.2.2). Im Lymphknoten können daraufhin naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen über die Interaktion von immundominanten Epitopen, welche von den APCs über MHC-II präsentiert werden, mit dem kognaten TZR aktiviert werden. Die Aktivierung von naiven T-Zellen zu Effektorzellen durch eine aktivierte DC wird im Allgemeinen als *priming* bezeichnet. Bei der Synthese der MHC-II-Moleküle im endoplasmatischen Reticulum (ER) der APCs wird die Peptidbindungsstelle der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette durch die invariante Kette (CD74) blockiert, was eine Bindung endogener Peptide verhindert. Das unbeladene MHC-II-Molekül wird über den Golgi zur Fusion mit einem späten Endosom geleitet, wo es zum Austausch der invarianten Kette mit höher affinen Peptiden aus der endosomalen Degradation kommt (Neefjes u. a., 2011). Zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkennen ihre Zielzellen durch die Präsentation endogener Peptide über MHC-I. Dafür werden ubiquitinylierte zytosolische und nukleäre Proteine durch das Proteasom zu Peptiden abgebaut, welche zum ER transportiert werden. Das Peptid wird dort mit der schweren Kette des MHC-I und  $\beta$ 2-Mikroglobulins assembliert und an die Zellmembran transloziert (Neefjes u. a., 2011). Die Aktivierung von CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen über MHC-I durch APCs wird durch den Vorgang der *cross-presentation* sichergestellt. Das *cross-priming* einer zytotoxischen T-Zellantwort wurde bereits frühzeitig als ein wichtiger Mechanismus zur Abwehr viraler Infektion und zur Elimination von Tumoren beschrieben (Bevan, 1976). Die genauen Mechanismen des durch *cross-presentation* hervorgerufenen *cross-primings* sind jedoch bis heute nicht geklärt. Die Funktion des *cross-primings* ist allerdings für die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen gegenüber Tumorantigenen unabdingbar, da DCs über keine endogene Produktion solcher Neoantigene verfügen. Die *cross-presentation* wird von spezialisierten Subtypen von DCs ausgeführt und es werden dafür verschiedene Mechanismen diskutiert (Joffre u. a., 2012; Neefjes und Sadaka, 2012). Zum einen ist eine Aufnahme von extrazellulären Proteinen ins Zytosol der DCs und ein darauf folgender Abbau durch das Proteasom (*cytosolic pathway*) beschrieben worden, zum anderen eine Aufnahme über den endozytischen Weg und Abbau der Proteine in Lysosomen (*vacuolar pathway*) und darauffolgende Beladung auf MHC-I denkbar (Joffre u. a., 2012).

Die erfolgreiche Aktivierung und Fortsetzung dieses immunologischen Kreislaufs setzt voraus, dass das Sterben der Tumorzellen von der Freisetzung proimmunologischer Faktoren begleitet wird, welche die

Ausbildung einer Immunantwort fördern. Die Apoptose der Tumorzellen durch einen immunogenen Zelltod oder Nekrose, beispielsweise ausgelöst durch zytostatische Agenzien wie Anthrazykline, anstelle eines tolerogenen Zelltods oder Apoptose ist in diesem Zusammenhang für die Ausbildung einer Immunreaktion essentiell. Der immunogene Zelltod von Tumorzellen führt über ER-Stress und die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species* (ROS)) zur Freisetzung von *damage-associated molecular patterns* (DAMPs), welche wichtig für die Ausbildung einer inflammatorischen Immunreaktion sind, indem sie die *cross-presentation* von APCs fördern und die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 (IL-1) und Interferon- $\alpha$  (INF- $\alpha$ ) induzieren (Krysko u. a., 2012; Basu u. a., 2001; Lippitz, 2013).

Die im Lymphknoten aktivierten T-Helferzellen sowie zytotoxische T-Zellen wandern zurück zum Tumor und infiltrieren diesen. Durch die Interaktion der TZR mit dem kognaten Neoantigenen präsentiert auf den Tumorzellen über MHC-I kommt es im Folgenden zu einer tumorspezifischen Lyse durch zytotoxische T-Zellen. Der Kreislauf schließt und verstärkt sich durch die Freisetzung der bei der Lyse der Tumorzellen entstehenden TAAs.

Das Prinzip der immunologischen Überwachung und Elimination ist bei Krebspatienten weitreichend gestört. Zum einen ist es möglich, dass vom Tumor freigesetzte Antigene von den Immunzellen nicht detektiert werden. Zum anderen kann es passieren, dass DCs und T-Zellen die Antigene als gesund und eigen definieren, was zur Ausbildung einer das Wachstum des Tumors fördernden regulatorischen T-Zellantwort anstelle einer Effektorantwort führt. Weitergehend kann ebenfalls das *homing* der T-Zellen zum Tumor oder die Infiltration in den Tumor gestört sein (Chen und Mellman, 2013). Die einzelnen Schritte des *Cancer Immunity Cycles* sowie stimulierende und inhibierende Faktoren dieses Kreislaufs sind in Abbildung 1 schematisch zusammengefasst.



**Abbildung 1: Der Cancer Immunity Cycle nach Chen und Mellman** (Chen und Mellman, 2013). Die Entstehung einer effektiven anti-Tumor-Immunität ist ein zyklischer Prozess. Dieser Kreislauf startet mit der Freisetzung von tumorassoziierten Neoantigenen durch das Sterben von Tumorzellen und endet mit der Infiltration aktivierter tumorspezifischer zytotoxischer T-Zellen, welche die Krebszellen bekämpfen. Proinflammatorische und immunstimulierende Faktoren (dargestellt in grün) treiben diesen Zyklus in einen sich selbst verstärkenden Kreislauf. Im Verlauf einer Krebserkrankung kommt es zu einer Immunevasion durch Verschiebung dieser Faktoren zu einem antiinflammatorischen und immunsupprimierenden Phänotyp (Faktoren dargestellt in rot). Obwohl in der Abbildung nicht enthalten, spielen als inhibitorische Faktoren intratumorale regulatorische T-Zellen, Makrophagen und myeloide Suppressorzellen ebenfalls eine entscheidende Rolle. IL: Interleukin; TNF: Tumornekrosefaktor; IFN: Interferon; CDN: cyclisches Dinukleotid; ATP: Adenosintriphosphat; HMGB1: High-mobility group protein B1; TLR: Toll-like-Rezeptor; HVEM: herpes virus entry mediator; GITR: Glucocorticoid-induced TNFR family-related gene; CTLA4: Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4; PD-L1: Programmed death-ligand 1; CXCL/CCL: Chemokine motif ligands; LFA1: Lymphocyte function-associated antigen-1; ICAM-1: Intracellular adhesion molecule 1; VEGF: Vascular endothelial growth factor;IDO: Indoleamin-2,3-Dioxygenase; TGF: Transforming growth factor; BTLA: B- and T-lymphocyte attenuator; VISTA: V-domain Ig suppressor of T cell activation; LAG-3: lymphocyte-activation gene 3 protein; MIC: MHC class I polypeptide-related sequence protein; TIM-3: T cell immunoglobulin domain and mucin domain-3. (Abbildung modifiziert nach (Chen und Mellman, 2013))

### 1.2.2 DIE REGULATION DER T-ZELLAKTIVIERUNG UND DIE KONTROLLE VON EFFEKTORFUNKTIONEN

Das priming sowie die Effektorfunktionen von T-Zellen sind auf mehreren Ebenen hochkontrollierte Prozesse, die die Entstehung von Autoimmunerkrankungen einerseits sowie die Überreaktion der Immunantwort auf einen pathogenen Einfluss und die Zerstörung von beispielsweise gesundem

Gewebe andererseits, unterbinden sollen. Das erste Signal zur Etablierung einer Immunantwort gegen einen definierten Stimulus ist, wie vorgängig beschrieben, die spezifische Erkennung eines Antigens durch T-Zellrezeptoren, welche nicht durch die negative Selektion der zentralen Toleranz aus dem T-Zell-Repertoire ausgeschlossen sind. Als evolutionäre Konsequenz dieses klonalen Selektionsmodells benötigt es aber eine extrathymische Toleranz, da das Immunsystem in der Lage sein muss, eine aufkommende Immunantwort gegenüber fremden, aber harmlosen Antigenen zu kontrollieren (Babcock u. a., 1987). Diese extrathymische Regulation der Immunantwort wird durch ein komplexes Netzwerk von kostimulatorischen Rezeptoren und Liganden, sogenannten Immuncheckpoint Molekülen (ICM), ausgeführt und gilt als zweites Signal der Immunantwort.

Die Aktivierung einer reifen T-Zelle erfolgt durch die Bindung des T-Zellrezeptorkomplexes mit seinem kognaten Antigen auf MHC. Dieser Kontakt wird durch die Moleküle CD8 bzw. CD4 stabilisiert, welche an nicht polymorphe Regionen von MHC-I bzw. MHC-II binden. Diese Interaktion führt zur Ausbildung einer immunologischen Synapse, in der weitere TZR assoziierter Proteine und kostimulatorische Signale integriert werden. Solche Synapsen werden auch von B- und NK-Zellen bei Kontakt mit ihren Zielzellen gebildet. Im Folgenden soll allerdings hauptsächlich auf die Interaktion von  $\alpha\beta$  T-Zellen mit APCs eingegangen werden. In der immunologischen Synapse werden drei unterschiedliche Arten von Rezeptoren vereint: Der T-Zellrezeptorkomplex, Adhäsionsmoleküle sowie kostimulatorische / Immuncheckpoint Moleküle (Dustin, 2014). Die Bindungsenergie der Adhäsionsmoleküle führt dabei T-Zelle und APC eng genug aneinander, um eine dauerhafte Interaktion von Rezeptoren und Liganden sowie eine präzise Ausübung der Effektorfunktion zu gewährleisten (Springer, 1990). Kostimulatorische und koinhibitorische Signale modifizieren in einem beträchtlichen Ausmaß den funktionellen Output der immunologischen Synapse (Yokosuka u. a., 2008). Nicht zuletzt deshalb wird dieser Regulationsmechanismus von Tumorzellen als ein wesentlicher Mechanismus zur Evasion des Immunsystems missbraucht (Pardoll, 2012). Die Bildung und Reifung der Synapse kann in vier Schritte gegliedert werden. Innerhalb der ersten 30 Minuten beim Kontakt einer  $CD4^+$  T-Zelle mit einer B-Zelle bilden sich Pseudopodien aus, welche die Zelle tief penetrieren, allerdings ohne eine schädliche Wirkung auszuüben (Ueda u. a., 2011). Ähnliche Beobachtungen wurden bereits Ende der 1970er-Jahre auch bei  $CD8^+$  T-Zellen gemacht (Sanderson und Glauert, 1979). Es wird spekuliert, dass dieser Effekt die Kontaktfläche zwischen T-Zelle und B-Zelle bzw. APC vergrößert (Xie u. a., 2013). Im zweiten Schritt der Formation der Synapse beginnt die Reorganisation der Mikrotubuli zwischen dem Centrosom, oder auch Mikrotubuli-organisierendes Zentrum (engl. *microtubule organizing center* (MTOC)), und der Zellmembran, welche im dritten Schritt nach ein bis zwei Stunden, in der Ausrichtung der Centriolen mit dem Golgi-Komplex auf Höhe der Kontaktstelle endet. Nach ungefähr vier Stunden sind im letzten Schritt die Zellmembranen der beiden Zellen flach aneinandergedrückt, der Golgi-Komplex der T-Zellen stark vergrößert und die ersten Zytokin-Sekretionen messbar (Xie u. a., 2013).

Eines der ersten Signale *downstream* nach Bindung des Antigens an den TZR ist die Aktivierung der Kinase Lck. Lck phosphoryliert darauffolgend die *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs* (ITAMs) an den TZR assoziierten CD3 Signalmolekülen. Die phosphorylierten CD3- $\zeta$  Untereinheiten rekrutieren daraufhin die Kinase *zeta chain of T-cell receptor associated protein kinase 70* (ZAP-70), welche das in der Plasmamembran lokalisierte Adaptermolekül *linker for activation of T-cells* (LAT) rekrutiert und ebenfalls phosphoryliert. Über LAT findet darauffolgend die von der Phospholipase C- $\gamma$  katalysierte hydrolytische Spaltung des membrangebundenen Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zu den beiden sekundären Botenstoffen Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) statt (Xie u. a., 2013). Der lösliche Botenstoff IP3 führt zum Einströmen von Calcium aus Calciumspeichern des ER ins Zytoplasma, was wiederum die Öffnung weiterer Calciumkanäle in der Zellmembran bewirkt. Die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration aktiviert die Phosphatase Calcineurin, welche den *nuclear factor of activated T cells* (NFAT) dephosphoryliert. NFAT ist einer der wichtigsten Transkriptionsfaktoren der T-Zellaktivierung, der darauffolgend die Transkription einer großen Anzahl an Genen, wie IL-2 steuert. Das membrangebundene DAG hingegen rekrutiert weitere Moleküle an die Plasmamembran, wodurch es zur Aktivierung der Proteinkinase C- $\theta$  (PKC) kommt. Über Zwischenschritte führt dies zur Translokation des Transkriptionsfaktors *nuclear factor  $\kappa$ B* (NF $\kappa$ B) in den Zellkern. Durch DAG wird ebenfalls das *RAS guanyl nucleotide-releasing protein* (RasGRP) rekrutiert, welches als Guanine Austauschfaktor die kleine GTPase Ras aktiviert, was schlussendlich zur Aktivierung des *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) Signalweges führt. Die Aktivierung des MAPK Signalweges endet schließlich in der Translokation des dritten für die T-Zellaktivierung wichtigen Transkriptionsfaktors *activator protein 1* (AP-1) (Bonilla und Oettgen, 2010).

Die Kinetik dieser Vielzahl an hauptsächlich durch Phosphorylierungen gesteuerten Aktivierungskaskade wird maßgeblich von einem komplexen Zusammenspiel von kostimulatorischen Rezeptoren und ihren agonistischen Liganden auf APCs oder Zielzellen gesteuert. Die Aktivierung reifer T-Zellen in Abwesenheit von Kostimulationen führt beispielsweise zu einer klonalen Deletion der aktivierten Zellen oder zu einem nicht responsiven Zustand der Anergie (Dustin, 2014; Jenkins und Schwartz, 1987). Antigen-präsentierende DCs können mitunter mit zehn spezifischen T-Zellen gleichzeitig Interaktionen eingehen, welche über mehrere Stunden andauern können (Bousso und Robey, 2003). Der am besten beschriebene kostimulatorische Rezeptor ist CD28, welcher innerhalb der immunologischen Synapse mit den Liganden CD80 und CD86 auf APCs oder Zielzellen interagiert (Tseng u. a., 2008). Die Expression von CD80 und CD86 auf DCs wird wiederum unter anderem durch DAMPs heraufreguliert (Fang u. a., 2014). CD28 selber hat keine enzymatisch katalytische Domäne, rekrutiert aber die Kinase Lck und führt damit indirekt zur Aktivierung der Proteinkinase-C und nachfolgend NF $\kappa$ B (Kong u. a., 2011). Neben dem bekannten kostimulatorischen Rezeptor CD28 ist in den letzten Jahren durch Sequenzanalysen des humanen Genoms die mögliche Existenz von bis zu

4000 neuen Molekülen postuliert worden, welche einen Einfluss auf die Regulation der Immunantwort haben könnten (Lander u. a., 2001). Einer dieser Rezeptoren ist das *cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4* (CTLA4), welches in intrazellulären Reservoiren gespeichert wird. Nach Aktivierung durch APCs erfolgt die Translokation an die Zellmembran, wo CTLA4 mit CD28 um die beiden Liganden CD80 und CD86 konkurriert und in dieser Form die Immunantwort balanciert (Schneider u. a., 2006). Neben CD28, CTLA4 sowie CD80 und CD86 ist noch eine Reihe weiterer Moleküle an der Regulation der Immunantwort beteiligt. Eine Vielzahl an kostimulatorischen Molekülen gehört der TNF-Proteinfamilie an, wie CD27, CD137, OX40, HVEM und DR3. Ebenfalls hat sich die Familie um CD28 um die kostimulatorischen Moleküle ICOS, DNAM-1, CRTAM und neben CTLA4 um die zusätzlichen koinhibitorischen Moleküle PD-1, BTLA-4, LAG-3, TIM-3, TIGIT und LAIR-1 erweitert, um nur eine Auswahl zu nennen. Die Interaktionen und das Zusammenspiel dieser vielen Moleküle zeigen eine enorme Komplexität in der Regulation der T-Zellaktivierung und Regulation der Effektorantwort auf, was eher einem Fließmodell ähnlich der Gezeitenströmungen (engl. *tide model*) nahekommmt, als einem simplen Ein/Aus-Schalter (Zhu u. a., 2011).

Aktivierte zytotoxische T-Zellen (engl. *cytotoxic T cells* (CTLs)) eliminieren ihre Zielzellen entweder durch die gezielte Freisetzung lytischer Granula in den synaptischen Spalt oder durch die Ligandierung des Todesliganden Fas (FasL) an den Fas-Rezeptor (FasR). Neben den CD8<sup>+</sup> T-Zellen können auch CD4<sup>+</sup> T-Zellen zytotoxische Funktionen ausüben, die in ihrer Hauptaufgabe eigentlich Zytokine sekretieren (Hahn u. a., 1995). Die Ligandierung von FasR an FasL löst über den *death-inducing signaling complex* (DISC) die Apoptose der Zielzellen aus. Während die Freisetzung lytischer Granula der Elimination pathologischer Zellen dient, stellt die Fas-medierte Zytotoxizität auch einen Bestandteil zur Regulation der Immunantwort dar (Page u. a., 1998). Beispielsweise verläuft die Elimination inflammatorischer Zellen, welche immunprivilegierte Organe wie das Auge infiltrieren, über Fas-vermittelte Apoptose, und ein Defekt des Fas-Systems führt zur Entstehung lymphoproliferativer Störungen und zu Autoimmunerkrankungen (Griffith u. a., 1995; Nagata und Golstein, 1995). Die lytischen Granula sind mit dem Mikrotubuli-Netzwerk der T-Zellen verbunden. Durch die Aktivierung der T-Zellen richtet sich das Mikrotubuli-organisierende Zentrum in Richtung des TZR-Stimulus innerhalb der immunologischen Synapse aus, und die Granula werden zur Zellmembran transportiert (Andersen u. a., 2006). Die Granula verschmelzen mit der Zellmembran an der sekretorischen Domäne zwischen der T-Zelle und der APC und sekretieren die darin enthaltenen zytotoxischen Proteine Perforin und die Granzyme A, B, H, K und M, wobei Granzym A und B die relevantesten Granzyme darstellen (Chowdhury und Lieberman, 2008). Die molekulare Funktionsweise von Perforin ist nicht vollständig verstanden. Die vereinfachte Darstellung, in der Perforin Poren in der Zellmembran der Zielzelle bildet und somit eine passive Diffusion der Granzyme in die Zielzelle ermöglicht, gilt als überholt. Heutzutage ist akzeptiert, dass die Perforinporen in der Plasmamembran der Zielzelle eine Calcium-abhängige endozytotische

Aufnahme der durch elektrostatische Wechselwirkung an die Zellmembran gebundenen Granzym-Moleküle bewirkt (Keefe u. a., 2005). Granzym-Moleküle können sich zudem über den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor anheften, dieser Rezeptor ist jedoch für die Aufnahme der Granzyme nicht obligat (Motyka u. a., 2000; Kurschus u. a., 2005). Eine kürzlich erschienene Studie konnte zudem zeigen, dass CTLs mechanische Kräfte über die immunologische Synapse auf die Zielzelle wirken lassen, wodurch die Bildung von Perforinporen verstärkt wird (Basu u. a., 2016). Die CTLs selber schützen sich vor dem Zelltod durch Granzym B durch die Expression Granzym B inaktivierender zytosolischer Serinproteasen (*serpins*) (Sun u. a., 1996). Zusätzlich wird an die CTL-Membran zurück geleitetes Perforin durch extrazelluläres Cathepsin B an der CTL-Membran proteolytisch inaktiviert (Balaji u. a., 2002). Innerhalb der Zielzelle lösen die Granzyme über drei unterschiedliche intrazelluläre Signalwege die Apoptose der Zielzelle aus. Granzym B induziert den Caspase-abhängigen Apoptoseweg durch Spaltung von Caspase-3 sowie die direkte Proteolyse einiger Caspasesubstrate. Granzym A hingegen fungiert über einen Caspase-unabhängigen mitochondrialen und DNA-zerstörenden Signalweg (Chowdhury und Lieberman, 2008).

Die Effektorfunktionen, die von einer CTL ausgeübt werden, verlaufen teilweise äußerst schnell, was die über Stunden andauernde Bildung einer immunologischen Synapse, wie es bei der Regulation der CD4<sup>+</sup> T-Zellaktivierung zur Zytokinsekretion der Fall ist, in Frage stellt. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass zur Ausbildung einer stabilen, vollentwickelten immunologischen Synapse die Interaktion von zehn Peptid-MHC-Komplexen notwendig ist, während für die Ausübung zytotoxischer Effektorfunktionen die Interaktion mit drei Peptid-MHC-Komplexen ausreicht (Purbhoo u. a., 2004). In diesem Kontext wurde deutlich, dass CTLs in der Lage sind, zwei unterschiedliche Arten von Synapsen auszubilden. Eine hohe Antigenichte führt dabei zur Ausbildung einer ausgereiften stimulatorischen Synapse, welche für die Zytokinsekretion der CTL und der damit verbundenen klonalen Expansion der aktivierten CTL von Bedeutung ist. Niedrige Antigenichten hingegen initiieren eine eher rudimentäre immunologische Synapse, die dennoch zur vollständigen Ausbildung der lytischen Maschinerie der CTL führt. Damit stellt die Ausübung der zytotoxischen Effektorfunktion einen weniger hohen Aktivierungsschwellenwert dar als die Formation einer vollentwickelten IS, und es ergibt sich ein Modell mit einem dualen Aktivierungsmuster für CTLs (Faroudi u. a., 2003). Darüber hinaus konnte kürzlich gezeigt werden, dass CTLs nicht zwangsläufig von Zielzelle zu Zielzelle wandern, sondern vielmehr mit bereits getöteten Zielzellen verbunden bleiben, während sie weitere Zielzellen eliminieren. Dabei sind die CTLs durch die Polarisierung lytischer Granula auf unterschiedliche Zielzellen in der Lage, mehrere Zielzellen gleichzeitig zu töten. Durch diesen dynamischen Prozess sind das rapide Abtöten vieler Zielzellen einerseits und die kontinuierliche Stimulation der CTL andererseits möglich (Wiedemann u. a., 2006).

### 1.2.3 DYSFUNKTIONALE T-ZELLEN

Wie eingangs beschrieben sind zytotoxische T-Zellen durchaus in der Lage, anti-Tumor-spezifische Immunantworten durch die Erkennung von Tumor-spezifischen Antigenen auszuüben. Die Anwesenheit Tumor-infiltrierender Lymphozyten (TILs) gilt in vielen soliden Tumorentitäten als ein guter prognostischer Marker für den Krankheitsverlauf (Zarour, 2016). Trotz der hohen Anzahl Tumor-spezifischer TILs kommt es jedoch in vielen Fällen zu einer Progression der Erkrankung (Rosenberg u. a., 2005). Dieses Paradoxon ist einer Vielzahl negativer immunoregulatorischer Mechanismen geschuldet, die durch die chronische Exposition von Neoantigenen des Tumors hervorgerufen wird. Diese Phänomene wurden zu allererst bei der Erforschung chronischer Viruserkrankungen mit hoher Virusreplikation, wie beim humanen Immundefizienz-Virus oder der lymphozytären Choriomeningitis, beobachtet. Die diesen Zustand verursachenden negativen Regulationsmechanismen lassen sich in vier wesentliche Bestandteile gliedern: i) Die aberrante Expression koinhibitorischer Rezeptoren der T-Zellregulation (im folgenden Immuncheckpoint Moleküle) wie z.B. PD-1, ii) die vermehrte Ausschüttung antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10, sowie iii) die vermehrte Existenz von T-Zellsubtypen wie regulatorischer T-Zellen (Wherry, 2011). Im Kontext der Krebserkrankung ist zudem iv) die zusätzliche metabolische Restriktion durch den hohen Energieverbrauch der Tumorzellen und daraus resultierenden Mangel an Glucose ein wichtiger Faktor bei der Entstehung dieser dysfunktionalen T-Zellen (Zarour, 2016). Die Entstehung solcher dysfunktionalen oder auch entkräfteten T-Zellen (engl. *exhausted T cells*) ist ein stufenweise verlaufender Prozess, dessen Schwere mit der Menge an exponierten Antigenen korreliert (Wherry u. a., 2003). Die dauerhafte Exposition von Antigenen führt bei chronischen Infektionen sowie Tumorerkrankungen zu einer Heraufregulation von Immuncheckpoint-Molekülen (ICMs). Wie eingangs erwähnt führt die verstärkt durchgeführte wissenschaftliche Forschung auf diesem Gebiet zu der kontinuierlichen Entdeckung neuer ICMs. In den letzten Jahren haben dabei Moleküle wie CTLA4, PD-1, *T-cell immunoglobulin mucin receptor 3* (TIM-3), *lymphocyte activating 3* (LAG3) und der *T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains* (TIGIT) maßgeblich zum Verständnis der tumorinduzierten negativen Beeinflussung des Immunsystems beigetragen. Dabei wurde deutlich, dass die chronische Aktivierung des TZR durch Tumorantigene zu einer Heraufregulation von einer Vielzahl unterschiedlicher ICMs in dysfunktionalen tumorspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen führt (Gros u. a., 2014). Auch wenn die Expression von ICMs auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen charakteristisch für die Pathogenese einer fortgeschrittenen Tumorerkrankung ist, so lassen sich einige ICMs, wie PD-1, auch auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen gesunder Menschen detektieren, was in diesem Fall jedoch eher den T-Zellsubtyp der Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (engl. *effector memory*) beschreibt (Duraiswamy u. a., 2011). Die ICMs interagieren mit ihren jeweiligen Liganden, die von APCs in der Tumormikroumgebung (engl. *tumor microenvironment*) sowie vom Tumor selbst exprimiert werden.

Die Interaktion mit den jeweiligen Liganden reguliert über eine Reihe unterschiedlicher Mechanismen die Effektorantwort der T-Zellen, wobei die exakte Funktionsweise der ICMs noch nicht geklärt werden konnte (Zarour, 2016). Die Blockierung von ICMs oder deren Liganden mit Antikörpern stellt einen wesentlichen Bestandteil der Immuntherapie dar (Pardoll, 2012). Der das Immuncheckpoint Molekül CTLA4 blockierende Antikörper Ipilimumab kann als ein Meilenstein dieser neuen Therapiestrategie betrachtet werden, da durch den Einsatz in klinischen Studien bei ca. 20 % der Patienten länger andauernde Remissionen erreicht werden konnten, was zur klinischen Zulassung von Ipilimumab zur Behandlung des malignen Melanoms durch die amerikanische Behörde für Lebens- und Arzneimittel (engl. *Food and Drug Administration* (FDA)) im Jahre 2011 führte (Hodi u. a., 2010). In Einklang mit diesen Daten konnten mit dem Einsatz der PD-1 blockierenden Antikörper Pembrolizumab und Nivolumab bei vielen Tumorentitäten wie dem Melanom, dem Hodgkin-Lymphom sowie bei Blasen- und Lungenkrebs klinische Erfolge erzielt werden (Topalian u. a., 2012; Brahmer u. a., 2012). Beide Medikamente wurden deshalb ebenfalls von der FDA für die Therapie des Melanoms und des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms zugelassen. In vielen präklinischen Studien konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass die therapeutische Blockierung multipler ICMs Vorteile gegenüber der Monotherapie bietet (Zhou u. a., 2011; Chauvin u. a., 2015; Yu u. a., 2010; Jing u. a., 2015). Das gleichzeitige *Targeting* von CTLA4 und PD-1 zur Behandlung des Melanoms konnte in klinischen Studien ebenfalls gegenüber der Monotherapie überzeugen (Wolchok u. a., 2013; Larkin u. a., 2015; Postow u. a., 2015). Neueste Erkenntnisse liefern Einsichten in die transkriptionellen Veränderungen in dysfunktionalen T-Zellen (Wherry und Kurachi, 2015). In weiteren Arbeiten konnte zwar gezeigt werden, dass durch eine Blockade der Interaktion von PD-1 mit seinen Liganden PD-L1 und PD-L2 der funktionelle Status der Effektorzellen wieder belebt werden konnte, die Zellen bei bleibender hoher Antigenkonzentration nach Absetzen des Inhibitors jedoch direkt wieder in den dysfunktionalen Phänotyp zurückfielen und bei Entfernung des Antigenstimulus nicht in T-Gedächtniszellen differenzierten. Der Grund für das Unvermögen der dysfunktionalen T-Zellen, dauerhaft in einen physiologischen Effektorstatus zurückzugelangen, konnte in der Reorganisation der epigenetischen Landschaft gefunden werden. Die Unfähigkeit, die Umstrukturierung der epigenetischen Eigenschaften rückgängig zu machen, könnte den Erfolg momentaner Immuntherapien beeinflussen (Pauken u. a., 2016; Sen u. a., 2016).

Durch die in den letzten Jahren durchgeführten Forschungsarbeiten hat sich eine Vielzahl an Definitionen für tumor-spezifische, entkräftete T-Zellen gebildet. Die Entwicklung eines solchen Phänotyps verläuft stufenweise. Das Konsortium um Apetoh und Kollegen hat deshalb eine Konsensusnomenklatur vorgeschlagen, welche die unterschiedlichen Phänotypen dieser CD8<sup>+</sup>T-Zellen umschreibt, und hat die Begriffe terminale Effektorzellen, dysfunktionale-, senescente- und *stem like*-T-Zellen eingeführt (Apetoh u. a., 2015). Danach sind terminale Effektor-T-Zellen durch die Expression

des Oberflächenmarkers *killer-cell lectin like receptor G1* (KLRG1) und die fehlende Expression der *homing* Rezeptoren CD62L und CCR7 sowie des kostimulatorischen Rezeptors CD28 charakterisiert. Zudem weisen diese T-Zellen eine hohe Expression der Transkriptionsfaktoren *eomes* und *Id2* auf. Terminale Effektorzellen schütten wenig IL-2, aber viel TNF- $\alpha$  und INF- $\gamma$  aus. Sie sind noch in der Lage, zytotoxische Effektorfunktionen auszuüben, haben aber ein gestörtes Selbsterneuerungspotential (engl. *self-renewal*). Dysfunktionale T-Zellen exprimieren mehrere ICMs und haben diverse Störungen in ihren Effektorfunktionen, wie eine gestörte Proliferation nach antigenem Stimulus, fehlende Zytotoxizität und die fehlende Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-2, TNF- $\alpha$  und INF- $\gamma$ . Das Spektrum innerhalb der dysfunktionalen T-Zellen reicht von schwacher bis starker Dysfunktion. Der Zustand seneszenten T-Zellen ist durch die Expression der Oberflächenmarker KLRG-1 und CD57 gekennzeichnet, während die kostimulatorischen Rezeptoren CD27 und CD28 nicht exprimiert werden. Seneszente T-Zellen haben zudem kurze Telomere, befinden sich in einem irreversiblen Zellzyklusarrest, exprimieren eine Vielzahl an Genen der DNA-Reparaturmechanismen und sekretieren IL-6 und IL-8. Der gesunde Phänotyp einer Effektor-T-Zelle wird als *stem-like T cell* bezeichnet. Diese Zellen exprimieren CCR7, CD62L, CD45RA, CD27 und CD28. Zudem exprimieren sie die Transkriptionsfaktoren *Id2* und *Tcf7*. *Stem-like T cells* haben das Potential der Selbsterneuerung und verfügen über effiziente zytotoxische Effektorfunktionen (Apetoh u. a., 2015).

### 1.3 DIE IMMUNCHECKPOINT-ACHSE TIGIT-PVR/PVRL2

Von großer Bedeutung für die Regulation der Immunantwort über ICMs ist der koinhibitorische Rezeptor *T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains* (TIGIT), der durch Bindung seiner Liganden *poliovirus receptor* (PVR) oder *poliovirus receptor-related 2* (PVRL2) durch multiple Mechanismen einen negativen Regulator der Immunantwort darstellt und dadurch eine Schlüsselrolle als Inhibitor des *cancer immunity cycles* einnimmt (Manieri u. a., 2017). Der Rezeptor TIGIT wird ausschließlich auf Lymphozyten exprimiert, und die Expression konnte bisher auf aktivierten und Gedächtnis-T-Zellen, auf Zytokin-induzierten Killerzellen (engl. *cytokine-induced killer cells* (CIKs)), regulatorischen T-Zellen, folliculären T-Helferzellen sowie NK- und NKT-Zellen nachgewiesen werden (Yu u. a., 2009; Stanietzky u. a., 2009; Levin u. a., 2011; Joller u. a., 2014, 2011; Boles u. a., 2009; Zhang u. a., 2016). TIGIT ist ein Typ-1-Transmembranprotein der Immunglobulin-Superfamilie und verfügt über eine extrazelluläre Immunglobulin *variable-set* (IgV) Domäne, die charakteristische Typ-1 Transmembrandomäne sowie einen intrazellulären Anteil, welcher ein *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif* (ITIM) und ein *immunoglobulin tyrosine tail* (ITT) Motiv beinhaltet (Yu u. a., 2009). Die extrazelluläre IgV Domäne besitzt ein konserviertes (V/I)(S/T)Q, ein AX6G und ein T(F/Y)PX1G Submotiv und gruppiert damit den

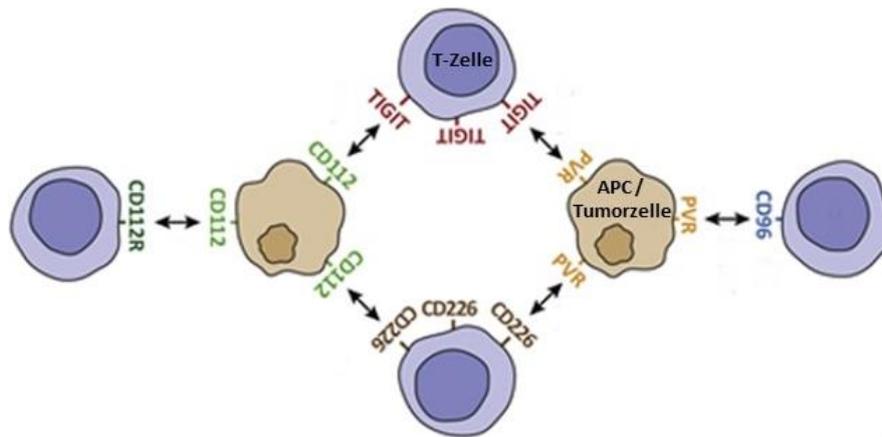
Rezeptor TIGIT in die PVR/Nectin-Proteinfamilie ein, zu der neben PVR (Nectin-like 5 (NECL5)) und PVRL2 (NECTIN2) auch DNAM-1 (CD226), CD96 und PVRL3 (NECTIN3, CD113) gezählt werden. Als Bindungspartner für TIGIT wurde neben dem hochaffinen Liganden PVR und dem weniger affinen Liganden PVRL2 auch PVRL3 als schwach bindender Ligand identifiziert (Yu u. a., 2009). Die Beteiligung der Bindung von PVRL3 an TIGIT in einem funktionellen Kontext wurde bisher jedoch nicht beschrieben.

Nectin- und Nectin-like-Proteine sind als Oberflächenrezeptoren an der Zell-Zelladhäsion durch *adherence junctions*, an der Gewebeorganisation, an der Zellpolarisation und über heterophile sowie homophile *trans*-Interaktionen an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt (Fabre u. a., 2002; Sakisaka und Takai, 2004). Zudem wurde für PVR und PVRL2 die Beteiligung an der homophilen hämatopoetischen und endothelialen Adhäsion sowie an der monozytären Transmigration nachgewiesen (Lopez u. a., 1998; Gerhardt und Ley, 2015; Samanta u. a., 2012). PVR wurde initial als der Eintrittsmediator für das Poliovirus beschrieben und dient über diesen Rezeptor als eine extraneurale Replikationsstätte des Poliovirus in hämatopoetischen Zellen (Nobis u. a., 1985; Freistadt u. a., 1993). Ähnliche Beobachtungen konnten für PVRL2 in Bezug auf das Herpes Simplex Virus gemacht werden (Martinez und Spear, 2001; Cocchi u. a., 2000; Fujimoto u. a., 2016). Die Gene für PVR und PVRL2 sind beide auf Chromosom 19q13 lokalisiert. Dieser chromosomale Abschnitt wurde bereits mit der Entstehung der Multiplen Sklerose assoziiert. Eine Rolle dieser beiden Proteine bei der Pathogenese der Multiplen Sklerose konnte allerdings bisher nicht bestätigt werden (Rosche u. a., 2004; Ramagopalan u. a., 2007). Eine Assoziation von PVR und PVRL2 in der Entstehung der Lippen- und Gaumenspalte konnte hingegen bereits mehrfach gezeigt werden (Pezzetti u. a., 2007; Warrington, 2006; Sözen u. a., 2009). Zudem wurde das Vorhandensein bestimmter Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl. *single nucleotide polymorphisms* (SNPs)) im Gen für PVRL2 mit der Entstehung der Alzheimer-Krankheit in Verbindung gebracht (Logue u. a., 2011; Takei u. a., 2009). SNPs im Gen für PVRL2 wurden überdies ebenfalls mit dem LDL-Cholesterolfstoffwechsel und der Entstehung koronarer Herzerkrankungen assoziiert (Freitas u. a., 2002; Talmud u. a., 2009).

Der Rezeptor TIGIT spielt nicht nur bei der Entstehung und Progression von Krebserkrankungen eine Rolle, sondern hat auch einen erheblichen Einfluss bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen. Ein homozygoter *knockout* von TIGIT in Mäusen führt im Gegensatz zum *knockout* von CTLA4 nicht zur Entstehung von Immunopathien, was vermuten lässt, dass TIGIT beim *priming* von T-Zellen eine untergeordnetere Rolle zukommt als CTLA4 (Levin u. a., 2011). In einem Modell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis entwickelten TIGIT<sup>-/-</sup>-Mäuse jedoch ein deutlich schwerwiegenderes Krankheitsbild als Wildtypmäuse (Joller u. a., 2011; Levin u. a., 2011). Darüber hinaus konnte in den Arbeiten von Levin und Kollegen gezeigt werden, dass der homozygote TIGIT *knockout* sowie die

Blockade mit einem anti-TIGIT Antikörper zu einer stärkeren Autoimmunreaktion bei Transplantat-gegen-Wirt-Reaktionen (engl. *graft-versus-host disease* (GVHD)) sowie bei einem Modell der Kollagen-induzierten Arthritis führte (Levin u. a., 2011). Zudem konnte die Typ-IV-Hypersensitivität durch die Blockierung der TIGIT-Liganden mit einem TIGIT-Fc-Fusionsprotein in Abhängigkeit von IL-10 inhibiert werden (Yu u. a., 2009).

Die Liganden PVR und PVRL2 üben nicht nur über TIGIT eine negative Regulation der Immunantwort aus. Ferner konnten der koinhibitorische Rezeptor CD96 (*T cell activation, increased and late expression* (tactile)) als Bindungspartner für PVR und CD112R als Bindungspartner für PVRL2 identifiziert werden (Wang u. a., 1992; Fuchs u. a., 2004; Zhu u. a., 2016). Zudem binden PVR und PVRL2 an den kostimulatorischen Rezeptor *DNAX accessory molecule-1* (DNAM, CD226), welcher auf NK-Zellen, T-Zellen und Monozyten exprimiert wird (Burns u. a., 1985; Shibuya u. a., 1996; Bottino u. a., 2003; Pende u. a., 2005a). Das Gleichgewicht zwischen TIGIT und DNAM-1 kann in gewisser Analogie zu CD28 und CTLA4 betrachtet werden (Lozano u. a., 2012; Pauken und Wherry, 2014). Die Interaktionen von PVR und PVRL2 mit ihren Rezeptoren sind schematisch in Abbildung 2 dargestellt. Die Kristallstrukturen von TIGIT mit seinen Liganden PVR und PVRL2 konnten kürzlich aufgeklärt werden (Stengel u. a., 2012; Samanta u. a., 2017). Dabei bindet TIGIT jeweils an ein PVR Molekül im Schlüssel-Schloss-Prinzip, und dieses TIGIT/PVR-Dimer bildet ein Heterodimer mit einem TIGIT/TIGIT *cis*-Homodimer (siehe Abbildung 3) (Stengel u. a., 2012). Obwohl die Affinität von TIGIT zu PVRL2 um ein Vielfaches kleiner ist, wird für die Bindung von PVRL2 ein ähnliches Bindungsmodell angenommen, bei dem das Aminosäuremotiv <sup>112</sup>TYP<sup>114</sup> von TIGIT eine entscheidende Rolle bei der Interaktion spielt (Samanta u. a., 2017).



**Abbildung 2: Die bekannten Interaktionen von PVR und PVRL2 mit ihren Rezeptoren.** TIGIT, exprimiert auf allen T-Zellsubtypen und NK-Zellen, interagiert mit PVR und PVRL2 auf Antigen-präsentierenden Zellen (engl. *antigen presenting cell* (APC)) bzw. Tumorzellen. Zudem wurde die jeweilige Interaktion von CD96 oder CD112R auf T-Zellen mit PVR bzw. PVRL2 beschrieben. PVR und PVRL2 sind gleichzeitig auch Ligand für den immunstimulierenden Rezeptor DNAM-1, dessen Expression ebenfalls auf einer Reihe von Immunzellen beschrieben wurde. (Abbildung modifiziert nach (Manieri u. a., 2017))

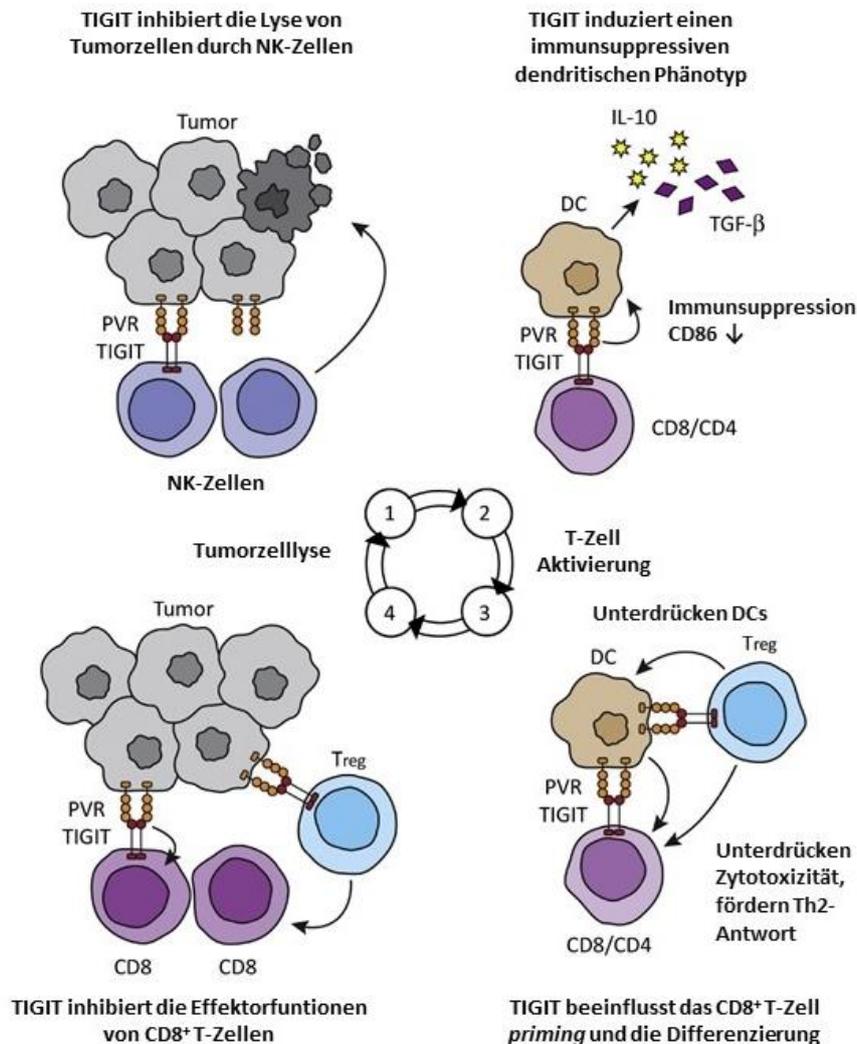
Durch die Interaktion von PVR und PVRL2 mit dem Rezeptor TIGIT ergeben sich auf vier Ebenen gravierende Schnittstellen zur negativen immunregulatorischen Beeinflussung des oben eingeführten *cancer immunity cycle* (Manieri u. a., 2017). Die erste Abwehr gegenüber malignen Zellen wird häufig durch die zytotoxische Wirkung von NK-Zellen vermittelt. Die inhibierende Wirkung von TIGIT auf NK-Zellen nach Ligation der Liganden PVR und PVRL2 auf Tumorzellen wurde beim Menschen wie auch bei Mäusen beschrieben (Stanietsky u. a., 2009, 2013). Bei NK-Zellen wird die inhibierende Wirkung durch die intrazelluläre ITIM-Domäne vermittelt, was durch mutierte Varianten der ITIM-Domäne von TIGIT nachgewiesen werden konnte (Stanietsky u. a., 2009). Andererseits konnte gezeigt werden, dass die Ligation von PVR an TIGIT auf NK-Zellen über die Ausschaltung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs die verminderte Produktion des pro-inflammatorischen Zytokins IFN- $\gamma$  zur Folge hat. Dabei führt die Phosphorylierung des ITT-like Motivs zur Rekrutierung des Adaptorproteins  $\beta$ -*arrestin 2*, welches im Folgenden die SH2-containing inositol phosphatase 1 (SHIP1) rekrutiert. SHIP1 vermindert die Autoubiquitylierung von *TNF receptor-associated factor 6*, wodurch die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktors verhindert wird. Ein *knockout* von TIGIT auf NK-Zellen führt hingegen zu einer verstärkten Produktion von IFN- $\gamma$  (Li u. a., 2014). Ein weiterer Mechanismus in NK-Zellen wurde von Liu und Kollegen beschrieben. In diesem Modell führt die Phosphorylierung des ITT-Motivs an Tryosin<sup>225</sup> zur Bindung des Adaptorproteins *growth factor receptor-bound 2* (Grb2) und darüber zur Rekrutierung von SHIP1. Hierbei kommt es darauffolgend zu einer Terminierung des Phosphatidylinositol-3-Kinase- und des MAPK-Signalwegs. Zudem konnten die Autoren zeigen, dass eine Ligation von PVR an TIGIT zu einer Gruppierung von TIGIT in der immunologischen Synapse führt, was eine Störung der Reorganisation des *microtubule organizing center* und dadurch die verhinderte

Polarisierung und Ausschüttung lytischer Granula in den synaptischen Spalt zur Folge hatte (Liu u. a., 2013). Die Expression von TIGIT auf NK-Zellen variiert in gesunden Menschen, und die Stärke der TIGIT-Expression korreliert negativ mit der Fähigkeit der NK-Zellen, PVR-exprimierende Zielzellen zu töten, sowie mit der Fähigkeit IFN- $\gamma$  zu produzieren, wodurch die Expressionsstärke von TIGIT maßgeblich an der funktionellen Heterogenität von NK-Zellen beteiligt ist (Wang u. a., 2015a). Der genaue Signalweg von TIGIT in primären T-Zellen ist noch nicht weit genug aufgeklärt. Es kann allerdings davon ausgegangen werden, dass sehr starke Analogien zu der Signalübertragung in NK-Zellen existieren. Die Arbeiten von Joller und Kollegen weisen darauf hin, dass TIGIT die Bildung des T-Zellrezeptorkomplexes stört, da ein agonistischer anti-TIGIT-Antikörper zu einer Herunterregulation der Expression der TZR- $\alpha$ -Kette und CD3 $\epsilon$  führte (Joller u. a., 2011).

TIGIT fungiert im *cancer immunity cycle* ebenfalls als funktioneller Ligand für PVR auf DCs. Yu und Kollegen konnten beweisen, dass die Aktivierung von PVR auf DCs nach Bindung von TIGIT auf T-Zellen zur Ausbildung eines tolerogenen Phänotyps der DCs führt, was durch eine erhöhte Expression von IL-10 und verminderte Expression von IL-12 der DCs gekennzeichnet ist (Yu u. a., 2009). TIGIT kann ebenfalls direkt die IL-10-Konzentration erhöhen, da eine Bindung von TIGIT auf regulatorischen T-Zellen zu einer vermehrten Ausschüttung von IL-10 führt (Joller u. a., 2014). Zusätzlich greift TIGIT in die Regulation des Zytokinmilieus ein, indem TIGIT die T-Zelldifferenzierung von den pro-inflammatorischen Phänotypen der Th1- und Th17-Zellen hin zu anti-inflammatorischen und IL-10 sekretierenden Th2-Zellen polarisiert (Kourepini u. a., 2016). IL-10 wirkt direkt negativ auf die T-Zellproliferation und vermindert die Antigenpräsentation von APCs, was die anti-inflammatorischen Effekte in der Tumormikroumgebung weiter verstärkt. TIGIT wird zudem konstitutiv auf regulatorischen T-Zellen (Tregs) exprimiert und steuert die Funktion dieser anti-inflammatorischen Zellen maßgeblich (Joller u. a., 2014; Fuhrman u. a., 2015). In diesem Zusammenhang wurde durch Daten eines murinen Mausmodells ebenfalls postuliert, dass TIGIT die globale anti-Tumor-Immunität über Tregs und nicht über zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen reguliert (Kurtulus u. a., 2015). Kontrovers dazu stehen die Arbeiten von Johnston und Kollegen, die beeindruckend belegen, dass TIGIT sowohl die anti-Tumor-Immunität als auch antivirale Immunität durch die Regulation der CD8<sup>+</sup> Effektorzellen steuert (Johnston u. a., 2014). In diesen Modellen sahen die Autoren keinen Effekt von TIGIT auf die Regulation von Tregs (Johnston u. a., 2014). Darüber hinaus konnte in einem Melanommodell die Regulation der Effektorantwort durch TIGIT nach Interaktion mit PVR bestätigt werden (Inozume u. a., 2016). Die Antikörperblockade von TIGIT oder ein TIGIT *knockdown* konnten die Effektorfunktionen von T-Zellen aus Melanom- und AML-Patienten wieder herstellen (Chauvin u. a., 2015; Kong u. a., 2016). TIGIT ist auf TILs verstärkt exprimiert, und diese zeigen einen dysfunktionalen Phänotyp, der durch eine verminderte Expression pro-inflammatorischer Zytokine, einer erhöhten Expression von IL-10 und gestörter Freisetzung lytischer Granula gekennzeichnet ist (Johnston u. a., 2014; Kurtulus

u. a., 2015). Die verschiedenen Beeinflussungen des Rezeptors TIGIT in den *cancer immunity cycle* sind in Abbildung 3 schematisch zusammengefasst.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der TIGIT-PVR/PVRL2-Achse als Zielstruktur zur Therapie der akuten myeloischen Leukämie untersucht. Daher werden in den folgenden Abschnitten zunächst die Pathophysiologie sowie die aktuellen Therapiekonzepte der AML erläutert.



