

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

II. Medizinische Klinik und Poliklinik für Onkologie, Hämatologie und Knochenmarkstransplantation mit
Sektion Pneumologie

Prof. Dr. med. Carsten Bokemeyer

Die Rolle der Immuncheckpoint-Liganden Galectin-9, PVR und PVRL-2 im Rahmen der Akuten Myeloischen Leukämie

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Jan Felix Klingler
aus Hamburg

Hamburg 2017

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 10.01.2018**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Walter Fiedler

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Manfred Jücker

Inhaltsverzeichnis

1 - ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG	4
2 - EINLEITUNG	5
2.1. Die aktue myeloische Leukämie	5
2.2. Bedeutung des Immunsystems in der Therapie der AML	7
2.3. Immuntherapie	9
2.4. Zielsetzung	11
3 - MATERIAL UND METHODEN	12
3.1. Gewinnung von cDNA	12
3.2. Klonierung eines Plasmidstandards	12
3.3. Quantitative RealTime-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)	13
3.4. Zellkultur: Rahmenbedingungen, Zelllinien	13
3.5. Protein-Expressionsbestimmung	13
3.6. Nachweis der Lyse einer Targetzellpopulation durch eine Effektorzellpopulation	14
3.7. Verwendete Materialien und Zelllinien	16
4 - ERGEBNISSE	19
4.1. Die Rolle der Genexpression von Galectin-9, PVR und PVRL-2 in der AML	19
4.2. Auswirkung von Galectin-9, PVR und PVRL2 auf die Lyse von Tumorzellen	24
5 - DISKUSSION	39
5.1. Reflektion der verwendeten Methoden	39
5.2. BiTE® Antikörper als Grundlage einer Immuntherapie	40
5.3. Die Rolle von Immuncheckpoint-Liganden in der Immuntherapie	41
6 - ZUSAMMENFASSUNG	44
6.1. Deutsch / German	44
6.2. Englisch / English	45
7 - ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	46
8 - LITERATURVERZEICHNIS	48
9 - DANKSAGUNG	55
10 - LEBENSLAUF	56
11 - EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	57

1 - Arbeitshypothese und Fragestellung

Trotz intensiver Chemotherapie ist die Prognose für Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) schlecht, weshalb neue Therapiekonzepte entwickelt werden müssen. Einen neuen Ansatz stellt die sogenannte Immuntherapie dar. Der Hintergrund für diesen Ansatz ist die Tatsache, dass das Immunsystem in der Lage ist, entartete Zellen zu erkennen und zu eliminieren. Allerdings entwickeln Tumorzellen Strategien, dieser Immunüberwachung („Immunsurveillance“) zu entgehen, ein Prozess, der als „Immunescape“ bezeichnet wird. Immuncheckpoint-Moleküle spielen eine entscheidende Rolle im Immunescape, denn sie regulieren das empfindliche Gleichgewicht von aktivierenden und inhibierenden Signalen der T-Zell-Aktivierung, was entscheidend für die Aufrechterhaltung der Eigentoleranz des Immunsystems ist. T-Zellen exprimieren inhibitorische Immuncheckpoint-Rezeptoren wie cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4), T cell Ig and ITIM domain (TIGIT) oder T-cell immunoglobulin and mucin domain-3 (TIM-3), während antigen-präsentierende Zellen entsprechende Immuncheckpoint-Liganden exprimieren. Diesen Mechanismus machen sich Tumorzellen durch die Expression von Immuncheckpoint-Liganden zunutze, was zu einer Unterdrückung der Immunantwort gegen Tumorzellen und somit zum Immunescape führt.

In dieser Arbeit soll untersucht werden welche Rolle die Immuncheckpoint-Liganden Galectin-9, Poliovirusrezeptor (PVR) und Poliovirusreceptor-like protein 2 (PVRL-2) in der Pathophysiologie der AML einnehmen. Zum einen soll eine PCR-Analyse zeigen wie sich die Expression der drei Immuncheckpoint-Moleküle auf das Überleben von AML-Patienten in der AMLSG-07/04-Kohorte auswirkt. Zum anderen soll mittels FACS-Analyse untersucht werden, ob die Blockierung von Galectin-9, PVR und PVRL-2 auf der Zelloberfläche von AML-Zellen zu einer Aktivitätsänderung des Immunsystems führt.

2 - Einleitung

2.1. Die akute myeloische Leukämie

Der Begriff akute myeloische Leukämie (AML) bezeichnet eine bösartige klonale Neoplasie des hämatopoetischen Systems. Dabei entarten unreife Zellen der myeloischen Reihe. Die malignen Zellen sind differenzierungsunfähig und proliferieren unabhängig von Wachstumsfaktoren. Es kommt zu einer klonalen Expansion unreifer Zellen im Knochenmark. Als Folge wird die normale Hämatopoese verdrängt und Blasten werden ins periphere Blut ausgeschwemmt (Stock und Thirman 2014).