**Abbildung 3: Darstellung der negativen Beeinflussung von TIGIT auf den *Cancer Immunity Cycle*.** TIGIT beeinflusst den Verlauf und die Verstärkung des Kreislaufs auf vier Arten. Die erste Abwehr von Tumorzellen wird durch die Lyse dieser Zellen durch NK-Zellen gewährleistet, wodurch es zu einer Freisetzung von tumorspezifischen Neoantigenen kommt. TIGIT inhibiert die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität durch die Ligation von PVR auf Tumorzellen. Zudem führt die Interaktion von TIGIT auf T-Zellen mit PVR und PVRL2 auf dendritischen Zellen (engl. *dendritic cells* (DCs)) zur Ausbildung eines immunsuppressiven DC-Phänotyps, was die Antigenpräsentation der DCs vermindert und zusätzlich zu einem immuninhibierenden Zytokinmilieu beiträgt. PVR und PVRL2 auf DCs beeinträchtigen hingegen das *priming* von Effektorzellen und die Interaktion TIGIT<sup>+</sup> regulatorischer T-Zellen mit diesen DCs führt wiederum zu einer negativen Beeinflussung von DCs und zu einer Polarisation der CD4<sup>+</sup> T-Helferzellentwicklung zu einem immunsuppressiven Th2-Phänotyp. Im finalen Schritt des Zyklus, der Elimination von Tumorzellen durch zytotoxische Effektorzellen, supprimiert die Interaktion von PVR und PVRL2 auf Tumorzellen mit TIGIT direkt oder über regulatorische T-Zellen die zytotoxischen Effektorfunktionen tumorspezifischer CD8<sup>+</sup> zytotoxischer T-Zellen. (Abbildung modifiziert nach (Manieri u. a., 2017))

## 1.4 DIE AKUTE MYELOISCHE LEUKÄMIE (AML)

Im Jahre 2012 erkrankten etwa 13.500 Menschen in Deutschland an einer Leukämie, wobei bei ca. einem Viertel der Betroffenen eine akute myeloische Leukämie (AML) diagnostiziert wurde (Kaatsch u. a., 2015). Krebs entwickelt sich durch somatische Mutationen in Genen, durch die ein bestimmter Klon einen selektiven Vorteil durch die Verbesserung des Überlebens oder der Reproduktion in seiner Umgebung erhält. Solche Mutationen werden als *Driver-Mutationen* bezeichnet und sorgen für die komplexe biologische und klinische Vielfalt dieser Erkrankungen. Die AML ist eine maligne Erkrankung des blutbildenden Systems, bei der frühe hämatopoetische Vorläuferzellen durch die Akkumulation von Mutationen zum einen proliferative Vorteile erlangen und zum anderen in ihrer hämatopoetischen Differenzierung gestört sind (Kihara u. a., 2014). Durch die Analyse von *Driver-Mutationen* in 111 unterschiedlichen in der AML relevanten Krebsgenen und die Kombination mit dem zytogenetischen Profil sowie den klinischen Daten von 1540 AML-Patienten aus drei klinischen Studien mit intensiver Chemotherapie, konnten genetische Subgruppen und ihre Relevanz für den klinischen Verlauf der Erkrankung bestimmt werden (Papaemmanuil u. a., 2016). Die neu aufgelegte WHO-Klassifikation implementiert in mehreren unterschiedlichen Krankheitsgruppen neueste Erkenntnisse aus genetischer Information und Morphologie (Arber u. a., 2016). Obwohl in der Studie von Papaemmanuil und Kollegen 96 % der analysierten Patienten eine *Driver-Mutation* aufwiesen, ließen sich interessanterweise 48 % der Patienten nicht in die molekularen Subgruppen-Klassifikationen der 2008 neu auferlegten *World Health Organization* (WHO) Klassifikation eingliedern. In den Analysen ergaben sich vielmehr Muster von Mutationen, welche häufig gemeinsam in AML-Patienten auftreten, wodurch elf molekulare Subgruppen gebildet werden konnten. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Deutlich wurde in diesen Analysen, dass Punktmutationen für 73 % der *Driver-Mutationen* verantwortlich waren. Obwohl bekannt war, dass bestimmte Mutationen häufig gepaart mit anderen auftreten, konnten in dieser Analyse viele neue, häufig gemeinsam auftretende Mutationen gefunden werden. Das Auftreten von Mutationen kann auch nur einen Subklon betreffen. Leukämien bestehen deshalb oft aus einer heterogenen Mischung unterschiedlicher Klone, deren Anzahl sich spontan oder durch die Therapie vergrößern oder verkleinern kann (Shlush u. a., 2014). Durch die in der Studie durchgeführte Analyse konnte nachgewiesen werden, dass die Entwicklung der AML einen spezifischen und geordneten Verlauf an Mutationen aufzeigt. Mutationen in den Genen, welche an der epigenetischen Modifizierung beteiligt sind, wie *DNMT3A*, *ASXL1*, *IDH1/2* und *TET2*, treten dabei häufig als erstes auf. Mutationen im Gen für *NPM1* sind häufig als zweite Mutation zu finden (Papaemmanuil u. a., 2016).

**Tabelle 1: Die von Papaemmanuil und Kollegen vorgeschlagene neue genomische Klassifikation der AML**  
(Tabelle adaptiert nach (Papaemmanuil u. a., 2016))

Genetische Subgruppe: AML mit	Häufigkeit in 1540 Patienten	am häufigsten mutierte Gene (in %)*
<b><i>NPM1</i>-Mutation</b>	27 %	<i>NPM1</i> (100), <i>DNMT3A</i> (54), <i>FLT3<sup>ITD</sup></i> (39), <i>NRAS</i> (19), <i>TET2</i> (16), <i>PTPN11</i> (15)
mutiertem Chromatin, <i>RNA-Splicing</i> Genen oder beidem **	18 %	<i>RUNX1</i> (39), <i>MLL<sup>PTD</sup></i> (25), <i>SRSF2</i> (22), <i>DNMT3A</i> (20), <i>ASXL1</i> (17), <i>STAG2</i> (16), <i>NRAS</i> (16), <i>TET2</i> (15), <i>FLT3<sup>ITD</sup></i> (15)
<b><i>TP53</i>-Mutationen, Chromosomaler Aneuploidie oder beidem ***</b>	13 %	Komplexer Karyotyp (68), -5/5q (47), -7/7q (44), <i>TP53</i> (44), -17/17p (31), -12/12p (17), +8/8q (16)
<b>inv(16)(p13.1;q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i></b>	5 %	inv(16) (100), <i>NRAS</i> (53), +8/8q (16), +22 (16), <i>KIT</i> (15), <i>FLT3<sup>TKD</sup></i> (15)
<b>biallelischen <i>CEBPA</i>-Mutationen</b>	4 %	<i>CEBPA<sup>biallelisch</sup></i> (100), <i>NRAS</i> (30), <i>WT1</i> (21), <i>GATA2</i> (20)
<b>t(15;17)(q22;q12); <i>PML-RARA</i></b>	4 %	t(15;17) (100); <i>FLT3<sup>ITD</sup></i> (35); <i>WT1</i> (17)
<b>t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i></b>	4 %	t(8;21) (100), <i>KIT</i> (38), -Y (33), -9q (18)
<b><i>MLL</i> Fusionsgenen; t(x;11)(x;q23) ****</b>	3 %	t(x11q23) (100); <i>NRAS</i> (23)
<b>inv(3)(q21;q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2); <i>GATA2, MECOM (EVI1)</i></b>	1 %	inv(3) (100), -7 (85) <i>KRAS</i> (30), <i>NRAS</i> (30), <i>PTPN11</i> (30), <i>ETV6</i> (15), <i>PHF6</i> (15), <i>SF3B1</i> (15)
<b><i>IDH2<sup>R172</sup></i> Mutationen und keine anderen Subgruppen-definierenden Läsionen</b>	1 %	<i>IDH2<sup>R172</sup></i> (100); <i>DNMT3A</i> (67); +8/8q (17)
<b>t(6;9)(q23;q34); <i>DEK-NUP214</i></b>	1 %	t(6;9) (100); <i>FLT3<sup>ITD</sup></i> (80), <i>KRAS</i> (20)
<b>Driver-Mutationen, aber ohne detektierbare Subgruppen-definierende Läsionen</b>	11 %	<i>FLT3<sup>ITD</sup></i> (39), <i>DNMT3A</i> (16)
<b>nicht detektierbaren Driver-Mutationen</b>	4 %	
<b>AML, welche 2 oder mehr Kriterien entsprachen</b>	4 %	

\* Gene welche mit einer Häufigkeit von 15 % oder mehr mutiert sind

\*\* Klassifikation in diese Subgruppe bedeutet eine oder mehr *Driver-Mutationen* in den Genen: *RUNX1*, *ASXL1*, *BCOR*, *SAG2*, *EZH2*, *SRSF2*, *SF3B1*, *USAF1*, *ZRSR2* oder *MLL<sup>PTD</sup>*. Wenn Subgruppen-definierende Läsionen vorhanden sind wie inv(16), t(15;17), t(8;21), t(6;9), *MLL* Fusionsgene, ein komplexer Karyotyp oder *Driver-Mutationen* in *TP53*, *NPM1* oder *CEBPA<sup>biallelisch</sup>*, sind zwei oder mehr *Chromatin-Spliceosome-Mutationen* notwendig.

\*\*\* Klassifikation in diese Subgruppe bedingt eine *TP53*-Mutation, einen komplexen Karyotyp oder in Abwesenheit anderer Subgruppen-definierenden Läsionen eine oder mehrere der folgenden Läsionen: -7/7q, -5/5q, -4/4q, -9q, -12/12p, -17/-17p, -18/18q, -20/20q, +11/11q, +13, +21 oder +22.

\*\*\*\* Es konnten mehrere Fusionsproteine als Partner für *MLL* identifiziert werden. Die klinische Implikation ist abhängig vom Fusionsprotein.

Die akute Leukämie wird bei einem Vorhandensein von mehr als 20 % Blasten im Knochenmark oder peripherem Blut diagnostiziert (Döhner u. a., 2010). Die Akkumulation hochproliferativer, undifferenzierter myeloischer Blasten führt zu einer Verdrängung der normalen Hämatopoese im Knochenmark, zur Ausschwemmung der Blasten ins periphere Blut und in seltenen Fällen auch zur Akkumulation in anderen Organen (Chlorom). Klinisch präsentiert sich die AML mit einem schwerwiegenden, lebensbedrohlichen Symptomkomplex aus Leukozytose und durch Knochenmarksinsuffizienz hervorgerufene Neutropenie, Anämie und Thrombozytopenie, die sich durch Infektionsanfälligkeit, Blutung, Fatigue, Anorexie und starken Gewichtsverlust manifestieren (Hoffman, 2013). Eine umfassende Risikostratifikation unter Einbeziehung prognostischer Faktoren ist für eine erfolgreiche Therapie unabdingbar. Das Alter der Patienten sowie der physische Zustand wirken sich dabei maßgeblich auf den Therapieerfolg aus (Kantarjian u. a., 2006). Zudem lassen sich die Patienten anhand des molekularen Profils in günstige, intermediäre und ungünstige prognostische Gruppen unterteilen, welche kürzlich auf Basis der neuesten Erkenntnisse vom *European LeukemiaNet* (ELN) neu definiert wurden (Döhner u. a., 2017). Die neue ELN-Risikoklassifizierung ist in Tabelle 2 zusammengefasst.

**Tabelle 2: ELN Risikostratifikation nach genetischem Profil der AML-Patienten** (übernommen und adaptiert aus (Döhner u. a., 2017))

Risikokategorie	Genetische Abnormalitäten
günstig	t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1 inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> Mutiertes <i>NPM1</i> ohne <i>FLT3<sup>ITD</sup></i> oder mit <i>FLT3<sup>ITD</sup></i> (niedrig) <i>CEBPA<sup>biallelisch</sup></i>
intermediär	Mutiertes <i>NPM1</i> und <i>FLT3<sup>ITD</sup></i> Wildtyp <i>NPM1</i> ohne <i>FLT3<sup>ITD</sup></i> oder mit <i>FLT3<sup>ITD</sup></i> (niedrig) (ohne als ungünstig eingestufte genetische Läsionen) t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLL3-KMT2A</i> zytogenetische Anomalitäten, welche nicht als günstig oder ungünstig eingestuft wurden
ungünstig	t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> neu geordnet t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> inv(3)(q21.3q26.2) oder t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2</i> , <i>MECOM(EVI1)</i> -5 oder del(5q); -7; -17/Abn(17p) Komplexer Karyotype, Monosomal Karyotype Wildtyp <i>NPM1</i> und <i>FLT3<sup>ITD</sup></i> (hoch) Mutiertes <i>RUNX1</i> * Mutiertes <i>ASXL1</i> * Mutiertes <i>TP53</i>

\* diese Marker sind nicht als ungünstige Marker zu verwenden, wenn sie gleichzeitig mit günstigen Subtypen auftreten

### 1.4.1 DIE THERAPIE DER AML

Neue Technologien erlauben immer tiefere Einblicke in die Heterogenität und Komplexität der AML. Nichtsdestoweniger hat sich die generelle Therapiestrategie für die Patienten in den letzten 30 Jahren nicht maßgeblich verändert (Dohner u. a., 2010). Ziel der Induktionstherapie ist das Erreichen einer vollständigen Remission (engl. *complete remission* (CR)), die unter anderem durch die Normalisierung der Anzahl der Neutrophilen und Thrombozyten sowie weniger als 5 % Blasten im Knochenmark gekennzeichnet ist (Dohner u. a., 2010). Um eine lang anhaltende Remission zu gewährleisten, wird der Induktionstherapie eine Konsolidierungstherapie angeschlossen. Als hauptsächliches Arzneiregime zur Induktion für Patienten, die jünger als 65 Jahre sind, hat sich eine „7+3“-Therapie etabliert. Dabei wird über eine kontinuierliche Infusion für sieben Tage das Cytidin-Analogon Cytarabin (AraC) in üblichen Konzentrationen von 100-200 mg/m<sup>2</sup> verabreicht. Darauf folgt eine dreitägige Infusion eines Antrazyklins, wie Daunorubicin (90 oder 60 mg/m<sup>2</sup>) oder Idarubicin (12 mg/m<sup>2</sup>) (De Kouchkovsky und Abdul-Hay, 2016). Eine Alternative dieser Standardtherapie stellt die gemeinsame Applikation von Daunorubicin, Cytarabin und Cladribine (DAC) dar. In einer Studie im Vergleich zu AraC und Daunorubicin erreichten im DAC-Arm mehr Patienten eine komplette Remission sowie ein höheres Gesamtüberleben (Holowiecki u. a., 2012). Die Behandlungsoptionen für Patienten über 65 Jahren gestalten sich auf Grund der häufiger vorkommenden ungünstigen zytogenetischen Risikoprofile sowie häufig vorgehenden myelodysplastischen Syndrome (MDS) schwieriger. Diese Patienten sprechen seltener auf eine Chemotherapie an und leiden vermehrt an unerwünschten Nebenwirkungen. Ebenfalls sollten Patienten über 65 Jahre, welche über ein günstiges genetisches Profil verfügen und eine ausreichende Fitness aufweisen, wiederholte Zyklen einer mittleren Cytarabin-basierten Therapie gefolgt von einer Stammzelltransplantation erhalten (Döhner u. a., 2015). Als Alternative dazu konnte auch CPX-351, liposomal verkapseltes Cytarabin und Daunorubicin im Verhältnis von 5:1, im Vergleich zu einer „7+3“-Therapie durch höhere Ansprechraten, durch ein eventfreieres wie auch besseres Gesamtüberleben bei älteren Patienten mit sekundärer AML überzeugen (Lancet u. a., 2014). Nach ausgiebiger Evaluation von Nutzen und Risiken der Standardtherapie bleibt für die älteren Patienten mit schlechter genetischer Prognose oder zusätzlichen negativen klinischen Faktoren jedoch oft nur die Chance einer investigativen Therapie (Döhner u. a., 2015; Walter und Estey, 2015). Durch die Verwendung von hypomethylierenden Agenzien, wie Azacitidine oder Decitabine, konnte in einer Studie ein leichter Überlebensvorteil gegenüber unterstützender Behandlung oder schwach dosiertem Cytarabin festgestellt werden, eine andere Studie konnte diesen Effekt lediglich in einer bestimmten Subgruppe von Patienten bestätigen (Kantarjian u. a., 2012; Dombret u. a., 2015).

Als Konsolidierungstherapie eignet sich sowohl die weitere Chemotherapie, als auch die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (engl. *allogenic hematopoietic stem cell transplantation* (allo-HSCT)) (Schlenk, 2014). Eine Konsolidierungstherapie durch eine mittlere Dosis von Cytarabin über 2 bis 4 Zyklen führt in Patienten mit günstigem genetischen Risikoprofil zu Heilungsraten von 60-70 % (Döhner u. a., 2015). In ELN günstigen AML-Subtypen in erster kompletter Remission konnte kein Vorteil der allo-HSCT gegenüber einer Chemotherapie nachgewiesen werden, wodurch die Chemotherapie für diese Patienten die Erstlinien-Therapie darstellen sollte (Koreth u. a., 2009). Komplexer stellt sich die Wahl für die anderen Risikogruppen dar. Grundsätzlich verspricht die allo-HSCT als Postremissionstherapie die stärksten antileukämischen Effekte aufgrund der zytoreduktiven Konditionierung und des späteren immunologischen Transplantat-gegen-Leukämie-Effekts (engl. *graft-versus-leukemia* (GvL)) (Gupta u. a., 2011). Die allo-HSCT ist auf Grund der zu erwartenden starken Nebenwirkungen wie Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (engl. *graft versus host disease* (GvHD)), einer Cytomegalievirus-Reaktivierung sowie Infektionen lediglich Patienten vorbehalten, bei denen eine verlängerte CR mit konventioneller Therapie nicht zu erwarten ist (Sorrör u. a., 2014; Armand u. a., 2014). Für einige Patienten mit intermediärem Risiko und für die meisten Patienten der ungünstigen prognostischen Risikogruppe stellt die allo-HSCT jedoch die bevorzugte Therapie zur Verlängerung des rückfallfreien- und Gesamtüberlebens (engl. *relapse-free survival* (RFS); *overall survival* (OS)) dar, wobei auch hier die Erfolgschancen häufig weniger als 20 % betragen (Yanada u. a., 2005; Li u. a., 2015). Aufgrund der nach wie vor unbefriedigenden Therapieerfolge für AML-Patienten sind zielgerichtete Therapieoptionen in den Mittelpunkt aktueller Studien gerückt. In den folgenden Abschnitten sollen die in der AML zum Einsatz kommenden wichtigsten neuartigen Therapieansätze vorgestellt werden.

#### 1.4.1.1 FLT3-INHIBITOREN

Neben den ungerichteten Therapieverfahren haben auch zielgerichtete therapeutische Ansätze den Einzug in die klinische Erprobung finden können. In vielen soliden als auch hämatopoetischen Krebserkrankungen sind Tyrosinkinase-Signalwege verstärkt aktiv. Einer zielgerichteten Inhibierung dieser Signalkaskaden kommt daher große Beachtung zu. Eine aussichtsreiche therapeutische Zielstruktur stellt hierbei die in der AML häufig mutierte FLT3-Kinase dar. Der kleinmolekulare Multi-Kinase-Inhibitor der ersten Generation Sorafenib ist gegen die FLT3-ITD, die Serin/Threonin-Kinase RAF (engl. *rat fibrosarcoma*) und die Tyrosinkinasen c-KIT, VEGFR (engl. *vascular endothelial growth factor receptor*) sowie PDGFR (engl. *platelet-derived growth factor receptor*) gerichtet. In ersten klinischen Studien zeigte Sorafenib teilweise Ansprechraten von bis zu 90 % bei gleichzeitig wenigen Grad 3 und

4 Nebenwirkungen und somit guter Verträglichkeit (Crump u. a., 2010; Borthakur u. a., 2011). Die Mehrheit der Patienten rezidiert jedoch nach sehr kurzer Zeit, was häufig auf Mutationen in der FLT3-Tyrosinkinasedomäne (TKD) zurückzuführen ist (Man u. a., 2012). In Kombination von Sorafenib mit Chemotherapeutika wurde ebenfalls eine Hochregulation der FLT3-Expression als möglicher Evasionsmechanismus postuliert (Al-Kali u. a., 2011; König und Levis, 2015). Für den FLT3-Tyrosinkinase-Inhibitor (TKI) Midostaurin konnte in einer globalen Phase-III-Studie in Kombination mit Standard-Induktionstherapie gefolgt von einer Konsolidierungstherapie bei Patienten bis 60 Jahre mit FLT3-Mutation ein Überlebensvorteil von 7 % im Vergleich zu Standardtherapie und Konsolidierungstherapie alleine festgestellt werden (Stone u. a., 2015). Midostaurin wurde daraufhin im April 2017 als erstes neues Medikament seit 30 Jahren von der FDA für die Behandlung der AML zugelassen. In Phase-I-Studien wurde ebenfalls der FLT-3-Inhibitor Sunitinib getestet, welcher in Monotherapie jedoch ebenfalls nur kurzzeitige Erfolge erzielen konnte (O'Farrell u. a., 2003; Fiedler u. a., 2005). Es ließ sich durch den Einsatz von Sunitinib als Erhaltungstherapie nach einer „7+3“-Induktionstherapie ein klinischer Nutzen für die Patienten feststellen (Fiedler u. a., 2015). Inhibitoren der zweiten Generation mit einem spezifischeren Wirkungsspektrum gegen FLT3 zur Verminderung der Nebenwirkungen durch *off-target*-Effekte zeigten ähnliche Therapieerfolge. Der Inhibitor Quizartinib weist ein engeres Wirkungsspektrum auf. Jedoch traten beim Einsatz dieses Medikaments in ersten Studien ebenfalls frühe Resistenzmechanismen und daraus resultierende kurze Remissionszeiten von nur 5 Wochen auf (Levis u. a., 2012). Für den FLT3-TKI Crenolanib mit Aktivität gegen die FLT3-ITD und FLT3-TKD konnten hingegen bisher keinerlei Resistenzentwicklungen beobachtet werden (Smith u. a., 2014b). Crenolanib bindet nicht an die ATP-Bindungstasche der Rezeptoren, sondern blockiert die aktivierte Form der Rezeptoren (Muralidhara u. a., 2014). Erste Phase 2 Studienergebnisse lieferten aussichtsreiche Daten in AML-Patienten mit einem Event-freien-Überleben (engl. event free survival (EFS)) von 8 Wochen und einem OS von 19 Wochen (Randhawa u. a., 2014).

#### 1.4.1.2 IMMUNTHERAPEUTISCHE ANSÄTZE

Der erfolgreichste Ansatz der Immuntherapie zur Behandlung der AML ist nach wie vor die allo-HSCT. Der dabei wirkende *graft-versus-leukemia* Effekt beweist, dass eine Beseitigung von Leukämiezellen durch Immunzellen grundsätzlich möglich ist (Bleakley und Riddell, 2004). Darüber hinaus wurde die Beteiligung des endogenen Immunsystems in der Elimination myeloischer Blasten beschrieben, was Hoffnung auf den Erfolg immunologischer Ansätze zur Therapie der AML schürt (Behl u. a., 2006; Müller u. a., 2004). Derzeit werden drei wesentliche immuntherapeutische Ansätze in der AML

verfolgt, auf die im Folgenden kurz eingegangen werden soll: i) Zytokintherapie inklusive NK-Zelltransfer, ii) Antigen-spezifische Therapieverfahren, und iii) Immuncheckpoint-Manipulationen (Austin u. a., 2016).

#### 1.4.1.2.1 ZYTOKINTHERAPIE UND ADOPTIVER NK-ZELLTRANSFER

Ein weiterer Ansatz zur Therapie unterschiedlichster Krebsentitäten ist die Gabe von Zytokinen zur Stimulation des Immunsystems. Die Aktivierung von Immunzellen durch IL-2 wurde bei einer Reihe klinischer Studien bei Patienten in kompletter Remission untersucht. Es zeigte sich jedoch, dass sich IL-2 alleine nicht als Erhaltungstherapie eignete (Buyse u. a., 2011). Für die Entwicklung und Homöostase von NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen ist das Zytokin IL-15 maßgebend. In ersten präklinischen Studien konnte ein positiver Effekt auf die Aktivierung von NK-Zellen zur Lyse von AML-Zellen nach IL-15-Stimulation aufgezeigt werden und in einer Reihe Phase-I-Studien wird momentan das Potential von IL-15 für die Therapie der AML untersucht (Szczepanski u. a., 2010). Zudem wurde eine Phase-I-Studie, die haploidentische NK-Zell-Infusionen mit IL-15-Gabe kombinierte, kürzlich abgeschlossen, wobei die Ergebnisse dieser Studie noch ausstehen (NCT01385423). Die durch INF- $\alpha$  gesteigerte Aktivität von NK-Zellen konnte bei AML-Patienten ebenfalls einen klinischen Nutzen erzielen (Berneman u. a., 2010; Anguille u. a., 2011). In laufenden klinischen Studien wird momentan eine Verstärkung des *graft-versus-leukemia* Effektes nach allo-HSCT untersucht (NCT02027064 und NCT02328755). Eine weitere Studie untersucht die Effektivität der Aktivierung von NK-Zellen vor Infusion durch Exposition von Leukämiezellen (North u. a., 2006)( NCT01520558).

#### 1.4.1.2.2 ANTIGEN-SPEZIFISCHE THERAPIEVERFAHREN

AML-Zellen exprimieren häufig AML-spezifische Neoantigene (ASNAs), die über MHC-I präsentiert werden. So konnten 61 tumorspezifische Phosphopeptide in hämatologischen Erkrankungen identifiziert werden, die eine robuste CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort auslösten (Cobbold u. a., 2013). Zudem wurden FLT3<sup>ITD</sup>, PML-RAR $\alpha$  und NPM1 als spezifische Neoantigene beschrieben, welche eine Immunantwort gegenüber der AML auslösen können (Graf u. a., 2007; Osman u. a., 1999; Greiner u. a., 2012). Neben ASNAs sind auch mehrere AML-assoziierte Antigene (AAAs) bekannt, welche zwar auch im gesunden Gewebe exprimiert werden, aber auf Grund ihrer wichtigen Funktion in der Aufrechterhaltung der Leukämogenese aussichtsreiche immunologische Zielstrukturen darstellen (Berlin u. a., 2015; Greiner u. a., 2008). Antigen-spezifische Therapieverfahren richten sich in Form von

Leukämievakzinen, dem adoptiven Transfer chimärer Antigen-reaktiver T-Zellen (engl. *chimeric antigen-reactive T cell* (CAR-T)) oder bispezifischen Antikörpern gegen ASNAs oder AAAs. Durch Peptid-Vakzinierungen gegen das AML-assoziierte Antigen Wilms Tumor-1 (WT-1) Protein konnten bereits komplette Remissionen in AML-Patienten erreicht werden (Ochsenreither u. a., 2011). CAR-T-Zellen sind *ex vivo* modifizierte T-Zellen, welche einen transgenen Rezeptor exprimieren, welcher aus der gegen ein spezifisches Antigen gerichteten extrazellulären Domäne eines monoklonalen Antikörpers besteht, die meistens mit der intrazellulären CD3- $\zeta$ -Aktivierungsdomäne fusioniert ist. In ersten klinischen Studien zur Therapie hämatologischer B-Zellerkrankungen wie der B-akuten lymphatischen Leukämie konnten durch den Einsatz CD19 spezifischer CAR-T-Zellen Remissionsraten von 88 % erreicht werden (Davila u. a., 2014). Die Schwierigkeit der Translation dieser Erfolge auf die AML liegt in der gemeinsamen Expression von Antigenen auf AML-Blasten und frühen hämatopoetischen Vorläuferzellen. Aussichtsreiche Zielstrukturen für eine CAR-T-Zell-Therapie in der AML sind die Moleküle CD33, CD123 und WT-1, wobei in einer ersten kleinen klinischen Studie antileukämische Aktivitäten *ex-vivo* expandierter WT-1 spezifischer CAR-T-Zellen gezeigt werden konnten (Gill u. a., 2014; Pizzitola u. a., 2014; Mardiros u. a., 2013; Chapuis u. a., 2013).

#### 1.4.1.2.3 BISPEZIFISCHE ANTIKÖRPER

Eine an Bedeutung gewinnende Klasse von neuen Immuntherapeutika stellen so genannte bispezifische Antikörper (engl. *Bispecific T cell Engager* (BiTE®)) dar. Diese Antikörperkonstrukte fungieren als Verbindungsmolekül zwischen Tumor- und T-Zelle, indem sie Bindungsstellen für Tumorantigene und das Molekül CD3 des T-Zellrezeptorkomplexes besitzen. BiTE® Antikörperkonstrukte bestehen aus den jeweiligen *single-chain variable* Domänen zweier monoklonaler Antikörper, die über einen Linker miteinander verbunden sind (Friedrich u. a., 2014). Mittlerweile sind BiTE® Antikörperkonstrukte gegen eine Vielzahl von Tumorantigenen verfügbar, wobei der CD3-Teil immer an eine nicht polymorphe Region der CD3-Komponente des T-Zellrezeptorkomplexes bindet. Der enge Kontakt zwischen Tumor- und T-Zellen führt dabei zur Ausbildung einer MHC-I-unabhängigen zytotoxischen Synapse, zur potenten Aktivierung der T-Zelle und zur effizienten Lyse der Tumorzellen durch einen Perforin- und Granzym-abhängigen Mechanismus. BiTE® Antikörperkonstrukte sind bereits in pico- und femtomolaren Konzentrationen wirksam, wodurch sie ein gutes Mimikry zur physiologischen Interaktion von Peptid-MHC-Verbindungen darstellen (Nagorsen und Baeuerle, 2011). Der CD19/CD3-BiTE® Blinatumomab ist bereits zur Behandlung der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) zugelassen. Neben hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert auch der Großteil von AML-Blasten das Molekül CD33,

und dieses stellt somit eine mögliche Zielstruktur zur Therapie der AML dar. Aufgrund der aussichtsreichen präklinischen Daten zum CD33/CD3-BiTE® AMG 330 wurde kürzlich eine erste Phase-I-Studie initiiert (NCT02520427) (Aigner u. a., 2013; Friedrich u. a., 2014; Krupka u. a., 2014). Interessanterweise resultierte die Behandlung von AML-Zellen mit dem CD33/CD3-BiTE® zu einer Aktivierung von negativen Immuncheckpoint Molekülen wie PD-L1 oder PD-L2 und die Kombination des CD33/CD3-BiTE® mit einem blockierenden PD-1-Antikörper führte zur Verstärkung der anti-leukämischen Effekte (Krupka u. a., 2015; Laszlo u. a., 2015).

#### 1.4.1.2.4 IMMUNCHECKPOINT-MANIPULATIONEN

In aktuellen Studien wird das Potential verschiedener Immuncheckpoint-Manipulationen in der AML untersucht. Die Depletion intratumoraler regulatorischer T-Zellen konnte kürzlich bei soliden Tumoren als Wirkungsmechanismus einer CTLA4-blockierenden Immuncheckpoint-Therapie nachgewiesen werden (Simpson u. a., 2013). Bei der Pathogenese der AML wurde regulatorischen T-Zellen ebenfalls eine wichtige Rolle zugesprochen, so dass sich eine anti-CTLA4-Therapie als Konsolidierungstherapie zur Reduktion dieser immunsuppressiven Zellen eignen könnte (Shenghui u. a., 2011; Szczepanski u. a., 2009). Wenn die Leukämie mikroskopisch im Knochenmark nicht mehr nachweisbar ist, sondern nur noch über hoch sensible Verfahren wie der Durchflusszytometrie oder der PCR detektiert werden kann, wird von einer minimalen Resterkrankung (engl. *minimal residual disease* (MRD)) gesprochen. Der CTLA4-blockierende Antikörper Ipilimumab wird in diesem Zusammenhang derzeit als Therapie in einer Phase-I-Studie zur Behandlung der MRD bei der AML untersucht (NCT01757639). Darüber hinaus konnte der Einfluss der Immuncheckpoint-Achse PD-1-PD-L1 in der AML gezeigt werden (Zhang u. a., 2009). In einer ersten klinischen Studie konnte ein klinischer Nutzen bei 33 % der Patienten, die mit einem humanisierten PD-1-blockierenden Antikörper behandelt wurden, nachgewiesen werden (Berger u. a., 2008). Neben diesen beiden konventionellen Checkpoint Molekülen sind für die Therapie der AML auch blockierende Antikörper gegen CD47 in der klinischen Erprobung (NCT02216409). CD47 ist der Ligand für den inhibitorischen Rezeptor *signal regulatory protein alpha* (SIRPα), welcher von Phagozyten exprimiert wird. Eine Interaktion von CD47 mit SIRPα unterdrückt die Phagozytose von Zielzellen (Barclay und Brown, 2006). Präklinische Studien konnten dementsprechend zeigen, dass die Blockierung von CD47 durch Antikörper die Phagozytose von AML-Zellen verstärkt, was zu einem effizienteren *priming* Tumor-spezifischer T-Zellen führt (Majeti u. a., 2009; Tseng u. a., 2013).

## 1.5 ZIELSETZUNG

Die Therapie der AML hat sich aufgrund des immer tieferen Verständnisses über die Entstehung und Progression dieser Erkrankung in den letzten Jahrzehnten stetig verbessert. Nichtsdestoweniger gibt es immer noch Subgruppen von Patienten mit einer schlechten Prognose, wie ältere Patienten, für die dringend neue Therapieoptionen benötigt werden. Eine Hoffnung in der Krebstherapie ist die Immuntherapie, bei der durch unterschiedliche Mechanismen versucht wird, die Bremsen des Immunsystems zur Bekämpfung neoplastischer Zellen zu lösen und eine effektive und vor allem langanhaltende Remission oder eine vollständige Heilung von der Krankheit zu erreichen. Therapeutische Erfolge durch den Einsatz blockierender Antikörper gegen Immuncheckpoint Moleküle wie CTLA4 oder PD-1 setzen dabei Meilensteine in der Therapie solider Krebsentitäten.

Die Immuncheckpoint Moleküle PVR und PVRL2 sowie ihr korrespondierender Rezeptor TIGIT wurden bereits als aussichtsreiche therapeutische Zielstrukturen zur Behandlung von chronisch viralen Erkrankungen und Krebserkrankungen beschrieben. Über die Rolle dieser wichtigen Achse zur Kontrolle immunologischer Reaktionen in hämatologischen Neoplasien gibt es bis heute wenig Erkenntnisse. Bispezifische Antikörper, welche Krebszellen mit T-Zellen verbinden und so eine effektive anti-Tumor-Immunantwort auslösen, konnten in klinischen Studien zur Therapie der akuten lymphatischen Leukämie überzeugen. Auch die präklinischen Arbeiten zum BiTE® Antikörperkonstrukt AMG 330 zur Behandlung der akuten myeloischen Leukämie (AML) lieferten aussichtsreiche Daten, was zur Initiierung einer Phase-I-Studie mit diesem Arzneiregime führte (NCT02520427). In mehreren Arbeiten konnte jedoch eine Abhängigkeit zytotoxischer Effektorantworten von BiTE® Antikörperkonstrukten mit Immuncheckpoint Molekülen aufgezeigt werden.

Ziel dieser Dissertation war es, das therapeutische Potential der Immuncheckpoint-Achse TIGIT-PVR/PVRL2 für die Immuntherapie der AML alleine und in Kombination mit dem BiTE® Antikörperkonstrukt AMG 330 zu untersuchen. Dafür sollten die Effekte dieser Achse auf die Lyse von Leukämiezelllinien und primären Blasten unbehandelter AML-Patienten durch blockierende Antikörper untersucht werden. Die *in vitro* Daten sollten im Folgenden in einem Tiermodell bestätigt werden. Das maßgebende Ziel dabei war, durch die Ergebnisse den Weg für die Entwicklung einer neuen effizienten Immuntherapie zur Behandlung der AML zu ebneten.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 MATERIALIEN

#### 2.1.1 GERÄTE

Alle in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 3 aufgelistet.

**Tabelle 3: Verwendete Geräte**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Agarose-Gelelektrophoresekammer</b>	Mini Sub Cell GT / Wide Mini Sub cell GT	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
<b>Dokumentation Mikroskop</b>	AxioCam MRc	Carl Zeiss (Oberkochen)
<b>Durchflusszytometer</b>	FACS Calibur	Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA)
<b>Durchflusszytometer</b>	FACS Canto™ II	Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA)
<b>Durchflusszytometer-Sortierer</b>	FACS Aria™ IIIu	Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA)
<b>Elektronisches Hämacytometer</b>	Vi-CELL™ XR	Beckman Coulter (Brea, CA, USA)
<b>Elektroporator</b>	GenePulser Cxell	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
<b>Gefrierbehälter</b>	Mr. Frosty	Nalgene (Rochester, NJ, USA)
<b>Geldokumentationssystem</b>	EBOX VX 2.0 MP	Peqlab (Erlangen)
<b>Inkubator (Bakterien)</b>	Heraeus B17	Heraeus (Hanau)
<b>Inkubator (Zellkultur)</b>	Forma Scientific 3165	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
<b>Neubauer Zählkammer</b>	Neubauer-Improved	Paul Marienfeld GmbH & CO KG (Lauda-Königshofen)
<b>Schüttler (Bakterien)</b>	Innova 40	New Brunswick Scientific (Edison, NJ, USA)
<b>Sicherheitswerkbank</b>	HeraSafe HS9	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
<b>Stickstoff-Lagerungstank</b>	CryoPlus	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
<b>UV-Vis Spectrophotometer</b>	NanoDrop2000	VWR International GmbH (Erlangen)
<b>Wasserbad</b>	GFL 1002	Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel)

### 2.1.2 CHEMIKALIEN

Alle chemikalischen Feststoffe wurden in doppelt destilliertem Wasser gelöst. Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, mit dem Reinheitsgrad „pro analysi (p.a.)“ von folgenden Firmen bezogen:

Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

### 2.1.3 KITS, REAGENZIEN UND LÖSUNGEN

Alle in dieser Arbeit verwendeten Kits, kommerziell erworbene wie eigens hergestellte Lösungen sind in Tabelle 4 dargestellt.

**Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Kits und kommerziell sowie eigens hergestellten Reagenzien und Lösungen**

Bezeichnung	Katalognummer	Hersteller
<b>7AAD</b>	559925	BD Pharmingen (San José, CA USA)
<b>AB-Serum</b>	805135	BioRad, Hercules, CA, USA
<b>Agarose</b>	50005	Lonza (Basel, Schweiz)
<b>pAML-Medium</b>	-	(Pabst u. a., 2014)
<b>CellTracker™ Green</b>	C2925	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
<b>DMSO</b>	D8418-100ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
<b>DPBS</b>	14190-094	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
<b>DuoSet Ancilliary Reagent Kit 2</b>	DY008	R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)
<b>DuoSet Human Granzym B</b>	DY2906-05	R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)
<b>Erylysepuffer</b>	-	Eigene Herstellung: 155 mM NH <sub>4</sub> Cl, 10 mM KHCO <sub>3</sub> , 100 μM EDTA
<b>Ethanol, 80 %</b>	2294-5L	Th. Geyer GmbH (Renningen)
<b>FACS Probenpuffer</b>	-	Eigene Herstellung: PBS + 10 % AB-Serum
<b>FBS Superior</b>	S 0615	Biochrom GmbH (Berlin)
<b>GM-CSF (human)</b>	300-03	Peptotech (Hamburg)
<b>LB Medium</b>	X968.2	Carl Roth (Karlsruhe)
<b>LB-Ampicillin-Agar</b>	Fas-am-s	InvivoGen (San Diego, CA, USA)
<b>LibraryEfficiency DH5α</b>	18263012	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
<b>Medium zur Kryokonservierung</b>	-	Eigene Herstellung: 40 % RPMI 1640, 10 % DMSO, 50 % FBS

Bezeichnung	Katalognummer	Hersteller
<b>MycoAlert Detection Kit</b>	LT07-318	Lonza (Basel, Schweiz)
<b>NucleoBond Xtra Midi EF</b>	740420.10	Macherey-Nagel (Düren)
<b>NucleoSpin Gel and PCR Clean up</b>	740609.50	Macherey-Nagel (Düren)
<b>NucleoSpin Plasmid</b>	740588.250	Macherey-Nagel (Düren)
<b>PAN T Cell Isolation Kit</b>	130-096-535	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
<b>Polysucrose 400</b>	PS400L500	Biocloth GmbH (Aidenbach)
<b>Rotistain</b>	3865.2	Carl Roth (Karlsruhe)
<b>RPMI 1640 + GlutaMAX™-I</b>	72400-021	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
<b>T Cell Activation/Expansion Kit</b>	130-091-441	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
<b>TAE-Puffer</b>	-	Eigene Herstellung: 40 mM Tris-HCL, 20 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 8,2
<b>Trypanblau</b>	93595-250ML	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
<b>MEM <math>\alpha</math></b>	12561056	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
<b><math>\beta</math>-Mercaptoethanol 50 mM</b>	31350-010	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

#### 2.1.4 ENZYME

Alle verwendeten Enzyme sind in Tabelle 5 aufgelistet.

**Tabelle 5: Verwendete Enzyme**

Enzym	Katalognummer	Hersteller
<b>T4 DNA Ligase</b>	EL0011	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
<b>FD Bpil (BbsI)</b>	FD1014	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
<b>FD Lgul (SapI)</b>	FD1934	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
<b>T4 PNK</b>	EK0031	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
<b>FastAP</b>	EF0654	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

#### 2.1.5 DNA-STANDARDS

Die in dieser Arbeit als Größenstandard verwendeten DNA-Leitern sind in Tabelle 6 aufgelistet.

**Tabelle 6: Verwendete DNA-Standards**

Standard	Katalognummer	Hersteller
<b>GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder</b>	SM1331	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
<b>GeneRuler 100bp DNA Ladder</b>	SM0241	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

### 2.1.6 OLIGONUKLEOTIDE

In Tabelle 7 sind alle Oligonukleotide und ihre Verwendung aufgelistet.

**Tabelle 7: Verwendete Oligonukleotide**

Name des Oligos	Sequence (5'->3')	Verwendung
<b>gRNA PVR</b>	GATGTTTCGGGTTGCGCGTAG	Genetischer <i>knockout</i> PVR
<b>gRNA PVRL2</b>	CGGCGATCTCGACGGCAGGA	Genetischer <i>knockout</i> PVRL2
<b>PVR forw subclone</b>	GCTACCTACAGGTGCCCAAC	Amplifikation der CRISPR/Cas9 Zielregion
<b>PVR rev subclone</b>	CTCCAGTGAGCTGGACCTTC	
<b>PVRL2 forw subclone</b>	CCCCACAGGCACCTACTAAA	
<b>PVRL2 rev subclone</b>	ACCCATCTTAGGGTGGAAAGG	
<b>pJet1.2 forward sequencing primer</b>	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	Sequenzierung der subklonierten Amplicons

### 2.1.7 VEKTOREN

Alle in dieser Arbeit verwendeten Vektoren sind in Tabelle 8 verzeichnet.

**Tabelle 8: Verwendete Vektoren**

Name des Vektors	Beschreibung	Hersteller
<b>U6-cgRNA-SFFV-Cas9-IRES-mCherry</b>	Abgeleitet von px330 und LeGo-iC (Cong u. a., 2013; Weber u. a., 2008)	Zur Verfügung gestellt von Dr. Ulricke Mock
<b>pJet 1.2/blunt</b>	CloneJET PCR Cloning Kit	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
<b>pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9</b>	Addgene Plasmid 42230	Zur Verfügung gestellt von Feng Zang

### 2.1.8 ANTIKÖRPER

Die Tabelle 9 listet alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper für Zytotoxizitätsassays und die durchflusszytometrischen Analysen auf.

Tabelle 9: Verwendete FACS-Antikörper, blockierende Antikörper und bispezifische Antikörper

Antikörper	Konjugat	Klon	Hersteller
<b>AMG 330</b>	-	-	AMGEN (Thousand Oaks, CA, USA)
<b>ChromPure <i>human IgG, wohle molecule</i></b>	-	Polyclonal	Jackson ImmunoResearch Labs, Inc. (Baltimore, MD, USA)
<b>Maus anti-human CD117</b>	PE	A3C6E2	BioLegend (San Diego, CA, USA)
<b>Maus anti-human CD133/2</b>	PE	293C	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
<b>Maus anti-human CD3</b>	PE	UCHT1	BD Pharmingen (San José, CA USA)
<b>Maus anti-human CD33</b>	FITC	HIM3-4	BioLegend (San Diego, CA, USA)
<b>Maus anti-human CD34</b>	PE	561	BioLegend (San Diego, CA, USA)
<b>Maus anti-human PVR</b>	-	D171	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
<b>Maus anti-human PVR</b>	APC	SKII.4	BioLegend (San Diego, CA, USA)
<b>Maus anti-human PVRL2</b>	-	L14	Zur Verfügung gestellt von Dr. Daniela Pende (Bottino u. a., 2003)
<b>Maus anti-human PVRL2</b>	PE	TX31	BioLegend (San Diego, CA, USA)
<b>Maus anti-human TIGIT</b>	APC	741182	R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)
<b>Maus IgG1</b>	APC	MOPC-21	BioLegend (San Diego, CA, USA)
<b>Maus IgG1</b>	PE	MOPC-21	BioLegend (San Diego, CA, USA)
<b>Maus IgG1</b>	FITC	MOPC-21	BD Pharmingen (San José, CA USA)

### 2.1.9 SOFTWARE

Es wurde die in Tabelle 10 aufgelistete Software verwendet.

Tabelle 10: Verwendete Software

Software	Version	Hersteller
<b>Acrobat Reader DC</b>	2015.020.20042	Adobe Systems (San José, CA, USA)
<b>AxioVision Rel.</b>	4.8.2-SP2	Carl Zeiss, Oberkochen
<b>CellQuest Pro</b>	5.2.1	Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA)
<b>CRISPR Design (crispr.mit.edu)</b>	2015	Zang Laboratory, MIT (Massachusetts, MA, USA)
<b>FACS Diva</b>	8.0.1	Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA)

Software	Version	Hersteller
FinchTV	1.4.0	Geospezia, PerkinElmer (Waltham, MA, USA)
Firefox	50.0	Mozilla Foundation (Mountain View, CA, USA)
Flowing Software	2.5.1	Perttu Terho, University of Turku (Turku, Finland)
GraphPad Prism®	5.01	GraphPad Software Inc. (La Jolla, CA, USA)
Mendeley Desktop	1.17.3	Mendeley Ltd (London, England)
MS Office	2013	Microsoft (Redmond, WA, USA)
SnapGene Viewer	3.2.1	GSL Biotech LLC (Chicago, IL, USA)
SPSS	21	IBM (Armonk, NY, USA)
Mutationtaster2	-	www.mutationtaster.org, (Schwarz u. a., 2014)

## 2.2 METHODEN

### 2.2.1 KULTIVIERUNG VON ZELLEN

Alle verwendeten Zelllinien (siehe Tabelle 11) wurden bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> in einem Inkubator kultiviert und drei Mal pro Woche gesplittet. Es wurden die Angaben der ATCC ([www.atcc.org](http://www.atcc.org)) bzw. DSMZ ([www.dsmz.de](http://www.dsmz.de)) zur minimalen und maximalen Zelldichte pro mL eingehalten. Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden kürzlich durch die Firma Multiplexion GmbH (Heidelberg) unter Verwendung des *multiplex human cell line authentication* Test verifiziert und in Abständen von zwei Monaten auf Mycoplasmen-Freiheit überprüft.

Primäre AML (pAML) Blasten wurden nach Einverständnis der Patienten aus Knochenmarkpunktionen durch Dichtegradientenzentrifugation mit Polysucrose 400 isoliert. Die Blasten wurden in pAML-Medium bei einer Dichte von  $2-2,5 \times 10^6$  Zellen/mL kultiviert (Pabst u. a., 2014). Für durchgeführte *in vitro* Versuche lag ein Votum der Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg vor (PV3469).

Tabelle 11: Verwendete Zelllinien, deren Ursprung sowie das korrespondierende Kultivierungsmedium

Zelllinie	Herkunft	Kultivierungsmedium	ATCC/DSMZ Nummer
<b>HL-60</b>	36-jährige europäische Frau mit APL	RPMI 1640 + 10 % FBS	CCL-240
<b>Kasumi-1</b>	7-jähriger japanischer Junge mit AML (1989)	RPMI 1640 + 20 % FBS	CRL-2724
<b>KG-1</b>	59-jähriger europäischer Mann mit AML	RPMI 1640 + 10 % FBS	CCL-246
<b>Molm-13</b>	20-jähriger Mann mit AML FAB M5a (1995)	RPMI 1640 + 10 % FBS	ACC 554
<b>MV4-11</b>	10-jähriger Junge mit biphänotypischer B-myelomonozytärer Leukämie (1987)	RPMI 1640 + 10 % FBS	CRL-9591
<b>OCI-AML3</b>	57-jähriger Mann mit AML FAB M4 (1987)	$\alpha$ -MEM + 20 % FBS	ACC 582
<b>OCI-AML5</b>	77-jähriger Mann mit AML FAB M4 (1990)	$\alpha$ -MEM + 20 % FBS + 2,5 ng/mL GM-CSF	ACC 247
<b>OCI-M1</b>	62-jähriger Mann mit AML (1988)	RPMI 1640 + 10 % FBS	ACC 529
<b>TF-1</b>	35-jähriger Japaner mit schwerer Panzytopenie (1987)	RPMI 1640 + 10 % FBS + 2,5 ng/mL GM-CSF	CRL-2003
<b>UKE-1</b>	62-jährige Frau mit AML	IMDM + 10% FBS + 10% HS + 1 $\mu$ M HC	Referenz (Fiedler u. a., 2000)

### 2.2.2 KRYOKONSERVIERUNG VON ZELLEN

Zur Konservierung von eukaryotischen Zellen wurden  $2,5 \times 10^6$  Zellen bei 300 g für 5 Minuten abzentrifugiert und das Zellpellet in 1,6 mL Medium zur Kryokonservierung resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen überführt und in einem Gefrierbehälter bei  $-1 \text{ }^\circ\text{C/Stunde}$  auf  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  heruntergekühlt und in flüssigem Stickstoff gelagert.

### 2.2.3 AUFTAUEN VON KRYOKONSERVIERTEN ZELLEN

Zum Auftauen kryokonservierter Zellen wurde das Kryoröhrchen für ca. eine Minute bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  im Wasserbad aufgetaut und die Zellsuspension in 10 mL Zellkulturmedium gegeben. Die Zellen wurden bei 300 g für fünf Minuten abzentrifugiert und das Zellpellet in 5 mL Zellkulturmedium in einer Zellkulturflasche ausplattiert.

#### 2.2.4 ZELLZÄHLUNG

Zur Zellzählung wurde das automatische Hämacytometer Vi-CELL™ XR verwendet. Das Gerät arbeitet nach dem gleichen Prinzip wie ein manuelles Hämacytometer nach Neubauer und verwendet zur Vitalitätsbestimmung die Trypanblau-Ausschlussmethode. Die Zellsuspension wird mit einer Trypanblaulösung vermischt, wobei der Farbstoff Trypanblau ausschließlich in tote Zellen mit nicht mehr intakter Zellmembran eindringen kann. Für den Fall, dass, bei beispielsweise primären Proben, nur eine geringe Gesamtzellzahl vorhanden war, wurden die Zellen manuell unter dem Mikroskop in einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

#### 2.2.5 PROLIFERATIONSASSAY

Um das Wachstum von Zellen zu charakterisieren und um unterschiedliche Wachstumsverhalten von Wildtyp-Zellen im Vergleich zu hergestellten *knockout*-Zellen auszuschließen, wurden Proliferationsassays durchgeführt. Dafür wurden die Zellen eine Woche vor Beginn des Assays unter exakt gleichen Bedingungen kultiviert, um die Startbedingungen für die Zellen anzugleichen. Am Tag des Assays wurde die Zellzahl auf  $0,1 \times 10^6$  Zellen/mL eingestellt und von dieser Zellsuspension 5 mL in Triplikaten in einer 6-Loch-Platte ausplattiert. Die Zellzahl der Zellsuspension wurde an Tag 0, 2 und 4 jeweils in Duplikaten gemessen und der Versuch drei Mal wiederholt.

#### 2.2.6 ZYTOTOXIZITÄTSASSAY

Um den Effekt der PVR- und PVRL2-blockierenden Antikörper auf die Lyse von AML-Zellen durch Effektorzellen zu untersuchen, wurden Zytotoxizitätsassays durchgeführt. Für diese Assays wurden  $4 \times 10^6$  Zielzellen mit 140 nM des Fluoreszenzfarbstoffs CMFDA (CellTracker™ Green) für 20 min bei 37°C gefärbt. Zur Isolation der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (engl. *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs)) wurde ein von der Blutbank des UKE zur Verfügung gestellter Zytomegalievirus-seronegativer Buffy-Coat eines gesunden Spenders über eine Dichtegradientenzentrifugation mit Polysucrose 400 mit anschließender Erylyse aufgetrennt.

Zur Isolation von CD3-positiven T-Zellen aus der PBMC-Fraktion wurde eine magnetische Negativ-Selektion mit dem PAN T-Cell Isolation Kit nach Herstellerangaben durchgeführt.

Bei dieser Art von Assays tritt ein zytotoxischer, allogener Effekt der immunologischen Effektorzellen gegenüber den Leukämiezellen ein. Dieser Effekt wird hauptsächlich durch unterschiedliche Blutgruppenantigene und die Inkompatibilität der Peptid-MHC-Komplexe ausgelöst. Dabei können NK-Zellen die Leukämiezellen durch den *missing-self*-Mechanismus über Perforin und Granzyme töten (Villard, 2011). Die PBMC-Fraktionen enthalten ca. 50 % T-Zellen, welche zum Großteil alloreaktiv gegenüber den Leukämiezellen sind. Die Alloreaktivität ist dabei zu einem kleinen Teil durch die eventuell nicht identischen MHC-Antigene selbst bedingt. Hauptsächlich wird die Alloreaktivität jedoch über die Erkennung von Peptid-MHC-Komplexen als Antigen mediiert, wobei eine Polyspezifität vorliegt und eine Vielzahl verschiedener Peptid-MHC-Varianten als Immunogen erkannt wird. Dies resultiert in einer hohen Anzahl alloreaktiver T-Zellen, dessen Aktivierung identisch zur autologen T-Zellaktivierung verläuft (Felix und Allen, 2007; Boardman u. a., 2016).

Die CellTracker™ gefärbten Leukämiezellen wurden in einem Verhältnis von 1:6 mit den PBMCs oder T-Zellen bei einer Zelldichte von  $1 \times 10^6$ /mL vermischt und 200  $\mu$ L pro Loch in Triplikaten in einer 96-Loch-Platte ausplattiert. Das Zellgemisch wurde jeweils mit bzw. ohne den Antikörper gegen PVR (4  $\mu$ g/mL; Klon D171), den Antikörper gegen PVRL2 (25  $\mu$ L/mL Hybridoma-Zellkulturüberstand; Klon L14) und den CD3/CD33 bispezifischen Antikörper AMG 330 (0,1 ng/mL) für 24 h bei 37 °C inkubiert. Die spezifische Lyse der AML-Zielzellen wurde für die Zelllinien nach 24 h und für die primären Blasten nach 72 h am Durchflusszytometer gemessen (siehe 2.2.8.3).

### 2.2.7 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON HUMANEM GRANZYM B

Eine zur Kontrolle erhöhte Konzentration von humanem Granzym B im Überstand eines Zytotoxizitätsassays kann als direkter Parameter für die T-Zellaktivierung herangezogen werden. Für einige Zytotoxizitätsassays wurden parallel zum Versuch die Granzym B Konzentrationen bestimmt. Dafür wurde der eigentliche Reaktionsansatz von 200  $\mu$ L auf 300  $\mu$ L erhöht, die Zellen abzentrifugiert und 120  $\mu$ L Überstand abgenommen und bis zur Durchführung des Assays bei -20°C gelagert. Die Bestimmung der Granzym B Konzentration erfolgte mittels des DuoSet Granzym B ELISAs nach Herstellerangaben.

## 2.2.8 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Die durchflusszytometrische Analyse (FACS, engl. für *fluorescence activated cell scanning/sorting*) erlaubt die Charakterisierung einer Vielzahl an Zellen aufgrund ihrer Größe und Granularität. Zusätzlich kann durch den Einsatz von fluoreszenzmarkierten Antikörpern die Expression von Oberflächenproteinen wie auch von intrazellulären Proteinen nachgewiesen werden. Des Weiteren kann die DNA der Zellen durch Farbstoffe angefärbt werden, welche bei Interkalation ihre Fluoreszenzeigenschaften verändern. Dabei wird eine Einzelzellsuspension in einem Flüssigkeitsstrom (Hüllstrom) fokussiert und die Zelle von einem oder mehreren Laserstrahlen angeregt. Das dabei entstehende Streulicht oder das emittierte Fluoreszenzlicht wird von unterschiedlichen Detektoren empfangen und elektronisch verstärkt. Die somit erhaltenen Messwerte können mit Hilfe einer Software dargestellt und ausgewertet werden. In dieser Arbeit wurden die Messungen entweder auf einem FACS Calibur oder dem FACS Canto II durchgeführt. Zellsortierungen wurden auf einem FACS Aria IIIu ausgeführt. Die zur Fluoreszenzmarkierung der Zellen verwendeten Antikörper sind in Tabelle 9 dargestellt.

### 2.2.8.1 PROTEINANALYSE

Durch die Kopplung von Fluorochromen an einen Antikörper, welcher gegen ein Epitop eines Oberflächenmoleküls gerichtet ist, kann die Expression eines Proteins auf einer Zelle nachgewiesen werden. Die daraus resultierende mediane Fluoreszenzintensität (MFI, engl. *median fluorescence intensity*) ist dabei proportional zur Anzahl der Moleküldichte auf der Zelle und kann bei Verwendung der gleichen Instrumenteneinstellungen, des gleichen Geräts und desselben Antikörpers als indirektes Maß für die Proteinexpression herangezogen werden.

### 2.2.8.2 ZELLSORTIERUNG

Die Sortierung von Einzelzellen in zwei unterschiedliche Populationen wurde verwendet, um PVR- und PVRL2-Doppelknockout-Zellen der AML-Zelllinie MV4-11 von den parental Wildtyp-Zellen zu trennen. Das Sortieren ist dabei eine Variante der Durchflusszytometrie, bei der der Probenstrahl durch Vibration in einzelne Tröpfchen zerlegt wird, welche jeweils nur eine einzige Zelle enthalten.

Diese Tröpfchen werden mit einer elektrostatischen Ladung versehen. Durch ein elektrostatisches Ablenkungssystem können die Zellen in unterschiedliche Auffangbehälter sortiert werden.

### 2.2.8.3 MESSUNG VON ZYTOTOXIZITÄTSASSAYS

Um die Zytotoxizität von T-Zellen oder PBMCs gegenüber Leukämiezellen zu messen, wurde die spezifische Lyse von mit CellTracker™ Green gefärbten Leukämiezellen anhand der DNA-Interkalation des Avitalfarbstoffs 7-AAD gemessen. Dafür wurde der, wie unter 2.2.6 beschrieben, hergestellte Assay resuspendiert und in ein Probenröhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde mit 7-AAD-Lösung versetzt und für 15 min im Dunkeln inkubiert. Zur Auswertung der Daten wurde die CellTracker™ Green Population durch *gating* ausgewählt und in dieser Population die 7-AAD positiven Zellen bestimmt.

Zur Darstellung der Ergebnisse aus unabhängigen Wiederholungen wurden die Daten auf die jeweilige Kontrolle normiert und die Änderungen als n-fache Steigerung der Lyse zur Kontrolle dargestellt.

### 2.2.9 BAKTERIELLE TRANSFORMATION

Zur Amplifikation von Plasmiden wurden 10 ng DNA per Hitzeschock in kompetente DH5α *E.Coli* transformiert. Bei der Amplifikation von Ligationsansätzen wurde der gesamte Ligationsansatz transformiert. Für die Transformation wurden 50 µL Bakteriensuspension auf Eis aufgetaut und das Plasmid bzw. der Ligationsansatz langsam in die Suspension gerührt und für 30 min auf Eis inkubiert. Das Tube wurde daraufhin für 45 Sekunden in ein 42 °C warmes Wasserbad gestellt und erneut 2 min auf Eis abgekühlt. Die Bakterien wurden mit 500 µL warmem SOC Medium für 1 Std bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert und daraufhin auf LB-Ampicillin-Agar-Platten ausgestrichen. Zur Amplifikation von Plasmiden wurde eine Bakterienkultur im 8 mL oder 200 mL Maßstab angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Die Isolation der Plasmide erfolgte nach Herstellerangaben unter Verwendung des NucleoSpin Plasmid oder NucleBond Xtra Midi EF Kits.

### 2.2.10 AGAROSEGELEKTROPHORESE

Zur Analyse und zur Aufreinigung von DNA wurde die DNA über eine 1%-ige bis 1,5%-ige Agarosegelelektrophorese bei 90 V unter Verwendung eines TAE-Puffers aufgetrennt. Die

Visualisierung der Fragmente erfolgte durch Roti®-GelStain im Geldokumentationssystem mit einem DNA-Größenstandard als Referenz. Bei Verwendung der Fragmente zur weiteren Klonierung wurde die UV-Licht-Intensität und Expositionszeit verringert, um Schäden an der DNA zu verhindern. Ausgeschnittene DNA-Fragmente wurden unter Verwendung des Kits NucleoSpin Gel and PCR Clean up nach Herstellerangaben isoliert.

### 2.2.11 GENETISCHER *KNOCKOUT* DURCH CRISPR/CAS9

Durch die von Le Cong und Kollegen (Cong u. a., 2013) sowie zeitgleich auch von Prashant Mali und Kollegen (Mali u. a., 2013) modifizierte Variante des Typ II prokaryotischen CRISPR (*Clustered regulary interspaced short palindromic repeats*)/Cas (*CRISPR-associated*) Systems zur adaptiven Immunabwehr können genetische *knockout*-Varianten bestimmter Gene in Zelllinien hergestellt werden. Durch den Expressionvektor pX330 wird die codon-optimierte Variante der Endonuklease Cas9 des Stammes *Streptococcus pyogenes* zusammen mit einer synthetischen Fusions-RNA exprimiert. Die Fusions-RNA enthält dabei neben der CRISPR-RNA (crRNA) und der transaktivierenden crRNA (tracrRNA) eine einklonierte variable Sequenz, welche komplementär zur genomischen Zielsequenz ist und die Spezifität der Endonuklease bestimmt. Diese zielführende RNA-Sequenz (guideRNA) wurde mit dem bioinformatischen Tool CRISPR Design ([www.crispr.mit.edu](http://www.crispr.mit.edu), Zang Laboratory, MIT, USA) ausgewählt. Es wurden nur hoch spezifische guideRNAs selektiert, welche einen Qualitätsscore von  $\leq 92$  besitzen und bei denen eine Kreuzreaktivität zu anderen Genen nur bei vier Basenfehlpaarungen auftreten kann. Die ausgewählten guideRNAs wurden entweder in das Plasmid pX330 oder in das nicht integrierende lentivirale Konstrukt U6-cgRNA-SFFV-Cas9-IRES-mCherry (abgewandelt aus px330 und LEGO-iC, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Ulrike Mock) kloniert. Zur Amplifikation der klonierten Plasmide wurde eine Transformation der Plasmide in kompetente DH5 $\alpha$  Bakterien mittels Hitzeschock durchgeführt, und die Plasmide wurden endotoxinfrei isoliert. Für den Transport des Konstruktes in die Leukämie-Zielzellen wurde zum einen das Verfahren der Elektroporation für das Plasmid pX330 und zum anderen lentivirale Transduktion für das Plasmid U6-cgRNA-SFFV-Cas9-IRES-mCherry eingesetzt. Die Elektroporation erfolgte mit dem Protokoll *exponential decay* bei 1050  $\mu$ F, 1000 Ohm und 300 V in einer gekühlten 4mm-Küvette. Dritte Generation von nicht integrierenden Lentiviren wurden mit den Verpackungsplasmiden pRSV-Rev, pHCMV-VSV-G und pCMVD8.74D64V generiert ([addgene.org](http://addgene.org), (Yáñez-Muñoz u. a., 2006)). Der *knockout* wurde durchflusszytometrisch analysiert, und Einzellzellen wurden zur genetischen Analyse sowie polyklonale *knockout* Kulturen für funktionelle Assays sortiert.

Für die genetische Analyse von Einzellzellen wurde die DNA isoliert und der entsprechende Bereich mit Hilfe der Primer PVR und PVRL2 for/rev subclone (siehe Tabelle 7) aus der DNA amplifiziert. Die Amplicons wurden unter Verwendung des CloneJet Kits nach Herstellerangaben in den pJet1.2/blunt Vektor subkloniert und unter Verwendung des Primers pJet1.2 forward sequenziert. Die erhaltenen Resultate wurden mit der parentalen Wildtyp-Sequenz verglichen. Veränderungen zur Wildtyp-Sequenz wurden in die Referenz-cDNA-Sequenz (NM\_006505.3 für PVR und NM\_001042724.1 für PVRL2) inkorporiert und Effekte auf die resultierende Proteinsequenz untersucht. Zudem wurden die Auswirkungen der Mutationen mit dem Programm Mutationtaster ([www.mutationtaster.org](http://www.mutationtaster.org)) analysiert. Dafür diente für PVR das Transkript ENST00000344956 (PVR-201) und für PVRL2 das Transkript ENST00000252485 (Nectin2-001) als Referenz.

### 2.2.12 *IN VIVO* MAUSMODELL

Um den Effekt der Immuncheckpoint Moleküle PVR und PVRL2 *in vivo* zu untersuchen wurde ein AML-Xenograft-Mausmodell etabliert. Im Mittelpunkt der Fragestellung stand dabei die Überlebensdauer der Mäuse. Alle in dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche erfüllen die Auflagen des Deutschen Tierschutzgesetzes und der europäischen Richtlinie EU 2010/63. Alle Versuche und deren Abläufe wurden von Tierschutzbeauftragten des UKE sowie der Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz der Hansestadt Hamburg mit der Antragsnummer 121/14 genehmigt.

#### 2.2.12.1 MÄUSE

Für die AML-Xenograft-Modelle in dieser Arbeit wurden NOD.Cg-PrkdcscidIL2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ (NSG) Mäuse verwendet. Diese Mauslinie zeichnet sich durch eine Immuninkompetenz aus. Die fehlende Expression der Gene *Prkdc* und *IL2rg* führt zu einer Abwesenheit von reifen T-Zellen, B-Zellen und funktionellen NK-Zellen. Zudem weisen die Mäuse eine unzureichende Signalübertragung durch Zytokine auf.

Die Mäuse wurden von Charles River bezogen und in Homozygotie im UKE gezüchtet. Die Mäuse wurden in einem Tag-Nacht-Rhythmus (12 Stunden hell, 12 Stunden dunkel) in einer definiert pathogenfreien Umgebung in individuell belüfteten Käfigen (engl. *individually ventilated cages* (IVC)) bei  $22 \pm 1$  °C und 55 % Luftfeuchtigkeit gehalten. Wasser und Futter standen den Tieren dabei unbegrenzt zur Verfügung.

### 2.2.12.2 AKTIVIERUNG UND EXPANSION VON T-ZELLEN

Die Isolation von CD3 T-Zellen erfolgte aus 500 mL heparanisiertem Vollblut eines gesunden Spenders. Die Lymphozytenfraktion wurde durch Dichtezentrifugation mit Polysucrose 400 gewonnen und eine Erylyse durchgeführt. Die Isolation der T-Zellen erfolgte durch eine magnetische Negativselektion durch das PANT Cell Isolation Kit. Anschließend wurde die Reinheit der CD3-Fraktion am FACS bestätigt und alle erhaltenen T-Zellen wurden mit Hilfe des T Cell Activation and Expansion Kits bei einer Dichte von  $2,5 \times 10^6 / \text{mL/cm}^2$  in RPMI 1640 + 10 % FBS + 20 Einheiten/mL rIL2 nach Herstellerangaben über zwei Wochen expandiert.

### 2.2.12.3 TRANSPLANTATION VON LEUKÄMIE- UND T-ZELLEN

Entweder  $2 \times 10^5$  MV4-11-Wildtyp- oder MV4-11 PVR- und PVRL2-Doppelknockout-Zellen wurden intravenös in NSG-Mäuse injiziert. Alle Mäuse erhielten fünf Tage später  $20 \times 10^6$  aktivierte und expandierte T-Zellen des gleichen Spenders (siehe 2.2.12.2) durch intraperitoneale Injektion. Die Mäuse wurden randomisiert in Gruppen aufgeteilt und die Tiere ab Tag 8 in einem verblindeten Experiment täglich entweder mit Placebo (PBS) oder mit 10  $\mu\text{g/kg}$ , 15  $\mu\text{g/kg}$  oder 50  $\mu\text{g/kg}$  des CD3/CD33 bispezifischen Antikörpers AMG 330 durch intraperitoneale Injektion behandelt. Das Überleben der Mäuse wurde beobachtet. Die Gruppengrößen betragen zwischen 12 und 15 Tiere pro Gruppe (siehe Ergebnisse Tabelle 13).

### 2.2.13 STATISTIK UND GRAPHISCHE DARSTELLUNG

Die Genexpression von Immuncheckpoint Molekülen im Zusammenhang mit dem Überleben der AML-Patienten wurde in Kaplan-Meier-Kurven analysiert. Mit Hilfe der *Classification and Regression Tree* Analyse wurde für die PVR-Expression ein diskriminativer Schwellenwert ermittelt, welcher die Patienten in hoch und niedrige Expressoren unterteilte (Hothorn u. a., 2006). Für die anderen Gene wurde der Median der Expressionsintensitäten herangezogen. Mit Hilfe eines multivariate Cox-Regressionsmodells mit Rückwärtsselektion wurden Gene identifiziert, welche einen unabhängigen prognostischen Prädiktor darstellen. Das Überleben unterschiedlicher Gruppen in *in vivo* Mausversuchen wurde ebenfalls in Kaplan-Meier-Überlebenskurven analysiert. Alle Kaplan-Meier-Analysen und die daraus resultierenden nicht-parametrischen Log-Rank-Tests zur Berechnung der Signifikanz zweier Gruppen wurden mit SPSS erstellt. Die Darstellung der *in vitro* Versuche versteht

sich als Mittelwert unabhängiger Experimente  $\pm$  der Standardabweichung. Alle Graphiken wurden mit GraphPad Prism erstellt. Die Berechnung statistischer Signifikanz erfolgte durch Mann-Whitney-U-Tests oder gepaarte T-Tests ebenfalls in GraphPad Prism, wobei p-Werte von  $\leq 0,05$  als statistisch signifikant betrachtet wurden.

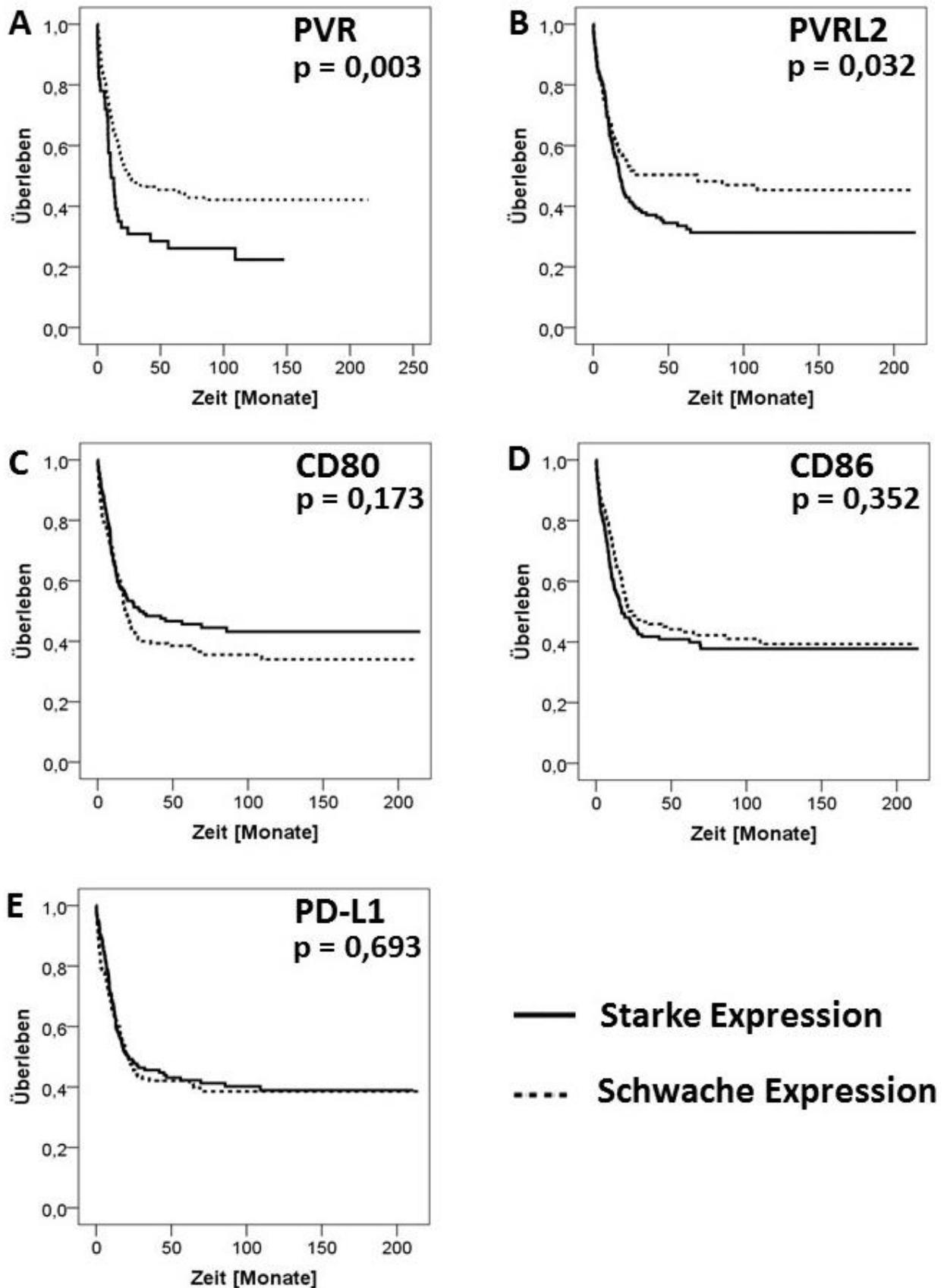
### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 DIE EXPRESSION VON PVR UND PVRL2 REPRÄSENTIERT EINEN UNABHÄNGIGEN PROGNOTISCHEN FAKTOR IN DER AML

Um neue therapeutische Zielstrukturen für die Behandlung der AML zu identifizieren, wurden in Kooperation mit Dr. Jasmin Wellbrock publizierte *Microarray*-Genexpressionsdaten von 290 Patienten mit neu diagnostizierter AML, zu denen klinische Daten zur Verfügung standen, auf die prädiktive Bedeutung der Expression unterschiedlicher Immuncheckpoint Moleküle untersucht (Verhaak u. a., 2009). Dafür wurde die Genexpression von PVR und PVRL2, der CTLA4 Liganden CD80 und CD86 und des PD-1 Liganden PD-L1 und PD-L2 mit dem Überleben der Patienten in Kaplan-Meier-Analysen analysiert. Die Patientencharakteristika sind in Tabelle 12 dargestellt. Mit Hilfe der *Classification and Regression Tree* Analyse wurde für die PVR-Expression ein diskriminativer Schwellenwert ermittelt, welcher die Patienten in solche mit guter bzw. schlechter Prognose trennt. Für die anderen Gene wurde der Median der Genexpressionwerte herangezogen. Eine hohe PVR- als auch PVRL2-Expression war in diesen Log-Rank-Analysen mit einem signifikant verkürzten Gesamtüberleben der Patienten unter konventioneller Chemotherapie assoziiert ( $p=0,003$  für PVR und  $p=0,032$  für PVRL2, siehe Abbildung 4 A und B). Für die Expression der Liganden CD80, CD86 und PD-L1 konnte kein Einfluss auf das Überleben der Patienten festgestellt werden. Eine Expression von PD-L2 konnte in den publizierten *Microarray*-Genexpressiondaten von Verhaak und Kollegen nicht detektiert werden (Verhaak u. a., 2009) (siehe Abbildung 4 C-E). Weiterführend wurde das Gesamtüberleben der Patienten nach Chemotherapie in einem multivariaten Cox-Regressionsmodell für die Parameter PVR, PVRL2, CD80, CD86, PD-L1 sowie Alter, Karyotyp und FLT3-Mutationsstatus untersucht. Schrittweise wurden nicht signifikante Parameter aus der Analyse eliminiert. Letztendlich resultierte eine hohe PVR-Expression sowie die FLT3-Mutation als unabhängige prognostische Marker für das Überleben (für PVR: Hazard Ratio (HR) 3,39 (95% Konfidenzintervall (KI) 1,45 – 7,94),  $p=0,005$ ; für FLT3: HR 1,37 (95% (KI) 1,01 – 1,85),  $p=0,045$ ).

**Tabelle 12: Patientencharakteristika der analysierten Kohorte von Verhaak und Kollegen** (Verhaak u. a., 2009)

Patientencharakteristika	n=290
Medianes Alter in Jahren (Spanne)	44 (15 -60)
Anteil männlicher Patienten	44 %
Patienten mit ungünstigem Karyotyp	35 %
Patienten mit FLT3-Mutation	41 %

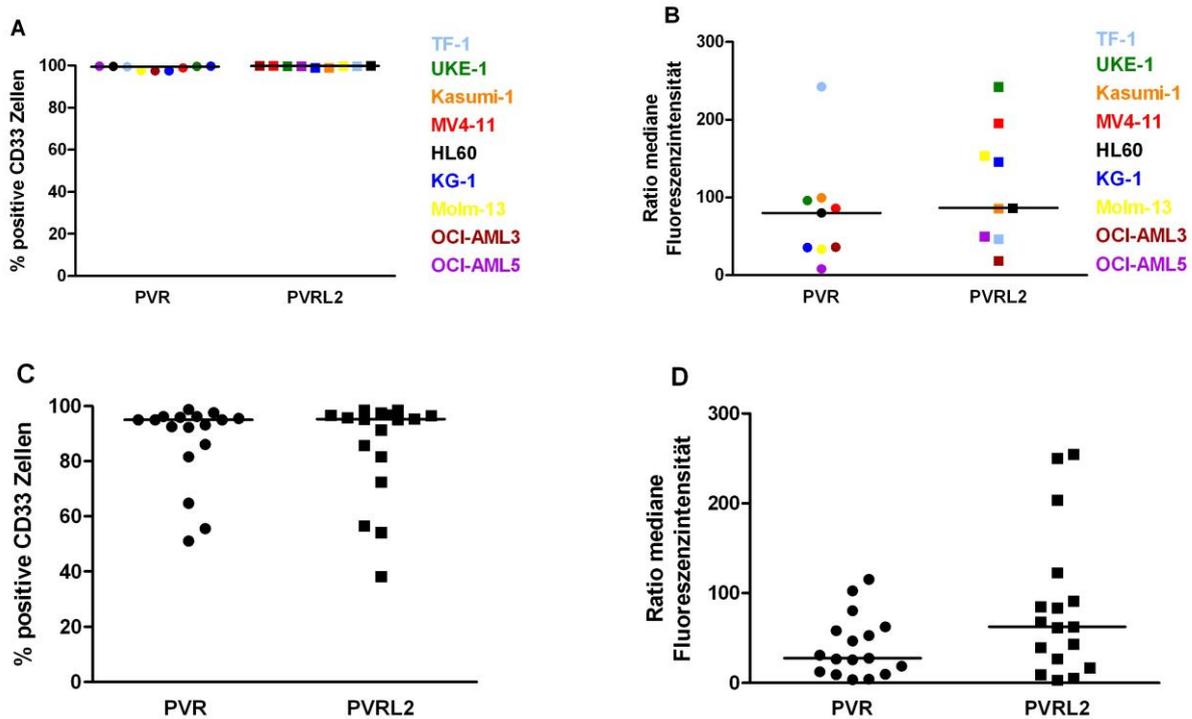


**Abbildung 4: Einfluss unterschiedlicher Immuncheckpoint Liganden auf das Gesamtüberleben von AML-Patienten.** Die Genexpression von 290 AML-Patienten aus einer Studie von Verhaak und Kollegen wurde mit dem Überleben in einer Kaplan-Meier-Analyse korreliert. Für die Berechnung der signifikanten Unterschiede der Überlebenskurven wurden Log-Rank-Tests durchgeführt.

Diese Daten konnten von Felix Klingler als Teil seiner medizinischen Doktorarbeit verifiziert werden. In dieser Arbeit wurden die cDNA Proben von 139 Patienten mit neu diagnostizierter AML aus der AMLSG 07-04 Studie der Deutsch-Österreichischen Studiengruppe mittels quantitativer RT-PCR auf die Expression von PVR und PVRL2 untersucht und anschließend mit den klinischen Daten der AML-Patienten korreliert. Eine Expression von PVR und PVRL2 wurde in 94 % bzw. 95 % der Patienten nachgewiesen. Ebenfalls wurden auch in dieser Kohorte die PVR- und PVRL2-Genexpression mit dem Alter, dem Karyotyp und dem FLT3-Mutationsstatus in Bezug auf das Eventfreie-Überleben (EFS), Rezidivfreie-Überleben (RFS) und Gesamtüberleben (engl. *overall survival* (OS)) in einem multivariaten Cox-Regressionsmodell untersucht. In diesen Analysen stellte eine hohe PVR-Expression zusammen mit dem Karyotyp einen unabhängigen prognostischen Marker für das EFS, RFS und OS dar. Zudem konnte eine hohe Korrelation zwischen der PVR- und PVRL2-Expression festgestellt werden (Pearson's  $\rho=0.827$ ,  $p<0.001$ ).

### 3.2 DIE EXPRESSION DER TIGIT LIGANDEN PVR UND PVRL2 AUF AML-ZELLINIEN SOWIE AUF CD33<sup>+</sup> PRIMÄREN AML-BLASTEN

Um die Relevanz der Proteine PVR und PVRL2 als potentielle Zielstrukturen für die Immuntherapie zu evaluieren, wurde ihre Expression auf AML-Zellen untersucht. Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch auf den AML-Zelllinien TF-1, UKE-1, Kasumi-1, KG-1, HL-60, MV4-11, Molm-13, OCI-AML3 und OCI-AML5 sowie auf den CD33<sup>+</sup> Blasten von 17 unbehandelten AML-Patienten (siehe Abbildung 5). Alle untersuchten Zelllinien zeigten eine variable, aber sehr hohe Expression von PVR und PVRL2 auf, welche als das Ratio der medianen Fluoreszenzintensität (engl. *median fluorescence intensity* (MFI); MFI für PVR-APC bzw. PVRL2-PE geteilt durch MFI für Isotypkontrolle-APC bzw. Isotypkontrolle-PE) dargestellt ist. Die Blasten von unbehandelten AML-Patienten zeigten in der Mehrheit eine PVR- und PVRL2-Expression auf, wobei die Expressionsintensitäten zwischen den Patienten variierten. Die Expression des korrespondierenden Rezeptors TIGIT wurde auf CD3<sup>+</sup> T-Zellen von vier gesunden Spendern analysiert. Die Expression von TIGIT konnte auf 13,6 %  $\pm$  3,7 % der CD3<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

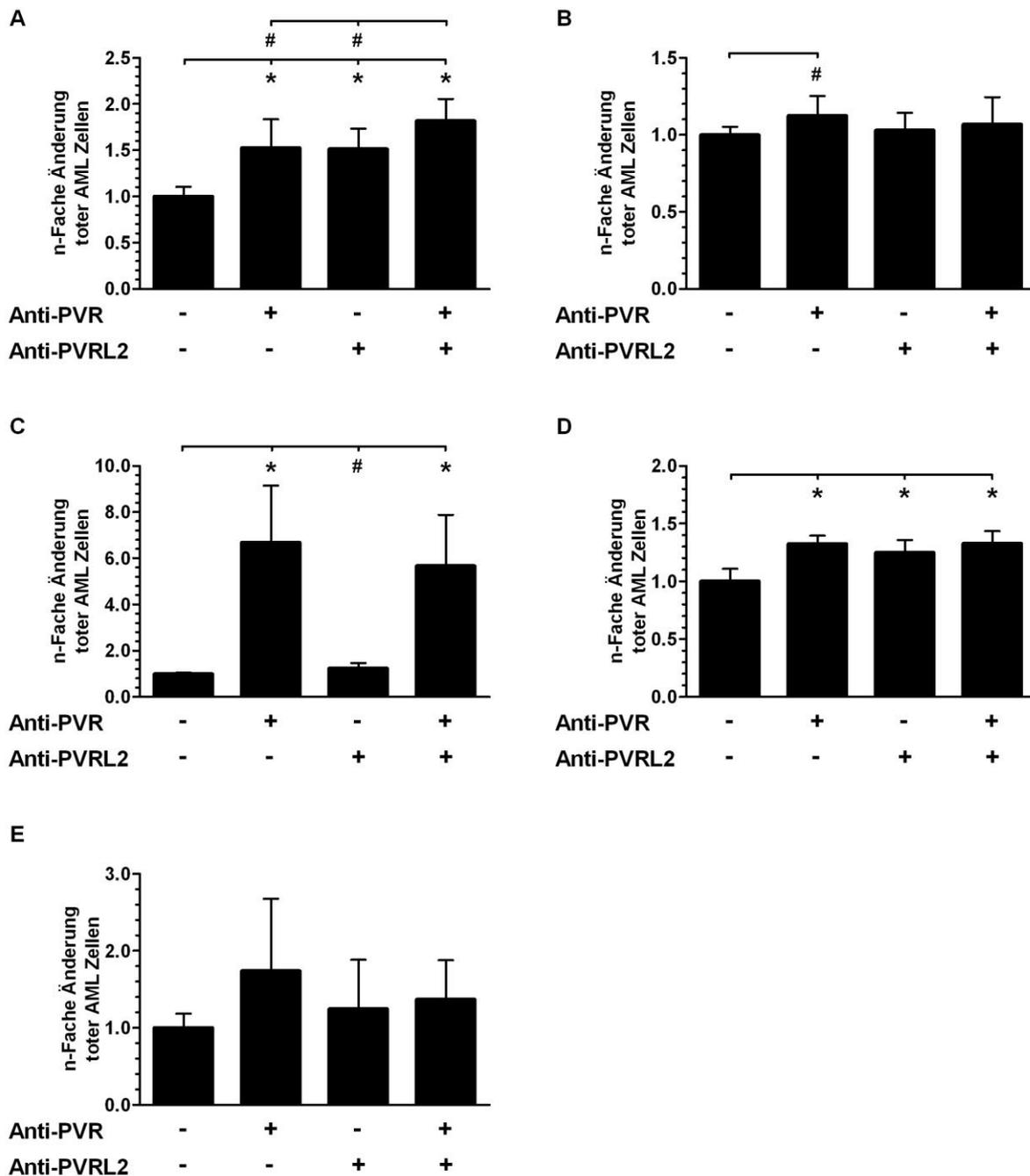


**Abbildung 5: Proteinexpression von PVR und PVRL2 auf AML-Zelllinien und CD33<sup>+</sup> Blasten von unbehandelten AML-Patienten.** Die PVR- und PVRL2-Proteinexpression wurde auf neun CD33<sup>+</sup> AML-Zelllinien (A, B) sowie auf CD33<sup>+</sup> Blasten von 17 unbehandelten AML-Patienten (C, D) fluoreszenz-zytometrisch gemessen. Abgebildet sind der Mittelwert der Anzahl positiver Zellen und das Ratio der medianen Fluoreszenzintensität als Maß der Expressionsintensität. Der schwarze Balken repräsentiert den Median.

### 3.3 DIE BLOCKIERUNG VON TIGIT ODER DER LIGANDEN PVR UND PVRL2 FÜHRT ZU EINER SIGNIFIKANTEN ERHÖHUNG DER ZYTOTOXIZITÄT

In *in vitro* Zytotoxizitätsassays wurde das therapeutische Potential einer Maskierung der bisher wenig beschriebenen Immuncheckpoint Moleküle PVR und PVRL2 auf leukämischen Blasten untersucht. Dafür wurden CellTracker Green™ gefärbte AML-Zielzellen mit mononukleären Zellen des peripheren Blutes von gesunden Spendern (engl. *healthy donor peripheral blood mononuclear cells* (HD-PBMCs)) vermischt und mit blockierenden Antikörpern gegen PVR und PVRL2 inkubiert. Nach 24 h wurde die spezifische Lyse der AML-Zellen durchflusszytometrisch durch einen Avitalfarbstoff bestimmt. Die spezifische Lyse der AML-Zelllinien TF-1, Molm-13, Kasumi-1, HL60 und OCI-AML5 ist als der Mittelwert der auf die Kontrolle ohne blockierende Antikörper normalisierten n-fachen Steigerung an apoptotischen Zielzellen in Abbildung 6 A-E dargestellt. Im Vergleich zur Kontrolle konnte die Lyse von TF-1-Zellen durch das Blockieren des Liganden PVR um das 1,53-Fache ( $\pm$  0,31-Fach) erhöht werden. Die Blockade von PVRL2 verstärkte die Lyse dieser Zellen um das 1,51-Fache ( $\pm$  0,22-Fach). Die Kombination des PVR-blockierenden und PVRL2-blockierenden Antikörpers erhöhte die spezifische Lyse von TF-1-Zellen um das 1,82-Fache ( $\pm$  0,24-Fach) und war damit signifikant besser als die Blockade

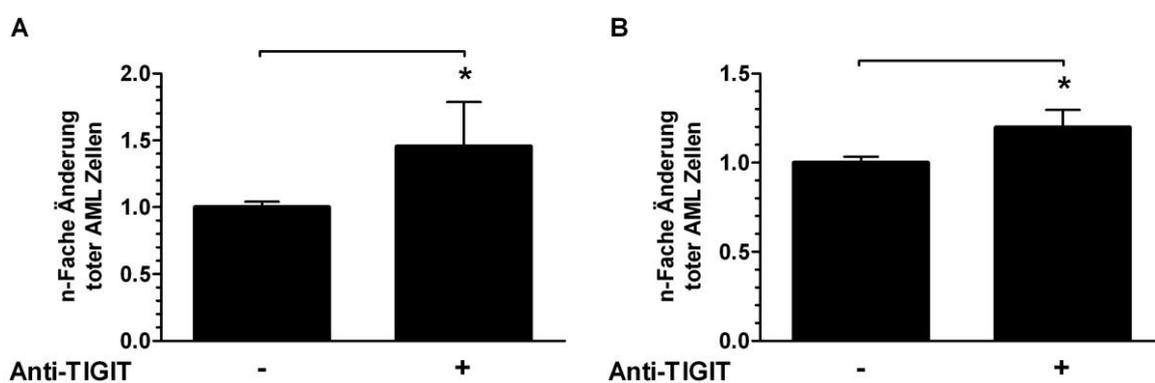
von PVR oder PVRL2 alleine. Für die Zelllinie Molm-13 konnte eine signifikante Erhöhung der Zelllyse bei Zugabe des PVR-blockierenden Antikörpers von 1,12-Fach ( $\pm 0,13$ -Fach) im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden. In den Versuchen mit der Zelllinie Kasumi-1 führte die Blockade von PVR zu einer signifikanten Steigerung der Lyse von 6,68-Fach ( $\pm 2,46$ -Fach) und von PVRL2 zu einer Steigerung der Lyse von 1,24-Fach ( $\pm 0,22$ -Fach). Wurde der Ligand PVR oder PVRL2 auf der Zelllinie HL-60 durch Antikörper blockiert, konnten die zytotoxischen Effekte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um das 1,32-Fache ( $\pm 0,07$ -Fach) bzw. 1,25-Fache ( $\pm 0,11$ -Fach) erhöht werden. Für die Zelllinie OCI-AML5 zeigte sich keine signifikante Steigerung der Effekte bei Blockade der Liganden. Es konnte jedoch eine Tendenz zu einer gesteigerten Lyse der Zellen bei Blockade von PVR, PVRL2 oder der Kombination festgestellt werden. Durchgeführte Kontrollexperimente ohne die Zugabe von HD-PBMCs als Effektorzellen zeigten keinen Einfluss auf die Lyse der AML Zelllinien TF-1, Molm-13 und Kasumi-1. Zusammengefasst zeigen die in Abbildung 6 A-E dargestellten Ergebnisse, dass eine Blockade von PVR sowie PVRL2 auf AML-Zellen die zytotoxischen Effekte von Immunzellen gegenüber diesen Zellen erhöht.



**Abbildung 6: Die Blockade von PVR und PVRL2 erhöht die Lyse von AML-Zelllinien.** HD-PBMCs (engl. *healthy donor peripheral blood mononuclear cells*) wurden als Effektorzellen mit den AML-Zelllinien TF-1 (A, n=3), Molm-13 (B, n=6), Kasumi-1 (C, n=3), HL-60 (D, n=4) oder OCI-AML5 (E, n=4) im Verhältnis 6:1 mit oder ohne PVR und PVRL2 blockierenden Antikörpern für 24 h inkubiert. Die spezifische Lyse der AML-Zelllinie ist als der Mittelwert der n-fachen Änderungen ( $\pm$  Standardabweichung) toter AML-Zellen normalisiert auf die Kontrolle ohne blockierende Antikörper dargestellt. Alle Messungen wurden in technischen Triplikaten ausgeführt. Für die statistische Auswertung wurden Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt (#  $p \leq 0.05$ ; \*  $p \leq 0.001$ ).

Starke zytotoxische Effekte ließen sich ebenfalls bei Verwendung der Zelllinie MV4-11 bei Zugabe von PVR- und PVRL2-blockierenden Antikörpern messen. Bei der Zelllinie MV4-11 war die Lyse jedoch größtenteils unabhängig von Effektorzellen, da vergleichbare Effekte ohne die Zugabe von Effektorzellen messbar waren (Daten nicht gezeigt). Der Mechanismus dieses antileukämischen

Effektes von PVR- und PVRL2-blockierenden Antikörpern auf die Zelllinie MV4-11 konnte bisher nicht geklärt werden. Die Blockierung des Rezeptors TIGIT auf HD-PBMCs zeigte jedoch in Zytotoxizitätsassays mit der Zelllinie MV4-11 eine spezifische, durch Effektorzellen bedingte, signifikante Steigerung der Lyse von 1,46-Fach ( $\pm$  0,33-Fach) im Vergleich zur Kontrolle ohne blockierenden TIGIT-Antikörper (siehe Abbildung 7 A). Ähnliche Ergebnisse konnten bei Verwendung der Zelllinie TF-1 erzielt werden. Hierbei ließ sich die Lyse der Zellen signifikant um das 1,2-Fache ( $\pm$  0,1-Fach) erhöhen (siehe Abbildung 7 B). Diese Ergebnisse belegen, dass nicht nur die Blockierung der Liganden PVR und PVRL2, sondern auch des Rezeptors TIGIT auf Effektorzellen die zytotoxische Wirkung gegenüber AML-Zelllinien erhöht.

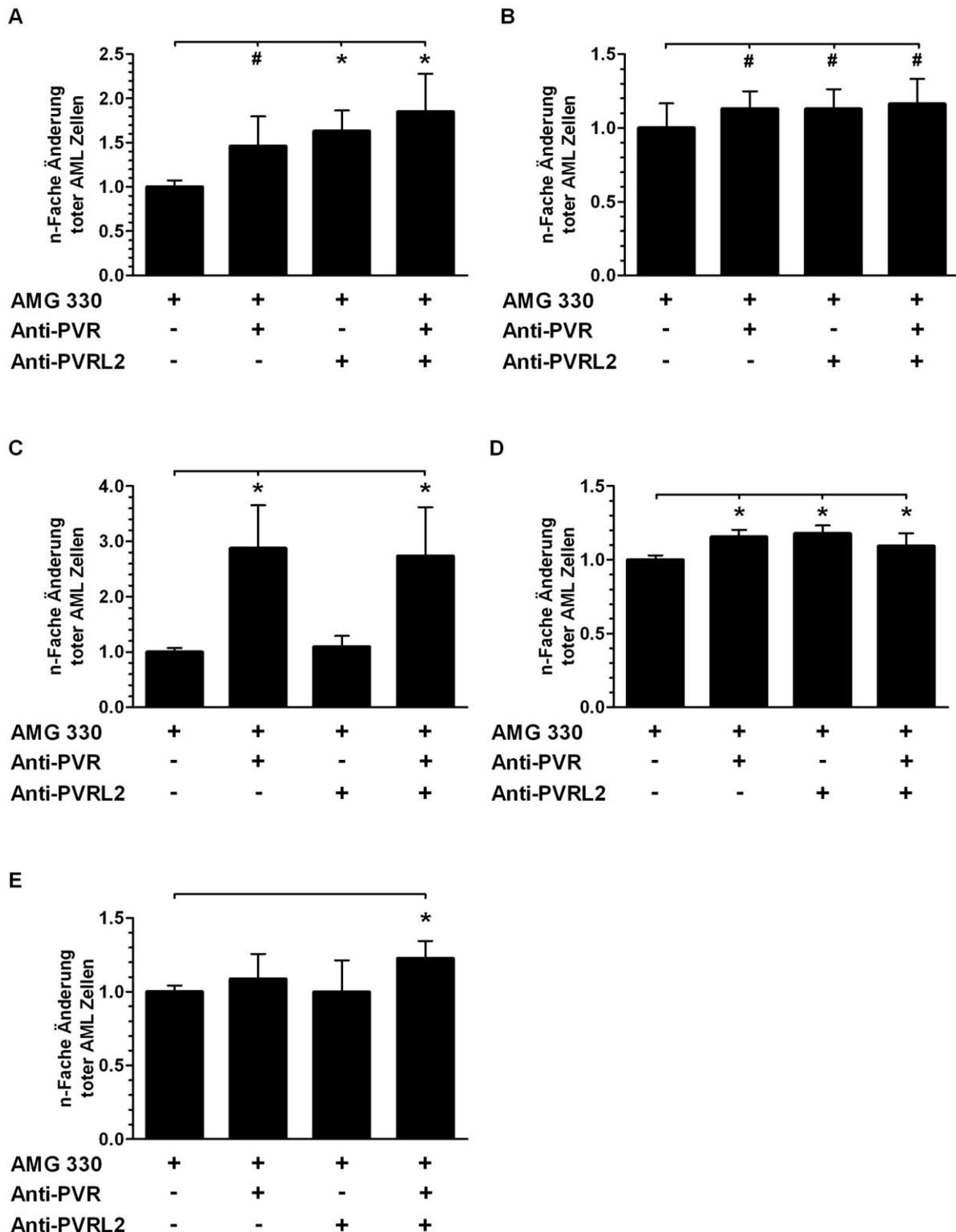


**Abbildung 7: Die Blockierung des Rezeptors TIGIT auf HD-PBMCs wurde in Assays mit den Zelllinien MV4-11 (A, n=3) und TF-1 (B, n=5) untersucht.** Die spezifische Lyse der AML-Zelllinie ist als der Mittelwert der n-fachen Änderungen ( $\pm$  Standardabweichung) toter AML-Zellen normalisiert auf die Kontrolle ohne blockierenden Antikörper dargestellt. Alle Messungen wurden in technischen Triplikaten ausgeführt. Für die statistische Auswertung wurden Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt (\*  $p \leq 0.001$ ).