2.1.1. Epidemiologie

Die Inzidenz wurde im Kollektiv des Haematological Malignancy Research Network in den Jahren 2004 bis 2009 auf 4 pro 100.000 Personen und Jahr geschätzt (alle Geschlechter), wobei Männer 1,25-mal so häufig betroffen waren wie Frauen. Das mediane Erkrankungsalter betrug 68,7 Jahre (Smith et al. 2011). Leukämien machten in den Jahren 2010-2014 zirka 3,4% aller tumorbedingten Todesfälle aus (Statistisches Bundesamt 2016).

2.1.2. Grundlage der Entartung

Essentiell für die maligne Transformation sind mindestens zwei Mutationen, die ein unkontrolliertes Wachstum und einen Differenzierungsblock bewirken (Stock und Thirman 2014).

Zu den bekannten Auslösern solcher Mutationen gehören neben einer vorangegangenen Chemotherapie auch ionisierende Strahlung und Exposition zu organischen Lösungsmitteln. Häufig sind die Auslöser jedoch unbekannt.

Man spricht von einer sekundären Leukämie, wenn die AML aus einer anderen hämatologischen Vorerkrankung, wie dem myelodysplastischen Syndrom (MDS) oder myeloproliferativen Syndrom (MPS) entstanden ist oder die AML durch bekannte Noxen wie Bestrahlung oder Chemotherapie verursacht wurde (Stock und Thirman 2014, Vardiman et al. 2002).

2.1.3. Klassifikation

Die Einteilung der AML erfolgt nach der WHO-Klassifikation (WHO: engl., World health organization) durch Aspekte wie Zytomorphologie, genetische Veränderungen und das klinische Erscheinungsbild (Arber et al. 2016). Neben der Einteilung in eine nicht weiter spezifizierte Form der AML unterscheidet diese Klassifikation in genetisch bedingte Formen, eine Form assoziiert mit dem myelodysplastischen Syndrom und eine Chemotherapie-assoziierte Form (Vardiman et al. 2009). In der Mehrzahl der AML-Fälle ist keine hämatologische Vorerkrankung oder vorhergehende Chemotherapie bekannt (78%). Etwa 58% der Patienten weisen zytogenetische Veränderungen auf. Nur bei einem kleinen Anteil ist eine Assoziation zum myelodysplastischen Syndrom (7%) oder einer Chemotherapie (0,4%) bekannt (Byun et al. 2016).

2.1.4. Therapie und Prognose

Sowohl die Therapie als auch die Prognose hängen von verschiedenen Einflussfaktoren ab, von denen die stärksten das Alter, der Karyotyp, Mutationen wie Nukleophosmin-1 (NPM-1), Fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3) oder DNA Cytosin-5 Methyltransferase 3A (DNMT3A) und der klinische Zustand sind (Juliusson et al. 2009; Grimwade et al. 2001; Brunetti et al. 2016; Kim et al. 2010). Bei erwachsenen Patienten unterscheidet man für gewöhnlich die Therapie junger Erwachsener (< 60 Lebensjahre) und älterer Erwachsener (≥ 60 Lebensjahre). Eine Therapie gliedert sich in zwei Phasen: es erfolgt zunächst eine Induktions- und anschließend eine Konsolidierungstherapie (Cassileth et al. 1988).

2.1.4.1. Standardtherapie bei Erstdiagnose AML im Alter unter 60 Lebensjahren

Die Standardtherapie für unter 60-jährige bei Erstdiagnose AML ist das sogenannte „7+3“-Schema, das eine kontinuierliche Cytarabin-Infusion in den ersten sieben Tagen vorsieht. Zusätzlich erhält der Patient in den ersten drei Tagen als Kurzinfusion oder Bolus ein weiteres Anthrazyklin wie zum Beispiel Daunorubicin (Rai et al. 1981). Ziel dieser Therapie ist das Erreichen einer kompletten

Remission (engl.: complete remission, CR), was in ca. 78% der Fälle mit bis zu zwei Induktionszyklen gelingt (Ohtake et al. 2011). Für gewöhnlich schließt sich im Rahmen der Konsolidierungstherapie eine weitere Chemotherapie oder eine Stammzelltransplantation an (Mayer et al. 1994; Büchner et al. 2003; Whitman et al. 2007; Schlenk et al. 2003).

2.1.4.2. Standardtherapie bei Erstdiagnose AML im Alter über 60 Lebensjahren

Bei älteren Erwachsenen stehen unterschiedlich intensive Induktions- und Konsolidierungstherapien zur Auswahl, wobei der Therapieerfolg und die Therapieentscheidung unter anderem vom klinischen Erscheinungsbild abhängt (Juliusson et al. 2009, Lübbert et al. 2012).