### 3.4 DIE BLOCKIERUNG DER TIGIT-PVR/PVRL2-ACHSE IN KOMBINATION MIT DEM BiTE® ANTIKÖRPERKONSTRUKT AMG 330 FÜHRT ZU EINER SIGNIFIKANTEN ERHÖHUNG DER T-ZELL-MEDIERTEN LYSE

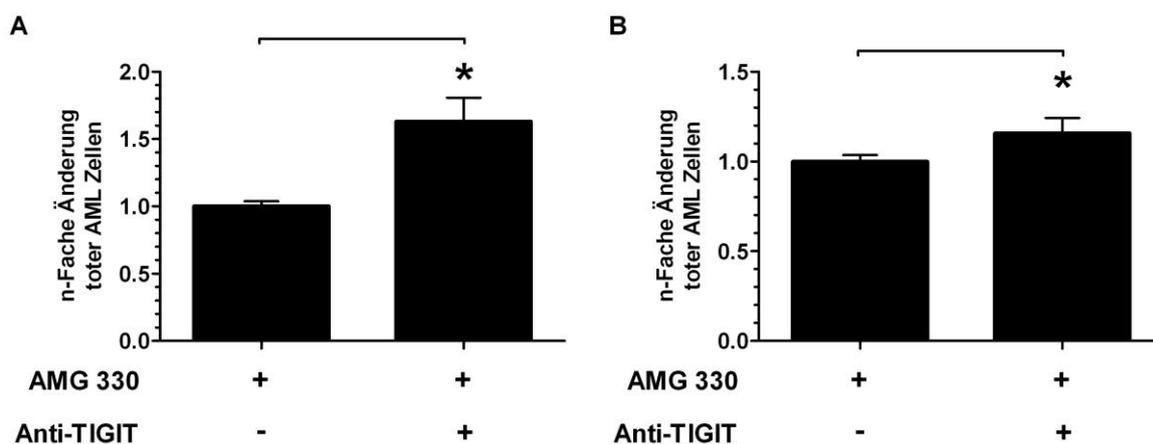
Unter Einsatz des *in vitro* Zytotoxizitätsassays mit HD-PBMCs als Effektorzellen wurde im Weiteren untersucht, ob die durch den bispezifischen Antikörper AMG 330 vermittelte T-Zell-Zytotoxizität durch eine Maskierung von PVR und PVRL2 weiter verstärkt werden kann. Dafür wurden die CellTracker™ Green gefärbten AML-Zelllinien TF-1, Molm-13, Kasumi-1, HL-60 oder OCI-AML5 zusammen mit den Effektorzellen für 24 Stunden mit oder ohne den BiTE Antikörper AMG 330 (0,1 ng/mL) in An- oder Abwesenheit der blockierenden Antikörper gegen PVR und PVRL2 inkubiert. Wie in Abbildung 8 A dargestellt, wurde die spezifische Lyse von TF-1-Zellen bei der zusätzlichen Zugabe von PVR- oder PVRL2-blockierenden Antikörpern im Vergleich zur Behandlung mit dem BiTE® Antikörperkonstrukt

alleine um das 1,46-Fache ( $\pm 0,34$ -Fach) bzw. das 1,63-Fache ( $\pm 0,23$ -Fach) erhöht. Eine Kombination von beiden blockierenden Antikörpern steigerte die Lyse dieser Zelllinie um das 1,85-Fache ( $\pm 0,43$ -Fach) im Vergleich zur Kontrolle. Ähnliche, wenn auch schwächere Effekte, konnten bei Verwendung der Zelllinie Molm-13 nachgewiesen werden (siehe Abbildung 8 B). In Bezug auf die Zelllinie Kasumi-1 konnte eine signifikante Steigerung der Lyse nur bei Verwendung des PVR-blockierenden Antikörpers oder bei der Kombination beider Antikörper, nicht aber bei Verwendung des PVRL2-blockierenden Antikörpers alleine, erzielt werden (siehe Abbildung 8 C). Die Lyse von HL-60-Zellen konnte bei Verwendung PVR- oder PVRL2-blockierender Antikörper um das 1,16-Fache ( $\pm 0,05$ -Fach) bzw. 1,18-Fache ( $\pm 0,06$ -Fach) gesteigert werden. Eine Kombination von PVR- und PVRL2-blockierenden Antikörpern erhöhte die Lyse der Zellen im Mittel um das 1,09-Fache ( $\pm 0,09$ -Fach; siehe Abbildung 8 D). Der Einsatz einer Kombination an PVR- und PVRL2-blockierenden Antikörpern konnte in Kombination mit dem BiTE<sup>®</sup> Antikörperkonstrukt AMG 330 die Lyse von OCI-AML5-Zellen signifikant auf das 1,23-Fache ( $\pm 0,12$ -Fach) erhöhen (siehe Abbildung 8 E). Diese Ergebnisse zeigen, dass die antileukämischen Effekte des CD3/CD33-spezifischen BiTE<sup>®</sup> Antikörperkonstrukts AMG 330 durch die zusätzliche Blockade der Liganden PVR und PVRL2 verstärkt werden kann.



**Abbildung 8: Die durch das BiTE® Antikörperkonstrukt medierte T-Zell-Lyse kann durch PVR- und PVRL2-blockierende Antikörper signifikant verstärkt werden.** Auf den Zelllinien TF-1 (A, n=3), Molm-13 (B, n=6), Kasumi-1 (C, n=3), HL-60 (D, n=4) oder OCI-AML5 (E, n=4) wurden in An- oder Abwesenheit des bispezifischen Antikörpers AMG 330 die Immuncheckpoint Moleküle PVR und PVRL2 blockiert und die spezifische Lyse durch HD-PBMCs als Effektorzellen nach 24 h detektiert. Die Ergebnisse der Versuche sind als der Mittelwert der n-fachen Änderungen ( $\pm$  Standardabweichung) totaler AML-Zellen normalisiert auf die Kontrolle ohne blockierende Antikörper dargestellt. Alle Assays wurden in technischen Triplikaten angesetzt. Für die statistische Auswertung wurden Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt (#  $p \leq 0.05$ ; \*  $p \leq 0.001$ ).

Ebenfalls wurde der Effekt der Blockierung des Rezeptors TIGIT auf den Effektorzellen in Kombination mit dem BiTE® Antikörperkonstrukt untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Blockierung des Rezeptors TIGIT die durch AMG 330 hervorgerufenen antileukämischen Effekte gegenüber den beiden getesteten Zelllinien MV4-11 und TF-1 signifikant verstärkte. Im Vergleich zur Kontrolle ohne blockierenden Antikörper erhöhte eine Blockierung von TIGIT in diesen Versuchen die Effekte des BiTE® Antikörperkonstruktes um das 1,63-Fache ( $\pm 0,18$ -Fach) für die Zelllinie MV4-11 und um das 1,16-Fache ( $\pm 0,08$ -Fach) für die Zelllinie TF-1 (siehe Abbildung 9).

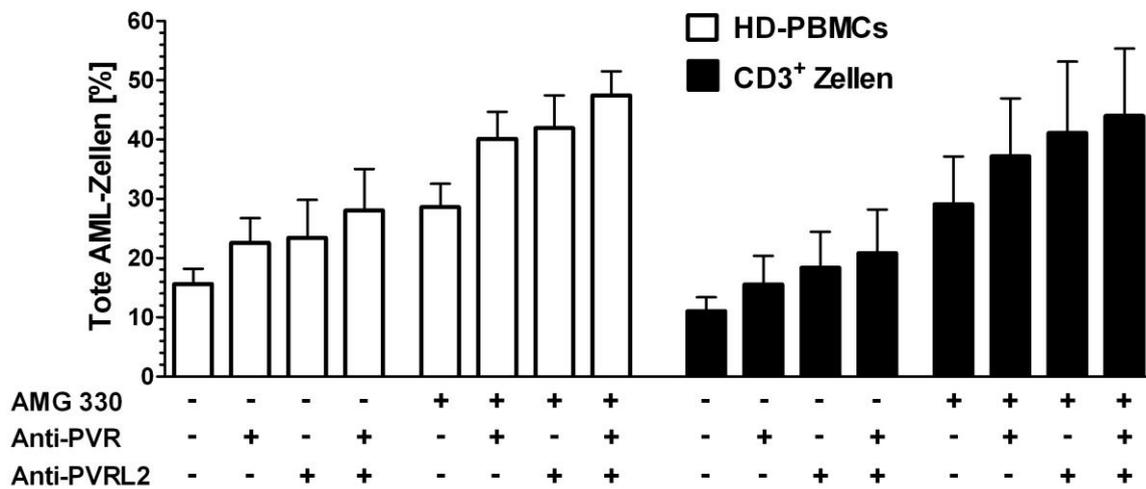


**Abbildung 9: Die Blockierung des Rezeptors TIGIT auf Effektorzellen erhöht die zytotoxische Wirkung des BiTE® Antikörperkonstruktes AMG 330.** Der Effekt der Blockade des Rezeptors TIGIT auf HD-PBMCs wurde in Zytotoxizitätsassays unter Einsatz der Zelllinien MV4-11 (A, n=3) und TF-1 (D, n=5) als Zielzellen untersucht. Die spezifische Lyse der Zielzellen wurde nach 24 h durchflusszytometrisch bestimmt. Die Ergebnisse sind als der Mittelwert der n-fachen Änderungen ( $\pm$  Standardabweichung) toter AML-Zellen normalisiert auf die Kontrolle ohne blockierenden Antikörper dargestellt. Alle Assays wurden in technischen Triplikaten angesetzt. Für die statistische Auswertung wurden Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt (\*  $p \leq 0.001$ ).

### 3.5 DIE GESTEIGERTE LYSE DER AML-ZELLEN IST T-ZELL-VERMITTELT

Um die Fragestellung zu beantworten, von welchem Subtyp von Effektorzellen innerhalb der mononuklären Zellfraktion die beobachtete Verstärkung der zytotoxischen Effekte ausgeht, wurden in Zytotoxizitätsassays HD-PBMCs und isolierte CD3<sup>+</sup>-Zellen des gleichen Spenders als Effektorzellen verglichen. Dabei zeigte sich, dass die in Abschnitt 3.3 und 3.4 dargestellte erhöhte Lyse der AML-Zellen nach Blockierung der Liganden PVR und PVRL2 T-Zell-vermittelt ist, da die Lyse von TF-1-Zellen durch HD-PBMCs und durch die isolierte CD3<sup>+</sup>-Fraktion des identischen Spenders als Effektorzellen vergleichbare Resultate lieferte. Ebenfalls wurden die antileukämischen Effekte des BiTE® Antikörperkonstruktes AMG 330 in vergleichbarer Weise durch die Blockierung der Liganden erhöht (siehe Abbildung 10). Durch diesen Versuch können zusätzlich Effekte der hauptsächlich von NK-Zellen

vermittelten antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität ausgeschlossen werden, da T-Zellen nicht über Fc-Rezeptoren verfügen.

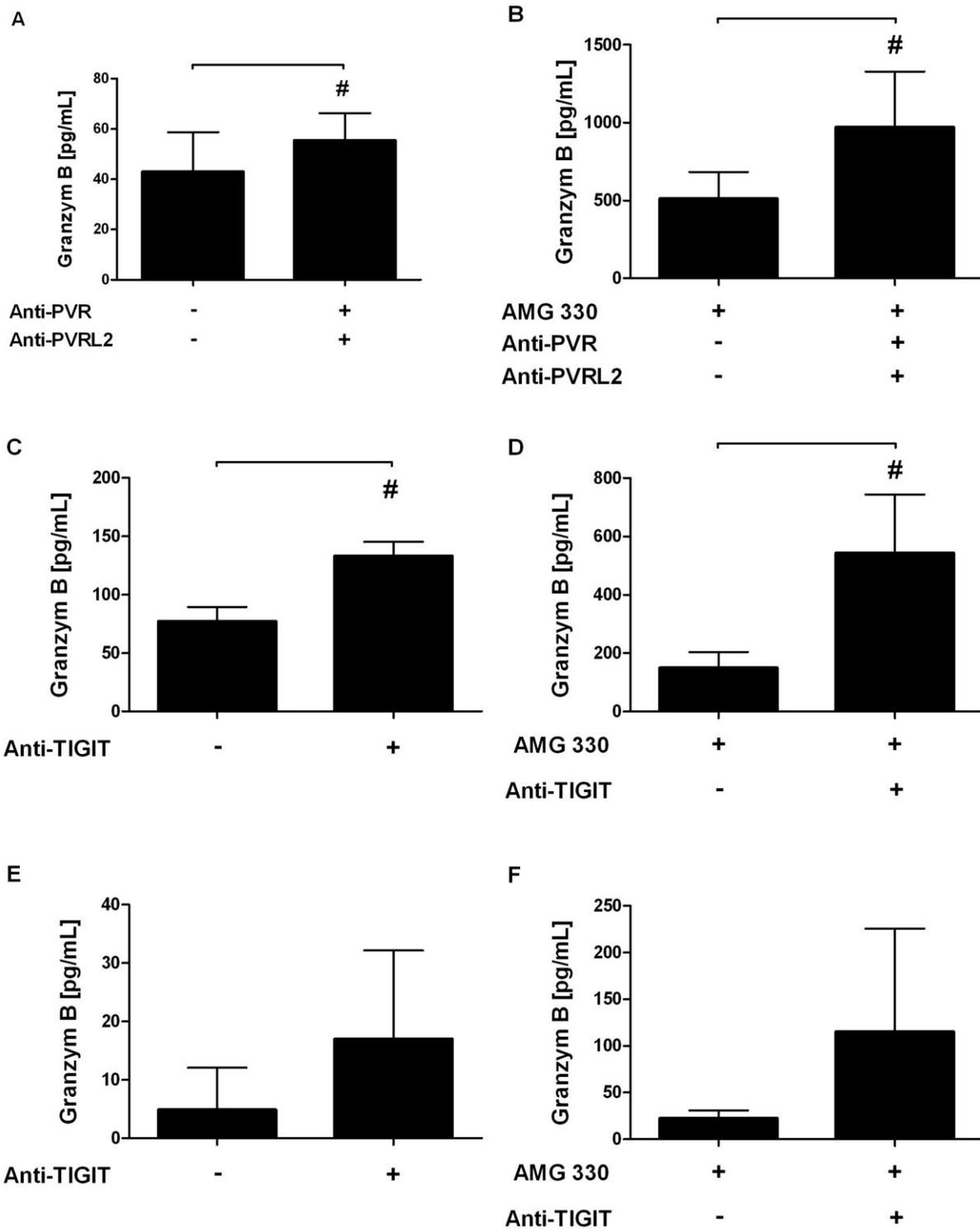


**Abbildung 10: Die durch die Blockade von PVR und PVRL2 gesteigerten zytotoxischen Effekte sind T-Zell-mediert.** Zytotoxizitätsassays mit HD-PBMCs oder CD3<sup>+</sup> T-Zellen des gleichen Spenders als Effektorzellen führten zur vergleichbaren Lyse von TF-1-Zielzellen (n=2). Der antileukämische Effekt des BiTE® Antikörperkonstruktes wird ebenfalls in vergleichbarer Weise durch die Blockierung der Liganden PVR und PVRL2 erhöht. Dieser Versuch dient gleichermaßen als Kontrolle für die NK-Zell-vermittelte Antikörperabhängige Zytotoxizität, da T-Zellen nicht über Fc-Rezeptoren verfügen. Die Ergebnisse sind als der Mittelwert toter AML-Zellen (± Standardabweichung) von zwei unabhängigen Experimenten dargestellt. Alle Messungen wurden in technischen Triplikaten ausgeführt.

### 3.6 DIE BLOCKIERUNG DER TIGIT-PVR/PVRL2-ACHSE STEIGT DIE EFFEKTORFUNKTIONEN VON IMMUNZELLEN GEGENÜBER AML-ZELLINIEN

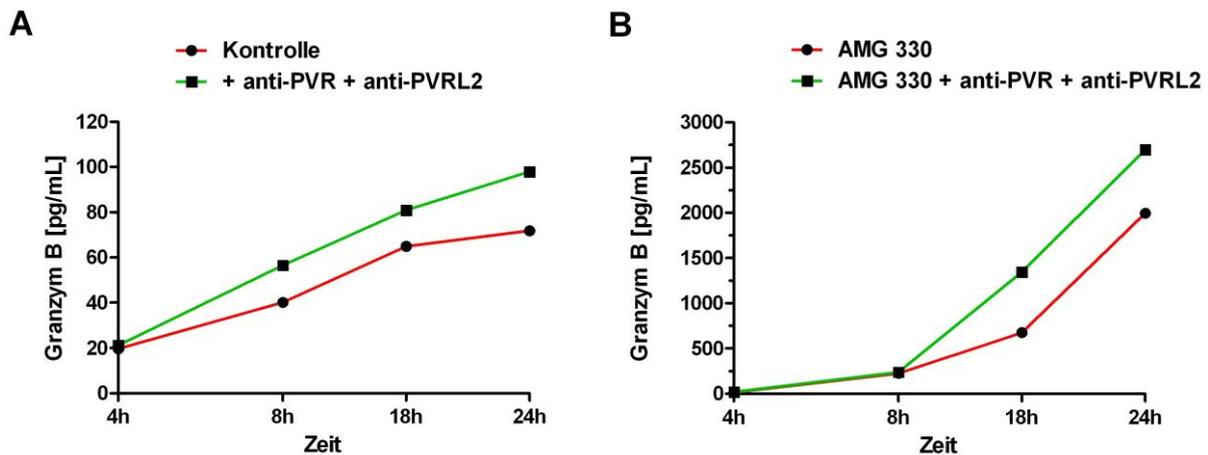
Um die Beteiligung von Immunzellen weiter zu charakterisieren, wurde in Überständen von Zytotoxizitätsassays der Zelllinien TF-1 und MV4-11 mit Hilfe von ELISA-Assays die Granzym B Konzentration bestimmt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind als der Mittelwert der Granzym B Konzentration aus drei unabhängigen Experimenten in Abbildung 11 dargestellt. Für die mit der Zelllinie TF-1 durchgeführten Assays zeigte sich bei Blockade der Liganden PVR und PVRL2 ein signifikanter Unterschied in der Granzym B Konzentration (siehe Abbildung 11 A). Dieser Effekt konnte ebenfalls beobachtet werden, wenn der korrespondierende Rezeptor TIGIT auf den Effektorzellen blockiert wurde (siehe Abbildung 11 C). Bei zusätzlicher Inkubation mit dem bispezifischen Antikörper AMG 330 war grundsätzlich eine ungefähr zehnfach höhere Granzym B Konzentration messbar. Die Kombination von AMG 330 mit der Blockierung der Liganden auf TF-1-Zellen führte ebenfalls zu einer signifikanten Erhöhung der Granzym B Konzentration (siehe Abbildung 11 B). Diese Ergebnisse spiegeln sich bei der Kombination von AMG 330 mit der Blockade des Rezeptors TIGIT wider, da in diesen Versuchen ebenfalls eine signifikante Erhöhung der Granzym B Konzentration im Vergleich zur

Kontrolle detektiert werden konnte (siehe Abbildung 11 D). Ein Vergleich der Granzym B Konzentrationen zwischen den Versuchen, in denen die Liganden blockiert wurden, und den Versuchen, in denen der Rezeptor blockiert wurde, muss unbeachtet bleiben, da in den jeweiligen Versuchen Effektorzellen unterschiedlicher Spender verwendet wurden. Die für die Zelllinie TF-1 erhaltenen Ergebnisse konnten bei Verwendung der Zelllinie MV4-11 bestätigt werden. Die Blockierung des Rezeptors TIGIT auf Effektorzellen in Zytotoxizitätsassays mit MV4-11 als Zielzellen führt zu einer deutlichen Erhöhung der messbaren Granzym B Konzentration (siehe Abbildung 11 E). In diesen Assays erhöht die Kombination von AMG 330 mit einer Blockierung des Rezeptors ebenfalls die Ausschüttung von Granzym B im Vergleich zu AMG 330 alleine (siehe Abbildung 11 F). Auf Grund der hohen Schwankung der Konzentrationen zwischen den verschiedenen unabhängigen Experimenten und der daraus resultierenden Standardabweichung sind diese Unterschiede jedoch statistisch nicht signifikant.



**Abbildung 11: Die Blockade der TIGIT-PVR/PVRL2-Achse führt zu einer erhöhten Freisetzung von Granzym B.** Die Zielzellen TF-1 (A-D) sowie MV4-11 (E,F) wurden mit HD-PBMCs als Effektorzellen im Verhältnis von 6:1 mit blockierenden Antikörpern gegen PVR, PVRL2 oder TIGIT in An- oder Abwesenheit des BiTE® Antikörperkonstruktes AMG 330 für 24 h inkubiert. Die Granzym B Konzentration wurde in Überständen der Assays mittels ELISA bestimmt. Die Ergebnisse sind als der Mittelwert der Granzym B Konzentration ( $\pm$  Standardabweichung) aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Die ELISA-Assays wurden in technischen Duplikaten gemessen. Zur statistischen Auswertung wurde ein gepaarter t-Test herangezogen (#  $p \leq 0.05$ ).

Zudem wurde für die Zelllinie TF-1 in einer Zeitreihe die Granzym B Konzentration im Zellkulturüberstand gemessen. Dafür wurden die Zellen entweder ohne oder mit AMG 330 in An- oder Abwesenheit einer Kombination von PVR- und PVRL2-blockierenden Antikörpern inkubiert und die Überstände nach 4 h, 8 h, 18 h und 24 h abgenommen. Das Ergebnis der Zeitreihe ist in Abbildung 12 dargestellt. Auch in diesem Versuch waren deutliche Unterschiede der Granzym B Freisetzung in beiden Ansätzen messbar.

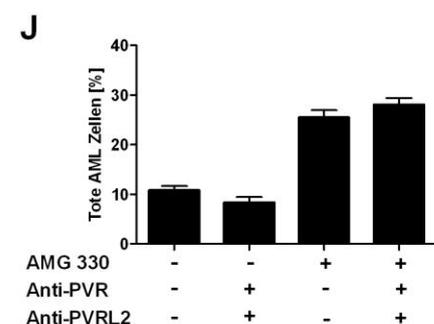
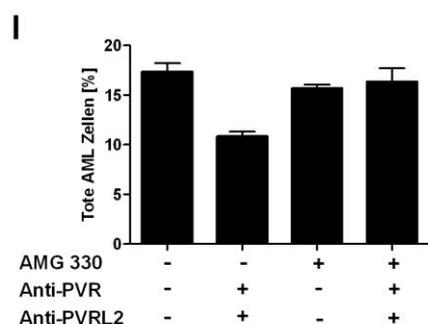
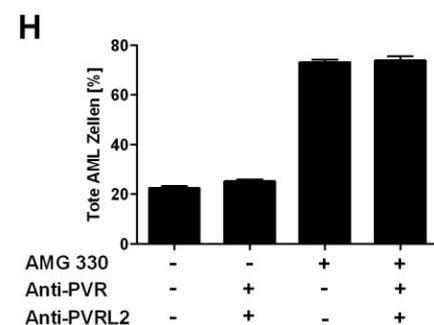
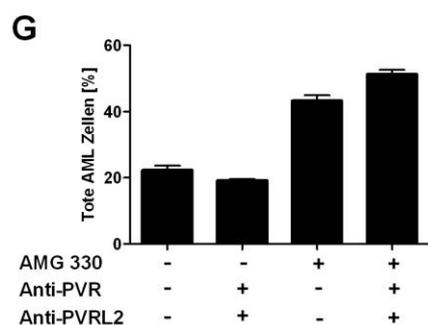
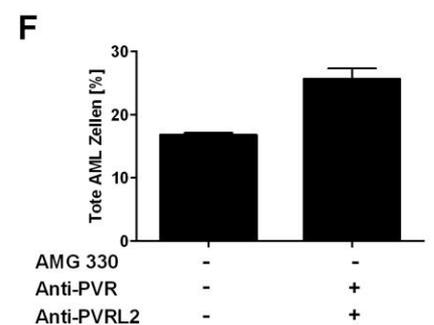
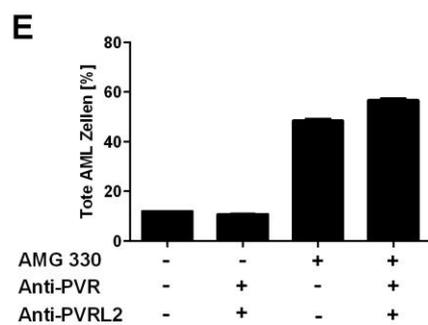
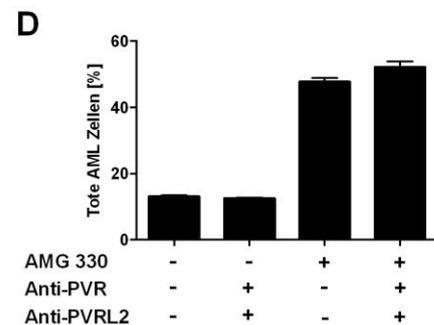
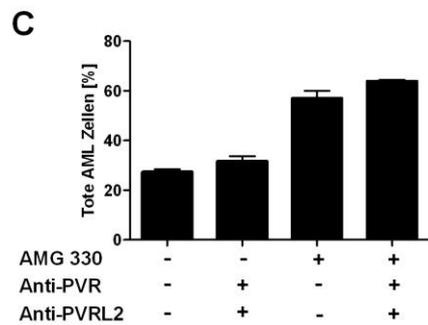
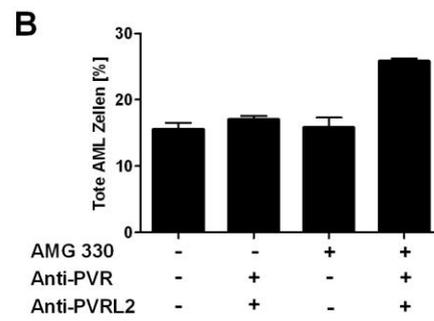
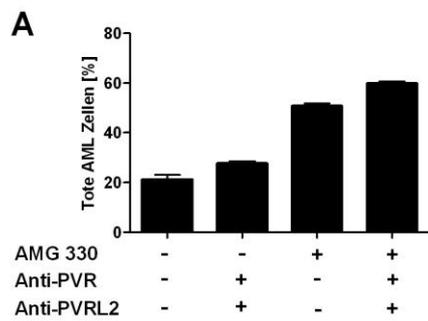


**Abbildung 12: Zeitreihe der Granzym B Konzentration.** Die Überstände eines Zytotoxizitätsassays mit TF-1 als Zielzellen und HD-PBMCs als Effektorzellen wurden an verschiedenen Zeitpunkten geerntet und die Granzym B Konzentration mittels ELISA bestimmt. Der ELISA wurde in technischen Duplikaten gemessen.

### 3.7 DIE BLOCKADE VON PVR UND PVRL2 VERSTÄRKT DIE ZYTOTOXIZITÄT GEGEN PRIMÄRE AML BLASTEN

In einer Reihe von Experimenten wurde der Effekt der Blockade von PVR und PVRL2 auf die Lyse primärer Blasten unbehandelter AML-Patienten untersucht. Dafür wurden zehn Patienten herangezogen, welche eine Blasteninfiltration von über 75 % im Knochenmark aufwiesen, wobei die Blasten eines Patienten keine CD33-Expression aufzeigten. Die spezifische Lyse der mononukleären Zellen der Patienten wurde in Zytotoxizitätsassays mit HD-PBMCs als Effektorzellen mit oder ohne Einsatz blockierende Antikörper gegen PVR und PVRL2 und dem BiTE® Antikörperkonstrukt AMG 330 nach 72 h gemessen. Eine gesteigerte Lyse der AML-Blasten konnte durch die Kombination von PVR- und PVRL2-blockierenden Antikörpern bei vier von 10 Patientenproben nachgewiesen werden (siehe Abbildung 13 A-C und F). Die gesteigerte Lyse im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bewegt sich hierbei von 2,7 % - 8,8 %. Die anti-leukämischen Effekte des BiTE® Antikörpers konnten durch die Blockierung von PVR und PVRL2 in sieben von neun Proben verstärkt werden, wobei in diesen Experimenten die Lyse im Vergleich zur Behandlung mit AMG 330 alleine um 2,6 % - 10 % höher ist.

(siehe Abbildung 13 A-E, G, K). Bei den Zellen der Patienten H und I konnte keine gesteigerte Lyse durch eine Blockierung der Liganden PVR und PVRL2 erreicht werden.

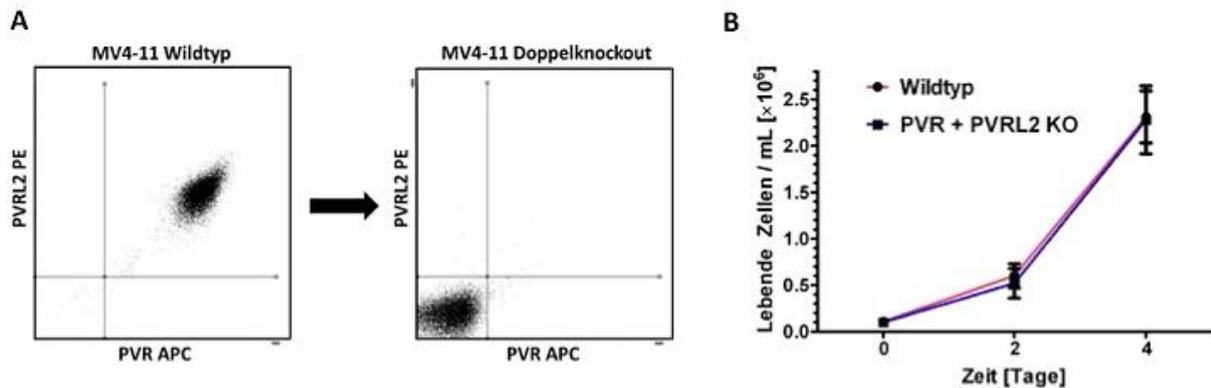


**Abbildung 13: Die Kombination PVR- und PVRL2-blockierender Antikörper verstärkt die zytotoxischen Effekte von HD-PBMCs gegenüber primären AML-Blasten.** Die mononukleäre Zellfraktion von zehn verschiedenen AML-Patienten mit einem Blastenanteil von über 75 % im Knochenmark wurde mit HD-PBMCs als Effektorzellen für 72 h inkubiert. Der Effekt einer Kombination von PVR- und PVRL2-blockierenden Antikörpern in An- und Abwesenheit des bispezifischen Antikörpers AMG 330 auf die spezifische Lyse der AML-Blasten wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die Blockade von PVR und PVRL2 konnte die Lyse der AML-Blasten in vier der zehn untersuchten Proben verstärken (**A,B,C,F**). Die Effekte des BiTE® Antikörperkonstruktes konnten in sieben von zehn analysierten Proben erhöht werden (**A-E, G** und **K**). Die Blasten von Patient (**F**) wiesen keine CD33-Expression auf, weshalb sie von Experimenten mit AMG 330 ausgeschlossen wurden. Die Ergebnisse sind als der Mittelwert von technischen Triplikaten ( $\pm$  Standardabweichung) toter AML-Blasten aufgetragen.

### 3.8 MV4-11 PVR UND PVRL2 DOPPEL-KNOCKOUT-ZELLEN REKAPITULIEREN DIE BEOBACHTETEN ANTIKÖRPEREFFEKTE

Um die erhaltenen Ergebnisse weiter zu bestätigen, wurden in einem zweistufigen Verfahren genetische PVR- und PVRL2-Doppelknockout-Zellen der AML-Zelllinie MV4-11 mit Hilfe des CRISPR/Cas9 *Genome Editings* hergestellt. Dafür wurden im ersten Schritt zwei hochspezifische guideRNAs für jedes der beiden Gene *PVR* und *PVRL2* erstellt. Die guide RNAs wurden so entworfen, dass die unspezifische Bindung an andere DNA-Bereiche im Genom nur über vier fehlerhafte Basenpaarungen möglich wäre, was die Wahrscheinlichkeit für *off-target*-Effekte auf ein Minimum reduziert. Da eine Transfektion von Suspensionszellen eine technische Schwierigkeit darstellt, wurden für den Transfer der DNA in die Zielzellen unterschiedliche Verfahren getestet. In einem ersten Ansatz wurde in Kooperation mit Dr. Ulrike Mock ein lentiviraler DNA-Transfer mit nicht-integrierenden Lentiviren durchgeführt. Die spezifischen guideRNAs wurden dafür in das *backbone* eines nicht-integrierenden Lentiviralen-Vektors kloniert und virale Partikel hergestellt. Die lentivirale Transduktion von MV4-11-Zellen mit dieser Methode stellte sich als schwierig dar, da die Transduktionseffizienzen extrem niedrig waren. Lediglich mit dem gegen *PVR* spezifischen guideRNA-Konstrukt mit der Sequenz 5'-GATGTTCCGGTTGCGCGTAG-3' konnten Ansätze mit 0,5-1,8 % PVR-negativen MV4-11-Zellen generiert werden. Diese Zellen wurden aus den Kulturen sortiert und expandiert. Auf Grund des mäßigen Erfolgs dieser Methode in Relation zum Arbeitsaufwand wurden unter Anwendung unterschiedlicher Protokolle die Verfahren der Nucleofektion und der DNA-Elektroporation für die Einbringung der CRISPR/Cas9-Konstrukte getestet. Nach Optimierung der Verfahren stellte sich die DNA-Elektroporation als die bei gleicher Effizienz kostengünstigere Methodik heraus. In die sortierten MV4-11-Zellen mit PVR-Knockout konnten im Folgenden durch Elektroporation des CRISPR/Cas9-Vektors mit der *PVRL2* spezifischen guideRNA mit der Sequenz 5'-CGGCGATCTCGACGGCAGGA-3' mit einer Effizienz von 0,6 % PVRL2 negative Zellen generiert werden. Zellen, welche einen Doppelknockout auf Proteinebene aufwiesen, wurden daraufhin durchflusszytometrisch zu einer polyklonalen Reinkultur sortiert (siehe Abbildung 14 A). Das Wachstum der Wildtyp-Zellen wurde mit

denen des Doppelknockouts in Proliferationsassays verglichen. Dabei konnte kein Einfluss des *knockouts* auf die Proliferationsrate der Zellen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 14 B).



**Abbildung 14: Doppelknockout Varianten der Zelllinie MV4-11 wurden zur polyklonalen Reinkultur sortiert. (A)** Die in einem zweistufigen Verfahren hergestellten PVR und PVRL2 Doppelknockout Varianten wurden durchflusszytometrisch zu einer polyklonalen Reinkultur sortiert und die Reinheit am FACS kontrolliert. **(B) Die Proliferationseigenschaften der Doppelknockout Zellen wurden mit den parentalen Wildtyp Zellen verglichen.** Dargestellt ist der Mittelwert ( $\pm$  Standardabweichung) der Anzahl lebender Zellen aus drei unabhängigen Versuchen. Die Analysen wurden in technischen Triplikaten durchgeführt.

Um die zum Proteinknockout führenden genetischen Modifikationen zu analysieren, wurden einige monoklonale Subkulturen durch Sortierung von Einzelzellen herangezogen. Die spezifischen guideRNAs sorgen für einen zielgerichteten Transport der Cas9-Endonuklease an die jeweiligen *PVR* und *PVRL2* Genloci. Die DNA wird darauffolgend an dieser Stelle geschnitten und der entstandene DNA-Doppelstrangbruch durch den Mechanismus der nicht-homologen Rekombination repariert. Dabei kommt es an dieser Stelle unspezifisch zu Insertionen und Deletionen (engl. *insertion and deletions* (INDELS)) von Basen, welche das Auftreten von Mutationen oder eine Leserasterverschiebung zur Folge haben. Die DNA der monoklonalen Zellen wurde isoliert; und die entsprechenden Bereiche der *PVR*- und *PVRL2*-Genloci wurden mit Primern flankiert und per PCR amplifiziert. Die Amplicons wurden daraufhin in einem Vektor subkloniert und sequenziert. Die Veränderungen wurden in die jeweilige Wildtyp-Sequenz implementiert und die Auswirkungen der Mutationen analysiert. Einige Ergebnisse dieser Sequenzierung sind in Abbildung 15 dargestellt. Zu beachten ist in diesem Falle, dass die Zelllinie MV4-11 den Karyotyp 48, XY, t(4;11)(q21;q23), +8, +19 besitzt. Die Gene für *PVR* und *PVRL2* sind beide auf 19q13 lokalisiert. Dadurch ergibt sich ein drittes, zusätzliches Allel, welches für einen homozygoten *knockout* getroffen werden muss. Im *PVR*-Genlocus kam es in dem gezeigten Ergebnis #1 in Abbildung 15 A zu einer Deletion eines Guanins an der Schnittstelle der Endonuklease (chr19:45150758\_45150758delG). Das Leseraster der mRNA verschiebt sich dadurch um eine Base, wodurch ein frühzeitiges Stoppcodon im Leseraster entsteht. Anstelle des 417 Aminosäuren langen Wildtypproteins kann lediglich eine trunkierte Proteinvariante von 114 Aminosäuren translatiert werden. Im zweiten Beispiel ergab sich eine Deletion der Basen Thymin und Adenin, die zusammen

mit Guanin im Basentriplett an dieser Stelle für die Aminosäure Valin kodieren (chr19:45150759\_45150760delTA). Dadurch ergibt sich ebenfalls eine Leserasterverschiebung, die zu einem frühzeitigen Stoppcodon und der Entstehung eines trunkeierten Proteins von 116 Aminosäuren führt. Im dritten angeführten Beispiel kam es zu einer Deletion der Basen Thymin, Alanin, Guanin, Alanin und Guanin (chr19:45150758\_45150762delGTAGA). Auch in diesem Fall führt die dadurch entstandene Leserasterverschiebung zu einem vorzeitigen Abbruch der Proteintranslation und zu einem nur 115 Aminosäuren langen Protein. In wie weit sich diese Änderungen eventuell schon auf die Stabilität der mRNA auswirken, kann nicht ohne weiteres vorhergesagt werden. Sicher ist aber, dass es durch starke Verkürzung des Proteins laut bioinformatischer Analyse bei allen drei gezeigten Beispielen zum Verlust von 23 Proteineigenschaften kommt. Unter anderem kommt es zum Verlust von 5 potentiellen Disulfidbrücken (Aminosäuren 123, 166, 221, 266 und 312), der charakteristischen Immunglobulin V-Set-Domäne (Aminosäuren 24-139), mehrere Carboxylierungsstellen (Aminosäure 120, 188, 218, 237, 278, 307, 313) sowie der charakteristischen Immunglobulin C2-Set-Type-1-Domäne (Aminosäuren 145-237) und Immunglobulin C2-Set-Type-2-Domäne (Aminosäuren 244-328). Zudem führen die in Ereignis #1 und #2 dargestellten Modifikationen zur Aufhebung potentieller Splicestellen. Die Bildung eines funktionalen PVR-Proteins kann damit ausgeschlossen werden.

Die analysierten Veränderungen im *PVRL2*-Locus präsentieren sich ein wenig anders (siehe Abbildung 15 B). Die Zielregion der guideRNAs liegt hier nur 13 Basenpaare *upstream* des Startcodons, so dass Änderungen im Leseraster frühere Auswirkungen auf die Gesamtproteinsequenz haben. Im ersten gezeigten Beispiel in Abbildung 15 B ist ein sehr großer Bereich um die Schnittstelle der Endonuklease deletiert (chr19:45349789\_45349823delCGGGCCGCTGCCCTCTGCCGTCGAGATCGCCG CC). Diese große Deletion führt zu einer Veränderung des Leserasters und einem frühzeitig auftretenden Stoppcodon. Das gebildete Protein ist nur 75 Aminosäuren lang. Im zweiten gezeigten Ergebnis führen eine Reihe Mutationen zu einer komplexen Veränderung des Genlocus (chr19:45349789C>A; chr19:45349790G>T; chr19:45349793\_45349812delCCGCTGCCCTCTGCCGTCG ; chr19:45349815\_45349823delATCGCCGCC; chr19:45349826\_45349844delCGCCGCTGCTGTGGCCG C T). Die erste Punktmutation [C/A] hat keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz. Es könnte sich hierbei auch um einen einfachen nicht annotierten Polymorphismus oder eine stille Mutation handeln, welche jedoch Einfluss auf das Splicing haben könnte. Die zweite Punktmutation [G/T] führt zu einem Aminosäureaustausch an Position 3 von Arginin zu Leucin, was zur Zerstörung des N-terminalen Signalpeptides führt. Ebenfalls könnte dieser Austausch das Splicing beeinflussen. Die darauf folgende Deletion führt zu einer Leserasterverschiebung und zur Translation eines 80 Aminosäuren langen Proteins, welches ab der dritten Base über eine völlig andere Aminosäuresequenz verfügt. Ein funktionelles *PVRL2*-Protein ist somit spätestens bedingt durch diese Deletion in der Nukleotidsequenz vollkommen ausgeschlossen. Beim dritten gezeigten Sequenzierungsergebnis im *PVRL2*-Locus handelt

es sich um eine Insertion eines Thymins (chr19:45349804\_45349805insT). Diese Insertion sorgt für eine Leserasterverschiebung und eine mutierte Aminosäuresequenz ab Aminosäure 9. Das entstehende Protein verfügt ebenfalls über ein frühzeitiges Stoppcodon, und es wird ein 87 Aminosäuren langes Protein gebildet. Durch die frühe Mutation sind keine Proteinstrukturen von PVRL2 in diesem Protein enthalten. Wie auch bei den beschriebenen Ereignissen für PVR gehen durch die frühen Mutationen im PVRL2-Locus und die verkürzten Proteinvarianten alle charakteristischen Domänen verloren. Wichtige verlorene Strukturen sind in diesem Fall das Signalpeptid (Aminosäure 1-31), die Immunglobulin V-Set-Domäne (Aminosäuren 32-156), sechs potentielle Disulfidbrücken (Aminosäure 54, 140, 183, 238, 283, 329) sowie die charakteristische Immunglobulin C2-Set-Type-1-Domäne (Aminosäuren 162-256) und Immunglobulin C2-Set-Type-2-Domäne (Aminosäuren 261-345) sowie zwei potentielle Carboxylierungsstellen (Aminosäure 137, 324).

**A**

**PVR (NCBI Referenzsequenz NM\_006505.3)**

	Zielregion	PAM	
WT Sequenz	CTGAGGATGTTTCGGGTTGCGCGTAGAGGATGAAGG		Wildtyp Protein (417 AS)
PVR KO Ergebnis #1	CTGAGGATGTTTCGGGTTGCGC-TAGAGGATGAAGG		Frühzeitiges Stoppcodon → Trunkiertes Protein (AS 1-114)
PVR KO Ergebnis #2	CTGAGGATGTTTCGGGTTGCGCG--GAGGATGAAGG		Frühzeitiges Stoppcodon → Trunkiertes Protein (AS 1-116)
PVR KO Ergebnis #3	CTGAGGATGTTTCGGGTTGCGCG-----GATGAAGG		Frühzeitiges Stoppcodon → Trunkiertes Protein (AS 1-115)

**B**

**PVRL2 (NCBI Referenzsequenz NM\_001042724.1)**

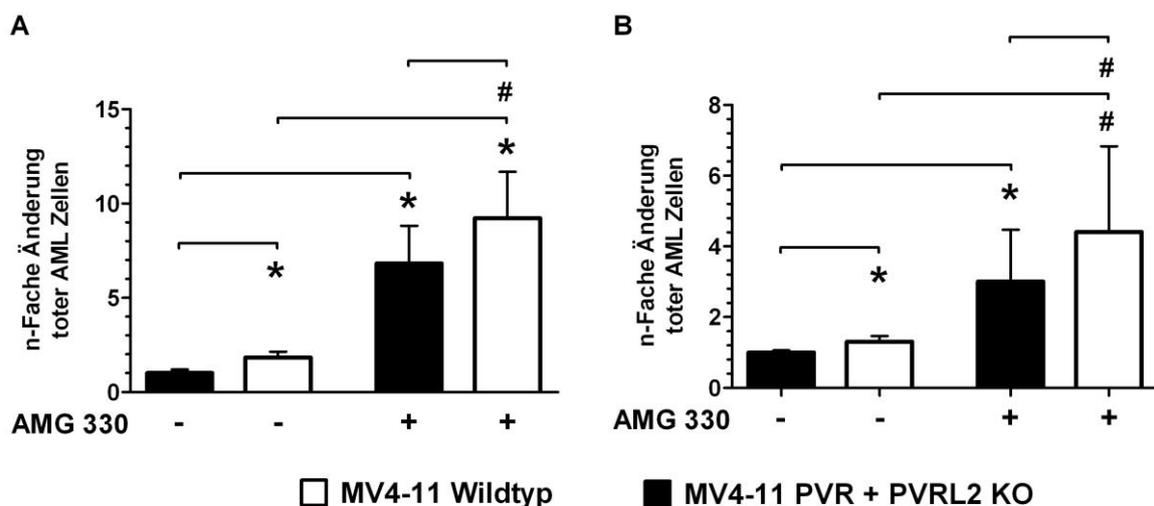
	PAM	Zielregion	(Revers komplementäre Orientierung)	
WT Sequenz	CATGGCCCGGGCCGCTGCCCTCCTGCCGTCGAGATCGCCGCCGACGCCGCTGCTGTGGCCGCTGCTG			Wildtyp Protein (538 AS)
PVRL2 KO Ergebnis #1	CATGGCC-----		-----GACGCCGCTGCTGTGGCCGCTGCTG	Mut. Protein ab AS 3 → Trunkiertes Protein (AS 1-75)
PVRL2 KO Ergebnis #2	CATGGCCATGG-----		-----AG-----GA-----GCTG	Mut. Protein ab AS 3 → Trunkiertes Protein (80 AS)
PVRL2 KO Ergebnis #3	CATGGCCCGGGCCGCTGCCCTCCT	TGCCGTCGAGATCGCCGCCGACGCCGCTGCTGTGGCCGCTGCTG		Mut. Protein ab AS 9 → Trunkiertes Protein (AS 1-87)

**Abbildung 15: Genomische Sequenzierungsanalysen monoklonaler MV4-11 PVR- und PVRL2-Doppelknockout-Zellen.** Aus der polyklonalen Reinkultur aus Abbildung 14 A wurden Einzelzellen sortiert und zu monoklonalen Kulturen herangezogen. Die DNA der Klone wurde präpariert, und die Loci der Schnittstellen der Cas9 Endonuklease wurden durch PCR amplifiziert. Die Amplicons wurden in einen Vektor subkloniert und sequenziert. Die genomischen Veränderungen wurden in die Wildtypsequenz inkorporiert, die Auswirkungen mit dem Wildtyp verglichen und bioinformatisch analysiert. Exemplarisch sind jeweils drei Sequenzanalysen und ihre Auswirkungen für PVR und PVRL2 gezeigt, da die Zelllinie MV4-11 über drei Allele durch den Karyotyp +19 verfügt. (NCBI: National Center for Biotechnology Information; PAM: Protospacer adjacent motif; WT: Wildtyp; KO: Knockout; Mut.: Mutiert; AS: Aminosäure)

Im Folgenden wurde die polyklonale PVR- und PVRL2-Doppelknockout-Kultur im direkten Vergleich zur parentalen Wildtyplinie in Zytotoxizitätsassays mit HD-PBMCs als Effektorzellen untersucht. In diesen Versuchen konnte eine signifikant verstärkte Lyse der Doppelknockout-Zellen im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden. Die Lyse des Doppelknockouts war in diesen Versuchen im Mittel um das 1,83-Fache ( $\pm 0,31$ -Fach) verglichen mit dem Wildtyp erhöht. Die antileukämischen Effekte des BiTE<sup>®</sup> Anitkörperkonstruktes AMG 330 sind ebenfalls im Vergleich zum Wildtyp deutlich stärker gegenüber den PVR- und PVRL2-Doppelknockout-Zellen (siehe Abbildung 16 A). Hierbei ließ sich eine Verstärkung

der zytotoxischen Wirkung von 9,24-Fach ( $\pm$  2,44-Fach) im Vergleich zu 6,83-Fach ( $\pm$  1,99-Fach) beim parentalen MV4-11-Wildtyp feststellen. Vergleichbare Resultate konnten beim Einsatz von CD3<sup>+</sup> Zellen als Effektorzellen beobachtet werden (siehe Abbildung 16 B). Ein direkter Vergleich der zytotoxischen Wirkung von HD-PBMCs und CD3-Zellen darf nicht geschlossen werden, da es sich in diesen Versuchen nicht um die Zellen der identischen Spender handelt.

In Überständen zweier Assays mit Doppelknockout-Zellen und CD3<sup>+</sup> Zellen als Effektorzellen wurde die Granzym B Konzentration durch ELISA bestimmt. In beiden Versuchen war eine deutlich gesteigerte Granzym B Konzentration bei der Verwendung der Doppelknockout-Zellen als Zielzellen im Vergleich zum Wildtyp messbar. Im ersten Versuch war dabei im direkten Vergleich die Granzym B Konzentration im Assay mit den Doppelknockout-Zellen als Zielzellen um 64,1 ng/mL höher als im Assay mit den Wildtyp-Zellen (144,1 ng/mL (Wildtyp) verglichen mit 208,2 ng/mL (Doppelknockout)). Im zweiten Versuch konnte eine 54 ng/mL höhere Granzym B Konzentration gemessen werden (23,6 ng/mL (Wildtyp) verglichen mit 77,6 ng/mL (Doppelknockout)).



**Abbildung 16: In vitro Analysen des Einflusses eines PVR- und PVRL2-Doppelknockouts der Zelllinie MV4-11.** Die polyklonalen MV4-11 PVR- und PVRL2-Doppelknockout-Zellen wurden in Zytotoxizitätsassays mit den parentalen MV4-11-Wildtyp-Zellen verglichen. Die Zellen wurden unter exakt gleichen Wachstumsbedingungen kultiviert und der Effekt des PVR- und PVRL2-Doppelknockouts in Zytotoxizitätsassays mit den parentalen MV4-11-Wildtyp-Zellen verglichen. Dafür wurden die Zellen zusammen mit HD-PBMCs (A, n=3) oder CD3<sup>+</sup> positiven T-Zellen (B, n=3) in An- oder Abwesenheit des BiTE® Antikörpers AMG 330 für 24 h inkubiert und die spezifische Lyse der Leukämiezellen durchflusszytometrisch analysiert. Die Ergebnisse sind als der Mittelwert der n-fachen Änderung ( $\pm$  Standardabweichung) toter AML-Zellen normalisiert auf den Wildtyp ohne Zugabe von AMG 330 dargestellt. Für die statistische Auswertung wurden Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt (# p $\leq$ 0.05; \* p $\leq$ 0.001).

### 3.9 DER *KNOCKOUT* VON PVR UND PVRL2 VERLEIHT EINEN ÜBERLEBENSVORTEIL IM MAUSMODELL

Um das therapeutische Potential von PVR und PVRL2 *in vivo* zu untersuchen, wurden die im Abschnitt 3.8 beschriebenen MV4-11 PVR- und PVRL2-Doppelknockout-Zellen oder die parentale Wildtyplinie intravenös in immundefiziente NSG-Mäuse injiziert. Fünf Tage später erhielten alle Mäuse expandierte und aktivierte humane T-Zellen desselben Spenders. Die Tiere wurden auf gleich große Gruppen randomisiert und erhielten in einem verblindeten Experiment täglich entweder ein Placebo (PBS) oder 10 µg/kg bzw. 15 µg/kg bzw. 50 µg/kg des bispezifischen Antikörpers AMG 330 als intraperitoneale Injektion. Die unterschiedlichen Gruppengrößen sind in Tabelle 13 aufgezeigt. Das Überleben der Tiere wurde beobachtet. Wie aus Abbildung 17 ersichtlich ist, hatten die mit PBS behandelten Mäuse, welche mit den MV4-11 PVR- und PVRL2-Doppelknockout-Zellen transplantiert wurden mit 37 versus 27 Tagen einen deutlichen Überlebensvorteil gegenüber den mit MV4-11 Wildtyp-Zellen transplantierten Tieren. Die mit Wildtyp-Zellen transplantierten Tiere, welche mit 10 µg/kg des bispezifischen Antikörpers AMG 330 behandelt wurden, lebten im Mittel 37 Tage, wohingegen das mediane Überleben der Tiere, welche mit PVR- und PVRL2-Doppelknockout-Zellen behandelt wurden, bis zur Beendigung des Versuchs an Tag 50 nicht erreicht wurde. In der Gruppe der Tiere, welche mit 15 µg/kg AMG 330 behandelt wurden, starben die Tiere, welche mit MV4-11 Wildtyp-Zellen transplantiert wurden, im Mittel nach 33 Tagen, wohingegen das mittlere Gesamtüberleben für die Tiere, welche mit PVR- und PVRL2-Doppelknockout-Zellen transplantiert wurden, ebenfalls nicht erreicht wurde (siehe Abbildung 17). In der Gruppe mit der höchsten Konzentration von AMG 330 lebten an Tag 50 noch alle Versuchstiere, welche mit den Doppelknockout-Zellen transplantiert wurden, wohingegen 4 von 12 Tieren, welche mit Wildtyp-Zellen transplantierten worden waren, verstarben (siehe Abbildung 17).

**Tabelle 13: Aufteilung der Versuchstiere auf die unterschiedlichen Gruppen im Mausversuch**

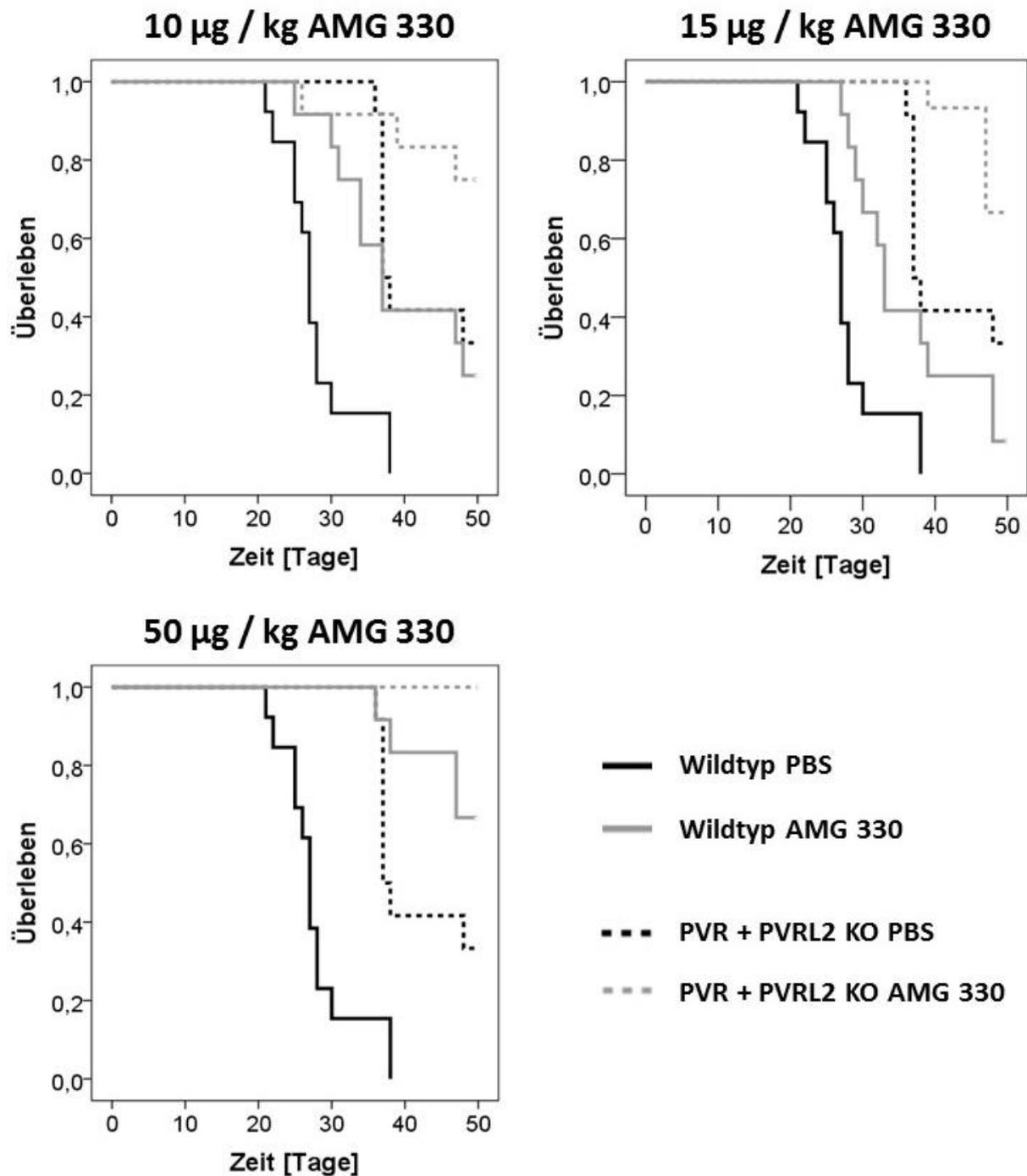
Gruppe	Wildtyp				PVR- und PVRL2-Doppelknockout			
	PBS	10 µg/kg	15 µg/kg	50 µg/kg	PBS	10 µg/kg	15 µg/kg	50 µg/kg
Anzahl Tiere	13	12	12	12	12	12	15	13

Mit den Überlebensdaten wurden für die jeweiligen Gruppen Log-Rank-Analysen durchgeführt. Zwischen allen analysierten Gruppen ergaben sich signifikante Unterschiede. Die Ergebnisse der Analysen sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

**Tabelle 14: Log-Rank-Tests der Überlebensdaten der unterschiedlichen Gruppen der Mausexperimente**

Behandlungsgruppe		p-Wert
Wildtyp PBS versus	Wildtyp 10 µg/kg*	≤ 0,001
	Wildtyp 15 µg/kg*	≤ 0,003
	Wildtyp 50 µg/kg*	≤ 0,0001
	Doppelknockout PBS	≤ 0,0001
	Doppelknockout 10 µg/kg	≤ 0,001
	Doppelknockout 15 µg/kg	≤ 0,003
	Doppelknockout 50 µg/kg	≤ 0,0001
Doppelknockout PBS versus	Doppelknockout 10 µg/kg	≤ 0,044
	Doppelknockout 15 µg/kg	≤ 0,027
	Doppelknockout 50 µg/kg	≤ 0,0001
Doppelknockout 10 µg/kg versus	Wildtyp 10 µg/kg	≤ 0,014
Doppelknockout 15 µg/kg versus	Wildtyp 15 µg/kg	≤ 0,0001
Doppelknockout 50 µg/kg versus	Wildtyp 50 µg/kg	≤ 0,026

\* Die Tiere wurden durch tägliche intraperitoneale Injektion mit dem bispezifischen Antikörper AMG 330 in angegebenen Konzentrationen behandelt.



**Abbildung 17: Überlebensvorteil durch PVR- und PVRL2-Doppelknockout im Vergleich zum Wildtyp im MV4-11-Mausmodell.** Immundefiziente NSG-Mäuse wurden mit MV4-11 Doppelknockout- oder Wildtyp-Zellen transplantiert und ein humanes Immunsystem durch die Injektion von T-Zellen rekonstituiert. In einem verblindeten Experiment erhielten die Tiere entweder PBS als Placebo oder 10 µg/kg bzw. 15 µg/kg bzw. 50 µg/kg des BiTE® Antikörperkonstrukts AMG 330 per intraperitonealer Injektion. Das Überleben der Tiere ist in Kaplan-Meier-Überlebensanalyse dargestellt. Die jeweiligen Gruppengrößen sind Tabelle 13 zu entnehmen. Für den statistischen Vergleich der Überlebensdaten wurden Log-Rank-Tests durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Tabelle 14 zusammengefasst. KO: Doppelknockout

Durch die allogenen Effekte der humanen T-Zellen gegenüber der Maus waren teilweise schwere Transplantat-gegen-Wirt-Reaktionen (engl. *graft versus host disease* (GvHD)) beobachtbar. Diese Nebeneffekte konnten jedoch in allen Gruppen sowohl bei den mit Wildtyp- als auch mit Doppelknockout-Zellen transplantierten Tieren festgestellt werden. Zudem wurde exemplarisch bei einem Teil der Tiere aus jeder Gruppe die Blasteninfiltration durchflusszytometrisch in der Milz, der Leber, dem Knochenmark und dem peripheren Blut bestimmt, um die Leukämielast zu bestätigen (Daten nicht gezeigt).

Interessanterweise zeigte sich, dass das *engraftment* der AML-Zellen in der Maus vom *knockout* unbeeinflusst war. In einem kleineren Experiment in Mäusen, denen keine T-Zellen zur Rekonstitution eines Immunsystems injiziert wurden, ergab sich kein Überlebensvorteil zwischen Mäusen, die mit MV4-11 Wildtyp-Zellen oder PVR- und PVRL2-Doppelknockout-Zellen transplantiert wurden (29 Tage  $\pm$  3 Tage (n=4) für Doppelknockout gegenüber 29 Tage  $\pm$  2 Tage (n=3) für Wildtyp).

## 4 DISKUSSION

Das Immunsystem besitzt in der Progression von Krebserkrankungen eine zweiseitige Rolle. Zum einen unterdrückt es die Entstehung eines Tumors, indem es maligne Zellen im Zuge der Immunüberwachung (engl. *immune surveillance*) eliminiert. Zum anderen fördert es die Progression durch die Selektion von Tumorzellen, welche in einer immunkompetenten Umgebung überleben können, oder indem es eine Mikroumgebung schafft, die das Wachstum des Tumors fördert. Diese Vorgänge beschreibt das *cancer immunoediting* (Schreiber u. a., 2011). Dabei kontrolliert das Immunsystem nicht nur die Quantität von Tumorzellen, sondern auch deren Qualität. Die Zellen des Tumors werden im Laufe der Tumorerkrankung kontinuierlich immer weniger immunogen (Shankaran u. a., 2001; Dunn u. a., 2002). Der Prozess des Editierens verläuft über drei Phasen: i) der Elimination, ii) dem Equilibrium und iii) dem Ausbruch (engl. *escape*) (Vesely u. a., 2011). Bei der *immune surveillance* arbeiten das angeborene und das adaptive Immunsystem in der Phase der Elimination bei der Erkennung und Zerstörung des Tumors zusammen. In der längsten der drei Phasen, dem Equilibrium, werden die wenigen Tumorzellen, welche die frühzeitige Elimination überstanden haben, durch das adaptive Immunsystem einerseits an einem Progress gehindert, andererseits in ihrer Immunogenität herabgesetzt. Die Zellen, die die Fähigkeit erlangt haben, der Erkennung und Zerstörung durch das Immunsystem zu umgehen, wachsen in der *escape* Phase zu einem bösartigen Tumor heran. Daraus ergibt sich, dass Tumore mit klinischer Manifestation erfolgreich Strategien entwickelt haben, sich den Tumor-supprimierenden Mechanismen des Immunsystems zu entziehen. Das Ziel einer Reihe unterschiedlicher immuntherapeutischer Ansätze ist, diese Mechanismen auszuschalten, um eine erfolgreiche Elimination der Tumorzellen wiederherzustellen (Schreiber u. a., 2011). Darunter ist die Blockierung von Immuncheckpoint-Signalwegen mit Hilfe von Antikörpern eine der aussichtsreichsten.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Potential der Blockierung der Immuncheckpoint Liganden *Poliovirus receptor* (PVR) und *Poliovirus receptor-related 2* (PVRL2) sowie des Rezeptors *T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains* (TIGIT) als neuer therapeutischer Ansatz zur Behandlung der akuten myeloischen Leukämie (AML) untersucht. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Arbeit und ihr Stellenwert als therapeutischer Ansatz diskutiert.

#### 4.1 DIE MANIPULATION DER TIGIT-PVR/PVRL2-ACHSE VERSTÄRKT DIE ZYTOTOXISCHEN EFFEKTE GEGENÜBER AML-ZELLEN ALLEINE UND IN KOMBINATION MIT DEM BITE® AMG 330

Durch die Verwendung blockierender Antikörper gegen PVR, PVRL2 oder deren Kombination konnten die Zytotoxizität mononukleärer Zellen gegenüber AML-Zelllinien signifikant erhöht werden. Die antileukämische Wirkung des bispezifischen Antikörpers AMG 330, welcher CD33<sup>+</sup> Leukämieblasten mit T-Zellen verbindet und dadurch eine effektive Lyse dieser Zellen auslöst, konnte durch den Einsatz dieser blockierenden Antikörper ebenfalls signifikant verstärkt werden. Durch Kontrollexperimente, in denen die zytotoxischen Effekte von mononukleären Zellen und isolierten T-Zellen desselben Spenders verglichen wurden, konnte gezeigt werden, dass die beobachtete Lyse hauptsächlich T-Zell-mediiert ist. Zudem konnten unspezifische, durch Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (engl. *antibody dependent cellular cytotoxicity* (ADCC)) ausgelöste Effekte durch diese Versuche gleichermaßen ausgeschlossen werden. Der Ausschluss von ADCC ist in diesem Fall deshalb wichtig, da diese Art der Lyse im Sinne der Bindung von jeglichen an die Zielzellen gebundenen IgG-Antikörpern ausgelöst wird und demnach nicht die gewünschte Spezifität einer Immuncheckpoint-Modulation hätte. ADCC wird hauptsächlich über NK-Zellen (definiert als CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup>) vermittelt, welche 5-15 % der Lymphozytenfraktion ausmachen, und stellt eine Verknüpfung des humoralen Teils des adaptiven Immunsystems mit Zellen des angeborenen Immunsystems dar (Seidel u. a., 2013). Über die Rezeptoren FcγRIIIA (CD16a) wie auch FcγIIC (CD32c) binden NK-Zellen den Fc-Teil von Immunglobulinen der Subklasse IgG, welche im Zuge der Immunantwort an immunogene Antigene auf infizierten oder als maligne identifizierten Zellen gebunden haben (Wang u. a., 2015b). Dies führt zur Lyse der markierten Zielzelle durch die NK-Zelle und zur Produktion von IFN-γ und damit zur Stimulation der adaptiven Immunantwort. Monoklonale Antikörper, die gegen Tumor-assoziierte- oder Tumor-spezifische Antigene gerichtet sind, wie der gegen Her2/neu gerichtete Antikörper Trastuzumab, lösen einen Großteil ihrer therapeutischen Wirkung über ADCC aus (Park u. a., 2010). Ein solcher Effekt wäre in dem in dieser Dissertation vorgestellten Ansatz jedoch nicht gewollt, da die Heraufregulation der anti-Tumor Immunantwort durch T-Zellen aussichtsreicher ist. T-Zellen verfügen grundsätzlich nicht über die Fähigkeit zur Ausübung von ADCC. Nichtsdestoweniger existiert eine kleine Subgruppe an CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK-T-Zellen im peripheren Blut. Diese Anzahl ist jedoch vernachlässigbar, da nur ca. 5 % aller Zellen im peripheren Blut gesunder Spender diesen Phänotyp aufweisen (Koreck u. a., 2002). Die CD3<sup>+</sup>-Zellen wurden mit Hilfe des Miltenyi-Kits über eine magnetische Negativselektion aufgereinigt, welche CD56<sup>+</sup>-Zellen depletiert. In weiteren Arbeiten in unserem Labor konnte Felix Klingler ebenfalls zeigen, dass Effekte durch ADCC bei Verwendung mononukleärer Zellen gesunder Spender (engl. *healthy donor mononuclear cells* (HD-PBMCs)) auszuschließen sind. In Kontrollexperimenten wurde dafür das Molekül CD117, welches keine

bekannte Funktion als Immuncheckpoint Molekül aufweist, auf der Zelllinie Kasumi-1 mit einem anti-CD117 monoklonalen Antikörper blockiert und der Effekt auf die Lyse dieser Zelllinie untersucht. Bei diesen Versuchen zeigte sich im Vergleich zu einer Blockierung von PVR und PVRL2 keine gesteigerte Lyse der Zelllinie Kasumi-1 bei Blockierung von CD117 (Stamm, Klingler, et al., Manuskript in Begutachtung).

Die Blockierung der Liganden PVR und PVRL2 auf der Zelllinie MV4-11 führte zu starken zytotoxischen Effekten, die jedoch unabhängig vom Einfluss von Immunzellen waren (Daten nicht gezeigt). Diese Effekte wurden ausschließlich für MV4-11 beobachtet, und der Mechanismus konnte nicht geklärt werden. Ein ähnliches Phänomen beschrieben Hou und Kollegen, die *in vitro* durch die Blockierung von PVR und PVRL2 mit löslichem DNAM-1 sowohl zytotoxische Effekte in der chronisch myeloischen Leukämie-Zelllinie K562 als auch der adhärennten HeLa-Zelllinie beobachten konnten. Zudem hatte lösliches DNAM-1 einen potentiellen Einfluss auf die Metastasierung von soliden Tumoren. Die Autoren schlugen deshalb lösliches DNAM-1 zur Blockierung von PVR und PVRL2 als mögliche Therapieoption vor (Hou u. a., 2014). Interessanterweise zeigte eine kürzlich erschienene Studie ein ähnliches Phänomen, in welcher rekombinantes DNAM-1 ebenfalls eine zytotoxische Wirkung gegenüber CD155-exprimierenden kutanen T-Zell-Lymphom-Zellen *in vitro* ausübte (Takahashi u. a., 2017).

Die Maskierung des korrespondierenden Rezeptors TIGIT durch einen Antikörper konnte die durch Blockierung der Liganden PVR und PVRL2 erhaltenen Ergebnisse bestätigen, da die Wirkung der mononukleären Zellen bei Blockierung von TIGIT alleine oder in Kombination mit dem BiTE® Antikörperkonstrukt AMG 330 ebenfalls signifikant verstärkt wurden. Dies bestätigt die Spezifität der beobachteten Lyse und schließt eine Beteiligung NK-Zell-vermittelter ADCC erneut aus. Als eine logische Konsequenz ist die Steigerung der antileukämischen Effekte nach Blockierung der TIGIT-PVR/PVRL2-Achse von einer verstärkten Aktivierung von Immunzellen begleitet, was durch die vermehrte Produktion des Effektormoleküls Granzym B nachgewiesen werden konnte.

Um die *in vitro* erhaltenen Ergebnisse in einem Mausmodell zu bestätigen, wurde ein PVR- und PVRL2-Doppelknockout der Zelllinie MV4-11 durch das CRISPR/Cas9-Genome-Editing erstellt, da eine Behandlung der Mäuse mit blockierenden Antikörpern zu dem Zeitpunkt nicht realisierbar war. In *in vitro* Versuchen zeigte sich, dass die Abwesenheit der Proteine PVR und PVRL2 auf der Zelloberfläche im direkten Vergleich zu den Wildtyp-Zellen zu einer deutlichen Steigerung der durch HD-PBMCs ausgelösten Effekte führte. Auch die antileukämische Wirkung des BiTE® Antikörperkonstruktes AMG 330 konnte signifikant im Vergleich zum Wildtyp gesteigert werden. Für diese experimentellen Ansätze wurde die Sortierung einer polyklonalen Doppelknockout-Kultur gegenüber der Etablierung monoklonaler Doppelknockout-Linien aus sortierten Einzelzellen gewählt. Es konnte beobachtet

werden, dass im Vergleich mehrerer unterschiedlicher monoklonaler Linien die durch HD-PBCMs ausgelösten zytotoxischen Effekte variabel waren (Daten nicht gezeigt). Durch den langen Zeitraum der Kultivierung einer Zelllinie mögen sich über den Zeitraum einzelne Zellen genetisch und epigenetisch verändern, was die Bildung einer polyklonalen Linie zur Folge hat (Stockholm u. a., 2007). Der Vergleich einer polyklonalen Doppelknockout-Kultur mit einer polyklonalen parentalen Wildtyp-Kultur erschien deshalb zwingend erforderlich, um andere, unbekannte und nicht durch den *knockout* von PVR und PVRL2 bedingte Effekte auszuschließen. Ausgehend von der Tatsache, dass die Wahrscheinlichkeit von Fehlschnitten der Endonuklease abhängig von der Dauer der Expression ist, erscheint eine - wie in dieser Arbeit gewählte - transiente Expression der Cas9 ebenfalls vorteilhaft (Ran u. a., 2013). Die Spezifität der Nuklease ist durch die Sequenz der guideRNA bestimmt. Es konnte zwar gezeigt werden, dass die Cas9-Nuklease zuverlässig an der angezielten Region schneidet, es bleibt jedoch fraglich, wie hoch die Wahrscheinlichkeiten für *off-target*-Effekte sind (Sander und Joung, 2014). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die Basenpaarungen 8-12 am 3'-Ende der 20 Nukleotide langen *guide*-Sequenz als sogenannte *seed*-Sequenz für die Spezifität der Cas9 bedeutender sind als Basenpaarungen am 5'-Ende (Semenova u. a., 2011). Der Einfluss von Basenfehlpaarungen auf die Wahrscheinlichkeit von *off-target*-Effekten ist jedoch insbesondere bei einer Vielzahl an Fehlpaarungen schwer vorhersagbar. Neben der eigentlichen Sequenz sind noch eine Reihe anderer Faktoren, wie die Konzentration der Nuklease, die unter anderem auch durch die Sequenz transkriptionell beeinflusst wird, relevant (Fu u. a., 2013; Hsu u. a., 2013). Bedingt durch die enorme Komplexität des menschlichen Genoms ist das Designen passender *guide*-Sequenzen ohne mögliche *off-target*-Loci nahezu unmöglich. Die Technologie des CRISPR/Cas9 *genome-engineerings* wird immer weiter entwickelt, so dass mittlerweile eine D10A Mutante der Cas9 vorhanden ist (Cas9 Nickase), welche mit zwei unterschiedlichen guideRNAs Einzelstrangbrüche auf beiden Seiten der DNA erzeugt. Durch diese Methode kann eine deutlich höhere Zielspezifität bei ähnlicher Effizienz erreicht werden (Shen u. a., 2014). Die in dieser Arbeit verwendeten Sequenzen wurden sorgfältig gewählt. Es ergaben sich für PVR bei 4 Fehlpaarungen zur eigentlichen Sequenz 8 mögliche *off-target*-Loci, wobei sich davon 3 in Genen befinden. Für die *guide*-Sequenz für PVRL2 ergaben sich bei 3-4 Fehlpaarungen 33 mögliche *off-target*-Loci, wobei 11 in Genen liegen. Generell gilt, dass mehr als 3 Fehlpaarungen in der *guide*-Sequenz nicht toleriert werden (Ran u. a., 2013). Für die guideRNA gegen PVRL2 waren nur zwei mögliche Loci vorhergesagt worden, die mit 3 Fehlpaarungen unspezifische Doppelstrangbrüche induzieren könnten. Weder das Gen *zinc finger protein 618* (NM\_133374; Fehlpaarungen zur ursprünglichen Zielsequenz an Base 4, 6, 19) noch das Gen *paired like homeodomain 3* (NM\_005029; Fehlpaarungen zur ursprünglichen Zielsequenz an Base 10, 13, 20) würden sich dabei als offensichtlich kritische Gene für *off-target*-Effekte beschreiben lassen. Eine zusätzliche Sequenzierung der potentiellen *off-target*-Loci in der polyklonalen Doppelknockout-Kultur wurde nicht durchgeführt. Bei

der Sequenzierung der *PVR*- und *PVRL2*-Genloci und deren Analysen konnten jedoch INDELS festgestellt werden, welche einen *knockout* der Gene zur Folge haben. Die sortierte polyklonale Doppelknockout-Kultur wies weder einen Unterschied in der Proliferationskapazität, noch in der Morphologie der Zellen im Vergleich zum Wildtyp auf. Zudem lagen die beobachteten Effekte der *in vitro* Zytotoxizitätsassays in einer Größenordnung, wie sie bereits bei der TIGIT-PVR/PVRL2-Blockade der AML-Zelllinien beobachtet wurden.

Die in *in vitro* Zytotoxizitätsassays beobachteten Effekte konnten in einem *in vivo* AML-Xenograft-Mausmodell in immundefizienten NSG-Mäusen, denen zusätzlich humane T-Zellen transplantiert wurden, bestätigt werden. AML-Xenograft-Modelle in immundefizienten Mäusen gehören schon lange zu einer anerkannten Methode, um die pathophysiologischen Mechanismen in der AML und die dabei wirkenden, *in vitro* nicht imitierbaren, Interaktionen zu erforschen (McCormack u. a., 2005). Die weitreichenden *in vivo* Versuche zeigten, dass die Last an Leukämiezellen, gemessen am Überleben der Mäuse, unter den Mäusen, welche mit den *PVR*- und *PVRL2*-Doppelknockout-Zellen transplantiert wurden, in allen Behandlungsgruppen niedriger war, was zu einem längeren Überleben der Mäuse in allen Gruppen im Vergleich zu mit Wildtyp-Zellen transplantierten Tieren führte. Die effektivere immunologische Beseitigung der Doppelknockout-Zellen im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen durch humane T-Zellen konnte dementsprechend auch im *in vivo* Modell bestätigt werden. Ohne die zusätzliche Transplantation von humanen T-Zellen zeigte sich kein Unterschied im Überleben von Mäusen, welche mit Wildtyp- oder Doppelknockout-Zellen transplantiert wurden, was eine Veränderung der *knockout*-Linie abgesehen von der Abwesenheit einer *PVR*- und *PVRL2*-Expression erneut ausschließt. Es kann zusammenfassend für die Doppelknockout-Zelllinie davon ausgegangen werden, dass die gesteigerte Lyse und das Verhalten der Linie *in vitro* und *in vivo* durch den genetischen *knockout* der Gene *PVR* und *PVRL2* und nicht durch unspezifische genetische Veränderungen verursacht wurde.

Als ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Lyse von primären AML-Blasten un behandelter Patienten durch *PVR*- und *PVRL2*-blockierende Antikörper in einem Teil der Patienten gesteigert werden konnte, wobei auch in diesen Versuchen eine Verstärkung von AMG 330 beobachtet wurde. Diese Ergebnisse sind besonders entscheidend, da Zelllinien als artifizielles System eine Besonderheit darstellen und es fraglich ist, inwieweit Ergebnisse, die bei Verwendung von Zelllinien detektiert werden, auf die Zellen eines Patienten übertragen werden können (Gillet u. a., 2013). Im Gegensatz zu den AML-Zelllinien, welche *PVR* und *PVRL2* alle sehr stark exprimieren, konnte bei den untersuchten 17 Proben der mononukleären Zellen von primären AML-Patienten eine heterogenere Expression festgestellt werden. Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen der in dieser Arbeit durchgeführten Analyse von *Microarray*-Genexpressionsdaten von 290 neu diagnostizierten

AML-Patienten, da die Patienten auch hier variable PVR- und PVRL2-Expressionswerte aufwiesen. Die heterogene Expression von PVR und PVRL2 in der AML wurde darüber hinaus in der Verifikationskohorte bestätigt, in der ebenfalls unterschiedlich starke PVR- und PVRL2-mRNA-Expressionslevel detektiert wurden.

Warum einige der getesteten Zelllinien in den Zytotoxizitätstests unter den gewählten Bedingungen besser als andere auf die Blockade von PVR und PVRL2 reagierten, konnte bislang nicht geklärt werden. Eine direkte Korrelation der Proteinexpression auf ein Ansprechen der verschiedenen Zelllinien ließ sich nicht feststellen. Die Zelllinie TF-1, welche gut auf Blockierung von PVR wie auch von PVRL2 reagiert, verfügt gemessen am MFI-Ratio über eine hohe Expressionsdichte von PVR und eine moderate Expressionsdichte von PVRL2 im Vergleich zu den anderen untersuchten Zelllinien. Die gemessenen Effekte sind jedoch für die Blockierung beider Moleküle nahezu identisch. Für die ebenfalls in Zytotoxizitätsassays gut auf eine Blockierung reagierende Zelllinie OCI-AML5 ließ sich jedoch im Vergleich zu den anderen Zelllinien eine mittlere Expressionsdichte auf Grundlage der MFI-Ratios beider Proteine ermitteln. In gleicher Weise ist bisher nicht klar, warum einige Blasten von AML-Patienten auf die Blockierung der Liganden PVR und PVRL2 reagierten und andere nicht. Auch in diesen Fällen konnte das Ansprechen auf die blockierenden Antikörper nicht mit der Expressionsdichte korreliert werden. Über Mechanismen, die zu einem Ansprechen der Blasten führen, kann an dieser Stelle lediglich spekuliert werden. Die Aktivierung von T-Zellen ist stark von der Menge an interagierenden Peptid-MHC-Komplexen abhängig, welche in T-Zellrezepterclustern mit den T-Zellrezeptoren (TZR) interagieren. Studien zeigten, dass mindestens vier solcher Komplexe pro Cluster benötigt werden, um eine Initiierung des Calcium-Influxes auszulösen (Manz u. a., 2011). Des Weiteren ist die Effektorantwort maßgeblich von der Anwesenheit kostimulatorischer und koinhibitorischer Signale beeinflusst. Dabei ist bekannt, dass Tumore kostimulatorische Signale auf unterschiedliche Art und Weise ausschalten können. Die Produktion von löslichem CD137-Ligand (CD137L) von Tumorzellen, welches die Interaktion mit dem kostimulatorischen Rezeptor CD137 blockiert und dadurch die T-Zellaktivierung mindert, ist in diesem Zusammenhang bereits beschrieben worden (Shao u. a., 2008). Eine hohe Serumkonzentration von löslichem CD137L konnte auch in Leukämiepatienten nachgewiesen werden (Furtner u. a., 2005). Ein weiterer Mechanismus der Tumorzellen zur Umgehung einer T-Zellaktivierung ist die Inhibierung oder Verhinderung der Präsentation von Antigenen über MHC-I (Töpfer u. a., 2011). In diesem Zusammenhang sind Punktmutationen oder Deletionen chromosomaler Bereiche des MHC-I-Gens, Mutationen im  $\beta$ 2-Mirkoglobulin, Störungen der transkriptionellen Regulation wie auch epigenetische Dysregulationen als Mechanismen zur Störung der Antigenpräsentationsmaschinerie beschrieben worden (Soong und Hui, 1992; Fonsatti u. a., 2003; Hicklin u. a., 1998; Nie u. a., 2001). Im Kontext koinhibitorischer Signale sind mittlerweile eine Reihe anderer Liganden identifiziert worden, welche das kritische Gleichgewicht

der T-Zellaktivierung stören können (Pardoll, 2012). So ist es in diesem Falle denkbar, dass neben PVR und PVRL2 zusätzliche koinhibitorische Moleküle wie *herpesvirus entry mediator* (HVEM), *programmed death-ligand 1* und *-ligand 2* (PD-L1, PD-L2) sowie B7-H3 und B7-H4 auf den Leukämiezellen heraufreguliert sind. Zusammen mit einer unzureichenden Menge an immunogenen Peptid-MHC-Komplexen, einer eventuellen Störung der Antigenpräsentationsmaschinerie und der unzureichenden Expression kostimulatorischer Signale könnte diese verstärkte Expression zusätzlicher koinhibitorischer Signale die Aktivierung der allogenen Effektorzellen gegen die AML-Zelllinien wie auch AML-Blasten stören. In immunprivilegierten Organen konnte zudem eine Expression des intrazellulären Serin-Proteaseinhibitors 9 (PI-9) als Inhibitor des Effektormoleküls Granzym B zum Schutz der dortigen Zellen vor einer Zerstörung zytotoxischer T- und NK-Zellen nachgewiesen werden (Bladergroen u. a., 2001). Als Mechanismus der Immunevasion konnte die Adaption dieses Mechanismus von Krebszellen bei einer Reihe von Entitäten nachgewiesen werden. So konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen des Lungen-, Kolon- und Prostatakarzinoms sowie interessanterweise auch Tumorzellen des Non-Hodgkin-Lymphoms durch die Expression von PI-9 einer Granzym B-vermittelten Apoptose entgehen (Medema u. a., 2001; Soriano u. a., 2012; Ray u. a., 2012; Bladergroen u. a., 2002). Demensprechend ist es denkbar, dass sich einige AML-Zelllinien oder auch Blasten primärer Patienten diesen Mechanismus zu Nutze machen und so unempfindlicher auf die Elimination durch eine Granzym B Effektorantwort reagieren.

Die Verwendung des bispezifischen Antikörpers AMG 330, welcher gegen das Molekül CD33 auf AML-Blasten und eine nicht polymorphe Region des CD3-Rezeptors auf T-Zellen gerichtet ist, ist unabhängig von TZR-MHC-I-Interaktionen (Offner u. a., 2006). BiTE® Antikörperkonstrukte sind höchst effektiv und bereits in pico- und femtomolaren Konzentrationen wirksam (Nagorsen und Baeuerle, 2011). In dieser Arbeit wurde in den *in vitro* Versuchen eine Konzentration von 0,1 ng/mL verwendet, welche lediglich eine suboptimale Lyse der Zielzellen hervorruft. Diese geringe Konzentration war notwendig, um Effekte bei einer Blockierung von PVR und PVRL2 beobachten zu können. In der Tat konnte bei allen analysierten Zelllinien eine gesteigerte Lyse im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle beobachtet werden, wohingegen lediglich bei 2 von 9 analysierten Patienten-Proben keine vermehrte Zytotoxizität bei dieser Konzentration beobachtet werden konnte. Nichtsdestoweniger wurde eine Beeinflussung der zytotoxischen Wirkung von BiTE® Antikörpern durch kostimulatorische und vor allem koinhibitorische Interaktionen bereits mehrfach beschrieben. Laszlo und Kollegen konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass die antileukämische Wirkung von AMG 330 durch T-Zellliganden positiv wie auch negativ beeinflusst wird. Die Überexpression der kostimulatorischen Liganden CD80 und CD86 auf AML-Zelllinien führte dabei zu einer Verstärkung der zytotoxischen Wirkung von AMG 330, wohingegen eine Überexpression von PD-L1 und PD-L2 die antileukämische Wirkung des BiTE® Antikörperkonstruktes abschwächte. Die Autoren konnten ebenfalls zeigen, dass die Kombination von

AMG 330 mit einem agonistischen Antikörper gegen den kostimulatorischen Rezeptor von CD80 und CD86, CD28, die Lyse von AML-Zelllinien und Blasten von AML-Patienten erhöhte (Laszlo u. a., 2015). Die Technik bispezifischer Antikörper (engl. *bispecific antibodies* (bsAbs)) wurde zudem bereits moduliert. Dem Labor von Michael Bachmann gelang es, an einen CD3-CD33 bsAb variable Module zu koppeln. Durch Kopplung des kostimulatorischen Moleküls CD137 an einen CD3-CD33 bsAb konnte die Lyse von AML-Zellen gesteigert werden, was insbesondere die Effektivität bei einer niedrigen CD33-Expression der Blasten optimierte (Arndt u. a., 2013, 2014). Unterstützend zu den Daten von Laszlo und Kollegen konnten auch Krupka und Kollegen zeigen, dass AML-Blasten in *ex vivo* Langzeitkulturen mit allogenen wie auch autologen T-Zellen als einen Resistenzmechanismus das koinhibitorische Molekül PD-L1 bei einer Therapie mit dem BiTE® AMG 330 stark heraufregulieren. In Analogie zu den Ergebnissen in dieser Arbeit konnte die Lyse von primären AML-Blasten durch eine Blockierung der PD-1/PD-L1-Interaktion gesteigert werden (Krupka u. a., 2015).

Bevor die Bedeutung der in dieser Arbeit generierten Daten als mögliche neue therapeutische Strategie zur Behandlung der AML diskutiert wird, soll im folgenden Abschnitt auf die komplexen Interaktionen von PVR und PVRL2 mit den Zellen des Immunsystems eingegangen werden.

#### 4.2 DIE IMMUNCHECKPOINT LIGANDEN PVR UND PVRL2: FEIND ODER FREUND?

Die Interaktionen von PVR und PVRL2 mit ihren Rezeptoren lassen ein gewisses Paradoxon entstehen, da diese Interaktionen sowohl immun-stimulierende als auch immun-inhibierende Eigenschaften nach sich ziehen können.

PVR wurde initial als der Rezeptor für die Bindung des Poliovirus identifiziert, und ein Eindringen des Virus konnte durch den monoklonalen Antikörper D171 verhindert werden (Nobis u. a., 1985; Kaplan und Racaniello, 1991). PVR wird auf allen mononukleären Zellen des Blutes exprimiert. Polymorphonukleäre Zellen (Granulozyten) weisen nur eine geringe PVR-Expression auf, und Thrombozyten sind PVR-negativ (Freistadt u. a., 1993). Mit 51 % Sequenzhomologie konnte PVRL2 (PRR2, Nectin-2) als Homolog zu PVR identifiziert werden (Eberlé u. a., 1995). Die Expression von PVRL2 wurde auf CD34<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup> und CD14<sup>+</sup> hämatopoetischen Zellen nachgewiesen (Lopez u. a., 1998). PVRL2 wurde als ein homophiles Adhäsionsmolekül auf hämatopoetischen Zellen und Endothelzellen beschrieben (Lopez u. a., 1998). Bei einer weitläufigen *RNA-Sequencing*-Analyse konnte für PVR und PVRL2 eine mRNA-Expression in allen 27 untersuchten Geweben nachgewiesen werden (Fagerberg u. a., 2014). Die Migration von Monozyten durch Endothelzellverbindungen wird durch die Interaktion von PVR auf Endothelzellen mit *DNAX accessory molecule 1* (DNAM-1, CD226) auf Monozyten reguliert

(Reymond u. a., 2004). DNAM-1 wird konstitutiv auf Lymphozyten exprimiert und konnte als ein aktivierender Rezeptor identifiziert werden, wobei blockierende Antikörper gegen DNAM-1 die T- und NK-Zell-vermittelten zytotoxischen Effekte gegenüber Tumorzellen sowie die Zytokinproduktion inhibierten (Shibuya u. a., 1996). In späteren Arbeiten konnten PVR und PVRL2 als die Liganden für DNAM-1 identifiziert werden, wobei eine Blockierung von DNAM-1 oder PVR durch Antikörper die NK-Zell-vermittelte Lyse gegenüber Zielzellen inhibierte (Bottino u. a., 2003). Die zytotoxischen Effekte von NK-Zellen gegenüber primären Neuroblasten sind heterogener als gegenüber Neuroblastomzelllinien, was mit der Expressionsintensität von PVR auf den Neuroblasten korreliert werden konnte. In diesen Studien wurde zum ersten Mal die Intensität der Oberflächenexpression von PVR als Parameter zur Einschätzung einer NK-Zell-basierten Neuroblastomtherapie diskutiert (Castriconi u. a., 2004). Der Einsatz von NK-Zellen stellt eine aussichtsreiche Therapieoption in der AML dar. Alloreaktive NK-Zellen konnten in T-Zell-depletierten allo-HSCTs bei vermindertem graft-versus-host- einen guten graft-versus-leukemia-Effekt auslösen (Ruggeri u. a., 2002). *Killer immunoglobulin-like receptors* (KIRs) sind auf NK-Zellen exprimierte Rezeptoren, welche die zytotoxische Funktion von NK-Zellen durch die Erkennung von MHC-Allelen regulieren und so transformierte oder fremde Zellen detektieren (Vilches und Parham, 2002). Der Vorteil einer KIR-Liganden-Inkompatibilität bei haploidentischen Spendern konnte auch ohne T-Zelldepletion nachgewiesen werden (Giebel u. a., 2003). Die zytotoxischen Effekte von NK-Zellen sind abhängig von *natural cytotoxicity receptors* (NCRs) und Korezeptoren wie NKp46, NKp30, NKG2D, 2B4 und DNAM-1, wobei für die Lyse von AML-Zellen eine besonders starke Abhängigkeit gezeigt werden konnte (Moretta u. a., 2001; Costello u. a., 2002). Pende und Kollegen konnten zeigen, dass die zytotoxischen Effekte von NK-Zellen gegenüber AML-Zellen mit der Expression von DNAM-1 und NKG2D korrelieren. Im Einklang zu den in dieser Arbeit präsentierten Daten konnte ebenfalls eine Expression von PVR und PVRL2 auf AML-Zellen unabhängig von ihrem FAB-Subtyp nachgewiesen werden. In der Studie von Pende und Kollegen führte eine Blockierung von DNAM-1 zu einer Inhibierung der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität, wobei spekuliert wurde, dass eine PVR- und PVRL2-Expression auf AML-Zellen für eine effiziente Lyse durch alloreaktive T-Zellen obligat ist (Pende u. a., 2005b). In den Studien von Carlsten und Kollegen wurde zudem eine Rolle von PVR auf primären Ovarialkarzinom-Zellen für die DNAM-1-medierte Erkennung von allogenen NK-Zellen beschrieben (Carlsten u. a., 2007). Chan und Kollegen konnten zeigen, dass NK-Zellen über die Interaktion von DNAM-1 mit PVR für die Unterdrückung von Melanom-Metastasen im Mausmodell relevant sind (Chan u. a., 2010). In dem murinen RMA Lymphom-Modell konnte zudem gezeigt werden, dass PVR und PVRL2 als Liganden von DNAM-1 über die Stimulation der angeborenen Immunantwort zu einer Zell-medierten Tumor-spezifischen Immunität beitragen, was die DNAM-1-PVR/PVRL2 gesteuerte Kontrolle der Immunregulation in ein globaleres und nicht nur NK-Zell-vermitteltes Bild rückt (Tahara-Hanaoka u. a., 2006).

Neben den oben geschilderten Arbeiten, welche PVR und PVRL2 als die anti-Tumorimmunität positiv beeinflussende Moleküle beschreiben, deuten andererseits viele Erkenntnisse auf eine gegenteilige Funktion von PVR und PVRL2 hin. Obwohl mittlerweile deutlich geworden ist, dass die Kontrolle des Immunsystems mehr einem Gleichgewicht zwischen kostimulatorischen und koinhibitorischen Signalen in Form eines Fließmodells als einem Ein/Aus-Schalters entspricht, wirft diese Doppelfunktion von PVR und PVRL2 in der Immuntherapie ein Paradoxon auf. Auf die Interaktion von PVR und PVRL2 mit dem Rezeptor TIGIT wurde eingangs bereits detailliert eingegangen. Zusätzlich konnte CD96 (Tactile) als Bindungspartner für PVR auf T-Zellen und NK-Zellen nach Aktivierung identifiziert werden (Wang u. a., 1992). CD96 wurde initial als zusätzlicher Adhäsions-Rezeptor auf NK-Zellen beschrieben, der die Zytotoxizität gegen Zielzellen steigert (Fuchs u. a., 2004). Zudem dient CD96 als Marker für Leukämienstammzellen (Hosen u. a., 2007). CD96 verfügt strukturell wie TIGIT über eine inhibitorische ITIM-Domäne, was die Rolle als aktivierenden Rezeptor grundsätzlich in Frage stellte. In der Tat konnten neuere Daten zeigen, dass CD96 mit DNAM-1 auf NK-Zellen um den gemeinsamen Liganden CD155 konkurriert und so die NK-Zell Funktion direkt negativ beeinflusst und damit einen entscheidendes therapeutisches Ziel darstellt (Chan u. a., 2014). Darüber hinaus konnte die Blockierung von CD96 mit einem monoklonalen Antikörper in drei unterschiedlichen Tumormodellen die Ausbildung von Metastasen verhindern und zeigte zudem gute Kombinationseigenschaften mit einer PD-1- oder CTLA4-Blockade (Blake u. a., 2016b). Demensprechend wird CD96 in der Immuntherapie in aktueller Betrachtung zusammen mit TIGIT als vielversprechende Zielstruktur in Analogie zu PD-1 und CTLA4 gesehen (Dougall u. a., 2017; Blake u. a., 2016a). Als weiterer Gegenspieler zu DNAM-1 konnte kürzlich zudem der koinhibitorische Rezeptor CD112R identifiziert werden. CD112R wird präferenziell auf T-Zellen exprimiert und konkurriert als Ligand mit höherer Bindungsaffinität mit CD226 um den gemeinsamen Bindungspartner PVRL2 und inhibiert so T-Zellrezeptor-medierte Signale der T-Zellen (Zhu u. a., 2016).

Fraglich ist in diesem Zusammenhang, welche Interaktionen von PVR und PVRL2 im Kontext der Immuntherapie entscheidend sind. In Anbetracht der immunstimulierenden Interaktion von PVR und PVRL2 mit DNAM-1 konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu autologen peripheren NK-Zellen, tumor-assoziierte NK-Zellen eine verminderte Expression von aktivierenden Rezeptoren wie DNAM-1 und 2B4 aufweisen. Darüber hinaus führte die gemeinsame Inkubation von NK-Zellen mit PVR-positiven Ovarialkarzinom-Zellen zu einer Herunterregulation von DNAM-1. Die Autoren schlussfolgerten, dass eine NK-zellvermittelte Unterdrückung von Ovarialkrebs durch eine gestörte DNAM-1-Expression auf tumor-assoziierten NK-Zellen stark limitiert ist, was durch die chronische Exposition von PVR auf den Tumorzellen verursacht wird (Carlsten u. a., 2009). Ähnliche Ergebnisse konnten die Arbeiten von Chauvin und Kollegen zeigen. In diesen Analysen konnte ebenfalls ein Ungleichgewicht zwischen der TIGIT- und DNAM-1-Expression aufgezeigt werden, wobei auf CD8<sup>+</sup> T-

Zellen von Melanompatienten eine hohe TIGIT-, aber eine niedrige DNAM-1-Expression nachgewiesen werden konnte (Chauvin u. a., 2015). Bei der chronisch viralen Infektion mit dem HI-Virus wurde auf dysfunktionalen CD8<sup>+</sup> T-Zellen zudem eine stark verminderte Expression von DNAM-1 beschrieben (Cella u. a., 2010). Im Einklang mit diesen Daten konnte eine andere Gruppe kürzlich zeigen, dass die Expression von DNAM-1 auf HIV-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen, welche eine hohe TIGIT-Expression aufweisen, stark vermindert ist (Tauriainen u. a., 2017). Im peripheren Blut von Patienten mit kutanem T-Zell-Lymphom konnte auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie auf NK-Zellen ebenfalls eine im Vergleich zu gesunden Probanden niedrigere DNAM-1-Expression nachgewiesen werden. Die Serumlevel der Patienten waren hingegen für lösliches DNAM-1 stark erhöht, was ein *membrane-shedding* von DNAM-1 vermuten lässt (Takahashi u. a., 2017). Interessanterweise konnte in zwei unabhängigen Arbeiten beeindruckend gezeigt werden, dass die Expression von DNAM-1 in AML-Patienten stark vermindert ist. Während die Expression von PVR und PVRL2 auf Blasten von AML-Patienten sehr hoch war, zeigten die NK-Zellen der Patienten eine signifikant verminderte Expression von DNAM-1 im Vergleich zu gesunden Kontrollen gleichen Alters auf. Die Autoren konnten zudem eine inverse Korrelation von PVRL2 auf Leukämieblasten mit DNAM-1 auf NK-Zellen feststellen, und die Kultivierung von PVR- und PVRL2-positiven Blasten mit NK-Zellen gesunder Spender führte zu einer Herunterregulation von DNAM-1 (Sanchez-Correa u. a., 2012). Diese Daten zeigen eindrucksvoll, dass die Exposition der Liganden PVR und PVRL2 in der AML die Expression des kostimulatorischen Rezeptors DNAM-1 inhibiert. Dies konnte von Kong und Kollegen kürzlich bestätigt werden, die ebenfalls zeigten, dass eine TIGIT-Expression invers mit der Expression von DNAM-1 korreliert. In dieser Studie war TIGIT auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen von AML-Patienten heraufreguliert, wohingegen die Expression von DNAM-1 im Vergleich zu Zellen gesunder Spender signifikant vermindert war (Kong u. a., 2016).

Im Hinblick auf die über PVR und PVRL2 regulierte Immunantwort von NK- wie auch T-Zellen kann zusammenfassend gesagt werden, dass eine negative Regulation und damit die Progression des Tumors fördernde Rolle der beiden Immuncheckpoint Moleküle überwiegt. Die in diesem Kapitel zusammengefassten Arbeiten gewichten die Expression von PVR und PVRL2 und ihre Funktion in der Immunüberwachung als schädlich. Eine Vielzahl wissenschaftlicher Arbeiten konnte in diesem Zusammenhang eine Überexpression von PVR und PVRL2 in unterschiedlichen Krebsentitäten nachweisen. Dies lässt vermuten, dass PVR wie auch PVRL2 nicht nur als Mediatoren der Immunevasion, sondern ebenfalls durch zellulären Stress oder bei Infektionen heraufreguliert werden. So ist sowohl PVR als auch PVRL2 auf Tumoren des Kolorektalkarzinoms erhöht, und bei den Patienten konnte darüber hinaus eine erhöhte Serumkonzentration von löslichem PVRL2 detektiert werden (Masson u. a., 2001; Wang u. a., 2010; Karabulut u. a., 2016). Die Expression von PVR ist ein unabhängiger prognostischer Faktor bei Patienten mit einem Pankreaskarzinom, und eine hohe PVR-Expression korreliert mit einer schlechteren postoperativen Prognose (Nishiwada u. a., 2015; Peng

u. a., 2016). Eine gesteigerte Expression von PVRL2 konnte auf Brust- und Ovarialkarzinomgewebe nachgewiesen werden (Oshima u. a., 2013). Zudem weisen die Läsionen von Patienten mit kutanem T-Zell-Lymphom eine erhöhte CD155-Expression auf (Takahashi u. a., 2017). Die Serumkonzentrationen von löslichem CD155 im Vergleich zu den Seren gesunder Kontrollpersonen sind in einer Reihe von Tumorentitäten wie bei Lungen- und Mammakarzinompatienten und bei gastrointestinalen, gynäkologischen und gastrischen Krebserkrankungen signifikant erhöht. Nach chirurgischer Resektion der Tumore fällt die Serumkonzentration ab, was ein Potential von löslichem CD155 als Biomarker für diese Krebsentitäten aufzeigt (Iguchi-Manaka u. a., 2016). Bislang konnte lediglich auf hepatozellulären Karzinomzellen eine signifikant verminderte PVR-Expression im Vergleich zu Kontrollen detektiert werden. In dieser Erkrankung konnte CD155 darüber hinaus als unabhängiger prognostischer Faktor eruiert werden, wobei Patienten mit einer hohen PVR-Expression ein verlängertes Gesamtüberleben aufwiesen (Qu u. a., 2014). Bezüglich der Regulation von PVR und PVRL2 konnte bei der Behandlung von Myelomzellen mit den Zytostatika Doxوروبicin, Melphalan oder Bortezomib eine Heraufregulation von PVR und PVRL2 beschrieben werden (Soriani u. a., 2009). Zudem konnte gezeigt werden, dass erhöhte Level von Stickstoffmonoxid, welches im Zuge der Immunantwort von Phagozyten freigesetzt wird, die Expression von PVR auf Zellen des multiplen Myeloms erhöht (Fionda u. a., 2015). Zusätzlich wurde für PVR die Regulation der Expression durch oxidativen Stress und den *DNA-damage response pathway* beschrieben (Ardolino u. a., 2011). In Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Regulation von PVR über den Fibroblasten-Wachstumsfaktor FGF oder durch das Onkogen Ras über einen Raf-MEK-ERK-AP-1-Signalweg gesteuert wird (Hirota u. a., 2005).