Der häufig als „intensive Therapie“ bezeichnete Pfad umfasst eine Induktionstherapie mit Dosen vergleichbar derer für junge Patienten (Löwenberg et al. 2009), sowie einer sich anschließenden Konsolidierungstherapie (Löwenberg et al. 1998) oder Stammzelltransplantation (McClune et al. 2010).

Im Gegensatz dazu steht der häufig als „weniger intensiv“ bezeichnete Therapiepfad mit Chemotherapeutikern wie Azacytidin (Dombret et al. 2015) sowie niedrigdosiertem Cytarabin (Dennis et al. 2015) oder lediglich einer supportiven Behandlung, die eine symptomorientierte zytoreduktive oder antibiotische Therapie umfasst (Amadori et al. 2016).

2.1.4.3. Weitere Optionen in der Therapie der AML

Neben den oben dargestellten Therapien werden auch andere Optionen erforscht. Hierzu gehören die Tyrosinkinaseinhibitoren, die der konstitutiven Aktivierung von Signalwegen entgegenwirken sollen. Bekannte Tyrosinkinasen im Zusammenhang mit der AML sind zum Beispiel FLT3- und c-KIT-Tyrosinkinase, die dazugehörigen Inhibitoren sind Midostaurin (FLT3) (Stone et al. 2015) und Quazitinib (c-KIT) (Kampa-Schittenhelm et al. 2013). Weitere Ansätze sind B-cell-lymphoma-2-Inhibitoren wie Venetoclax (Konopleva et al. 2016) und IDH2-Inhibitoren wie AG-221 (Stein et al. 2015), auf den nicht näher eingegangen werden soll.

2.1.4.4. Prognose

Allgemein haben Patienten mit schlechtem klinischem Status ein schlechteres Gesamtüberleben, als Patienten die sich klinisch unauffällig präsentieren und wenig Komorbiditäten haben (Juliusson et al. 2009).

Durch diverse klinische Studien wurden prognostisch relevante Karyotypen und Mutationen identifiziert. Eine übliche Einteilung erfolgt nach der European Leukemia Net (ELN-)Klassifikation (Döhner et al. 2010), dargestellt in Tabelle 1.

Prognostisch relevante Karyotypen (Auszug)			
<u>Günstige Karyotypen</u> „Favorable“	<u>Mäßiggünstige Karyotypen</u> „Intermediate-I“	<u>Mäßigungünstige Karyotypen</u> „Intermediate-II“	<u>Ungünstige Karyotypen</u> „Adverse“
<ul style="list-style-type: none"> — t(8;21) — inv(16)(p13.1q22) — Abberantes CEBPA — Abberantes NPM1 ohne FLT3-ITD 	<ul style="list-style-type: none"> — Abberantes NPM1 mit FLT3-ITD — Wildtyp NPM1 mit FLT3-ITD — Wildtyp NPM1 mit FLT3-ITD 	<ul style="list-style-type: none"> — t(9;11)(p22;p23) — Chromosomale Abberationen, die nicht als günstig oder ungünstig klassifiziert sind 	<ul style="list-style-type: none"> — inv(3)(q21q26.2) — t(3;3)(q21;q26.2) — t(6;9)(p23;q34) — t(v;11)(v;q23) — Chromosomen 5 oder/und 7 fehlend — del(5q) — abnl(17p) — Komplexe Karyotypen

Tabelle 1 – Prognostisch relevante Karyotypen (Auszug). ELN-Klassifikation, 2010.

ITD = Internal tandem repeat, CEBPA = CCAAT-enhancer-binding protein alpha, NPM1 = Nucleophosmin-1.

Die Wahrscheinlichkeit eine CR zu erreichen liegt in der Kohorte unter 60 Lebensjahren bei 80%. Allerdings kommt es bei zirka 50% aller Patienten mit einer CR zu einem Rezidiv (Burnett et al. 2010). Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei Patienten unter 60 Lebensjahren bei 58% (Burnett et al. 2010), in der Kohorte über 60 Lebensjahren liegt dieser Wert bei 20% (Goldstone et al. 2001). Trotz großer

Verbesserungen im Gesamtüberleben für beide Altersgruppen, werden neue Therapiemöglichkeiten benötigt, welche die Heilungschancen weiter steigern (Burnett et al. 2011).

2.1.4.5. Residuale Tumorzellen

Als ein Grund für Rezidive werden residuale AML-Zellen angesehen. Diese bleiben bei den heute verfügbaren Therapieoptionen nach Erreichen der kompletten Remission im Körper zurück und können Jahre nach der Initialtherapie zu einem Rezidiv führen (Konzept der Krebsstammzelle; Hope et al. 2003).

2.2. Bedeutung des Immunsystems in der Therapie der AML

Das Immunsystem hat als Schutz des Körpers vor Krankheiten die Möglichkeit, systemisch Gefahrenherde zu erkennen und zu eliminieren (Immunsurveillance). Ein zentraler Mechanismus ist hierbei die Unterscheidung von Selbst und Nicht-Selbst (Christen et al. 2016, S. 411).

Nahezu jede, zu einem Organismus zugehörige, Zelle präsentiert über den MHC-I-Komplex (engl.: Major histocompatibility complex I) im Zellinneren verdaute Peptidfragmente, die von Immunzellen erkannt werden können (Walzog und Fandrey 2010). Durch Mutationen in Proteinen ändern sich auch die präsentierten Peptidfragmente, sodass eine Zelle als „nicht normal“ erkannt werden kann. Killer-T-Zellen (T_C -Zelle) erkennen so eine Tumorzelle MHC-I-abhängig über ihren T-Zell-Rezeptor (Walzog und Fandrey 2010). Das daran gekoppelte CD3 (engl.: Cluster of differentiation 3) wirkt stimulierend auf die T-Zelle (vergleiche Abbildung 1, 1). Es kommt zu einer Freisetzung von Granzymen und Perforinen, woraufhin die Targetzelle lysiert wird (vergleiche Abbildung 1, 2). Unabhängig von der Aktivierung über den T-Zell-Rezeptor-CD3-Komplex kann die T-Zelle auch durch die Bindung von B7 (entspricht CD80/86) an CD28 stimuliert werden (Königshoff und Brandenburger 2012, S. 317).

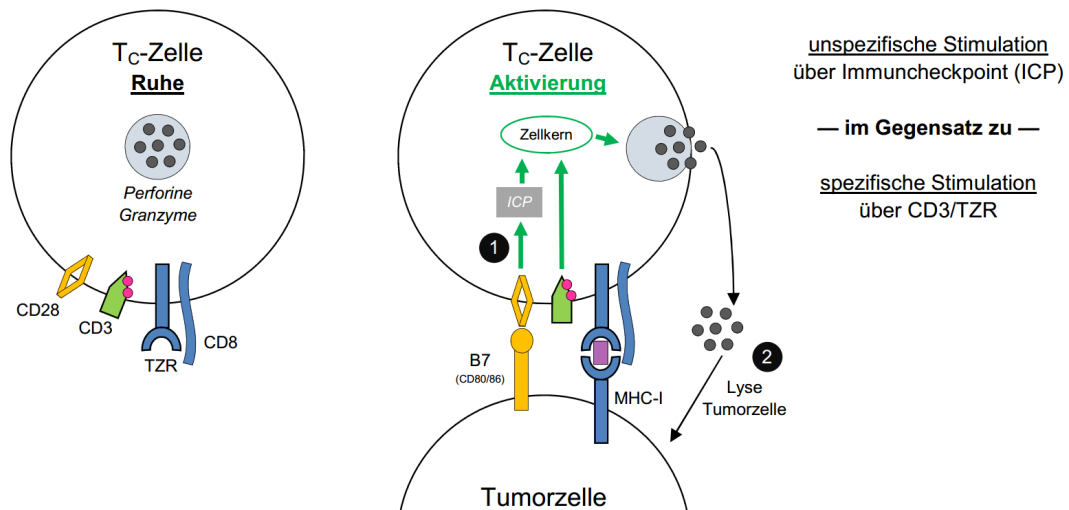


Abbildung 1- Mechanismus der Aktivierung von Killer-T-Zellen. Modifiziert nach Königshoff und Brandenburger 2012, S. 317. Tc-Zelle = Killer-T-Zelle, $CD8^+/CD3^+$ Zelle, TZR = T-Zell-Rezeptor.

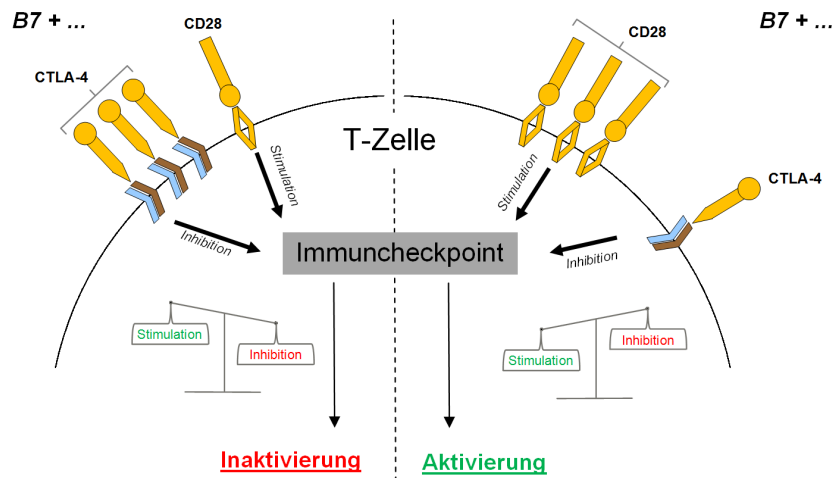


Abbildung 2 – Funktionsprinzip eines Immuncheckpoints. Verschiedene unspezifische Signale stehen im Gleichgewicht und können einer T-Zell-Aktivierung entgegenwirken, oder sie fördern, hier am Beispiel der Interaktion von B7 mit CD28 und CTLA-4 gezeigt. Modifiziert nach Buchbinder und Desai 2016. CTLA-4 = cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4.