Die hier dargelegten Eigenschaften von PVR und PVRL2 zur negativen Regulation der immunologischen Tumorüberwachung kombiniert mit der hohen Expression in der AML weisen die beiden Immuncheckpoint Moleküle als aussichtsreiche Zielstrukturen für eine Therapie mit blockierenden Antikörpern aus. Im folgenden Abschnitt soll deshalb das therapeutische Potential einer PVR- und PVRL2-blockierenden Immuntherapie zur Behandlung der AML diskutiert werden.

### 4.3 DIE BLOCKIERUNG DER TIGIT-PVR/PVRL2-ACHSE ZUR THERAPIE DER AML

In den Ergebnissen dieser Arbeit konnte das therapeutische Potential einer Blockierung der Immuncheckpoint-Achse TIGIT-PVR/PVRL2 zur Behandlung der AML anhand von Zytotoxizitätsassays an AML-Zelllinien und primären Blasten wie auch in einem Mausmodell aufgezeigt werden. Daraus resultiert die spannende Fragestellung, welches Potential eine solche therapeutische Strategie in sich trägt und in wie weit sich ein solcher Ansatz klinisch umsetzen lässt.

Zur Beantwortung dieser Frage sticht als eines der wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit die unabhängige prognostische Relevanz einer hohen PVR-Expression mit einer Hazard-Ratio von 3,39 (95 % KI: 1,45-7,94) zusammen mit dem FLT3-Mutationsstatus als unabhängiger, negativer Einflussfaktor in einer Kohorte von 290 AML-Patienten ins Auge. Die Relevanz von PVR konnte in einer nicht als Teil dieser Arbeit behandelten Verifikationskohorte mit 139 AML-Patienten zusammen mit dem Karyotyp für das eventfreie, das rezidivfreie und das Gesamtüberleben bestätigt werden (Stamm, Klingler et al. Manuskript in Begutachtung). In diesen Analysen konnte zudem eine hohe Korrelation der PVR- und PVRL2-Expression festgestellt werden (Pearson's rho = 0,827,  $p < 0.001$ ). Wurde PVR in den multivariaten Cox-Regressionen entfernt, so stellte sich auch PVRL2 als signifikanter unabhängiger prognostischer Marker für das rezidivfreie Überleben heraus und verfehlte nur knapp die Signifikanzgrenze in Bezug auf das Gesamtüberleben. Die Korrelationen einer niedrigen PVR- und PVRL2-Expression mit dem verlängerten Überleben der Patienten nach Chemotherapie weisen auf eine endogene Funktion des Immunsystems unter Chemotherapie hin. Dabei ist anscheinend vor allem die TIGIT-PVR/PVRL2-Achse von Bedeutung. Eine Blockade dieser Achse könnte sich deshalb positiv auf den Krankheitsverlauf der Patienten mit einer hohen PVR- und PVRL2-Expression auswirken. In der vorliegenden Arbeit konnte eine hohe Expression von PVR und gleichermaßen von PVRL2 auf den AML-Zelllinien und primären AML-Blasten gezeigt werden. Die Analysen der klinischen Daten in zwei unabhängigen Kohorten bestätigen diese Ergebnisse auf transkriptioneller Ebene. Auch in anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass PVR und PVRL2 in der AML stets gemeinsam exprimiert werden, was beide Liganden gleichermaßen als Zielstrukturen für eine Immuntherapie qualifiziert (Pende u. a., 2005b; Sanchez-Correa u. a., 2012; Kong u. a., 2016). Im Einklang mit den in dieser Arbeit vorgestellten Daten zum Potential einer Blockierung der TIGIT-PVR/PVRL2-Achse konnten Kong und Kollegen eine signifikant erhöhte Expression von TIGIT auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen von AML-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen feststellen. Ein *knockdown* von TIGIT hob den dysfunktionalen Phänotyp dieser Zellen partiell wieder auf, wodurch die Autoren schlussfolgerten, dass TIGIT eine wichtige Rolle in der Pathogenese der AML spielt und als aussichtsreiche immuntherapeutische Zielstruktur gilt (Kong u. a., 2016). Zehn bis vierzig Prozent der AML-Patienten erreichen nach dem ersten oder zweiten Zyklus der Induktionstherapie keine komplette Remission, was als primäre refraktäre AML bezeichnet wird. Die Therapie der Patienten mit primär refraktärer AML stellt eine große Herausforderung dar, die mit herkömmlichen Therapieregimen in der Regel nicht beherrschbar ist (Dohner u. a., 2010). Die allo-HSCT ist in dieser Situation die Option mit den besten Heilungschancen, welche jedoch nur Patienten niedrigen Alters und mit gutem Allgemeinzustand vorbehalten ist (Ramos u. a., 2015). Eine hohe TIGIT-Expression konnte in den Analysen von Kong und Kollegen mit der primär refraktären AML assoziiert werden (Kong u. a., 2016). Neben einer möglichen Identifikation solcher Patienten für eine frühzeitige Risikostratifikation durch den TIGIT-Expressionsstatus könnte ein therapeutischer Ansatz der

Blockierung der TIGIT-PVR/PVRL2-Achse eine zusätzliche mögliche Therapieoption zur Behandlung dieser Patienten liefern. Obwohl die allo-HSCT eine gute Therapieoption der AML auch im fortgeschrittenen Stadium darstellt, rezidivieren viele Patienten nach Transplantation, und nahezu die Hälfte der Patienten verstirbt an der rezidierten Krankheit (Tischer u. a., 2014; Roux u. a., 2017). Ein Auftreten eines Rezidivs nach der allo-HSCT ist durch ein Versagen der *graft-versus-leukemia*-Immunantwort der Spender T- und NK-Zellen bedingt (Bleakley und Riddell, 2004). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen von rezidierten Patienten im Vergleich zu den Zellen der Patienten in Remission eine höhere TIGIT-Expression aufweisen (Kong u. a., 2016). Für diese Patienten könnte eine Blockierung der TIGIT-PVR/PVRL2-Achse ebenfalls von großem Nutzen sein.

Neben den in dieser Arbeit vorgestellten Daten konnte der Mechanismus einer Steigerung der Zytotoxizität von Immunzellen gegenüber Krebszellen durch eine Blockierung der TIGIT-PVR/PVRL2-Achse bereits auch von anderen Gruppen gezeigt werden. Hervorzuheben sind in diesem Zusammenhang besonders die Daten von Johnston und Kollegen, welche TIGIT als maßgeblichen Regulator CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei Krebs- wie auch viralen Erkrankungen identifizierten. Die Autoren konnten eine hohe TIGIT-Expression auf Tumor-infiltrierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen in einer Vielzahl von humanen wie auch murinen Tumoren nachweisen. Zudem wurde in den Analysen deutlich, dass TIGIT von einer PD-1-Expression auf T-Zellen von Patienten mit nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen und Kolonkarzinomen sowie auf T-Zellen in murinen Kolon- und Brustkrebsmodellen begleitet war. Während eine Blockierung von TIGIT oder PD-L1 alleine die T-Zelleffektorfunktionen auf T-Zellen in ableitenden Lymphknoten wiederherstellen konnte, so war eine Blockade beider Rezeptoren in einer hoch immunsuppressiven Mikroumgebung notwendig, um den dysfunktionalen Phänotyp der Effektorzellen aufzuheben. Diese Ergebnisse konnten in Modellen chronischer Viruserkrankungen bestätigt werden (Johnston u. a., 2014). Für das Melanom zeigte sich ein ähnliches Bild. Tumor-spezifische wie auch Tumor-infiltrierende CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigten in dieser Studie eine hohe TIGIT-Expression auf, welche oft von einer hohen PD-1 Expression begleitet war. Zudem konnten die Autoren zeigen, dass eine PD-1-Blockade auf dysfunktionalen PD-1<sup>+</sup>TIM-3<sup>+</sup> Melanom-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu einer Hochregulation von TIGIT führte. Eine Blockierung von TIGIT und PD-1 auf Tumor-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigte einen additiven Effekt auf die Proliferation, die Zytokinproduktion und die Ausschüttung von Granzym B (Chauvin u. a., 2015). Interessanterweise konnte eine weitere Studie diese Ergebnisse nicht nur bestätigen, sondern darüber hinaus zeigen, dass die immunsuppressiven Effekte von Melanom-spezifischen T-Zellen mit der Intensität der PVR-Expression auf Melanomzellen korrelierte. Eine Überexpression der PVR-Expression verstärkte dabei den dysfunktionalen Phänotyp, wobei ein *knockdown* von PVR auf Melanomzellen zu einer Verbesserung der T-Zelleffektorfunktionen führte. In dieser Studie konnte ein synergistischer Effekt einer kombinierten Blockade von TIGIT und

PD-1 auf die Steigerung der Effektorantwort von autologen Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TILs) gegen Melanomzellen festgestellt werden (Inozume u. a., 2016).

Die ersten Erfahrungen mit dem Einsatz von Immuncheckpoint Inhibitoren gegen CTLA4 oder PD-1 beim Melanom zeigen, dass eine Kombination von blockierenden Antikörpern einen klinischen Vorteil gegenüber der Monotherapie erbringt (Wolchok u. a., 2013; Larkin u. a., 2015; Postow u. a., 2015). Die im vorherigen Absatz zusammengefassten Daten zur Rolle von TIGIT beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom, beim kolorektalen Karzinom und beim Melanom weisen auf ein gemeinsames Auftreten von TIGIT mit PD-1 auf T-Zellen hin. Auch die Daten von Krupka und Kollegen zeigten, dass die Behandlung von primären AML-Blasten mit AMG 330 zu einer Heraufregulation von PD-1 führte und sich der dadurch entstehende dysfunktionale Phänotyp der T-Zellen in der AML mit einer Blockierung von PD-L1 mit einem monoklonalen Antikörper umkehren ließ (Krupka u. a., 2015). In dieser Dissertation konnte das therapeutische Potential einer TIGIT-PVR/PVRL2-Blockierung aufgezeigt werden. Durch den Erfolg klinischer Studien mit PD-1 blockierenden Antikörpern und der gemeinsamen Expression von TIGIT und PD-1 auf T-Zellen von AML-Patienten, ist eine Kombination einer PD-1-Blockade mit einer Blockierung der TIGIT-PVR/PVRL2-Achse vermutlich sinnvoll. Jedoch konnte in der Analyse der publizierten Genexpressionsdaten des Verhaak-Kollektivs für die PD-L1-Expression kein Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten gezeigt werden. Eine Expression von PD-L2 konnte in den Datensätzen zudem nicht detektiert werden. Die Arbeit von Krupka und Kollegen weist ebenfalls darauf hin, dass primäre AML-Blasten keine konstitutive PD-L1-Expression aufweisen, was durch den stark anti-inflammatorischen und immunsupprimierenden Phänotyp der AML bedingt sein könnte (Krupka u. a., 2015). Eine Expression von PD-L1 ist häufig an ein inflammatorisches Milieu gekoppelt (Taubke u. a., 2012; Krönig u. a., 2014). Die Expression von PD-L1 wurde in diesem Kontext in der AML im zeitlichen Verlauf der antileukämischen Therapie mit AMG 330 über INF- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  induziert (Krupka u. a., 2015). Eine Heraufregulation von PD-L1 als Immunevasionsmechanismus gegen eine BiTE<sup>®</sup> Therapie mit Blinatumumab konnte auch für die akute lymphatische Leukämie gezeigt werden (Köhnke u. a., 2015; Feucht u. a., 2016). Eine erste kleine Phase-I-Studie in acht Patienten mit AML zeigte allerdings nur bei einem Patienten ein minimales Ansprechen durch Blockierung von PD-1 (Berger u. a., 2008). Die Beeinflussung des Immunsystems durch den Einsatz Immuncheckpoint-blockierender Antikörper geht generell zu Lasten von teilweise beträchtlichen Nebenwirkungen (engl. *immune-related adverse events* (IRAEs)). Obwohl IRAEs mit Steroiden relativ gut behandelt werden können, geschieht dies wiederum auf Kosten der gewollten anti-Tumor-Immunantwort (Michot u. a., 2016). Weiterführende Studien sollten untersuchen, ob eine Blockierung der TIGIT-PVR/PVRL2-Achse in der AML zu einer Heraufregulation von PD-1 oder seiner Liganden führt und somit eine Kombinationstherapie sinnvoll erscheint. Eine Blockierung des Rezeptors TIGIT anstelle seiner Liganden könnte von Vorteil sein, da TIGIT spezifisch auf Immunzellen exprimiert wird und die

präklinische Datenlage zum Einsatz TIGIT-blockierender Antikörper zum jetzigen Zeitpunkt fundierter ist. Eine Phase-I-Studie zur Behandlung fortgeschrittener oder metastasierter solider Tumore wurde zudem kürzlich initiiert (NCT03119428). Obwohl in dieser Arbeit keinerlei Effekte durch ADCC bei Verwendung der monoklonalen Antikörper gegen PVR oder PVRL2 aufgezeigt werden konnten, können eventuell zu erwartende Nebenwirkungen durch die ebenfalls physiologische Expression von PVR und PVRL2 in einer Vielzahl an Geweben bisher nicht abgeschätzt werden und müssen durch toxikologische Studien untersucht werden. Wie im vorherigen Abschnitt allerdings herausgestellt, kann der positive Effekt von PVR und PVRL2 über DNAM-1 auf die Regulation der Immunantwort vernachlässigt werden, da die Expression von DNAM-1 in vielen Tumorentitäten inklusive der AML stark reduziert ist (Carlsten u. a., 2009; Sanchez-Correa u. a., 2012; Chauvin u. a., 2015; Kong u. a., 2016; Takahashi u. a., 2017). Neben PD-1 würden sich theoretisch auch noch weitere Immuncheckpoint-Therapien mit der Blockade der TIGIT-PVR/PVRL2-Achse kombinieren lassen. Kong und Kollegen konnten in dem Zusammenhang zeigen, dass TIGIT auf CD8<sup>+</sup>T-Zellen nicht nur mit einer PD-1 Expression assoziiert ist, sondern dass die Expression von TIGIT ebenfalls von der Expression der koinhibitorischen Rezeptoren CD160 und 2B4 begleitet wird. Eine Korrelation von PD-1 mit Tim-3, BTLA oder LAG3 konnte jedoch nicht festgestellt werden (Kong u. a., 2016).

Die Möglichkeit der Kombination einer TIGIT-PVR/PVRL2 Immuncheckpoint-Therapie mit einem in der AML verwendeten Chemotherapeutikum ist ebenfalls gegeben. Entgegen der langjährigen Annahme, dass Chemotherapie immunsuppressiv ist, konnten neuere Forschungsergebnisse zeigen, dass einige Chemotherapeutika als Nebeneffekt neben der Induktion eines immunogenen apoptotischen Zelltods der Krebszellen ebenfalls Mechanismen der Tumormunevasion, wie die Unterdrückung von regulatorischen T-Zellen, bedingen können und somit durchaus unterstützend zu einer Immuntherapie wirken können (Lutsiak u. a., 2005; Vandenabeele u. a., 2016). Diese Eigenschaft ist allerdings stark von der Art des Chemotherapeutikums, der Dosierung und dem Therapieplan abhängig (Emens und Middleton, 2015). Zudem verringert eine Lymphopenie als häufiger Nebeneffekt einer Chemotherapie grundsätzlich die Erfolgchancen einer Immuntherapie drastisch (van der Most u. a., 2005). Durch die Verdrängung der normalen Hämatopoese im Krankheitsverlauf der AML scheint es deshalb vorteilhaft, einen weiteren Abfall der Lymphozyten für den Erfolg einer Immuntherapie zu vermeiden. In dieser Arbeit wurde neben der Blockade der TIGIT-PVR/PVRL2-Achse ebenfalls das Potential einer Kombination von blockierenden Antikörpern mit dem BiTE<sup>®</sup> Antikörperkonstrukt präklinisch evaluiert. CD33 Antikörper wie auch der bispezifische Antikörper AMG 330 verfügen über ein geringes hämatotoxikologisches Nebenwirkungsprofil. Obwohl eine Reaktivität gegenüber hämatopoetischen Stammzellen vorliegt, ist das Selbsterneuerungspotential dieser Zellen nach einer BiTE<sup>®</sup> Therapie nicht beeinträchtigt (Aigner u. a., 2013; Arndt u. a., 2013). Das Potential und die Sicherheit von AMG 330 werden zur Therapie der AML gerade in einer Phase-I-Studie getestet (NCT02520427). Die

Kombination mit einer TIGIT-PVR/PVRL2-Blockade stellt deshalb einen sinnvollen Ansatz dar. Neben der Kombination mit AMG 330 ergibt sich auch die Kombination mit Myelotarg (Gemtuzumab Ozogamicin). Bei Myelotarg handelt es sich um einen humanisierten monoklonalen anti-CD33 Antikörper, der kovalent an ein halbsynthetisches Derivat des DNA-schädigenden Toxins Calicheamicin gekoppelt ist. Auf Grund des Erreichens einer kompletten Remission, oder einer kompletten Remission mit unvollständiger Erholung des Blutbildes bei 30 % der Patienten wurde Myelotarg im Jahr 2000 für die Behandlung der AML zugelassen (Sievers u. a., 2001; Larson u. a., 2005). Trotz guter Ansprechraten konnten jedoch keine langfristigen Effekte beobachtet werden (Petersdorf u. a., 2013). Das Auftreten starker Nebenwirkungen bedingt durch starke Lebertoxizitäten durch spontane Dissoziation des Toxins oder Aufnahme von Calicheamicin von CD33<sup>+</sup> ansässigen Blasten in der Leber führten letztendlich zu einer freiwilligen Zurücknahme des Präparats (McKoy u. a., 2007; Rajvanshi u. a., 2002). Bedingt durch die dennoch guten Studienergebnisse in Dosis-angepassten Studien erlebt das Medikament eine Renaissance in der AML-Therapie (Burnett u. a., 2011, 2012; Castaigne u. a., 2012; Hills u. a., 2014; Ravandi u. a., 2012). Eine Kombination mit einer TIGIT-PVR/PVRL2-Immuntherapie erscheint deshalb vielversprechend. Eine Kombination dieser Therapie mit einer anti-CD123-Therapie wäre ebenfalls denkbar. Die Bindung von IL-3 an den IL-3 $\alpha$ -Rezeptor (CD123) wirkt anti-apoptotisch und proliferationssteigernd auf Tumorzellen, und eine Hochregulation von CD123 konnte in der AML mit einer schlechten Prognose und als einer der Gründe für das Auftreten eines Rezidivs und das Versagen einer Chemotherapie identifiziert werden (Masarova et al., 2017). Ein unkonjugierter anti-CD123-Antikörper mit optimierten ADCC-Eigenschaften konnte in einer Phase-I-Studie zur Behandlung von AML-Patienten in Remission vielversprechende Daten liefern (Smith u. a., 2014a). In Analogie zu Myelotarg konnte ein mit dem Diphtherie-Toxin gekoppelter CD123-Ligand über die Inhibierung der Proteinbiosynthese nach Internalisierung in die Zielzellen ebenfalls Erfolge in klinischen Studien zur Therapie der AML erzielen (Frankel u. a., 2000; Konopleva u. a., 2015; Sweet u. a., 2015). CD123 wird darüber hinaus als Zielstruktur für bispezifische Antikörper gekoppelt an CD3 evaluiert, und eine Phase-I-Studie rekrutiert aktuell Probanden (NCT02715011). Zudem befindet sich ein *Dual Affinity Retargeting Bispecific Antibody* (DART), welcher jeweils zwei Bindungsstellen für CD123 und CD3 pro Molekül präsentiert, in einer Phase-I-Studie zur Therapie der AML (NCT02152956) (Chichili u. a., 2015).

Eine weiter aufstrebende Therapieoption zur Behandlung der AML, welche sich mit einer TIGIT-PVR/PVRL2-Blockierung kombinieren ließe, ist die aktive Vakzinierung. Diese Therapieoption zielt darauf ab, eine T-Zell-spezifische Immunantwort gegen bestimmte Tumorneoantigene zu kreieren (Kissick und Sanda, 2015). Klinisch relevante Vakzinierungsstrategien richten sich dabei in der AML gegen die AML-assoziierten Antigene *Wilm Tumor-1* (WT1), Proteinase-1 und -3 (PR1 und PR3), *hyaluronic acid-mediated motility* (RHAMM) und Mucin1 (MUC1) (Rezvani u. a., 2008; Keilholz u. a., 2009; Ochsenreither u. a., 2011; Van Driessche u. a., 2012). Obwohl in den Studien teilweise sehr gute

Ansprechraten beobachtet wurden, so scheint eine lang anhaltende immunologische Reaktion gegen die Blasten durch den Phänotyp dysfunktionaler T-Zellen gestört (Kuball u. a., 2011; Uttenthal u. a., 2014). Aktive Immunisierungen beeinflussen positiv die geringe Neoantigenlast und dadurch niedrige Immunogenität der AML-Blasten. Eine Kombination von aktiven Vakzinierungen mit einer Immuncheckpoint-Inhibierung gegen die TIGIT-PVR/PVRL2-Achse erscheint deshalb vielversprechend.

Immuntherapeutische Konzepte in der AML könnten eine aussichtsreiche Chance bieten, die therapeutische Lücke zwischen den Patienten zu schließen, die für eine allo-HSCT nicht qualifiziert sind, und hat zudem das Potential, die *graft-versus-leukemia*-Effekte in Patienten nach allo-HSCT maßgeblich zu verbessern, um lang anhaltende Remissionen für AML-Patienten zu schaffen.

## 5 SCHLUSSWORT UND AUSBLICK

Für die Mehrzahl an Krebspatienten hat sich eine Immuntherapie mit nur einem Agens als unwirksam erwiesen (Mahoney u. a., 2015). Anscheinend müssen für eine Heilung von Krebspatienten die Synergien einer Kombination von Immuntherapien genutzt werden (Melero u. a., 2015). Neben einer gesteigerten anti-Tumor-Immunantwort ist dies aber auch unweigerlich von einem verstärkten Auftreten unerwünschter Nebenwirkungen wie IRAEs begleitet. Man darf zuversichtlich bleiben, dass die Behandlung mit Immuntherapeutika in klinischen Studien und der klinischen Praxis zu der Entwicklung von Behandlungsplänen führen wird, welche einen optimalen Therapieerfolg mit minimalen Nebenwirkungen ermöglicht. TIGIT ebenso wie die Rezeptoren CD96 und CD112R sowie die Liganden PVR und PVRL2 stellen aussichtsreiche Zielstrukturen dar, die auf multiple Weise den *Cancer Immunity Cycle* negativ beeinflussen. Die in dieser Dissertation vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass eine Blockierung der Interaktion dieser negativen Immuncheckpoint-Regulatoren eine aussichtsreiche Therapiestrategie für die Behandlung der AML darstellen könnte. Viele Arbeiten konnten einen positiven Effekt von PVR und PVRL2 durch die Aktivierung des Rezeptors DNAM-1 auf die anti-Tumorimmunität zeigen. In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass die Expression von PVR einen unabhängigen negativen prognostischen Faktor in der AML darstellt und eine hohe PVR- und PVRL2-Expression negativ mit dem Überleben der AML-Patienten assoziiert ist. Neben der vielfach gezeigten Herunterregulation von DNAM-1 durch eine Exposition von PVR und PVRL2 zeigen die Zytotoxizitätsassays mit blockierenden Antikörpern gegen TIGIT und PVR/PVRL2 dieser Arbeit eine weitere Erklärung für den Mechanismus dieser negativen Faktoren in der AML auf. Inwiefern eine Immuncheckpoint-Blockierung im Patienten langfristige Erfolge liefern kann, muss in klinischen Studien untersucht werden. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die irreversible Installation einer in dysfunktionalen T-Zellen spezifischen genetischen Landschaft den dauerhaften Erfolg von Immuncheckpoint-Blockierungen eindämmen könnte (Sen u. a., 2016; Pauken u. a., 2016). Ob dies auch für die dysfunktionalen T-Zellen in der AML zutrifft, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit beruhen teilweise auf in der klinischen Forschung gängigen Modellsystemen, welche die Situation im Patienten nicht vollständig abbilden können. Eine experimentelle Annäherung so nah wie möglich an den Patienten ist deshalb zwingend erforderlich, um die hier erforschten Konzepte in die klinische Testung zu translatieren. Dementsprechend sollten Experimente mit AML-Primärmaterial mit autologen T-Zellen im Fokus der künftigen Fragestellungen stehen. Dafür ist es denkbar, die im Knochenmark der Patienten befindlichen Lymphozyten anzureichen, *ex vivo* zu expandieren und in *ex vivo* Zytotoxizitätsassays mit dem Knochenmark oder aufgereinigten Blasten des Patienten zu inkubieren. Dies würde eine Abbildung der dysfunktionalen

Immunzellen in Multicolor-FACS-Analysen ebenso wie die Messung komplexer Zytokin-Panel der Zellen des Patienten ermöglichen. Darüber könnten wiederum detaillierte Ergebnisse über die Art und den Grad der dysfunktionellen Immunzellen gewonnen werden. Zudem könnte bestimmt werden, welche T-Zellkompartimente an der Reaktion beteiligt sind. PVR wie auch PVRL2 werden von einer Reihe an Geweben physiologisch exprimiert. Da durch die Ergebnisse dieser Arbeit die eventuellen Nebenwirkungen einer Blockade von PVR und PVRL2 nicht eingeschätzt werden können, ist für eine Translation in die Klinik zudem erforderlich, die eventuell auftretenden Nebenwirkungen in toxikologischen Mausmodellen zu untersuchen. Ein negativer Effekt der ungewollten Bindungen an gesundes Gewebe konnte bereits bei Arbeiten mit anti-CD47-Antikörpern gezeigt werden (Dheilly u. a., 2016). Die physiologische Expression von PVR und PVRL2 ergibt ebenfalls ein Problem des *antigen sink*, bedingt durch die Bindung der Antikörper an gesundes Gewebe und die dadurch verminderte Bioverfügbarkeit (Wang u. a., 2012). Um die Effektivität mit gleichzeitig geringerem Nebenwirkungsprofil einer PVR/PVRL2-Antikörpertherapie zu steigern, ist die Herstellung von *Triplebodies* denkbar. Basierend auf den Daten dieser Arbeit ist die Generierung eines CD33-CD3-PVR/PVRL2 *Triplebodies* in Analogie zum 33-3-19 *Triplebody* zur Therapie der biphänotypischen CD19<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> Leukämie denkbar (Roskopf u. a., 2016). Eine Herstellung eines solchen Konstruktes könnte zudem mit der *Dock-and-Lock*-Methode relativ einfach realisiert werden (Chang u. a., 2007; Goldenberg u. a., 2007).

Eine Erhöhung von löslichem PVRL2 im Kolonkarzinom sowie von löslichem PVR in einer Vielzahl von Tumorentitäten konnte bereits gezeigt werden. In diesem Zusammenhang ist durchaus interessant, ob auch in der AML eine erhöhte Serum-Konzentration der beiden löslichen Rezeptoren auftritt und ob dies eventuell als Biomarker nutzbar wäre. Das therapeutische Potential einer TIGIT- und PVR- sowie PVRL2-Blockierung sowie die Verstärkung der antileukämischen Wirkung eines bispezifischen Antikörpers konnten in dieser Arbeit hinreichend aufgezeigt werden. Zudem wurde dargelegt, dass die TIGIT-PVR/PVRL2-Achse zur Regulation der Immunantwort einer Reihe von Tumorentitäten anscheinend eine gravierende Rolle spielt. Dementsprechend ist es die logische Konsequenz, die Methodik dieser Arbeit auf eine Reihe weiterer Krebsentitäten zu übertragen.

## 6 DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei meinen beiden Mentoren Prof. Dr. Walter Fiedler und PD Dr. Jasmin Wellbrock ganz herzlich für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und das innovative und spannende Projekt bedanken. Als meine beruflichen Eltern habt ihr mir alles beigebracht und mich dahin gebracht, wo ich jetzt bin. Danke für die viele Unterstützung. Danke dafür, dass ihr wirklich zu jeder Zeit ein offenes Ohr habt. Danke, dass ihr mich hervorragend geleitet habt und mir dennoch jegliche Freiheiten gelassen habt, meine eigenen Ideen umzusetzen.

Mein herzlicher Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr. Jörg Ganzhorn für die Bereitschaft die Begutachtung dieser Arbeit zu übernehmen und Herrn PD Dr. Hartwig Lüthen für seine Unterstützung und die Bereitschaft als Co-Betreuer zu fungieren.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern. Ihr habt mir immer vertraut. Ihr habt hinter mir gestanden, egal was war und mich immer unterstützt. Durch eure mentale und finanzielle Unterstützung habt ihr es mir ermöglicht, immer genau das zu tun, wonach mir ist. Ein Luxus, der definitiv nicht selbst verständlich ist. Ohne euch wäre ich nicht der, der ich heute bin und nicht dort, wo ich bin! Ihr seid die Besten. Danke!

Das beste Projekt und die besten Betreuer sind natürlich nichts ohne tolle Kollegen und ein gutes Arbeitsklima. Christine, ohne dich wäre ich nicht hier und wenn doch, wäre ich ohne den mit dir möglichen Frusttalk wahrscheinlich geplatzt. Kerstin, Frau PCR, ich würde immer noch den Fehler in der Klonierung suchen. Danke dir für alles Fachliche und genauso für alle Gespräche hinter den Kulissen. Emily, auch dir ein großes Dankeschön. Du hast mich oft geerdet. Marianne, Jana, Gabi, Miguel, Steffi, Mark, Raimund, Simon, Anna, Nati, Sina, Vic, Flo, Sandra, Jakob, Tobi, Ina, Sergey, Isa, Malte, Cecile, Tim, Polli, Tanja, Inke, Susanne, Sarina, Janna, Robert, Leticia, Aneta...ihr seid spitze! Dank euch komme ich jeden Tag gerne hier her, lasse mich immer wieder gerne von der Arbeit ablenken oder fühle mich auch einfach verleitet, euch abzulenken. Danke euch für die tolle Zeit. Danke für all die Hilfe bei den kleinen und großen Problemen auf der Arbeit und im Leben. Und ein großes Sorry an diejenigen, die mir hier entfallen sind.

Ein ganz großes Dankeschön geht an Delia Evers, die beim Korrekturlesen auch noch den letzten kleinen Fehler in dieser Arbeit gefunden hat. In diesem Zusammenhang geht mein Dank auch an Nati und Julia.

Saskia und Eva, ihr wart die ersten, die ich betreut habe und ich habe dabei auch eine Menge über mich selbst lernen können. Danke euch für eure offene und aufgeweckte Art und die tolle Zeit!

Zudem möchte ich mich bei Felix Klinger bedanken, der dieses Projekt gestartet hat und durch seine gute und gründliche Vorarbeit zum Gelingen des Projektes beigetragen hat.

Ein ganz großes Dankeschön möchte ich auch an Frau Anja Borger und ihr Team vom Institut für Transfusionsmedizin richten. Die unkomplizierte und immer freundliche Art und die Bereitschaft auch kurzfristig Buffy Coats aufzutreiben und für mich aufzuarbeiten haben meine Arbeiten sehr erleichtert.

Dem Team der Forschungstierhaltung möchte ich für die großartige und liebevolle Unterstützung bei der Betreuung und Pflege der Mäuse danken.

Ich möchte mich außerdem bei Prof. Dr. Eva Tolosa bedanken. Auch deine Tür stand mir immer offen und du hast mir in vielen Diskussionen mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Bedanken möchte ich mich

an dieser Stelle ebenfalls bei allen Kolleginnen und Kollegen vom Institut für Immunologie, die jederzeit mit Ratschlägen oder Reagenzien ausgeholfen haben.

Ich danke zudem der Lieselotte-Beutel Stiftung, AMGEN Inc. und der Werner-Otto-Stiftung für die Förderungen dieses Projektes.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei all meinen Freunden bedanken. Ihr seid meine Stützpfeiler! Danke, dass ihr für mich da seid. Danke, dass ihr an mich glaubt. Danke, dass ihr mich immer wieder aufbaut und auch danke, dass ihr mich manchmal zurück auf den Boden holt.

## 7 REFERENZEN

- Aigner, M., J. Feulner, S. Schaffer, R. Kischel, P. Kufer, K. Schneider, a Henn, B. Rattel, M. Friedrich, P. a Baeuerle, a Mackensen, und S.W. Krause. 2013. T lymphocytes can be effectively recruited for ex vivo and in vivo lysis of AML blasts by a novel CD33/CD3-bispecific BiTE antibody construct. *Leukemia*. 27:1107–15. doi:10.1038/leu.2012.341.
- Al-Kali, A., J. Cortes, S. Faderl, D. Jones, C. Abril, S. Pierce, M. Brandt, H. Kantarjian, und F. Ravandi. 2011. Patterns of molecular response to and relapse after combination of sorafenib, idarubicin, and cytarabine in patients with FLT3 mutant acute myeloid leukemia. *Clin. Lymphoma. Myeloma Leuk*. 11:361–6. doi:10.1016/j.clml.2011.06.007.
- Andersen, M.H., D. Schrama, P. Thor Straten, und J.C. Becker. 2006. Cytotoxic T cells. *J. Invest. Dermatol*. 126:32–41. doi:10.1038/sj.jid.5700001.
- Anguille, S., E. Lion, Y. Willemen, V.F.I. Van Tendeloo, Z.N. Berneman, und E.L.J.M. Smits. 2011. Interferon- $\alpha$  in acute myeloid leukemia: an old drug revisited. *Leukemia*. 25:739–748. doi:10.1038/leu.2010.324.
- Apetoh, L., M.J. Smyth, C.G. Drake, J.-P. Abastado, R.N. Apte, M. Ayyoub, J.-Y. Blay, M. Bonneville, L.H. Butterfield, A. Caignard, C. Castelli, F. Cavallo, E. Celis, L. Chen, M.P. Colombo, B. Comin-Anduix, G. Coukos, M. V. Dhodapkar, G. Dranoff, I.H. Frazer, W.-H. Fridman, D.I. Gabrilovich, E. Gilboa, S. Gnjatic, D. Jäger, P. Kalinski, H.L. Kaufman, R. Kiessling, J. Kirkwood, A. Knuth, R. Liblau, M.T. Lotze, E. Lugli, F. Marincola, I. Melero, C.J. Melief, T.R. Mempel, E. a. Mittendorf, K. Odun, W.W. Overwijk, A.K. Palucka, G. Parmiani, A. Ribas, P. Romero, R.D. Schreiber, G. Schuler, P.K. Srivastava, E. Tartour, D. Valmori, S.H. van der Burg, P. van der Bruggen, B.J. van den Eynde, E. Wang, W. Zou, T.L. Whiteside, D.E. Speiser, D.M. Pardoll, N.P. Restifo, und A.C. Anderson. 2015. Consensus nomenclature for CD8(+) T cell phenotypes in cancer. *Oncoimmunology*. 4:e998538. doi:10.1080/2162402X.2014.998538.
- Arber, D.A., A. Orazi, R. Hasserjian, J. Thiele, M.J. Borowitz, M.M. Le Beau, C.D. Bloomfield, M. Cazzola, und J.W. Vardiman. 2016. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 127:2391–2405. doi:10.1182/blood-2016-03-643544.
- Ardolino, M., A. Zingoni, C. Cerboni, F. Cecere, A. Soriani, M.L. Iannitto, und A. Santoni. 2011. DNAM-1 ligand expression on Ag-stimulated T lymphocytes is mediated by ROS-dependent activation of DNA-damage response: relevance for NK-T cell interaction. *Blood*. 117:4778–86. doi:10.1182/blood-2010-08-300954.
- Armand, P., H.T. Kim, B.R. Logan, Z. Wang, E.P. Alyea, M.E. Kalaycio, R.T. Maziarz, J.H. Antin, R.J. Soiffer, D.J. Weisdorf, J.D. Rizzo, M.M. Horowitz, und W. Saber. 2014. Validation and refinement of the Disease Risk Index for allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 123:3664–71. doi:10.1182/blood-2014-01-552984.
- Arndt, C., M. von Bonin, M. Cartellieri, a Feldmann, S. Koristka, I. Michalk, S. Stamova, M. Bornhäuser, M. Schmitz, G. Ehninger, und M. Bachmann. 2013. Redirection of T cells with a first fully humanized bispecific CD33-CD3 antibody efficiently eliminates AML blasts without harming hematopoietic stem cells. *Leukemia*. 27:964–7. doi:10.1038/leu.2013.18.
- Arndt, C., a Feldmann, M. von Bonin, M. Cartellieri, E.-M. Ewen, S. Koristka, I. Michalk, S. Stamova, N. Berndt, a Gocht, M. Bornhäuser, G. Ehninger, M. Schmitz, und M. Bachmann. 2014. Costimulation improves the killing capability of T cells redirected to tumor cells expressing low levels of CD33: description of a novel modular targeting system. *Leukemia*. 28:59–69.

doi:10.1038/leu.2013.243.

- Austin, R., M.J. Smyth, und S.W. Lane. 2016. Harnessing the immune system in acute myeloid leukaemia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 103:62–77. doi:10.1016/j.critrevonc.2016.04.020.
- Babcock, S.K., R.G. Gill, D. Bellgrau, und K.J. Lafferty. 1987. Studies on the two-signal model for T cell activation in vivo. *Transplant. Proc.* 19:303–6.
- Bagley, C.J., J.M. Woodcock, F.C. Stomski, und A.F. Lopez. 1997. The structural and functional basis of cytokine receptor activation: lessons from the common beta subunit of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3 (IL-3), and IL-5 receptors. *Blood.* 89:1471–82.
- Balaji, K.N., N. Schaschke, W. Machleidt, M. Catalfamo, und P.A. Henkart. 2002. Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation. *J. Exp. Med.* 196:493–503.
- Barclay, A.N., und M.H. Brown. 2006. The SIRP family of receptors and immune regulation. *Nat. Rev. Immunol.* 6:457–464. doi:10.1038/nri1859.
- Basu, R., B.M. Whitlock, J. Husson, A. Le Floch, W. Jin, A. Olyer-Yaniv, F. Dotiwala, G. Giannone, C. Hivroz, N. Biais, J. Lieberman, L.C. Kam, und M. Huse. 2016. Cytotoxic T Cells Use Mechanical Force to Potentiate Target Cell Killing. *Cell.* 165:100–110. doi:10.1016/j.cell.2016.01.021.
- Basu, S., R.J. Binder, T. Ramalingam, und P.K. Srivastava. 2001. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity.* 14:303–13.
- Behl, D., L.F. Porrata, S.N. Markovic, L. Letendre, R.K. Pruthi, C.C. Hook, A. Tefferi, M. a Elliot, S.H. Kaufmann, R. a Mesa, und M.R. Litzow. 2006. Absolute lymphocyte count recovery after induction chemotherapy predicts superior survival in acute myelogenous leukemia. *Leukemia.* 20:29–34. doi:10.1038/sj.leu.2404032.
- Berger, R., R. Rotem-Yehudar, G. Slama, S. Landes, A. Kneller, M. Leiba, M. Koren-Michowitz, A. Shimoni, und A. Nagler. 2008. Phase I Safety and Pharmacokinetic Study of CT-011, a Humanized Antibody Interacting with PD-1, in Patients with Advanced Hematologic Malignancies. *Clin. Cancer Res.* 14:3044–3051. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-4079.
- Berlin, C., D.J. Kowalewski, H. Schuster, N. Mirza, S. Walz, M. Handel, B. Schmid-Horch, H.R. Salih, L. Kanz, H.-G. Rammensee, S. Stevanović, und J.S. Stickel. 2015. Mapping the HLA ligandome landscape of acute myeloid leukemia: a targeted approach toward peptide-based immunotherapy. *Leukemia.* 29:647–659. doi:10.1038/leu.2014.233.
- Berneman, Z.N., S. Anguille, V. Van Marck, W.A. Schroyens, und V.F. Van Tendeloo. 2010. Induction of complete remission of acute myeloid leukaemia by pegylated interferon- $\alpha$ -2a in a patient with transformed primary myelofibrosis. *Br. J. Haematol.* 149:152–155. doi:10.1111/j.1365-2141.2009.08029.x.
- Bevan, M.J. 1976. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J. Exp. Med.* 143:1283–1288. doi:10.1084/jem.143.5.1283.
- Bladergroen, B.A., C.J.L.M. Meijer, R.L. ten Berge, C.E. Hack, J.J.F. Muris, D.F. Dukers, A. Chott, Y. Kazama, J.J. Oudejans, O. van Berkum, und J.A. Kummer. 2002. Expression of the granzyme B inhibitor, protease inhibitor 9, by tumor cells in patients with non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma: a novel protective mechanism for tumor cells to circumvent the immune system? *Blood.* 99:232–7.
- Bladergroen, B.A., M.C. Strik, N. Bovenschen, O. van Berkum, G.L. Scheffer, C.J. Meijer, C.E. Hack, und

- J.A. Kummer. 2001. The granzyme B inhibitor, protease inhibitor 9, is mainly expressed by dendritic cells and at immune-privileged sites. *J. Immunol.* 166:3218–25.
- Blake, S.J., W.C. Dougall, J.J. Miles, M.W.L. Teng, und M.J. Smyth. 2016a. Molecular Pathways: Targeting CD96 and TIGIT for Cancer Immunotherapy. *Clin. Cancer Res.* 22:5183–5188. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-0933.
- Blake, S.J., K. Stannard, J. Liu, S. Allen, M.C.R. Yong, D. Mittal, A.R. Aguilera, J.J. Miles, V.P. Lutzky, L.F. de Andrade, L. Martinet, M. Colonna, K. Takeda, F. Kühnel, E. Gurlevik, G. Bernhardt, M.W.L. Teng, und M.J. Smyth. 2016b. Suppression of Metastases Using a New Lymphocyte Checkpoint Target for Cancer Immunotherapy. *Cancer Discov.* 6:446–59. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0944.
- Bleakley, M., und S.R. Riddell. 2004. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat. Rev. Cancer.* 4:371–380. doi:10.1038/nrc1365.
- Boardman, D.A., J. Jacob, L.A. Smyth, G. Lombardi, und R.I. Lechler. 2016. What Is Direct Allorecognition? *Curr. Transplant. Reports.* 3:275–283. doi:10.1007/s40472-016-0115-8.
- Boles, K.S., W. Vermi, F. Facchetti, A. Fuchs, T.J. Wilson, T.G. Diacovo, M. Cella, und M. Colonna. 2009. A novel molecular interaction for the adhesion of follicular CD4 T cells to follicular DC. *Eur. J. Immunol.* 39:695–703. doi:10.1002/eji.200839116.
- Bonilla, F.A., und H.C. Oettgen. 2010. Adaptive immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125:S33–S40. doi:10.1016/j.jaci.2009.09.017.
- Boon, T., J.C. Cerottini, B. Van den Eynde, P. van der Bruggen, und A. Van Pel. 1994. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 12:337–65. doi:10.1146/annurev.iy.12.040194.002005.
- Borthakur, G., H. Kantarjian, F. Ravandi, W. Zhang, M. Konopleva, J.J. Wright, S. Faderl, S. Verstovsek, S. Mathews, M. Andreeff, und J.E. Cortes. 2011. Phase I study of sorafenib in patients with refractory or relapsed acute leukemias. *Haematologica.* 96:62–8. doi:10.3324/haematol.2010.030452.
- Bottino, C., R. Castriconi, D. Pende, P. Rivera, M. Nanni, B. Carnemolla, C. Cantoni, J. Grassi, S. Marcenaro, N. Reymond, M. Vitale, L. Moretta, M. Lopez, und A. Moretta. 2003. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as Cell Surface Ligands for the Human DNAM-1 (CD226) Activating Molecule. *J. Exp. Med.* 198:557–567. doi:10.1084/jem.20030788.
- Bouso, P., und E. Robey. 2003. Dynamics of CD8+ T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes. *Nat. Immunol.* 4:579–85. doi:10.1038/ni928.
- Brahmer, J.R., S.S. Tykodi, L.Q.M. Chow, W.-J. Hwu, S.L. Topalian, P. Hwu, C.G. Drake, L.H. Camacho, J. Kauh, K. Odunsi, H.C. Pitot, O. Hamid, S. Bhatia, R. Martins, K. Eaton, S. Chen, T.M. Salay, S. Alaparthi, J.F. Grosso, A.J. Korman, S.M. Parker, S. Agrawal, S.M. Goldberg, D.M. Pardoll, A. Gupta, und J.M. Wigginton. 2012. Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. *N. Engl. J. Med.* 366:2455–2465. doi:10.1056/NEJMoa1200694.
- Burnet, F.M. 1967. Immunological Aspects Of Malignant Disease. *Lancet.* 289:1171–1174. doi:10.1016/S0140-6736(67)92837-1.
- Burnett, A.K., R.K. Hills, D. Milligan, L. Kjeldsen, J. Kell, N.H. Russell, J.A.L. Yin, A. Hunter, A.H. Goldstone, und K. Wheatley. 2011. Identification of Patients With Acute Myeloblastic Leukemia Who Benefit From the Addition of Gemtuzumab Ozogamicin: Results of the MRC AML15 Trial. *J. Clin. Oncol.* 29:369–377. doi:10.1200/JCO.2010.31.4310.
- Burnett, A.K., N.H. Russell, R.K. Hills, J. Kell, S. Freeman, L. Kjeldsen, A.E. Hunter, J. Yin, C.F. Craddock, I.H. Dufva, K. Wheatley, und D. Milligan. 2012. Addition of Gemtuzumab Ozogamicin to Induction

- Chemotherapy Improves Survival in Older Patients With Acute Myeloid Leukemia. *J. Clin. Oncol.* 30:3924–3931. doi:10.1200/JCO.2012.42.2964.
- Burns, G.F., T. Triglia, J.A. Werkmeister, C.G. Begley, und A.W. Boyd. 1985. TLISA1, a human T lineage-specific activation antigen involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes and anomalous killer cells from their precursors. *J. Exp. Med.* 161:1063–78.
- Buyse, M., P. Squifflet, B.J. Lange, T.A. Alonzo, R.A. Larson, J.E. Kolitz, S.L. George, C.D. Bloomfield, S. Castaigne, S. Chevret, D. Blaise, D. Maraninchi, K.J. Lucchesi, und T. Burzykowski. 2011. Individual patient data meta-analysis of randomized trials evaluating IL-2 monotherapy as remission maintenance therapy in acute myeloid leukemia. *Blood.* 117:7007–13. doi:10.1182/blood-2011-02-337725.
- Carlsten, M., N.K. Björkström, H. Norell, Y. Bryceson, T. van Hall, B.C. Baumann, M. Hanson, K. Schedvins, R. Kiessling, H.-G. Ljunggren, und K.-J. Malmberg. 2007. DNAX accessory molecule-1 mediated recognition of freshly isolated ovarian carcinoma by resting natural killer cells. *Cancer Res.* 67:1317–25. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2264.
- Carlsten, M., H. Norell, Y.T. Bryceson, I. Poschke, K. Schedvins, H.-G. Ljunggren, R. Kiessling, und K.-J. Malmberg. 2009. Primary Human Tumor Cells Expressing CD155 Impair Tumor Targeting by Down-Regulating DNAM-1 on NK Cells. *J. Immunol.* 183:4921–4930. doi:10.4049/jimmunol.0901226.
- Castaigne, S., C. Pautas, C. Terré, E. Raffoux, D. Bordessoule, J.-N. Bastie, O. Legrand, X. Thomas, P. Turlure, O. Reman, T. de Revel, L. Gastaud, N. de Gunzburg, N. Contentin, E. Henry, J.-P. Marolleau, A. Aljijakli, P. Rousselot, P. Fenau, C. Preudhomme, S. Chevret, und H. Dombret. 2012. Effect of gemtuzumab ozogamicin on survival of adult patients with de-novo acute myeloid leukaemia (ALFA-0701): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet.* 379:1508–1516. doi:10.1016/S0140-6736(12)60485-1.
- Castriconi, R., A. Dondero, M.V. Corrias, E. Lanino, D. Pende, L. Moretta, C. Bottino, und A. Moretta. 2004. Natural Killer Cell-Mediated Killing of Freshly Isolated Neuroblastoma Cells : Critical Role of DNAX Accessory Molecule-1 – Poliovirus Receptor Interaction. 9180–9184.
- Cella, M., R. Presti, W. Vermi, K. Lavender, E. Turnbull, C. Ochsenbauer-Jambor, J.C. Kappes, G. Ferrari, L. Kessels, I. Williams, CHAVI Clinical Core B, A.J. McMichael, B.F. Haynes, P. Borrow, M. Colonna, und NIAID Center for HIV/AIDS Vaccine Immunology. 2010. Loss of DNAM-1 contributes to CD8+ T-cell exhaustion in chronic HIV-1 infection. *Eur. J. Immunol.* 40:949–54. doi:10.1002/eji.200940234.
- Chan, C.J., D.M. Andrews, N.M. McLaughlin, H. Yagita, S. Gilfillan, M. Colonna, und M.J. Smyth. 2010. DNAM-1/CD155 interactions promote cytokine and NK cell-mediated suppression of poorly immunogenic melanoma metastases. *J. Immunol.* 184:902–11. doi:10.4049/jimmunol.0903225.
- Chan, C.J., L. Martinet, S. Gilfillan, F. Souza-Fonseca-Guimaraes, M.T. Chow, L. Town, D.S. Ritchie, M. Colonna, D.M. Andrews, und M.J. Smyth. 2014. The receptors CD96 and CD226 oppose each other in the regulation of natural killer cell functions. *Nat. Immunol.* 15:431–438. doi:10.1038/ni.2850.
- Chang, C.H., E.A. Rossi, und D.M. Goldenberg. 2007. The dock and lock method: A novel platform technology for building multivalent, multifunctional structures of defined composition with retained bioactivity. *Clin. Cancer Res.* 13:5586–5592. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1217.
- Chapuis, A.G., G.B. Ragnarsson, H.N. Nguyen, C.N. Chaney, J.S. Pufnock, T.M. Schmitt, N. Duerkopp, I.M. Roberts, G.L. Pogosov, W.Y. Ho, S. Ochsenreither, M. Wölfl, M. Bar, J.P. Radich, C. Yee, und P.D. Greenberg. 2013. Transferred WT1-reactive CD8+ T cells can mediate antileukemic activity and persist in post-transplant patients. *Sci. Transl. Med.* 5:174ra27. doi:10.1126/scitranslmed.3004916.