Immuncheckpoints sind Schnittstellen verschiedener Signalwege, die maßgeblich auf die Aktivierung von Immunzellen Einfluss nehmen. Das Funktionsprinzip verdeutlicht Abbildung 2. Hier ist zu erkennen, dass verschiedene Signale, beispielsweise die Interaktion von B7 mit CD28 oder CTLA-4, in einem Gleichgewicht stehen und je nach Gleichgewichtslage eine Aktivierung oder Inaktivierung begünstigen (Buchbinder und Desai 2016).

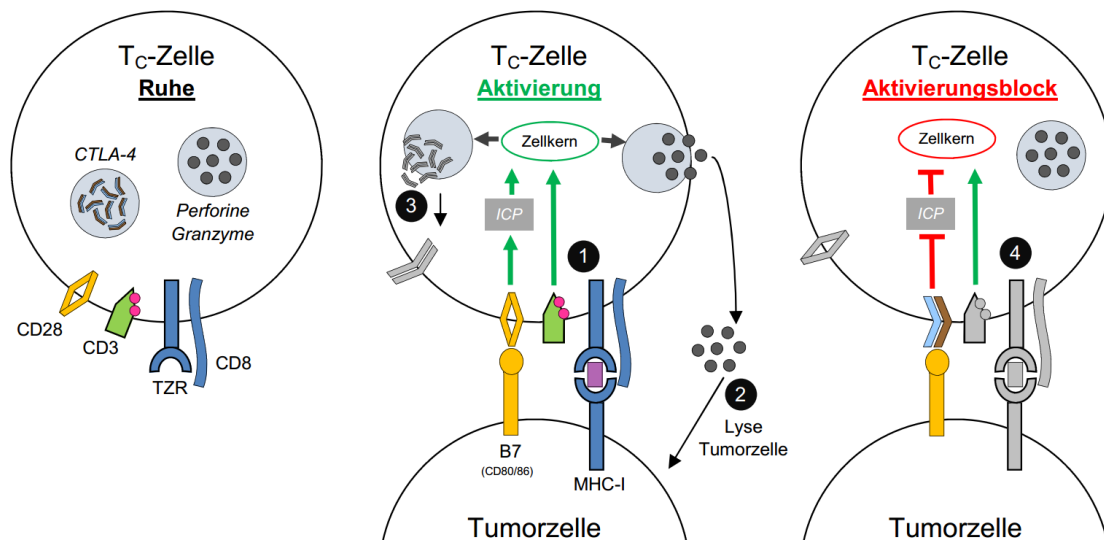


Abbildung 3 – Aktivierung und Inaktivierung von Killer-T-Zellen durch Immuncheckpoint-Liganden. Die Erkennung einer Tumorzelle durch den T-Zell-Rezeptor wirkt kostimulatorisch mit der Interaktion von B7/CD28 am Immuncheckpoint (1). Es kommt zur Tumorzelllyse (2). CTLA-4-Rezeptoren translozieren durch die Aktivierung in die Zellmembran (3). Durch die Interaktion von CTLA-4 mit B7 wird eine T-Zell-Aktivierung verhindert (4). Modifiziert nach Topalian et al. 2012.

Die Bedeutung der Immuncheckpoints veranschaulicht Abbildung 3. Parallel zur Aktivierung einer T-Zelle (vergleiche Abbildung 3, 1 und 2) translozieren CTLA-4-Rezeptoren in die Zellmembran, wo sie mit CD28 um die Bindung von B7 konkurriert (vergleiche Abbildung 3, 3). CTLA-4 hat eine höhere Affinität zu B7 als zu CD28. Durch die Bindung von B7 an CTLA-4 überwiegen am Immuncheckpoint inhibitorische Signale (vergleiche Abbildung 3, 4), es kommt nicht zur Lyse der Targetzelle. Die Nutzung eines Mechanismus, der die Lyse von Tumorzellen verhindert, wird als Immunescape (Deutsches Krebsforschungszentrum 2015) bezeichnet. Dabei kann der Aktivierungsblock sowohl, wie im Fall von CTLA-4, von den Immunzellen als auch, wie beispielsweise im Zusammenhang mit PD1 (engl.: Programmed death-1), von den Tumorzellen ausgehen (Topalian et al. 2012). Tumorzellen exprimieren häufig PDL-1 (Kataoka et al. 2016). Bindet es an PD1 auf T-Zellen, löst es deren Apoptose aus (vergleiche Abbildung 4, 4). Eine anti-Tumor-Immunantwort wird verhindert (Buchbinder und Desai 2016).

Als Weg die Lyse von Tumorzellen durch das körpereigene Immunsystem zu steigern, hat sich in den letzten Jahren eine Immuntherapie durch Blockierung der Immuncheckpoint-Inhibitoren herauskristallisiert.

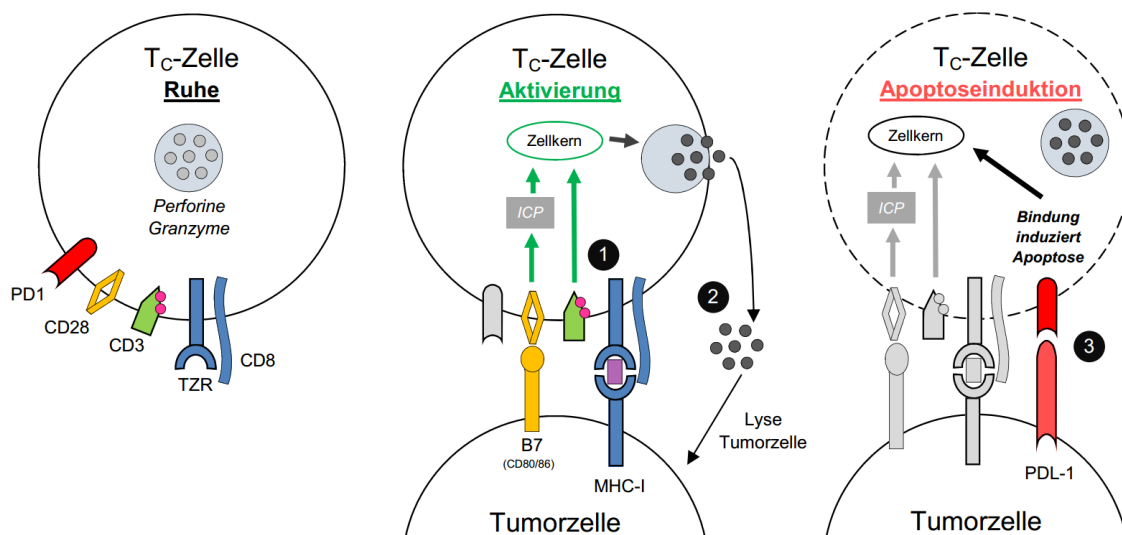


Abbildung 4 – Apoptoseinduktion durch den Immuncheckpoint-Liganden PDL-1. Die Bindung von PDL-1 an PD1 führt zu einem Immunescape. Die Erkennung einer Tumorzelle durch den T-Zell-Rezeptor wirkt kostimulatorisch mit der Interaktion von B7/CD28 am Immuncheckpoint (1). Es kommt zur Tumorzellyse (2). Die Bindung von PDL-1 an PD1 führt zur Apoptoseinduktion (3). Modifiziert nach Buchbinder und Desai 2016, Topalian et al. 2012.

2.3. Immuntherapie

Immuntherapeutische Ansätze verfolgen mit verschiedenen Strategien das Ziel, Tumorzellen für Effektorzellen besser erkenn- und eliminierbar zu machen. Dabei spielt neben der grundsätzlichen Verfügbarkeit von Effektorzellen auch die Erleichterung der Tumorzellerkennung und Effektorzellaktivierung eine Rolle. Drei Säulen der Immuntherapie werden im Folgenden dargestellt.

2.3.1. Transplantation von Effektorzellen

Im Rahmen der allogenen Transplantation zur AML-Therapie werden neben hämatopoetischen Stammzellen auch Lymphozyten übertragen, die tumorassoziierte Antigene auf Leukämiezellen erkennen können und diese durch eine Graft-versus-Leukemia/Graft-versus-Host-Reaktion (GVL-/GVH-Reaktion) eliminieren. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer GVH-Reaktion einen verlängerten rückfallfreien Überlebenszeitraum haben (Horowitz et al. 1990).

2.3.2. Steigerung Zugänglichkeit immunaktivierender Strukturen

Im Zusammenhang dieses Ansatzes wird versucht, den Effektorzellen die Erkennung von Tumorzellen zu erleichtern. Hierbei spielt beispielsweise die Markierung von Leukämie-assoziierten Antigenen (LAA) mit monoklonalen Antikörpern eine wichtige Rolle (Smits et al. 2009; Mulford und Jurcic 2004; Caron et al. 1994).