- Chauvin, J., O. Pagliano, J. Fourcade, Z. Sun, H. Wang, C. Sander, J.M. Kirkwood, T.T. Chen, M. Maurer, A.J. Korman, und H.M. Zarour. 2015. TIGIT and PD-1 impair tumor antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells in melanoma patients. *J. Clin. Invest.* 125:2046–58. doi:10.1172/JCI80445.
- Chen, D.S., und I. Mellman. 2013. Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. *Immunity.* 39:1–10. doi:10.1016/j.immuni.2013.07.012.
- Chichili, G.R., L. Huang, H. Li, S. Burke, L. He, Q. Tang, L. Jin, S. Gorlatov, V. Ciccarone, F. Chen, S. Koenig, M. Shannon, R. Alderson, P.A. Moore, S. Johnson, und E. Bonvini. 2015. A CD3xCD123 bispecific DART for redirecting host T cells to myelogenous leukemia: preclinical activity and safety in nonhuman primates. *Sci. Transl. Med.* 7:289ra82. doi:10.1126/scitranslmed.aaa5693.
- Chowdhury, D., und J. Lieberman. 2008. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annu. Rev. Immunol.* 26:389–420. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090404.
- Cobbold, M., H. De La Peña, A. Norris, J.M. Polefrone, J. Qian, A.M. English, K.L. Cummings, S. Penny, J.E. Turner, J. Cottine, J.G. Abelin, S.A. Malaker, A.L. Zarling, H.-W. Huang, O. Goodyear, S.D. Freeman, J. Shabanowitz, G. Pratt, C. Craddock, M.E. Williams, D.F. Hunt, und V.H. Engelhard. 2013. MHC class I-associated phosphopeptides are the targets of memory-like immunity in leukemia. *Sci. Transl. Med.* 5:203ra125. doi:10.1126/scitranslmed.3006061.
- Cocchi, F., L. Menotti, P. Dubreuil, M. Lopez, und G. Campadelli-Fiume. 2000. Cell-to-cell spread of wild-type herpes simplex virus type 1, but not of syncytial strains, is mediated by the immunoglobulin-like receptors that mediate virion entry, nectin1 (PRR1/HveC/HlgR) and nectin2 (PRR2/HveB). *J. Virol.* 74:3909–17.
- Cong, L., F.A. Ran, D. Cox, S. Lin, R. Barretto, N. Habib, P.D. Hsu, X. Wu, W. Jiang, L.A. Marraffini, und F. Zhang. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.* 339:819–23. doi:10.1126/science.1231143.
- Costello, R.T., S. Sivori, E. Marcenaro, M. Lafage-Pochitaloff, M.-J. Mozziconacci, D. Reviron, J.-A. Gastaut, D. Pende, D. Olive, und A. Moretta. 2002. Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 99:3661–7. doi:10.1182/blood.V99.10.3661.
- Couzin-Frankel, J. 2013. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science.* 342:1432–3. doi:10.1126/science.342.6165.1432.
- Crump, M., D. Hedley, S. Kamel-Reid, B. Leber, R. Wells, J. Brandwein, R. Buckstein, J. Kassis, M. Minden, J. Matthews, S. Robinson, R. Turner, L. McIntosh, E. Eisenhauer, und L. Seymour. 2010. A randomized phase I clinical and biologic study of two schedules of sorafenib in patients with myelodysplastic syndrome or acute myeloid leukemia: a NCIC (National Cancer Institute of Canada) Clinical Trials Group Study. *Leuk. Lymphoma.* 51:252–60. doi:10.3109/10428190903585286.
- Davila, M.L., I. Riviere, X. Wang, S. Bartido, J. Park, K. Curran, S.S. Chung, J. Stefanski, O. Borquez-Ojeda, M. Olszewska, J. Qu, T. Wasielewska, Q. He, M. Fink, H. Shinglot, M. Youssif, M. Satter, Y. Wang, J. Hosey, H. Quintanilla, E. Halton, Y. Bernal, D.C.G. Bouhassira, M.E. Arcila, M. Gonen, G.J. Roboz, P. Maslak, D. Douer, M.G. Frattini, S. Giralto, M. Sadelain, und R. Brentjens. 2014. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci. Transl. Med.* 6:224ra25. doi:10.1126/scitranslmed.3008226.
- Dheilly, E., V. Moine, L. Broyer, S. Salgado-Pires, Z. Johnson, A. Papaioannou, L. Cons, S. Calloud, S. Majocchi, R. Nelson, F. Rousseau, W. Ferlin, M. Kosco-Vilbois, N. Fischer, und K. Masternak. 2016. Selective Blockade of the Ubiquitous Checkpoint Receptor CD47 Is Enabled by Dual-Targeting Bispecific Antibodies. *Mol. Ther.* 25:523–533. doi:10.1016/j.ymthe.2016.11.006.

- Döhner, H., E. Estey, D. Grimwade, S. Amadori, F.R. Appelbaum, T. Büchner, H. Dombret, B.L. Ebert, P. Fenaux, R.A. Larson, R.L. Levine, F. Lo-Coco, T. Naoe, D. Niederwieser, G.J. Ossenkoppele, M. Sanz, J. Sierra, M.S. Tallman, H. Tien, A.H. Wei, B. Löwenberg, und C.D. Bloomfield. 2017. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 129:424–447. doi:10.1182/blood-2016-08-733196.
- Döhner, H., E.H. Estey, S. Amadori, F.R. Appelbaum, T. Buchner, A.K. Burnett, H. Dombret, P. Fenaux, D. Grimwade, R.A. Larson, F. Lo-Coco, T. Naoe, D. Niederwieser, G.J. Ossenkoppele, M.A. Sanz, J. Sierra, M.S. Tallman, B. Lowenberg, und C.D. Bloomfield. 2010. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 115:453–474. doi:10.1182/blood-2009-07-235358.
- Döhner, H., D.J. Weisdorf, und C.D. Bloomfield. 2015. Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 373:1136–52. doi:10.1056/NEJMra1406184.
- Dombret, H., J.F. Seymour, A. Butrym, A. Wierzbowska, D. Selleslag, J.H. Jang, R. Kumar, J. Cavenagh, A.C. Schuh, A. Candoni, C. Récher, I. Sandhu, T. Bernal del Castillo, H.K. Al-Ali, G. Martinelli, J. Falantes, R. Noppeney, R.M. Stone, M.D. Minden, H. McIntyre, S. Songer, L.M. Lucy, C.L. Beach, und H. Döhner. 2015. International phase 3 study of azacitidine vs conventional care regimens in older patients with newly diagnosed AML with >30% blasts. *Blood*. 126:291–9. doi:10.1182/blood-2015-01-621664.
- Dougall, W.C., S. Kurtulus, M.J. Smyth, und A.C. Anderson. 2017. TIGIT and CD96: new checkpoint receptor targets for cancer immunotherapy. *Immunol. Rev.* 276:112–120. doi:10.1111/imr.12518.
- Van Driessche, A., Z.N. Berneman, und V.F.I. Van Tendeloo. 2012. Active Specific Immunotherapy Targeting the Wilms' Tumor Protein 1 (WT1) for Patients with Hematological Malignancies and Solid Tumors: Lessons from Early Clinical Trials. *Oncologist*. 17:250–259. doi:10.1634/theoncologist.2011-0240.
- Dunn, G.P., A.T. Bruce, H. Ikeda, L.J. Old, und R.D. Schreiber. 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* 3:991–998. doi:10.1038/ni1102-991.
- Duraiswamy, J., C.C. Ibegbu, D. Masopust, J.D. Miller, K. Araki, G.H. Doho, P. Tata, S. Gupta, M.J. Zilliox, H.I. Nakaya, B. Pulendran, W.N. Haining, G.J. Freeman, und R. Ahmed. 2011. Phenotype, function, and gene expression profiles of programmed death-1(hi) CD8 T cells in healthy human adults. *J. Immunol.* 186:4200–12. doi:10.4049/jimmunol.1001783.
- Dustin, M.L. 2014. The immunological synapse. *Cancer Immunol. Res.* 2:1023–33. doi:10.1158/2326-6066.CIR-14-0161.
- Eberlé, F., P. Dubreuil, M.G. Mattei, E. Devilard, und M. Lopez. 1995. The human PRR2 gene, related to the human poliovirus receptor gene (PVR), is the true homolog of the murine MPH gene. *Gene*. 159:267–72.
- Ehrlich, P. 1899. Croonian Lecture: On Immunity with Special Reference to Cell Life. *Proc. R. Soc. London*. 66:424–448.
- Emens, L.A., und G. Middleton. 2015. The Interplay of Immunotherapy and Chemotherapy: Harnessing Potential Synergies. *Cancer Immunol. Res.* 3:436–443. doi:10.1158/2326-6066.CIR-15-0064.
- Fabre, S., N. Reymond, F. Cocchi, L. Menotti, P. Dubreuil, G. Campadelli-Fiume, und M. Lopez. 2002. Prominent role of the Ig-like V domain in trans-interactions of nectins. Nectin3 and nectin 4 bind to the predicted C-C'-C''-D beta-strands of the nectin1 V domain. *J. Biol. Chem.* 277:27006–13. doi:10.1074/jbc.M203228200.
- Fagerberg, L., B.M. Hallström, P. Oksvold, C. Kampf, D. Djureinovic, J. Odeberg, M. Habuka, S.

- Tahmasebpour, A. Danielsson, K. Edlund, A. Asplund, E. Sjöstedt, E. Lundberg, C.A.-K. Szigartyo, M. Skogs, J.O. Takanen, H. Berling, H. Tegel, J. Mulder, P. Nilsson, J.M. Schwenk, C. Lindskog, F. Danielsson, A. Mardinoglu, A. Sivertsson, K. von Feilitzen, M. Forsberg, M. Zwahlen, I. Olsson, S. Navani, M. Huss, J. Nielsen, F. Ponten, und M. Uhlén. 2014. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol. Cell. Proteomics*. 13:397–406. doi:10.1074/mcp.M113.035600.
- Fang, H., B. Ang, X. Xu, X. Huang, Y. Wu, Y. Sun, W. Wang, N. Li, X. Cao, und T. Wan. 2014. TLR4 is essential for dendritic cell activation and anti-tumor T-cell response enhancement by DAMPs released from chemically stressed cancer cells. *Cell. Mol. Immunol.* 11:150–9. doi:10.1038/cmi.2013.59.
- Faroudi, M., C. Utzny, M. Salio, V. Cerundolo, M. Guiraud, S. Müller, und S. Valitutti. 2003. Lytic versus stimulatory synapse in cytotoxic T lymphocyte/target cell interaction: manifestation of a dual activation threshold. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:14145–14150. doi:10.1073/pnas.2334336100.
- Felix, N.J., und P.M. Allen. 2007. Specificity of T-cell alloreactivity. *Nat. Rev. Immunol.* 7:942–953. doi:10.1038/nri2200.
- Feucht, J., S. Kayser, D. Gorodezki, M. Hamieh, M. Döring, F. Blaesche, P. Schlegel, H. Bösmüller, L. Quintanilla-Fend, M. Ebinger, P. Lang, R. Handgretinger, und T. Feuchtinger. 2016. T-cell responses against CD19<sup>+</sup> pediatric acute lymphoblastic leukemia mediated by bispecific T-cell engager (BiTE) are regulated contrarily by PD-L1 and CD80/CD86 on leukemic blasts. *Oncotarget*. 8–11. doi:10.18632/oncotarget.12357.
- Fiedler, W., R.P. Henke, S. Ergün, U. Schumacher, U.M. Gehling, G. Vohwinkel, N. Kilic, und D.K. Hossfeld. 2000. Derivation of a new hematopoietic cell line with endothelial features from a patient with transformed myeloproliferative syndrome: a case report. *Cancer*. 88:344–51.
- Fiedler, W., S. Kayser, M. Kebenko, M. Janning, J. Krauter, M. Schittenhelm, K. Götz, D. Weber, G. Göhring, V. Teleanu, F. Thol, M. Heuser, K. Döhner, A. Ganser, H. Döhner, und R.F. Schlenk. 2015. A phase I/II study of sunitinib and intensive chemotherapy in patients over 60 years of age with acute myeloid leukaemia and activating FLT3 mutations. *Br. J. Haematol.* 169:694–700. doi:10.1111/bjh.13353.
- Fiedler, W., H. Serve, H. Döhner, M. Schwittay, O.G. Ottmann, A.-M. O'Farrell, C.L. Bello, R. Allred, W.C. Manning, J.M. Cherrington, S.G. Louie, W. Hong, N.M. Brega, G. Massimini, P. Scigalla, W.E. Berdel, und D.K. Hossfeld. 2005. A phase 1 study of SU11248 in the treatment of patients with refractory or resistant acute myeloid leukemia (AML) or not amenable to conventional therapy for the disease. *Blood*. 105:986–93. doi:10.1182/blood-2004-05-1846.
- Fionda, C., M. Abruzzese, A. Zingoni, A. Soriani, B. Ricci, R. Molfetta, R. Paolini, A. Santoni, und M. Cippitelli. 2015. Nitric oxide donors increase PVR/CD155 DNAM-1 ligand expression in multiple myeloma cells: role of DNA damage response activation. *BMC Cancer*. 15:17. doi:10.1186/s12885-015-1023-5.
- Fonsatti, E., L. Sigalotti, S. Coral, F. Colizzi, M. Altomonte, und M. Maio. 2003. Methylation-regulated expression of HLA class I antigens in melanoma. *Int. J. cancer*. 105:430-1-3. doi:10.1002/ijc.11077.
- Frankel, A.E., J. Ramage, M. Kiser, R. Alexander, G. Kucera, und M.S. Miller. 2000. Characterization of diphtheria fusion proteins targeted to the human interleukin-3 receptor. *Protein Eng.* 13:575–81.
- Freistadt, M.S., H.B. Fleit, und E. Wimmer. 1993. Poliovirus Receptor on Human Blood Cells: A Possible Extraneural Site of Poliovirus Replication. *Virology*. 195:798–803. doi:10.1006/viro.1993.1433.
- Freitas, E.M., T.C.A. Phan, C.E. Herbison, F.T. Christiansen, R.R. Taylor, und F.M. Van Bockxmeer. 2002.

- The poliovirus receptor related 2 (PRR2) and apolipoprotein E genes and coronary heart disease. *J. Cardiovasc. Risk.* 9:59–65.
- Friedrich, M., A. Henn, T. Raum, M. Bajtus, K. Matthes, L. Hendrich, J. Wahl, P. Hoffmann, R. Kischel, M. Kvesic, J.W. Slootstra, P. a Baeuerle, P. Kufer, und B. Rattel. 2014. Preclinical Characterization of AMG 330, a CD3/CD33-Bispecific T-Cell-Engaging Antibody with Potential for Treatment of Acute Myelogenous Leukemia. *Mol. Cancer Ther.* 13:1549–1557. doi:10.1158/1535-7163.MCT-13-0956.
- Fu, Y., J. a Foden, C. Khayter, M.L. Maeder, D. Reyon, J.K. Joung, und J.D. Sander. 2013. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat. Biotechnol.* 31:822–6. doi:10.1038/nbt.2623.
- Fuchs, A., M. Cella, E. Giurisato, A.S. Shaw, und M. Colonna. 2004. Cutting edge: CD96 (tactile) promotes NK cell-target cell adhesion by interacting with the poliovirus receptor (CD155). *J. Immunol.* 172:3994–8. doi:10.4049/jimmunol.172.7.3994.
- Fuhrman, C. a., W.-I. Yeh, H.R. Seay, P. Saikumar Lakshmi, G. Chopra, L. Zhang, D.J. Perry, S. a. McClymont, M. Yadav, M.-C. Lopez, H. V. Baker, Y. Zhang, Y. Li, M. Whitley, D. von Schack, M. a. Atkinson, J. a. Bluestone, und T.M. Brusko. 2015. Divergent Phenotypes of Human Regulatory T Cells Expressing the Receptors TIGIT and CD226. *J. Immunol.* 195:145–55. doi:10.4049/jimmunol.1402381.
- Fujimoto, Y., K. Ozaki, N. Iwamori, H. Takakuwa, und E. Ono. 2016. Accumulation of a soluble form of human nectin-2 is required for exerting the resistance against herpes simplex virus type 2 infection in transfected cells. *Acta Virol.* 60:41–8.
- Furtner, M., R.H. Straub, S. Krüger, und H. Schwarz. 2005. Levels of soluble CD137 are enhanced in sera of leukemia and lymphoma patients and are strongly associated with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 19:883–5. doi:10.1038/sj.leu.2403675.
- Gerhardt, T., und K. Ley. 2015. Monocyte trafficking across the vessel wall. *Cardiovasc. Res.* 107:321–30. doi:10.1093/cvr/cvv147.
- Giebel, S., F. Locatelli, T. Lamparelli, A. Velardi, S. Davies, G. Frumento, R. Maccario, F. Bonetti, J. Wojnar, M. Martinetti, F. Frassoni, G. Giorgiani, A. Bacigalupo, und J. Holowiecki. 2003. Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood.* 102:814–9. doi:10.1182/blood-2003-01-0091.
- Gill, S., S.K. Tasian, M. Ruella, O. Shestova, Y. Li, D.L. Porter, M. Carroll, G. Danet-Desnoyers, J. Scholler, S.A. Grupp, C.H. June, und M. Kalos. 2014. Preclinical targeting of human acute myeloid leukemia and myeloablation using chimeric antigen receptor-modified T cells. *Blood.* 123:2343–54. doi:10.1182/blood-2013-09-529537.
- Gillet, J.-P., S. Varma, und M.M. Gottesman. 2013. The Clinical Relevance of Cancer Cell Lines. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 105:452–458. doi:10.1093/jnci/djt007.
- Goldenberg, D.M., E.A. Rossi, R.M. Sharkey, W.J. McBride, und C.-H. Chang. 2007. Multifunctional Antibodies by the Dock-and-Lock Method for Improved Cancer Imaging and Therapy by Pretargeting. *J. Nucl. Med.* 49:158–163. doi:10.2967/jnumed.107.046185.
- Graf, C., F. Heidel, S. Tenzer, M.P. Radsak, F.K. Solem, C.M. Britten, C. Huber, T. Fischer, und T. Wölfel. 2007. A neoepitope generated by an FLT3 internal tandem duplication (FLT3-ITD) is recognized by leukemia-reactive autologous CD8+ T cells. *Blood.* 109:2985–8. doi:10.1182/blood-2006-07-032839.
- Greiner, J., L. Bullinger, B.A. Guinn, H. Döhner, und M. Schmitt. 2008. Leukemia-associated antigens are critical for the proliferation of acute myeloid leukemia cells. *Clin. Cancer Res.* 14:7161–7166.

doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1102.

- Greiner, J., Y. Ono, S. Hofmann, A. Schmitt, E. Mehring, M. Gotz, P. Guillaume, K. Dohner, J. Mytilineos, H. Dohner, und M. Schmitt. 2012. Mutated regions of nucleophosmin 1 elicit both CD4+ and CD8+ T-cell responses in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 120:1282–1289. doi:10.1182/blood-2011-11-394395.
- Griffith, T.S., T. Brunner, S.M. Fletcher, D.R. Green, und T.A. Ferguson. 1995. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science*. 270:1189–92.
- Gros, A., P.F. Robbins, X. Yao, Y.F. Li, S. Turcotte, E. Tran, J.R. Wunderlich, A. Mixon, S. Farid, M.E. Dudley, K.-I. Hanada, J.R. Almeida, S. Darko, D.C. Douek, J.C. Yang, und S.A. Rosenberg. 2014. PD-1 identifies the patient-specific CD8<sup>+</sup> tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. *J. Clin. Invest.* 124:2246–59. doi:10.1172/JCI73639.
- Gupta, V., M.S. Tallman, und D.J. Weisdorf. 2011. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for adults with acute myeloid leukemia: myths, controversies, and unknowns. *Blood*. 117.
- Hahn, S., R. Gehri, und P. Erb. 1995. Mechanism and biological significance of CD4-mediated cytotoxicity. *Immunol. Rev.* 146:57–79.
- Hanahan, D., und R.A. Weinberg. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 144:646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Hicklin, D.J., Z. Wang, F. Arienti, L. Rivoltini, G. Parmiani, und S. Ferrone. 1998. beta2-Microglobulin mutations, HLA class I antigen loss, and tumor progression in melanoma. *J. Clin. Invest.* 101:2720–9. doi:10.1172/JCI498.
- Hills, R.K., S. Castaigne, F.R. Appelbaum, J. Delaunay, S. Petersdorf, M. Othus, E.H. Estey, H. Dombret, S. Chevret, N. Ifrah, J.-Y. Cahn, C. Récher, L. Chilton, A. V Moorman, und A.K. Burnett. 2014. Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials. *Lancet Oncol.* 15:986–996. doi:10.1016/S1470-2045(14)70281-5.
- Hirota, T., K. Irie, R. Okamoto, W. Ikeda, und Y. Takai. 2005. Transcriptional activation of the mouse *Necl-5/Tage4/PVR/CD155* gene by fibroblast growth factor or oncogenic Ras through the Raf-MEK-ERK-AP-1 pathway. *Oncogene*. 24:2229–35. doi:10.1038/sj.onc.1208409.
- Hodi, F.S., S.J. O’Day, D.F. McDermott, R.W. Weber, J.A. Sosman, J.B. Haanen, R. Gonzalez, C. Robert, D. Schadendorf, J.C. Hassel, W. Akerley, A.J.M. van den Eertwegh, J. Lutzky, P. Lorigan, J.M. Vaubel, G.P. Linette, D. Hogg, C.H. Ottensmeier, C. Lebbé, C. Peschel, I. Quirt, J.I. Clark, J.D. Wolchok, J.S. Weber, J. Tian, M.J. Yellin, G.M. Nichol, A. Hoos, und W.J. Urba. 2010. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 363:711–723. doi:10.1056/NEJMoa1003466.
- Hoffman, R. 2013. Hematology : basic principles and practice. Saunders/Elsevier, Philadelphia, PA.
- Holowiecki, J., S. Grosicki, S. Giebel, T. Robak, S. Kyrzcz-Krzemien, K. Kuliczowski, A.B. Skotnicki, A. Hellmann, K. Sulek, A. Dmoszynska, J. Kloczko, W.W. Jedrzejczak, B. Zdziarska, K. Warzocha, K. Zawilska, M. Komarnicki, M. Kielbinski, B. Piatkowska-Jakubas, A. Wierzbowska, M. Wach, und O. Haus. 2012. Cladribine, but not fludarabine, added to daunorubicin and cytarabine during induction prolongs survival of patients with acute myeloid leukemia: a multicenter, randomized phase III study. *J. Clin. Oncol.* 30:2441–8. doi:10.1200/JCO.2011.37.1286.
- Hosen, N., C.Y. Park, N. Tatsumi, Y. Oji, H. Sugiyama, M. Gramatzki, A.M. Krensky, und I.L. Weissman. 2007. CD96 is a leukemic stem cell-specific marker in human acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:11008–13. doi:10.1073/pnas.0704271104.

- Hothorn, T., K. Hornik, und A. Zeileis. 2006. Unbiased Recursive Partitioning: A Conditional Inference Framework. *J. Comput. Graph. Stat.* 15:651–674. doi:10.1198/106186006X133933.
- Hou, S., X. Zheng, H. Wei, Z. Tian, und R. Sun. 2014. Recombinant soluble CD226 protein directly inhibits cancer cell proliferation in vitro. *Int. Immunopharmacol.* 19:119–126. doi:10.1016/j.intimp.2014.01.012.
- Hsu, P.D., D. a Scott, J. a Weinstein, F.A. Ran, S. Konermann, V. Agarwala, Y. Li, E.J. Fine, X. Wu, O. Shalem, T.J. Cradick, L. a Marraffini, G. Bao, und F. Zhang. 2013. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol.* 31:827–32. doi:10.1038/nbt.2647.
- Iguchi-Manaka, A., G. Okumura, H. Kojima, Y. Cho, R. Hirochika, H. Bando, T. Sato, H. Yoshikawa, H. Hara, A. Shibuya, und K. Shibuya. 2016. Increased soluble CD155 in the serum of cancer patients. *PLoS One.* 11:1–12. doi:10.1371/journal.pone.0152982.
- Inozume, T., T. Yaguchi, J. Furuta, K. Harada, Y. Kawakami, und S. Shimada. 2016. Melanoma Cells Control Antimelanoma CTL Responses via Interaction between TIGIT and CD155 in the Effector Phase. *J. Invest. Dermatol.* 136:255–263. doi:10.1038/JID.2015.404.
- Jenkins, M.K., und R.H. Schwartz. 1987. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* 165:302–19.
- Jing, W., J.A. Gershan, J. Weber, D. Tlomak, L. McOlash, C. Sabatos-Peyton, und B.D. Johnson. 2015. Combined immune checkpoint protein blockade and low dose whole body irradiation as immunotherapy for myeloma. *J. Immunother. cancer.* 3:2. doi:10.1186/s40425-014-0043-z.
- Joffre, O.P., E. Segura, A. Savina, und S. Amigorena. 2012. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* 12:557–569. doi:10.1038/nri3254.
- Johnston, R.J., L. Comps-Agrar, J. Hackney, X. Yu, M. Huseni, Y. Yang, S. Park, V. Javinal, H. Chiu, B. Irving, D.L. Eaton, und J.L. Grogan. 2014. The immunoreceptor TIGIT regulates antitumor and antiviral CD8(+) T cell effector function. *Cancer Cell.* 26:923–37. doi:10.1016/j.ccell.2014.10.018.
- Joller, N., J.P. Hafler, B. Brynedal, N. Kassam, S. Spoerl, S.D. Levin, A.H. Sharpe, und V.K. Kuchroo. 2011. Cutting edge: TIGIT has T cell-intrinsic inhibitory functions. *J. Immunol.* 186:1338–1342. doi:10.4049/jimmunol.1003081.
- Joller, N., E. Lozano, P.R. Burkett, B. Patel, S. Xiao, C. Zhu, J. Xia, T.G. Tan, E. Sefik, V. Yajnik, A.H. Sharpe, F.J. Quintana, D. Mathis, C. Benoist, D.A. Hafler, und V.K. Kuchroo. 2014. Treg cells expressing the coinhibitory molecule TIGIT selectively inhibit proinflammatory Th1 and Th17 cell responses. *Immunity.* 40:569–581. doi:10.1016/j.immuni.2014.02.012.
- Kaatsch, P., C. Spix, A. Katalinic, S. Hentschel, S. Luttmann, C. Stegmaier, G. Bundes, P. Kaatsch, C. Spix, A. Katalinic, S. Hentschel, S. Luttmann, C. Stegmaier, S. Caspritz, M. Christ, A. Ernst, J. Fokerts, J. Hansmann, S. Klein, K. Kranzhöfer, B. Kunz, K. Manegold, A. Penzkofer, K. Treml, S. Weg-Remers, und K. Wittenberg. 2015. Krebs in Deutschland 2011/2012. 10. Ausgab. Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.
- Kantarjian, H., S. O'Brien, J. Cortes, F. Giles, S. Faderl, E. Jabbour, G. Garcia-Manero, W. Wierda, S. Pierce, J. Shan, und E. Estey. 2006. Results of intensive chemotherapy in 998 patients age 65 years or older with acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome: *Cancer.* 106:1090–1098. doi:10.1002/cncr.21723.
- Kantarjian, H.M., X.G. Thomas, A. Dmoszynska, A. Wierzbowska, G. Mazur, J. Mayer, J.-P. Gau, W.-C. Chou, R. Buckstein, J. Cermak, C.-Y. Kuo, A. Oriol, F. Ravandi, S. Faderl, J. Delaunay, D. Lysák, M. Minden, und C. Arthur. 2012. Multicenter, randomized, open-label, phase III trial of decitabine versus patient choice, with physician advice, of either supportive care or low-dose cytarabine for the treatment of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.*

- 30:2670–7. doi:10.1200/JCO.2011.38.9429.
- Kaplan, G., und V.R. Racaniello. 1991. Down regulation of poliovirus receptor RNA in HeLa cells resistant to poliovirus infection . Down Regulation of Poliovirus Receptor RNA in HeLa Cells Resistant to Poliovirus Infection. 65.
- Karabulut, M., M. Gunaldi, H. Alis, C.U. Afsar, S. Karabulut, M. Serilmez, C. Akarsu, H. Seyit, und N.F. Aykan. 2016. Serum nectin-2 levels are diagnostic and prognostic in patients with colorectal carcinoma. *Clin. Transl. Oncol.* 18:160–71. doi:10.1007/s12094-015-1348-1.
- Keefe, D., L. Shi, S. Feske, R. Massol, F. Navarro, T. Kirchhausen, und J. Lieberman. 2005. Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis. *Immunity.* 23:249–62. doi:10.1016/j.immuni.2005.08.001.
- Keilholz, U., A. Letsch, A. Busse, A.M. Asemissen, S. Bauer, I.W. Blau, W.-K. Hofmann, L. Uharek, E. Thiel, und C. Scheibenbogen. 2009. A clinical and immunologic phase 2 trial of Wilms tumor gene product 1 (WT1) peptide vaccination in patients with AML and MDS. *Blood.* 113:6541–8. doi:10.1182/blood-2009-02-202598.
- Kihara, R., Y. Nagata, H. Kiyoi, T. Kato, E. Yamamoto, K. Suzuki, F. Chen, N. Asou, S. Ohtake, S. Miyawaki, Y. Miyazaki, T. Sakura, Y. Ozawa, N. Usui, H. Kanamori, T. Kiguchi, K. Imai, N. Uike, F. Kimura, K. Kitamura, C. Nakaseko, M. Onizuka, A. Takeshita, F. Ishida, H. Suzushima, Y. Kato, H. Miwa, Y. Shiraishi, K. Chiba, H. Tanaka, S. Miyano, S. Ogawa, und T. Naoe. 2014. Comprehensive analysis of genetic alterations and their prognostic impacts in adult acute myeloid leukemia patients. *Leukemia.* 28:1586–1595. doi:10.1038/leu.2014.55.
- Kissick, H.T., und M.G. Sanda. 2015. The role of active vaccination in cancer immunotherapy: lessons from clinical trials. *Curr. Opin. Immunol.* 35:15–22. doi:10.1016/j.coi.2015.05.004.
- Köhnke, T., C. Krupka, J. Tischer, T. Knösel, und M. Subklewe. 2015. Increase of PD-L1 expressing B-precursor ALL cells in a patient resistant to the CD19/CD3-bispecific T cell engager antibody blinatumomab. *J. Hematol. Oncol.* 8:111. doi:10.1186/s13045-015-0213-6.
- Kong, K.-F., T. Yokosuka, A.J. Canonigo-Balancio, N. Isakov, T. Saito, und A. Altman. 2011. A motif in the V3 domain of the kinase PKC- $\theta$  determines its localization in the immunological synapse and functions in T cells via association with CD28. *Nat. Immunol.* 12:1105–12. doi:10.1038/ni.2120.
- Kong, Y., L. Zhu, T.D. Schell, J. Zhang, D.F. Claxton, W.C. Ehmann, W.B. Rybka, M.R. George, H. Zeng, und H. Zheng. 2016. T-cell immunoglobulin and ITIM domain (TIGIT) associates with CD8+ T-cell exhaustion and poor clinical outcome in AML patients. *Clin. Cancer Res.* 22:3057–3066. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2626.
- Konig, H., und M. Levis. 2015. Targeting FLT3 to treat leukemia. *Expert Opin. Ther. Targets.* 19:37–54. doi:10.1517/14728222.2014.960843.
- Konopleva, M., D.E. Hogge, D.A. Rizzieri, T.P. Cirrito, J.S. Liu, S.M. Kornblau, M. Grable, I.-R. Hwang, G. Borthakur, A. Mankin, C. Bivins, G. Garcia-Manero, T. Kadia, D. Harris, F. Ravandi, M. Andreeff, J.E. Cortes, R. Niecestro, I. Bergstein, H.M. Kantarjian, und A.E. Frankel. 2015. Phase I Trial Results for SL-401, a Novel Cancer Stem Cell (CSC) Targeting Agent, Demonstrate Clinical Efficacy at Tolerable Doses In Patients with Heavily Pre-Treated AML, Poor Risk Elderly AML, and High Risk MDS. *Blood.* 116:3298 LP-3298.
- Koreck, A., A. Surányi, B.J. Szöny, A. Farkas, Z. Bata-Csörgö, L. Kemény, und A. Dobozy. 2002. CD3+CD56+ NK T cells are significantly decreased in the peripheral blood of patients with psoriasis. *Clin. Exp. Immunol.* 127:176–82.
- Koreth, J., R. Schlenk, K.J. Kopecky, S. Honda, J. Sierra, B.J. Djulbegovic, M. Wadleigh, D.J. DeAngelo, R.M. Stone, H. Sakamaki, F.R. Appelbaum, H. Döhner, J.H. Antin, R.J. Soiffer, und C. Cutler. 2009.

- Allogeneic Stem Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia in First Complete Remission. *JAMA*. 301:2349. doi:10.1001/jama.2009.813.
- De Kouchkovsky, I., und M. Abdul-Hay. 2016. 'Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update'. *Blood Cancer J.* 6:e441. doi:10.1038/bcj.2016.50.
- Kourepini, E., N. Paschalidis, D.C.M. Simoes, M. Aggelakopoulou, J.L. Grogan, und V. Panoutsakopoulou. 2016. TIGIT Enhances Antigen-Specific Th2 Recall Responses and Allergic Disease. *J. Immunol.* 196:3570–3580. doi:10.4049/jimmunol.1501591.
- Krönig, H., L. Kremmler, B. Haller, C. Englert, C. Peschel, R. Andreesen, und C.U. Blank. 2014. Interferon-induced programmed death-ligand 1 (PD-L1/B7-H1) expression increases on human acute myeloid leukemia blast cells during treatment. *Eur. J. Haematol.* 92:195–203. doi:10.1111/ejh.12228.
- Krupka, C., P. Kufer, R. Kischel, G. Zugmaier, J. Bogeholz, T. Kohnke, F.S. Lichtenegger, S. Schneider, K.H. Metzeler, M. Fiegl, K. Spiekermann, P. a. Baeuerle, W. Hiddemann, G. Riethmuller, und M. Subklewe. 2014. CD33 target validation and sustained depletion of AML blasts in long-term cultures by the bispecific T-cell-engaging antibody AMG 330. *Blood*. 123:356–365. doi:10.1182/blood-2013-08-523548.
- Krupka, C., P. Kufer, R. Kischel, G. Zugmaier, F.S. Lichtenegger, T. Köhnke, B. Vick, I. Jeremias, K.H. Metzeler, T. Altmann, S. Schneider, M. Fiegl, K. Spiekermann, P. a. Bauerle, W. Hiddemann, G. Riethmüller, und M. Subklewe. 2015. Blockade of the PD-1/PD-L1 axis augments lysis of AML cells by the CD33/CD3 BiTE antibody construct AMG 330: reversing a T-cell-induced immune escape mechanism. *Leukemia*. 1–8. doi:10.1038/leu.2015.214.
- Krysko, D. V., A.D. Garg, A. Kaczmarek, O. Krysko, P. Agostinis, und P. Vandenabeele. 2012. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*. 12:860–75. doi:10.1038/nrc3380.
- Kuball, J., K. de Boer, E. Wagner, M. Wattad, E. Antunes, R.D. Weeratna, A.P. Vicari, C. Lotz, S. van Dorp, S. Hol, P.D. Greenberg, W. Heit, H.L. Davis, und M. Theobald. 2011. Pitfalls of vaccinations with WT1-, Proteinase3- and MUC1-derived peptides in combination with MontanideISA51 and CpG7909. *Cancer Immunol. Immunother.* 60:161–171. doi:10.1007/s00262-010-0929-7.
- Kurschus, F.C., R. Bruno, E. Fellows, C.S. Falk, und D.E. Jenne. 2005. Membrane receptors are not required to deliver granzyme B during killer cell attack. *Blood*. 105:2049–58. doi:10.1182/blood-2004-06-2180.
- Kurtulus, S., K. Sakuishi, S. Ngiow, N. Joller, D.J. Tan, M.W.L. Teng, M.J. Smyth, V.K. Kuchroo, und A.C. Anderson. 2015. TIGIT predominantly regulates the immune response via regulatory T cells. *J. Clin. Invest.* 125:4053–62. doi:10.1172/JCI81187.
- Lancet, J.E., J.E. Cortes, D.E. Hogge, M.S. Tallman, T.J. Kovacovics, L.E. Damon, R. Komrokji, S.R. Solomon, J.E. Kolitz, M. Cooper, A.M. Yeager, A.C. Louie, und E.J. Feldman. 2014. Phase 2 trial of CPX-351, a fixed 5:1 molar ratio of cytarabine/daunorubicin, vs cytarabine/daunorubicin in older adults with untreated AML. *Blood*. 123:3239–46. doi:10.1182/blood-2013-12-540971.
- Lander, E.S., L.M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M.C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, R. Funke, D. Gage, K. Harris, A. Heaford, J. Howland, L. Kann, J. Lehoczy, R. LeVine, P. McEwan, K. McKernan, J. Meldrim, J.P. Mesirov, C. Miranda, W. Morris, J. Naylor, C. Raymond, M. Rosetti, R. Santos, A. Sheridan, C. Sougnez, Y. Stange-Thomann, N. Stojanovic, A. Subramanian, D. Wyman, J. Rogers, J. Sulston, R. Ainscough, S. Beck, D. Bentley, J. Burton, C. Clee, N. Carter, A. Coulson, R. Deadman, P. Deloukas, A. Dunham, I. Dunham, R. Durbin, L. French, D. Grafham, S. Gregory, T. Hubbard, S. Humphray, A. Hunt, M. Jones, C. Lloyd, A. McMurray, L. Matthews, S. Mercer, S. Milne, J.C. Mullikin, A. Mungall, R. Plumb, M. Ross, R. Shownkeen, S. Sims, R.H.

- Waterston, R.K. Wilson, L.W. Hillier, J.D. McPherson, M.A. Marra, E.R. Mardis, L.A. Fulton, A.T. Chinwalla, K.H. Pepin, W.R. Gish, S.L. Chissoe, M.C. Wendl, K.D. Delehaunty, T.L. Miner, A. Delehaunty, J.B. Kramer, L.L. Cook, R.S. Fulton, D.L. Johnson, P.J. Minx, S.W. Clifton, T. Hawkins, E. Branscomb, P. Predki, P. Richardson, S. Wenning, T. Slezak, N. Doggett, J.F. Cheng, A. Olsen, S. Lucas, C. Elkin, u. a. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 409:860–921. doi:10.1038/35057062.
- Larkin, J., V. Chiarion-Sileni, R. Gonzalez, J.J. Grob, C.L. Cowey, C.D. Lao, D. Schadendorf, R. Dummer, M. Smylie, P. Rutkowski, P.F. Ferrucci, A. Hill, J. Wagstaff, M.S. Carlino, J.B. Haanen, M. Maio, I. Marquez-Rodas, G.A. McArthur, P.A. Ascierto, G. V Long, M.K. Callahan, M.A. Postow, K. Grossmann, M. Sznol, B. Dreno, L. Bastholt, A. Yang, L.M. Rollin, C. Horak, F.S. Hodi, und J.D. Wolchok. 2015. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 373:23–34. doi:10.1056/NEJMoa1504030.
- Larson, R.A., E.L. Sievers, E.A. Stadtmauer, B. Löwenberg, E.H. Estey, H. Dombret, M. Theobald, D. Voliotis, J.M. Bennett, M. Richie, L.H. Leopold, M.S. Berger, M.L. Sherman, M.R. Loken, J.J.M. van Dongen, I.D. Bernstein, und F.R. Appelbaum. 2005. Final report of the efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first recurrence. *Cancer*. 104:1442–52. doi:10.1002/cncr.21326.
- Laszlo, G.S., C.J. Gudgeon, K.H. Harrington, und R.B. Walter. 2015. T-cell ligands modulate the cytolytic activity of the CD33/CD3 BiTE antibody construct, AMG 330. *Blood Cancer J.* 5:e340. doi:10.1038/bcj.2015.68.
- Levin, S.D., D.W. Taft, C.S. Brandt, C. Bucher, E.D. Howard, E.M. Chadwick, J. Johnston, A. Hammond, K. Bontadelli, D. Ardourel, L. Hebb, A. Wolf, T.R. Bukowski, M.W. Rixon, J.L. Kuijper, C.D. Ostrander, J.W. West, J. Bilborough, B. Fox, Z. Gao, W. Xu, F. Ramsdell, B.R. Blazar, und K.E. Lewis. 2011. Vstm3 is a member of the CD28 family and an important modulator of T-cell function. *Eur. J. Immunol.* 41:902–915. doi:10.1002/eji.201041136.
- Levis, M.J., A.E. Perl, H. Dombret, H. Döhner, B. Steffen, P. Rousselot, G. Martinelli, E.H. Estey, A.K. Burnett, G. Gammon, D. Trone, E. Leo, und J.E. Cortes. 2012. Final Results of a Phase 2 Open-Label, Monotherapy Efficacy and Safety Study of Quizartinib (AC220) in Patients with FLT3-ITD Positive or Negative Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia After Second-Line Chemotherapy or Hematopoietic Stem Cell Transpl. *Blood*. 120:673 LP-673.
- Li, D., L. Wang, H. Zhu, L. Dou, D. Liu, L. Fu, C. Ma, X. Ma, Y. Yao, L. Zhou, Q. Wang, L. Wang, Y. Zhao, Y. Jing, L. Wang, Y. Li, und L. Yu. 2015. Efficacy of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Intermediate-Risk Acute Myeloid Leukemia Adult Patients in First Complete Remission: A Meta-Analysis of Prospective Studies. *PLoS One*. 10:e0132620. doi:10.1371/journal.pone.0132620.
- Li, M., P. Xia, Y. Du, S. Liu, G. Huang, J. Chen, H. Zhang, N. Hou, X. Cheng, L. Zhou, P. Li, X. Yang, und Z. Fan. 2014. T-cell Immunoglobulin and ITIM Domain (TIGIT) Receptor/Poliovirus Receptor (PVR) Ligand Engagement Suppresses Interferon- $\gamma$  Production of Natural Killer Cells via  $\beta$ -Arrestin 2-mediated Negative Signaling. *J. Biol. Chem.* 289:17647–17657. doi:10.1074/jbc.M114.572420.
- Lippitz, B.E. 2013. Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. *Lancet Oncol.* 14:e218–e228. doi:10.1016/S1470-2045(12)70582-X.
- Liu, S., H. Zhang, M. Li, D. Hu, C. Li, B. Ge, B. Jin, und Z. Fan. 2013. Recruitment of Grb2 and SHIP1 by the ITT-like motif of TIGIT suppresses granule polarization and cytotoxicity of NK cells. *Cell Death Differ.* 20:456–464. doi:10.1038/cdd.2012.141.
- Logue, M.W., M. Schu, B.N. Vardarajan, J. Buros, R.C. Green, R.C.P. Go, P. Griffith, T.O. Obisesan, R. Shatz, A. Borenstein, L.A. Cupples, K.L. Lunetta, M.D. Fallin, C.T. Baldwin, L.A. Farrer, und Multi-

- Institutional Research on Alzheimer Genetic Epidemiology (MIRAGE) Study Group. 2011. A comprehensive genetic association study of Alzheimer disease in African Americans. *Arch. Neurol.* 68:1569–79. doi:10.1001/archneurol.2011.646.
- Lopez, M., M. Aoubala, F. Jordier, D. Isnardon, S. Gomez, und P. Dubreuil. 1998. The human poliovirus receptor related 2 protein is a new hematopoietic/endothelial homophilic adhesion molecule. *Blood.* 92:4602–11.
- Lozano, E., M. Dominguez-Villar, V. Kuchroo, und D. a. Hafler. 2012. The TIGIT/CD226 Axis Regulates Human T Cell Function. *J. Immunol.* 188:3869–3875. doi:10.4049/jimmunol.1103627.
- Lutsiak, M.E.C., R.T. Semnani, R. De Pascalis, S.V.S. Kashmiri, J. Schlom, und H. Sabzevari. 2005. Inhibition of CD4(+)25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide. *Blood.* 105:2862–8. doi:10.1182/blood-2004-06-2410.
- Mahoney, K.M., P.D. Rennert, und G.J. Freeman. 2015. Combination cancer immunotherapy and new immunomodulatory targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14:561–84. doi:10.1038/nrd4591.
- Majeti, R., M.P. Chao, A.A. Alizadeh, W.W. Pang, S. Jaiswal, K.D. Gibbs, N. van Rooijen, und I.L. Weissman. 2009. CD47 Is an Adverse Prognostic Factor and Therapeutic Antibody Target on Human Acute Myeloid Leukemia Stem Cells. *Cell.* 138:286–299. doi:10.1016/j.cell.2009.05.045.
- Mali, P., L. Yang, K.M. Esvelt, J. Aach, M. Guell, J.E. DiCarlo, J.E. Norville, und G.M. Church. 2013. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science.* 339:823–6. doi:10.1126/science.1232033.
- Man, C.H., T.K. Fung, C. Ho, H.H.C. Han, H.C.H. Chow, A.C.H. Ma, W.W.L. Choi, S. Lok, A.M.S. Cheung, C. Eaves, Y.L. Kwong, und A.Y.H. Leung. 2012. Sorafenib treatment of FLT3-ITD(+) acute myeloid leukemia: favorable initial outcome and mechanisms of subsequent nonresponsiveness associated with the emergence of a D835 mutation. *Blood.* 119:5133–43. doi:10.1182/blood-2011-06-363960.
- Manieri, N.A., E.Y. Chiang, und J.L. Grogan. 2017. TIGIT: A Key Inhibitor of the Cancer Immunity Cycle. *Trends Immunol.* 38:20–28. doi:10.1016/j.it.2016.10.002.
- Manz, B.N., B.L. Jackson, R.S. Petit, M.L. Dustin, und J. Groves. 2011. T-cell triggering thresholds are modulated by the number of antigen within individual T-cell receptor clusters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108:9089–94. doi:10.1073/pnas.1018771108.
- Mardiros, A., C. Dos Santos, T. McDonald, C.E. Brown, X. Wang, L.E. Budde, L. Hoffman, B. Aguilar, W.-C. Chang, W. Bretzlaff, B. Chang, M. Jonnalagadda, R. Starr, J.R. Ostberg, M.C. Jensen, R. Bhatia, und S.J. Forman. 2013. T cells expressing CD123-specific chimeric antigen receptors exhibit specific cytolytic effector functions and antitumor effects against human acute myeloid leukemia. *Blood.* 122:3138–48. doi:10.1182/blood-2012-12-474056.
- Martinez, W.M., und P.G. Spear. 2001. Structural features of nectin-2 (HveB) required for herpes simplex virus entry. *J. Virol.* 75:11185–95. doi:10.1128/JVI.75.22.11185-11195.2001.
- Masarova, L., H. Kantarjian, G. Garcia-Mannero, F. Ravandi, P. Sharma, und N. Daver. 2017. Harnessing the Immune System Against Leukemia: Monoclonal Antibodies and Checkpoint Strategies for AML. *Adv. Exp. Med. Biol.* 995:73–95. doi:10.1007/978-3-319-53156-4\_4.
- Masson, D., A. Jarry, B. Bauray, P. Blanchardie, C. Laboisie, P. Lustenberger, und M.G. Denis. 2001. Overexpression of the CD155 gene in human colorectal carcinoma. *Gut.* 49:236–40. doi:10.1136/gut.49.2.236.
- McCormack, E., O. Bruserud, und B.T. Gjertsen. 2005. Animal models of acute myelogenous leukaemia - development, application and future perspectives. *Leukemia.* 19:687–706. doi:10.1038/sj.leu.2403670.