2.3.2.1. Der Einsatz von BiTE® Antikörper Konstrukten

Bei einem BiTE® Antikörper (BiTE®: Bispecific T cell engager) handelt es sich um ein Antikörperkonstrukt, welches zwei Antigenbindungsstellen besitzt. Eine Domäne bindet CD3, welches auf T-Zellen vorkommt, wohingegen die andere Domäne ein tumorassoziiertes Antigen bindet (Aigner et al. 2013).

Die Verwendung eines BiTE® Antikörpers hat zum Ziel Tumorzellen und T-Zellen räumlich zusammenzubringen (Abbildung 5).

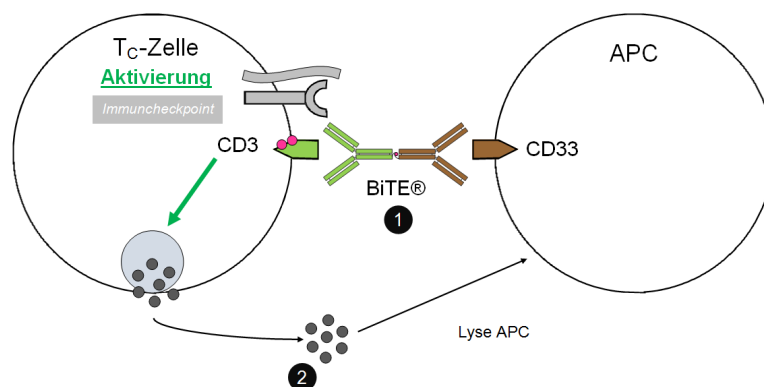


Abbildung 5 – Formung einer zytotoxischen Synapse durch Bindung des BiTE® Antikörpers. Der BiTE® bindet CD3 und CD33 (1) und führt unabhängig vom Immuncheckpoint zur Lyse der Tumorzelle (2).

Dadurch, dass der BiTE® an ein tumorassoziiertes Antigen bindet (vergleiche Abbildung 5, 1), kommt es zu einer spezifischen Immunantwort gegen Tumorzellen (vergleiche Abbildung 5, 2). Der Ablauf der Tumorzelllyse ist in Abschnitt 2.2 erklärt.

Ein CD3-CD19-BiTE® wird bereits bei der Therapie von B-Zell-Lymphomen und ALL (Akute lymphatische Leukämie) in klinischen Studien erfolgreich eingesetzt (Topp et al. 2011).

Als tumorassoziiertes Antigen für die AML wurde CD33 ausgewählt. In *in-vitro*- und Maus-*in-vivo*-Studien konnte bisher gezeigt werden, dass ein CD3-CD33-BiTE® zu einer signifikanten Lyse von AML-Zellen führt, ohne dass die normale Hämatopoese beeinflusst wird. Eine deutliche Aktivitätssteigerung von T-Zellen, die mit einem BiTE® stimuliert wurden, konnte im Vergleich zu den Experimenten ohne BiTE® Antikörper festgestellt werden (Arndt et al. 2013a). Klinische Studien stehen noch aus.

2.3.3. Reduktion der inhibitorischen Signale an Immuncheckpoints

Immuncheckpoints nehmen, wie oben beschrieben, eine entscheidende Position bei der Aktivierungskontrolle von Effektorzellen ein. Unter physiologischen Bedingungen stellen unter anderem diese Mechanismen die Selbst-Toleranz sicher (Topalian et al. 2012).

Ziel dieser Therapieansätze ist es die inhibitorischen Rezeptor-Liganden-Interaktionen zu unterbinden und somit einen Aktivierungsblock der Effektorzellen aufzuheben.

Für verschiedene Tumorentitäten wie beispielsweise Nierenzellkarzinom (Motzer et al. 2015), nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (Champiat et al. 2014) oder Melanom (Hodi et al. 2010) finden monoklonale Immuncheckpoint-Antikörper bereits klinische Anwendung.

Zur Blockade von Immuncheckpoint-Liganden oder -Rezeptoren werden in klinischen Studien bereits monoklonale Antikörper eingesetzt. CTLA-4 kann beispielsweise durch Ipilimumab, PD1 durch Nivolumab blockiert werden (Motzer et al. 2015). Durch den Einsatz von 4 Zyklen einer

Ipilimumab-Therapie konnten Eigentler et al. zeigen, dass sich das Überleben von Melanompatienten im Vergleich zum Einsatz von weniger als 4 Zyklen in der untersuchten Kohorte in etwa verdoppelte (Eigentler et al. 2014). Unter Ipilimumab-Therapie wurde ein Langzeitüberleben von 20% erreicht (Schadendorf et al. 2015).

Als weitere Immuncheckpoint-Liganden wurden Galectin-9, Poliovirusrezeptor (PVR) und Poliovirusrezeptor ähnliches Protein-2 (engl.: poliovirus receptor like protein-2, PVRL-2) identifiziert, die im Folgenden kurz dargestellt werden sollen.