- McKoy, J.M., C. Angelotta, C.L. Bennett, M.S. Tallman, M. Wadleigh, A.M. Evens, T.M. Kuzel, S.M. Trifilio, D.W. Raisch, J. Kell, D.J. DeAngelo, und F.J. Giles. 2007. Gemtuzumab ozogamicin-associated sinusoidal obstructive syndrome (SOS): An overview from the research on adverse drug events and reports (RADAR) project. *Leuk. Res.* 31:599–604. doi:10.1016/j.leukres.2006.07.005.
- Medema, J.P., J. de Jong, L.T. Peltenburg, E.M. Verdegaal, A. Gorter, S.A. Bres, K.L. Franken, M. Hahne, J.P. Albar, C.J. Melief, und R. Offringa. 2001. Blockade of the granzyme B/perforin pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6 constitutes a mechanism for immune escape by tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98:11515–20. doi:10.1073/pnas.201398198.
- Melero, I., D.M. Berman, M.A. Aznar, A.J. Korman, J.L. Pérez Gracia, und J. Haanen. 2015. Evolving synergistic combinations of targeted immunotherapies to combat cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 15:457–72. doi:10.1038/nrc3973.
- Michot, J.M., C. Bigenwald, S. Champiat, M. Collins, F. Carbonnel, S. Postel-Vinay, A. Berdelou, A. Varga, R. Bahleda, A. Hollebecque, C. Massard, A. Fuerea, V. Ribrag, A. Gazzah, J.P. Armand, N. Amellal, E. Angevin, N. Noel, C. Boutros, C. Mateus, C. Robert, J.C. Soria, A. Marabelle, und O. Lambotte. 2016. Immune-related adverse events with immune checkpoint blockade: a comprehensive review. *Eur. J. Cancer.* 54:139–148. doi:10.1016/j.ejca.2015.11.016.
- Moretta, A., C. Bottino, M. Vitale, D. Pende, C. Cantoni, M.C. Mingari, R. Biassoni, und L. Moretta. 2001. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.* 19:197–223. doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.197.
- van der Most, R.G., B.W.S. Robinson, und R.A. Lake. 2005. Combining immunotherapy with chemotherapy to treat cancer. *Discov. Med.* 5:265–70.
- Motyka, B., G. Korbitt, M.J. Pinkoski, J.A. Heibin, A. Caputo, M. Hobman, M. Barry, I. Shostak, T. Sawchuk, C.F. Holmes, J. Gaudie, und R.C. Bleackley. 2000. Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell.* 103:491–500.
- Müller, C.I., M. Trepel, R. Kunzmann, A. Lais, R. Engelhardt, und M. Lübbert. 2004. Hematologic and molecular spontaneous remission following sepsis in acute monoblastic leukemia with translocation (9;11): A case report and review of the literature. *Eur. J. Haematol.* 73:62–66. doi:10.1111/j.1600-0609.2004.00248.x.
- Muralidhara, C., A. Ramachandran, und V.K. Jain. 2014. Abstract 3683: Crenolanib, a novel Type I, mutant-specific inhibitor of Class III receptor tyrosine kinases, preferentially binds to phosphorylated kinases. *Cancer Res.* 72:3683 LP-3683.
- Murphy, K., P. Travers, M. Walport, und C. Janeway. 2012. *Janeway's immunobiology*. 8th Aufl. Garland Science, New York.
- Nagata, S., und P. Golstein. 1995. The Fas death factor. *Science.* 267:1449–56.
- Nagorsen, D., und P.A. Baeuerle. 2011. Immunomodulatory therapy of cancer with T cell-engaging BiTE antibody blinatumomab. *Exp. Cell Res.* 317:1255–1260. doi:10.1016/j.yexcr.2011.03.010.
- Neefjes, J., M.L.M. Jongsmá, P. Paul, und O. Bakke. 2011. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* 11:823. doi:10.1038/nri3084.
- Neefjes, J., und C. Sadaka. 2012. Into the intracellular logistics of cross-presentation. *Front. Immunol.* 3:31. doi:10.3389/fimmu.2012.00031.
- Nie, Y., G. Yang, Y. Song, X. Zhao, C. So, J. Liao, L.D. Wang, und C.S. Yang. 2001. DNA hypermethylation

- is a mechanism for loss of expression of the HLA class I genes in human esophageal squamous cell carcinomas. *Carcinogenesis*. 22:1615–23.
- Nishiwada, S., M. Sho, S. Yasuda, K. Shimada, I. Yamato, T. Akahori, S. Kinoshita, M. Nagai, N. Konishi, und Y. Nakajima. 2015. Clinical significance of CD155 expression in human pancreatic cancer. *Anticancer Res*. 35:2287–97.
- Nobis, P., R. Zibirre, G. Meyer, J. Kuhne, G. Warnecke, und G. Koch. 1985. Production of a Monoclonal Antibody against an Epitope on HeLa Cells that Is the Functional Poliovirus Binding Site. *J. Gen. Virol.* 66:2563–2569. doi:10.1099/0022-1317-66-12-2563.
- North, J., I. Bakhsh, C. Marden, H. Pittman, E. Addison, C. Navarrete, R. Anderson, und M.W. Lowdell. 2006. Tumor-Primed Human Natural Killer Cells Lyse NK-Resistant Tumor Targets: Evidence of a Two-Stage Process in Resting NK Cell Activation. *J. Immunol.* 178.
- O’Farrell, A.-M., J.M. Foran, W. Fiedler, H. Serve, R.L. Paquette, M.A. Cooper, H.A. Yuen, S.G. Louie, H. Kim, S. Nicholas, M.C. Heinrich, W.E. Berdel, C. Bello, M. Jacobs, P. Scigalla, W.C. Manning, S. Kelsey, und J.M. Cherrington. 2003. An innovative phase I clinical study demonstrates inhibition of FLT3 phosphorylation by SU11248 in acute myeloid leukemia patients. *Clin. Cancer Res*. 9:5465–76.
- Ochsenreither, S., A. Fusi, A. Busse, S. Bauer, C. Scheibenbogen, D. Stather, E. Thiel, U. Keilholz, und A. Letsch. 2011. “Wilms Tumor Protein 1” (WT1) Peptide Vaccination-induced Complete Remission in a Patient With Acute Myeloid Leukemia Is Accompanied by the Emergence of a Predominant T-cell Clone Both in Blood and Bone Marrow. *J. Immunother.* 34:85–91. doi:10.1097/CJI.0b013e3181f3cc5c.
- Offner, S., R. Hofmeister, A. Romaniuk, P. Kufer, und P. a Baeuerle. 2006. Induction of regular cytolytic T cell synapses by bispecific single-chain antibody constructs on MHC class I-negative tumor cells. *Mol. Immunol.* 43:763–771. doi:10.1016/j.molimm.2005.03.007.
- Oshima, T., S. Sato, J. Kato, Y. Ito, T. Watanabe, I. Tsuji, A. Hori, T. Kurokawa, und T. Kokubo. 2013. Nectin-2 is a potential target for antibody therapy of breast and ovarian cancers. *Mol. Cancer*. 12:60. doi:10.1186/1476-4598-12-60.
- Osman, Y., M. Takahashi, Z. Zheng, K. Toba, A. Liu, T. Furukawa, M. Narita, Y. Aizawa, T. Koike, und A. Shibata. 1999. Dendritic cells stimulate the expansion of PML-RAR alpha specific cytotoxic T-lymphocytes: its applicability for antileukemia immunotherapy. *J. Exp. Clin. Cancer Res*. 18:485–92.
- Pabst, C., J. Krosch, I. Fares, G. Boucher, R. Ruel, A. Marinier, S. Lemieux, J. Hébert, und G. Sauvageau. 2014. Identification of small molecules that support human leukemia stem cell activity ex vivo. *Nat. Methods*. 11:436–42. doi:10.1038/nmeth.2847.
- Page, L.J., A.J. Darmon, R. Uellner, und G.M. Griffiths. 1998. L is for lytic granules: lysosomes that kill. *Biochim. Biophys. Acta*. 1401:146–56.
- Papaemmanuil, E., M. Gerstung, L. Bullinger, V.I. Gaidzik, P. Paschka, N.D. Roberts, N.E. Potter, M. Heuser, F. Thol, N. Bolli, G. Gundem, P. Van Loo, I. Martincorena, P. Ganly, L. Mudie, S. McLaren, S. O’Meara, K. Raine, D.R. Jones, J.W. Teague, A.P. Butler, M.F. Greaves, A. Ganser, K. Döhner, R.F. Schlenk, H. Döhner, und P.J. Campbell. 2016. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 374:2209–21. doi:10.1056/NEJMoa1516192.
- Pardoll, D.M. 2012. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer*. 12:252–64. doi:10.1038/nrc3239.
- Park, S., Z. Jiang, E.D. Mortenson, L. Deng, O. Radkevich-Brown, X. Yang, H. Sattar, Y. Wang, N.K. Brown, M. Greene, Y. Liu, J. Tang, S. Wang, und Y.-X. Fu. 2010. The therapeutic effect of anti-HER2/neu

- antibody depends on both innate and adaptive immunity. *Cancer Cell*. 18:160–70. doi:10.1016/j.ccr.2010.06.014.
- Pauken, K.E., M.A. Sammons, P.M. Odorizzi, S. Manne, J. Godec, O. Khan, A.M. Drake, Z. Chen, D.R. Sen, M. Kurachi, R.A. Barnitz, C. Bartman, B. Bengsch, A.C. Huang, J.M. Schenkel, G. Vahedi, W.N. Haining, S.L. Berger, und E.J. Wherry. 2016. Epigenetic stability of exhausted T cells limits durability of reinvigoration by PD-1 blockade. *Science*. 354:1160–1165. doi:10.1126/science.aaf2807.
- Pauken, K.E., und E.J. Wherry. 2014. TIGIT and CD226: Tipping the Balance between Costimulatory and Coinhibitory Molecules to Augment the Cancer Immunotherapy Toolkit. *Cancer Cell*. 26:785–787. doi:10.1016/j.ccell.2014.11.016.
- Pende, D., C. Bottino, R. Castriconi, C. Cantoni, S. Marcenaro, P. Rivera, G.M. Spaggiari, A. Dondero, B. Carnemolla, N. Reymond, M.C. Mingari, M. Lopez, L. Moretta, und A. Moretta. 2005a. PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as ligands of the human DNAM-1 (CD226) activating receptor: involvement in tumor cell lysis. *Mol. Immunol.* 42:463–469. doi:10.1016/j.molimm.2004.07.028.
- Pende, D., G.M. Spaggiari, S. Marcenaro, S. Martini, P. Rivera, A. Capobianco, M. Falco, E. Lanino, I. Pierri, R. Zambello, A. Bacigalupo, M.C. Mingari, A. Moretta, und L. Moretta. 2005b. Analysis of the receptor-ligand interactions in the natural killer – mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias : evidence for the involvement of the Poliovirus receptor ( CD155 ) and Nectin-2 ( CD112 ). 105:2066–2073. doi:10.1182/blood-2004-09-3548.Supported.
- Peng, Y., C. Xi, Y. Zhu, L. Yin, und J. Wei. 2016. Altered expression of CD226 and CD96 on natural killer cells in patients with pancreatic cancer. *Oncotarget*. doi:10.18632/oncotarget.11953.
- Petersdorf, S.H., K.J. Kopecky, M. Slovak, C. Willman, T. Nevill, J. Brandwein, R.A. Larson, H.P. Erba, P.J. Stiff, R.K. Stuart, R.B. Walter, M.S. Tallman, L. Stenke, und F.R. Appelbaum. 2013. A phase 3 study of gemtuzumab ozogamicin during induction and postconsolidation therapy in younger patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 121:4854–60. doi:10.1182/blood-2013-01-466706.
- Pezzetti, F., A. Palmieri, M. Martinelli, L. Scapoli, M. Arlotti, U. Baciliero, E. Padula, P. Carinci, E. Caramelli, und F. Carinci. 2007. Linkage disequilibrium analysis of two genes mapping on OFC3: PVR and PVRL2. *Eur. J. Hum. Genet.* 15:992–994. doi:10.1038/sj.ejhg.5201868.
- Pizzitola, I., F. Anjos-Afonso, K. Rouault-Pierre, F. Lassailly, S. Tettamanti, O. Spinelli, A. Biondi, E. Biagi, und D. Bonnet. 2014. Chimeric antigen receptors against CD33/CD123 antigens efficiently target primary acute myeloid leukemia cells in vivo. *Leukemia*. 28:1596–1605. doi:10.1038/leu.2014.62.
- Postow, M.A., J. Chesney, A.C. Pavlick, C. Robert, K. Grossmann, D. McDermott, G.P. Linette, N. Meyer, J.K. Giguere, S.S. Agarwala, M. Shaheen, M.S. Ernstoff, D. Minor, A.K. Salama, M. Taylor, P.A. Ott, L.M. Rollin, C. Horak, P. Gagnier, J.D. Wolchok, und F.S. Hodi. 2015. Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *N. Engl. J. Med.* 372:2006–17. doi:10.1056/NEJMoa1414428.
- Purbhoo, M., D. Irvine, J. Huppa, und M. Davis. 2004. T cell killing does not require the formation of a stable mature immunological synapse. *Nat Immunol.* 5:524–530. doi:10.1038/ni1058.
- Qu, P., X. Huang, X. Zhou, Z. Lü, F. Liu, Z. Shi, L. Lü, Y. Wu, und Y. Chen. 2014. Loss of CD155 expression predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients. *Histopathology*. 706–714. doi:10.1111/his.12584.
- Rajvanshi, P., H.M. Shulman, E.L. Sievers, und G.B. McDonald. 2002. Hepatic sinusoidal obstruction after gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) therapy. *Blood*. 99:2310–4.
- Ramagopalan, S. V, G.C. Deluca, K.M. Morrison, B.M. Herrera, D.A. Dymont, S. Orton, M.T. Bihoreau, A. Degenhardt, M. Pugliatti, A.D. Sadovnick, S. Sotgiu, und G.C. Ebers. 2007. No effect of APOE

- and PVRL2 on the clinical outcome of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 186:156–160. doi:10.1016/j.jneuroim.2007.02.003.
- Ramos, N.R., C.C. Mo, J.E. Karp, und C.S. Hourigan. 2015. Current Approaches in the Treatment of Relapsed and Refractory Acute Myeloid Leukemia. *J. Clin. Med.* 4:665–95. doi:10.3390/jcm4040665.
- Ran, F.A., P.D. Hsu, J. Wright, V. Agarwala, D.A. Scott, und F. Zhang. 2013. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 8:2281–2308. doi:10.1038/nprot.2013.143.
- Randhawa, J.K., H.M. Kantarjian, G. Borthakur, P.A. Thompson, M. Konopleva, N. Daver, N. Pemmaraju, E. Jabbour, T.M. Kadia, Z. Estrov, A. Ramachandran, J. Paradela, M. Andreef, M. Levis, F. Ravandi, und J.E. Cortes. 2014. Results of a Phase II Study of Crenolanib in Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia Patients (Pts) with Activating FLT3 Mutations. *Blood.* 124:389 LP-389.
- Ravandi, F., E.H. Estey, F.R. Appelbaum, F. Lo-Coco, C.A. Schiffer, R.A. Larson, A.K. Burnett, und H.M. Kantarjian. 2012. Gemtuzumab Ozogamicin: Time to Resurrect? *J. Clin. Oncol.* 30:3921–3923. doi:10.1200/JCO.2012.43.0132.
- Ray, M., D.R. Hostetter, C.R.K. Loeb, J. Simko, und C.S. Craik. 2012. Inhibition of Granzyme B by PI-9 protects prostate cancer cells from apoptosis. *Prostate.* 72:846–55. doi:10.1002/pros.21486.
- Reymond, N., A.-M. Imbert, E. Devilard, S. Fabre, C. Chabannon, L. Xerri, C. Farnarier, C. Cantoni, C. Bottino, A. Moretta, P. Dubreuil, und M. Lopez. 2004. DNAM-1 and PVR regulate monocyte migration through endothelial junctions. *J. Exp. Med.* 199:1331–41. doi:10.1084/jem.20032206.
- Rezvani, K., A.S.M. Yong, S. Mielke, B.N. Savani, L. Musse, J. Superata, B. Jafarpour, C. Boss, und A.J. Barrett. 2008. Leukemia-associated antigen-specific T-cell responses following combined PR1 and WT1 peptide vaccination in patients with myeloid malignancies. *Blood.* 111:236–42. doi:10.1182/blood-2007-08-108241.
- Rosche, B., S. Cepok, S. Stei, F. Vogel, V. Grummel, S. Hoffmann, A. Kroner, M. Mäurer, P. Rieckmann, N. Sommer, und B. Hemmer. 2004. The role of the polio virus receptor and the herpesvirus entry mediator B genes for the development of MS. *J. Neuroimmunol.* 156:171–7. doi:10.1016/j.jneuroim.2004.07.001.
- Rosenberg, S.A., R.M. Sherry, K.E. Morton, W.J. Scharfman, J.C. Yang, S.L. Topalian, R.E. Royal, U. Kammula, N.P. Restifo, M.S. Hughes, D. Schwartzentruber, D.M. Berman, S.L. Schwarz, L.T. Ngo, S.A. Mavroukakis, D.E. White, und S.M. Steinberg. 2005. Tumor progression can occur despite the induction of very high levels of self/tumor antigen-specific CD8+ T cells in patients with melanoma. *J. Immunol.* 175:6169–76.
- Roskopf, C.C., T.A. Braciak, N.C. Fenn, S. Kobold, G.H. Fey, K.-P. Hopfner, und F.S. Oduncu. 2016. Dual-targeting triplebody 33-3-19 mediates selective lysis of biphenotypic CD19+ CD33+ leukemia cells. *Oncotarget.* 7:22579–89. doi:10.18632/oncotarget.8022.
- Roux, C., K. Tifratene, G. Socié, C. Galambrun, Y. Bertrand, F. Rialland, C. Jubert, C. Pochon, C. Paillard, A. Sirvent, B. Nelken, J.P. Vannier, C. Freycon, Y. Beguin, N. Raus, I. Yakoub-Agha, M. Mohty, J.-H. Dalle, G. Michel, C. Pradier, R. Peffault de Latour, und P.-S. Rohrlich. 2017. Outcome after failure of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children with acute leukemia: a study by the société Francophone de greffe de moelle et de thérapie cellulaire (SFGM-TC). *Bone Marrow Transplant.* 52:678–682. doi:10.1038/bmt.2016.360.
- Ruggeri, L., M. Capanni, E. Urbani, K. Perruccio, W.D. Shlomchik, A. Tosti, S. Posati, D. Rogaia, F. Frassoni, F. Aversa, M.F. Martelli, und A. Velardi. 2002. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science.* 295:2097–2100. doi:10.1126/science.1068440.

- Sakisaka, T., und Y. Takai. 2004. Biology and pathology of nectins and nectin-like molecules. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16:513–21. doi:10.1016/j.ceb.2004.07.007.
- Samanta, D., H. Guo, R. Rubinstein, U.A. Ramagopal, und S.C. Almo. 2017. Structural, mutational and biophysical studies reveal a canonical mode of molecular recognition between immune receptor TIGIT and nectin-2. *Mol. Immunol.* 81:151–159. doi:10.1016/j.molimm.2016.12.003.
- Samanta, D., U.A. Ramagopal, R. Rubinstein, V. Vigdorovich, S.G. Nathenson, und S.C. Almo. 2012. Structure of Nectin-2 reveals determinants of homophilic and heterophilic interactions that control cell-cell adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109:14836–40. doi:10.1073/pnas.1212912109.
- Sanchez-Correa, B., I. Gayoso, J.M. Bergua, J.G. Casado, S. Morgado, R. Solana, und R. Tarazona. 2012. Decreased expression of DNAM-1 on NK cells from acute myeloid leukemia patients. *Immunol. Cell Biol.* 90:109–115. doi:10.1038/icb.2011.15.
- Sander, J.D., und J.K. Joung. 2014. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat. Biotechnol.* 32:347–55. doi:10.1038/nbt.2842.
- Sanderson, C.J., und A.M. Glauert. 1979. The mechanism of T-cell mediated cytotoxicity. VI. T-cell projections and their role in target cell killing. *Immunology.* 36:119–29.
- Schlenk, R.F. 2014. Post-remission therapy for acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 99.
- Schneider, H., J. Downey, A. Smith, B.H. Zinselmeyer, C. Rush, J.M. Brewer, B. Wei, N. Hogg, P. Garside, und C.E. Rudd. 2006. Reversal of the TCR stop signal by CTLA-4. *Science.* 313:1972–5. doi:10.1126/science.1131078.
- Schreiber, R.D., L.J. Old, und M.J. Smyth. 2011. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science (80- )*. 331:1565–1570. doi:10.1126/science.1203486.
- Schwarz, J.M., D.N. Cooper, M. Schuelke, und D. Seelow. 2014. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat. Methods.* 11:361–2. doi:10.1038/nmeth.2890.
- Seidel, U.J.E., P. Schlegel, und P. Lang. 2013. Natural killer cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in tumor immunotherapy with therapeutic antibodies. *Front. Immunol.* 4:76. doi:10.3389/fimmu.2013.00076.
- Semenova, E., M.M. Jore, K.A. Datsenko, A. Semenova, E.R. Westra, B. Wanner, J. van der Oost, S.J.J. Brouns, und K. Severinov. 2011. Interference by clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) RNA is governed by a seed sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108:10098–103. doi:10.1073/pnas.1104144108.
- Sen, D.R., J. Kaminski, R.A. Barnitz, M. Kurachi, U. Gerdemann, K.B. Yates, H.-W. Tsao, J. Godec, M.W. LaFleur, F.D. Brown, P. Tonnerre, R.T. Chung, D.C. Tully, T.M. Allen, N. Frahm, G.M. Lauer, E.J. Wherry, N. Yosef, und W.N. Haining. 2016. The epigenetic landscape of T cell exhaustion. *Science.* 354:1165–1169. doi:10.1126/science.aae0491.
- Shankaran, V., H. Ikeda, A.T. Bruce, J.M. White, P.E. Swanson, L.J. Old, und R.D. Schreiber. 2001. IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature.* 410:1107–11. doi:10.1038/35074122.
- Shao, Z., F. Sun, D.R. Koh, und H. Schwarz. 2008. Characterisation of soluble murine CD137 and its association with systemic lupus. *Mol. Immunol.* 45:3990–9. doi:10.1016/j.molimm.2008.05.028.
- Shen, B., W. Zhang, J. Zhang, J. Zhou, J. Wang, L. Chen, L. Wang, A. Hodgkins, V. Iyer, X. Huang, und W.C. Skarnes. 2014. Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-

- target effects. *Nat. Methods*. 11:399–402. doi:10.1038/nmeth.2857.
- Shenghui, Z., H. Yixiang, W. Jianbo, Y. Kang, B. Laixi, Z. Yan, und X. Xi. 2011. Elevated frequencies of CD4+CD25+CD127<sup>lo</sup> regulatory T cells is associated to poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia. *Int. J. Cancer*. 129:1373–1381. doi:10.1002/ijc.25791.
- Shibuya, A., D. Campbell, C. Hannum, H. Yssel, K. Franz-Bacon, T. McClanahan, T. Kitamura, J. Nicholl, G.R. Sutherland, L.L. Lanier, und J.H. Phillips. 1996. DNAM-1, A Novel Adhesion Molecule Involved in the Cytolytic Function of T Lymphocytes. *Immunity*. 4:573–581. doi:10.1016/S1074-7613(00)70060-4.
- Shlush, L.I., S. Zandi, A. Mitchell, W.C. Chen, J.M. Brandwein, V. Gupta, J.A. Kennedy, A.D. Schimmer, A.C. Schuh, K.W. Yee, J.L. McLeod, M. Doedens, J.J.F. Medeiros, R. Marke, H.J. Kim, K. Lee, J.D. McPherson, T.J. Hudson, HALT Pan-Leukemia Gene Panel Consortium, A.M.K. Brown, F. Yousif, Q.M. Trinh, L.D. Stein, M.D. Minden, J.C.Y. Wang, und J.E. Dick. 2014. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature*. 506:328–33. doi:10.1038/nature13038.
- Sievers, E.L., R.A. Larson, E.A. Stadtmauer, E. Estey, B. Löwenberg, H. Dombret, C. Karanes, M. Theobald, J.M. Bennett, M.L. Sherman, M.S. Berger, C.B. Eten, M.R. Loken, J.J. van Dongen, I.D. Bernstein, F.R. Appelbaum, und Mylotarg Study Group. 2001. Efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first relapse. *J. Clin. Oncol.* 19:3244–54. doi:10.1200/JCO.2001.19.13.3244.
- Simpson, T.R., F. Li, W. Montalvo-Ortiz, M.A. Sepulveda, K. Bergerhoff, F. Arce, C. Roddie, J.Y. Henry, H. Yagita, J.D. Wolchok, K.S. Peggs, J. V Ravetch, J.P. Allison, und S.A. Quezada. 2013. Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J. Exp. Med.* 210:1695–710. doi:10.1084/jem.20130579.
- Smith, B.D., G.J. Roboz, R.B. Walter, J.K. Altman, A. Ferguson, T.J. Curcio, K.F. Orlowski, L. Garrett, S.J. Busfield, M. Barnden, B. Sedgmen, S. Ghosh, S. Hosback, R. Davis, A. Dyson, S. Dasen, M. DeWitte, D.M. Bensen-Kennedy, und A.W. Roberts. 2014a. First-in Man, Phase 1 Study of CSL362 (Anti-IL3R $\alpha$  / Anti-CD123 Monoclonal Antibody) in Patients with CD123+ Acute Myeloid Leukemia (AML) in CR at High Risk for Early Relapse. *Blood*. 124:120 LP-120.
- Smith, C.C., E.A. Lasater, K.C. Lin, Q. Wang, M.Q. McCreery, W.K. Stewart, L.E. Damon, A.E. Perl, G.R. Jeschke, M. Sugita, M. Carroll, S.C. Kogan, J. Kuriyan, und N.P. Shah. 2014b. Crenolanib is a selective type I pan-FLT3 inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111:5319–24. doi:10.1073/pnas.1320661111.
- Soong, T.W., und K.M. Hui. 1992. Locus-specific transcriptional control of HLA genes. *J. Immunol.* 149:2008–20.
- Soriani, A., A. Zingoni, C. Cerboni, M.L. Lannitto, M.R. Ricciardi, V. Di Gialleonardo, M. Cippitelli, C. Fionda, M.T. Petrucci, A. Guarini, R. Foà, A. Santoni, M.L. Iannitto, M.R. Ricciardi, V. Di Gialleonardo, M. Cippitelli, C. Fionda, M.T. Petrucci, A. Guarini, R. Foà, und A. Santoni. 2009. ATM-ATR-dependent up-regulation of DNAM-1 and NKG2D ligands on multiple myeloma cells by therapeutic agents results in enhanced NK-cell susceptibility and is associated with a senescent phenotype. *Blood*. 113:3503–3511. doi:10.1182/blood-2008-08-173914.
- Soriano, C., V. Mukaro, G. Hodge, J. Ahern, M. Holmes, H. Jersmann, D. Moffat, D. Meredith, C. Jurisevic, P.N. Reynolds, und S. Hodge. 2012. Increased proteinase inhibitor-9 (PI-9) and reduced granzyme B in lung cancer: mechanism for immune evasion? *Lung Cancer*. 77:38–45. doi:10.1016/j.lungcan.2012.01.017.
- Sorrer, M.L., R.F. Storb, B.M. Sandmaier, R.T. Maziarz, M.A. Pulsipher, M.B. Maris, S. Bhatia, F. Ostronoff, H.J. Deeg, K.L. Syrjala, E. Estey, D.G. Maloney, F.R. Appelbaum, P.J. Martin, und B.E.

- Storer. 2014. Comorbidity-age index: a clinical measure of biologic age before allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J. Clin. Oncol.* 32:3249–56. doi:10.1200/JCO.2013.53.8157.
- Sözen, M.A., J.T. Hecht, und R.A. Spritz. 2009. Mutation and association analysis of the PVR and PVRL2 genes in patients with non-syndromic cleft lip and palate. *Genet. Mol. Biol.* 32:466–9. doi:10.1590/S1415-47572009000300007.
- Springer, T.A. 1990. Adhesion receptors of the immune system. *Nature.* 346:425–34. doi:10.1038/346425a0.
- Stanietsky, N., T.L. Ravis, A. Glasner, E. Seidel, P. Tsukerman, R. Yamin, J. Enk, S. Jonjic, und O. Mandelboim. 2013. Mouse TIGIT inhibits NK-cell cytotoxicity upon interaction with PVR. *Eur. J. Immunol.* 43:2138–50. doi:10.1002/eji.201243072.
- Stanietsky, N., H. Simic, J. Arapovic, A. Toporik, O. Levy, A. Novik, Z. Levine, M. Beiman, L. Dassa, H. Achdout, N. Stern-Ginossar, P. Tsukerman, S. Jonjic, und O. Mandelboim. 2009. The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106:17858–17863. doi:10.1073/pnas.0903474106.
- Stengel, K.F., K. Harden-Bowles, X. Yu, L. Rouge, J. Yin, L. Comps-Agrar, C. Wiesmann, J.F. Bazan, D.L. Eaton, und J.L. Grogan. 2012. Structure of TIGIT immunoreceptor bound to poliovirus receptor reveals a cell-cell adhesion and signaling mechanism that requires cis-trans receptor clustering. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109:5399–5404. doi:10.1073/pnas.1120606109.
- Stockholm, D., R. Benchaouir, J. Picot, P. Rameau, T.M.A. Neildez, G. Landini, C. Laplace-Builhé, und A. Paldi. 2007. The origin of phenotypic heterogeneity in a clonal cell population in vitro. *PLoS One.* 2:e394. doi:10.1371/journal.pone.0000394.
- Stone, R.M., S. Mandrekar, B.L. Sanford, S. Geyer, C.D. Bloomfield, K. Dohner, C. Thiede, G. Marcucci, F. Lo-Coco, R.B. Klisovic, A. Wei, J. Sierra, M.A. Sanz, J.M. Brandwein, T. de Witte, D. Niederwieser, F.R. Appelbaum, B.C. Medeiros, M.S. Tallman, J. Krauter, R.F. Schlenk, A. Ganser, H. Serve, G. Ehninger, S. Amadori, R.A. Larson, und H. Dohner. 2015. The Multi-Kinase Inhibitor Midostaurin (M) Prolongs Survival Compared with Placebo (P) in Combination with Daunorubicin (D)/Cytarabine (C) Induction (ind), High-Dose C Consolidation (consol), and As Maintenance (maint) Therapy in Newly Diagnosed Acute Mye. *Blood.* 126:6 LP-6.
- Sun, J., C.H. Bird, V. Sutton, L. McDonald, P.B. Coughlin, T.A. De Jong, J.A. Trapani, und P.I. Bird. 1996. A cytosolic granzyme B inhibitor related to the viral apoptotic regulator cytokine response modifier A is present in cytotoxic lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 271:27802–9.
- Sweet, K.L., N. Pemmaraju, A.A. Lane, A.S. Stein, S. Vasu, W. Blum, D.A. Rizzieri, E.S. Wang, E.K. Rowinsky, M. Szarek, C.L. Brooks, S. Disalvatore, D. Liu, M. Duvic, J.D. Schwartz, und M. Konopleva. 2015. Lead-in Stage Results of a Pivotal Trial of SL-401, an Interleukin-3 Receptor (IL-3R) Targeting Biologic, in Patients with Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm (BPDCN) or Acute Myeloid Leukemia (AML). *Blood.* 126:3795 LP-3795.
- Szczepanski, M.J., M. Szajnik, M. Czystowska, M. Mandapathil, L. Strauss, A. Welsh, K.A. Foon, T.L. Whiteside, und M. Boyiadzis. 2009. Increased frequency and suppression by regulatory T cells in patients with acute myelogenous leukemia. *Clin. Cancer Res.* 15:3325–3332. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-3010.
- Szczepanski, M.J., M. Szajnik, A. Welsh, K.A. Foon, T.L. Whiteside, und M. Boyiadzis. 2010. Interleukin-15 enhances natural killer cell cytotoxicity in patients with acute myeloid leukemia by upregulating the activating NK cell receptors. *Cancer Immunol. Immunother.* 59:73–79. doi:10.1007/s00262-009-0724-5.
- Tahara-Hanaoka, S., K. Shibuya, H. Kai, A. Miyamoto, Y. Morikawa, N. Ohkochi, S. Honda, und A.

- Shibuya. 2006. Tumor rejection by the poliovirus receptor family ligands of the DNAM-1 (CD226) receptor. *Blood*. 107:1491–6. doi:10.1182/blood-2005-04-1684.
- Takahashi, N., M. Sugaya, H. Suga, T. Oka, M. Kawaguchi, T. Miyagaki, H. Fujita, T. Inozume, und S. Sato. 2017. Increased Soluble CD226 in Sera of Patients with Cutaneous T-Cell Lymphoma Mediating Cytotoxic Activity against Tumor Cells via CD155. *J. Invest. Dermatol.* doi:10.1016/j.jid.2017.03.025.
- Takei, N., A. Miyashita, T. Tsukie, H. Arai, T. Asada, M. Imagawa, M. Shoji, S. Higuchi, K. Urakami, H. Kimura, A. Kakita, H. Takahashi, S. Tsuji, I. Kanazawa, Y. Ihara, S. Odani, und R. Kuwano. 2009. Genetic association study on in and around the APOE in late-onset Alzheimer disease in Japanese. *Genomics*. 93:441–448. doi:10.1016/j.ygeno.2009.01.003.
- Talmud, P.J., F. Drenos, S. Shah, T. Shah, J. Palmen, C. Verzilli, T.R. Gaunt, J. Pallas, R. Lovering, K. Li, J.P. Casas, R. Sofat, M. Kumari, S. Rodriguez, T. Johnson, S.J. Newhouse, A. Dominiczak, N.J. Samani, M. Caulfield, P. Sever, A. Stanton, D.C. Shields, S. Padmanabhan, O. Melander, C. Hastie, C. Delles, S. Ebrahim, M.G. Marmot, G.D. Smith, D.A. Lawlor, P.B. Munroe, I.N. Day, M. Kivimaki, J. Whittaker, S.E. Humphries, A.D. Hingorani, ASCOT investigators, NORDIL investigators, und BRIGHT Consortium. 2009. Gene-centric association signals for lipids and apolipoproteins identified via the HumanCVD BeadChip. *Am. J. Hum. Genet.* 85:628–42. doi:10.1016/j.ajhg.2009.10.014.
- Taube, J.M., R.A. Anders, G.D. Young, H. Xu, R. Sharma, T.L. McMiller, S. Chen, A.P. Klein, D.M. Pardoll, S.L. Topalian, und L. Chen. 2012. Colocalization of Inflammatory Response with B7-H1 Expression in Human Melanocytic Lesions Supports an Adaptive Resistance Mechanism of Immune Escape. *Sci. Transl. Med.* 4:127ra37-127ra37. doi:10.1126/scitranslmed.3003689.
- Tauriainen, J., L. Scharf, J. Frederiksen, A. Naji, H.-G. Ljunggren, A. Sönnernborg, O. Lund, G. Reyes-Terán, F.M. Hecht, S.G. Deeks, M.R. Betts, M. Buggert, und A.C. Karlsson. 2017. Perturbed CD8+ T cell TIGIT/CD226/PVR axis despite early initiation of antiretroviral treatment in HIV infected individuals. *Sci. Rep.* 7:40354. doi:10.1038/srep40354.
- Tischer, J., N. Engel, S. Fritsch, D. Prevalsek, M. Hubmann, C. Schulz, A.K. Zoellner, V. Bücklein, S. Lippl, R. Reibke, C.T. Rieger, G. Ledderose, H.J. Stemmler, W. Hiddemann, C. Schmid, und A. Hausmann. 2014. Second haematopoietic SCT using HLA-haploidentical donors in patients with relapse of acute leukaemia after a first allogeneic transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 49:895–901. doi:10.1038/bmt.2014.83.
- Topalian, S.L., F.S. Hodi, J.R. Brahmer, S.N. Gettinger, D.C. Smith, D.F. McDermott, J.D. Powderly, R.D. Carvajal, J.A. Sosman, M.B. Atkins, P.D. Leming, D.R. Spigel, S.J. Antonia, L. Horn, C.G. Drake, D.M. Pardoll, L. Chen, W.H. Sharfman, R.A. Anders, J.M. Taube, T.L. McMiller, H. Xu, A.J. Korman, M. Jure-Kunkel, S. Agrawal, D. McDonald, G.D. Kollia, A. Gupta, J.M. Wigginton, und M. Sznol. 2012. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *N. Engl. J. Med.* 366:2443–2454. doi:10.1056/NEJMoa1200690.
- Töpfer, K., S. Kempe, N. Müller, M. Schmitz, M. Bachmann, M. Cartellieri, G. Schackert, und A. Temme. 2011. Tumor Evasion from T Cell Surveillance. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011:1–19. doi:10.1155/2011/918471.
- Tseng, D., J.-P. Volkmer, S.B. Willingham, H. Contreras-Trujillo, J.W. Fathman, N.B. Fernhoff, J. Seita, M.A. Inlay, K. Weiskopf, M. Miyanishi, und I.L. Weissman. 2013. Anti-CD47 antibody-mediated phagocytosis of cancer by macrophages primes an effective antitumor T-cell response. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110:11103–11108. doi:10.1073/pnas.1305569110.
- Tseng, S.-Y., J.C. Waite, M. Liu, S. Vardhana, und M.L. Dustin. 2008. T cell-dendritic cell immunological synapses contain TCR-dependent CD28-CD80 clusters that recruit protein kinase C theta. *J.*

- Immunol.* 181:4852–63.
- Ueda, H., M.K. Morphey, J.R. McIntosh, und M.M. Davis. 2011. CD4+ T-cell synapses involve multiple distinct stages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108:17099–104. doi:10.1073/pnas.1113703108.
- Uttenthal, B., I. Martinez-Davila, A. Ivey, C. Craddock, F. Chen, A. Virchis, P. Kottaridis, D. Grimwade, A. Khwaja, H. Stauss, und E.C. Morris. 2014. Wilms' Tumour 1 (WT1) peptide vaccination in patients with acute myeloid leukaemia induces short-lived WT1-specific immune responses. *Br. J. Haematol.* 164:366–375. doi:10.1111/bjh.12637.
- Vandenabeele, P., K. Vandecasteele, C. Bachert, O. Krysko, und D. V Krysko. 2016. Immunogenic Apoptotic Cell Death and Anticancer Immunity. *Adv. Exp. Med. Biol.* 930:133–49. doi:10.1007/978-3-319-39406-0\_6.
- Verhaak, R.G.W., B.J. Wouters, C.A.J. Erpelink, S. Abbas, H.B. Beverloo, S. Lugthart, B. Lowenberg, R. Delwel, und P.J.M. Valk. 2009. Prediction of molecular subtypes in acute myeloid leukemia based on gene expression profiling. *Haematologica.* 94:131–134. doi:10.3324/haematol.13299.
- Vesely, M.D., M.H. Kershaw, R.D. Schreiber, und M.J. Smyth. 2011. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu. Rev. Immunol.* 29:235–71. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101324.
- Vilches, C., und P. Parham. 2002. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 20:217–51. doi:10.1146/annurev.immunol.20.092501.134942.
- Villard, J. 2011. The role of natural killer cells in human solid organ and tissue transplantation. *J. Innate Immun.* 3:395–402. doi:10.1159/000324400.
- Walter, R.B., und E.H. Estey. 2015. Management of older or unfit patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 29:770–775. doi:10.1038/leu.2014.216.
- Wang, B., Y.Y. Lau, M. Liang, I. Vainshtein, M. Zusmanovich, H. Lu, F. Magrini, M. Sleeman, und L. Roskos. 2012. Mechanistic modeling of antigen sink effect for mavrilimumab following intravenous administration in patients with rheumatoid arthritis. *J. Clin. Pharmacol.* 52:1150–61. doi:10.1177/0091270011412964.
- Wang, F., H. Hou, S. Wu, Q. Tang, W. Liu, M. Huang, B. Yin, J. Huang, L. Mao, Y. Lu, und Z. Sun. 2015a. TIGIT expression levels on human NK cells correlate with functional heterogeneity among healthy individuals. *Eur. J. Immunol.* 45:2886–2897. doi:10.1002/eji.201545480.
- Wang, H., Z. Zhang, M. Fan, L. Wang, und G. Dong. 2010. [Expression of CD112 in colon carcinoma tissues and cell lines and their clinical significance]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* 26:477–9.
- Wang, P.L., S. O'Farrell, C. Clayberger, und A.M. Krensky. 1992. Identification and molecular cloning of tactile. A novel human T cell activation antigen that is a member of the Ig gene superfamily. *J. Immunol.* 148:2600–8.
- Wang, W., A.K. Erbe, J.A. Hank, Z.S. Morris, und P.M. Sondel. 2015b. NK cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in cancer immunotherapy. *Front. Immunol.* 6. doi:10.3389/fimmu.2015.00368.
- Warrington, A. 2006. Genetic evidence for the role of loci at 19q13 in cleft lip and palate. *J. Med. Genet.* 43:e26–e26. doi:10.1136/jmg.2005.034785.
- Wayteck, L., K. Breckpot, J. Demeester, S.C. De Smedt, und K. Raemdonck. 2014. A personalized view on cancer immunotherapy. *Cancer Lett.* 352:113–125. doi:10.1016/j.canlet.2013.09.016.
- Weber, K., U. Bartsch, C. Stocking, und B. Fehse. 2008. A multicolor panel of novel lentiviral „gene

- ontology“ (LeGO) vectors for functional gene analysis. *Mol. Ther.* 16:698–706. doi:10.1038/mt.2008.6.
- Wherry, E.J. 2011. T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* 12:492–499. doi:10.1038/ni.2035.
- Wherry, E.J., J.N. Blattman, K. Murali-Krishna, R. van der Most, und R. Ahmed. 2003. Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J. Virol.* 77:4911–27.
- Wherry, E.J., und M. Kurachi. 2015. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat. Rev. Immunol.* 15:486–499. doi:10.1038/nri3862.
- Wiedemann, A., D. Depoil, M. Faroudi, und S. Valitutti. 2006. Cytotoxic T lymphocytes kill multiple targets simultaneously via spatiotemporal uncoupling of lytic and stimulatory synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:10985–90. doi:10.1073/pnas.0600651103.
- Wolchok, J.D., H. Kluger, M.K. Callahan, M. a Postow, N. a Rizvi, A.M. Lesokhin, N.H. Segal, C.E. Ariyan, R.-A. Gordon, K. Reed, M.M. Burke, A. Caldwell, S. a Kronenberg, B.U. Agunwamba, X. Zhang, I. Lowy, H.D. Inzunza, W. Feely, C.E. Horak, Q. Hong, A.J. Korman, J.M. Wigginton, A. Gupta, und M. Sznol. 2013. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N. Engl. J. Med.* 369:122–33. doi:10.1056/NEJMoa1302369.
- Xie, J., C.M. Tato, und M.M. Davis. 2013. How the immune system talks to itself: the varied role of synapses. *Immunol. Rev.* 251:65–79. doi:10.1111/imr.12017.
- Yanada, M., K. Matsuo, N. Emi, und T. Naoe. 2005. Efficacy of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation depends on cytogenetic risk for acute myeloid leukemia in first disease remission: a metaanalysis. *Cancer.* 103:1652–8. doi:10.1002/cncr.20945.
- Yáñez-Muñoz, R.J., K.S. Balaggan, A. MacNeil, S.J. Howe, M. Schmidt, A.J. Smith, P. Buch, R.E. MacLaren, P.N. Anderson, S.E. Barker, Y. Duran, C. Bartholomae, C. von Kalle, J.R. Heckenlively, C. Kinnon, R.R. Ali, und A.J. Thrasher. 2006. Effective gene therapy with nonintegrating lentiviral vectors. *Nat. Med.* 12:348–353. doi:10.1038/nm1365.
- Yokosuka, T., W. Kobayashi, K. Sakata-Sogawa, M. Takamatsu, A. Hashimoto-Tane, M.L. Dustin, M. Tokunaga, und T. Saito. 2008. Spatiotemporal regulation of T cell costimulation by TCR-CD28 microclusters and protein kinase C theta translocation. *Immunity.* 29:589–601. doi:10.1016/j.immuni.2008.08.011.
- Yu, P., J.C. Steel, M. Zhang, J.C. Morris, und T.A. Waldmann. 2010. Simultaneous blockade of multiple immune system inhibitory checkpoints enhances antitumor activity mediated by interleukin-15 in a murine metastatic colon carcinoma model. *Clin. Cancer Res.* 16:6019–28. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1966.
- Yu, X., K. Harden, L. C Gonzalez, M. Francesco, E. Chiang, B. Irving, I. Tom, S. Ivelja, C.J. Refino, H. Clark, D. Eaton, und J.L. Grogan. 2009. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat. Immunol.* 10:48–57. doi:10.1038/ni.1674.
- Zarour, H.M. 2016. Reversing T-cell Dysfunction and Exhaustion in Cancer. *Clin. Cancer Res.* 22:1856–1864. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-1849.
- Zhang, B., W. Zhao, H. Li, Y. Chen, H. Tian, L. Li, L. Zhang, C. Gao, und J. Zheng. 2016. Immunoreceptor TIGIT inhibits the cytotoxicity of human cytokine-induced killer cells by interacting with CD155. *Cancer Immunol. Immunother.* 65:305–314. doi:10.1007/s00262-016-1799-4.
- Zhang, L., T.F. Gajewski, und J. Kline. 2009. PD-1/PD-L1 interactions inhibit antitumor immune responses in a murine acute myeloid leukemia model. *Blood.* 114:1545–52. doi:10.1182/blood-

2009-03-206672.

- Zhou, Q., M.E. Munger, R.G. Veenstra, B.J. Weigel, M. Hirashima, D.H. Munn, W.J. Murphy, M. Azuma, A.C. Anderson, V.K. Kuchroo, und B.R. Blazar. 2011. Coexpression of Tim-3 and PD-1 identifies a CD8<sup>+</sup> T-cell exhaustion phenotype in mice with disseminated acute myelogenous leukemia. *Blood*. 117:4501–4510. doi:10.1182/blood-2010-10-310425.
- Zhu, Y., A. Paniccia, A.C. Schulick, W. Chen, M.R. Koenig, J.T. Byers, S. Yao, S. Bevers, und B.H. Edil. 2016. Identification of CD112R as a novel checkpoint for human T cells. *J. Exp. Med.* 213:167–176. doi:10.1084/jem.20150785.
- Zhu, Y., S. Yao, und L. Chen. 2011. Cell Surface Signaling Molecules in the Control of Immune Responses: A Tide Model. *Immunity*. 34:466–478. doi:10.1016/j.immuni.2011.04.008.

## 8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µg	Mikrogramm
(HD-)PBMC	<i>(healty donor) peripheral blood mononuclear cell</i>
7AAD	7-Aminoactinomycin D
AAA	AML-assoziertes Antigen
ADCC	<i>Antibody dependent cellular cytotoxicity</i>
AIRE	<i>Autoimmune regulator</i>
allo-HSCT	<i>Allogenic hematopoietic stem cell transplantation</i>
AML	Akute myeloische Leukämie
AP	<i>Alkaline Phosphatase</i>
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
APC	<i>Antigen presenting cell</i>
APL	Akute Promyelozten Leukämie
ASNA	AML-spezifisches Neoantigen
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BiTE®	<i>Bispecific T cell Engager</i>
bp	<i>base pair</i>
BTLA	<i>B- and T-lymphocyte attenuator</i>
BZR	B-Zell-Rezeptor
CAR-T	<i>chimeric antigen-reactive T cell</i>
Cas	<i>CRISPR-associated</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDN	Cyclisches Dinukleotid
CMFDA	5-Chlormethylfluoresceindiacetat
CR	<i>Complete remission</i>
CRISPR	<i>Clustered regulary interspaced short palindromic repeats</i>
CTL	<i>Cytotoxic T cell</i>
CTLA4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4</i>
CXCL/CCL	<i>Chemokine motif ligands</i>
DAG	Diacylglycerol
DAMPs	<i>Damage-associated molecular patterns</i>
DC	<i>Dendritic cell</i>
DISC	<i>Death-inducing signaling complex</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNAM	<i>DNAX accessory molecule-1</i>
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	<i>Endotoxin free</i>
EFS	Event free survival
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ELN	<i>European LeukemiaNet</i>
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FACS	<i>Fluorescence activated cell scanning/sorting</i>
FasL	Fas-Ligand
FasR	Fas-Rezeptor

FBS	Fötales bovines Serum
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLT-3	<i>Fms related like tyrosine kinase 3</i>
GITR	<i>Glucocorticoid-induced TNFR family-related gene</i>
Grb	<i>Growth factor receptor-bound</i>
GvHD	<i>Graftversus host disease</i>
GvL	<i>Graft versus leukemia</i>
HC	Hydrocortison
HMGB1	High-mobility group protein B1
HS	<i>Horse Serum</i>
HSP	<i>Heat shock protein</i>
HVEM	<i>Herpes virus entry mediator</i>
ICAM-1	<i>Intracellular adhesion molecule 1</i>
ICM	Immuncheckpoint Molekül
IDO	Indoleamin-2,3-Dioxygenase
IgV	Immunglobulin <i>variable-set</i>
IL	Interleukin
INDELS	<i>Insertion and delitions</i>
INF	Interferon
IP3	Inositol-1,4,5-trisphospat
IS	Immunologische Synapse
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>
ITT	<i>Immunoglobulin tyrosine tail</i>
IVC	<i>Individually ventilated cages</i>
kb	Kilobase
Kg	Kilogramm
KI	Konfidenzintervall
LAG-3	<i>Lymphocyte-activation gene 3 protein</i>
LAT	<i>Linker for activation of T-cells</i>
LFA1	<i>Lymphocyte function-associated antigen-1</i>
M	Molar
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MFI	<i>Median fluorescence intensity</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MIC	<i>MHC class I polypeptide-related sequence protein</i>
MIT	<i>Massachusetts Institute of Technology</i>
mL	Milliliter
MRD	<i>Minimal residual disease</i>
MTOC	<i>Microtubule organizing center</i>
NECL	<i>Nectin-like</i>
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T cells</i>
NFκB	<i>Nuclear factor κB</i>
ng	Nanogramm
NK	<i>Natural killer</i>
NSG	NOD Scid Gamma (NOD.Cg-PrkdcscidIL2rg <sup>tm1Wjl</sup> /SzJ)
OS	<i>Overall survival</i>
p.a.	Pro analysi
pAML	Primäre AML

PAMP	<i>Pathogen associated molecular pattern</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDGFR	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i>
<i>PD-L1</i>	Programmed death-ligand 1
PE	Phycoerythrin
PNK	<i>Polynucleotide kinase</i>
PVR	<i>Polivirus receptor</i>
PVRL2	<i>Polivirus receptor-related 2</i>
RAF	<i>Rat fibrosarcoma</i>
RASGRP	<i>RAS guanyl nucleotide-releasing protein</i>
RFS	<i>Relapse-free survival</i>
rIL2	Rekombinantes Interleukin-2
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-qPCR	<i>Reverse transcription quantitative real time PCR</i>
sgRNA	<i>Single guide RNA</i>
SHIP	<i>SH2-containing inositol phosphatase</i>
SIRP	<i>Signal regulatory protein</i>
SMAC	<i>Supramolecular activation cluster</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TIGIT	<i>T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains</i>
TIL	Tumor-infiltrierender Lymphozyt
TIM-3	<i>T cell immunoglobulin domain and mucin domain-3</i>
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	Regulatorische T-Zelle
TSA	Tumor-spezifisches Antigen
TZR	T-Zell-Rezeptor
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
V	Volt
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>
VISTA	V-domain Ig suppressor of T cell activation
WT-1	Wilms Tumor-1
ZAP-70	<i>Zeta chain of T-cell receptor associated protein kinase 70</i>
KIR	<i>Killer immunoglobulin-like receptor</i>
NCR	<i>Natural cytotoxicity receptor</i>

## 9 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den 06.06.2017