2.3.3.1. *Galectin-9*

Galectin-9 gehört zur Familie der Galectine, einer Gruppe β -Galaktose bindender Proteine. Es liegt als ca. 39 Kilodalton (kDa) großes Homodimer vor (UniProtKB/Swiss-Prot 2014; Heusschen et al. 2013; Varki et al. 2009).

Die Funktionen von Galectin-9 sind nicht abschließend geklärt. Es wird diskutiert, dass Galectin-9 eine Inaktivierung von T-Zellen hervorruft und dass diese über eine Interaktion mit T cell immunoglobulin and mucin domain-3 (TIM-3) vermittelt wird (Zhu et al. 2005).

2.3.3.2. *Poliovirusrezeptor (PVR, CD155)*

Bei PVR handelt es sich um ein ca. 45 kDa großes Transmembranprotein, das zunächst als essentiell im Zusammenhang mit der Bindung von Polioviren beschrieben wurde (Kaplan und Racaniello 1991, UniProtKB/Swiss-Prot 1990). Es wurde gezeigt, dass es im Kontext von malignen Neoplasien an der Regulation von Effektorzellen beteiligt ist. Bindet PVR an DNAX accessory molecule-1 (DNAM-1, CD226), werden diese stimuliert (Pende et al. 2005; Pende 2005; Bottino et al. 2003; Stanietsky et al. 2009). Wohingegen eine Interaktion mit T cell Ig and ITIM domain (TIGIT) zu einer Inhibition von NK-Zellen (Natürliche Killerzellen) und folglich zu einer Reduktion der Targetzelllyse führt (Stanietsky et al. 2009).

2.3.3.3. *Poliovirusrezeptor-ähnliches Protein-2 (PVRL-2, PRR2, CD112)*

Bei PVRL-2 handelt es sich um ein PVR-ähnliches Transmembranprotein, welches ebenfalls im Zusammenhang mit der Aktivierung von Effektorzellen steht. Bei der HLA-Klasse-1-unabhängigen Regulation von Effektorzellen über DNAM-1 kommt es bei Bindung zu einer Aktivitätssteigerung der Effektorzellen (Stanietsky et al. 2009; Bottino et al. 2003; Pende et al. 2005). Es konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von PVRL-2 mit TIGIT zu einer Steigerung der Interleukin-2 (IL-2)-Sekretion führt, was für gewöhnlich bei einer Aktivierung von Effektorzellen stattfindet (Stanietsky et al. 2009; Smits et al. 2009).

2.4. Zielsetzung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob die Expressionsniveaus von Galectin-9, PVR und PVRL-2 auf leukämischen Blasten einen Einfluss auf das Überleben von AML-Patienten haben. Des Weiteren soll untersucht werden, ob die spezifische Lyse von Tumorzellen durch Effektorzellen mittels Immuncheckpoint-Inhibitoren beeinflusst werden kann und ob eine Kombination mit einem *in-vitro* erfolgreich getesteten BiTE® Antikörper eine weitere Lysesteigerung der Leukämiezellen bewirkt.

3 - Material und Methoden

3.1. Gewinnung von cDNA

3.1.1. Gewinnung von cDNA aus AML-Zelllinien und mononukleären Zellen gesunder Spender

Für die Gewinnung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut wurde eine Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt und der Buffy coat isoliert. Die CD34 positiven hämatopoetischen Vorläuferzellen wurden durch immunmagnetische Separation aus den mononukleären Zellen aus Leukaphereseprodukten isoliert (Indirect CD34 MicroBead Kit, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland). Unter Zellkulturstandardbedingungen wurde aus 1×10^7 Zellen mittels innuPREP RNA Mini Kit (Analytik Jena, Jena, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben RNA isoliert. Es folgte die reverse Transkription gemäß Herstellerprotokoll in cDNA (engl.: circular deoxyribonucleic acid, dt.: zirkuläre Desoxyribonukleinsäure) mit dem Maxima First Strand Kit (ThermoScientific, Waltham, USA). Die Konzentration wurde mittels Nanodrop1000 (Peqlab, Erlangen, Deutschland) bestimmt.

Die Buffy coats und Leukaphereseprodukte anonymen Spender wurden freundlicherweise von der Blutbank des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf zur Verfügung gestellt. Die Isolation der Zellen und das Umschreiben in cDNA wurden von Kollegen der Arbeitsgruppe Fiedler durchgeführt.

3.1.2. Gewinnung aus Patientenproben des AMLSG-07/04-Patientenkollektiv

Als Probenmaterial wurde Knochenmarkspunktat von Patienten verwendet, die an der AMLSG-07/04-Studie (AMLSG: AML-Studiengruppe) mit Erstdiagnose AML teilnahmen (gemäß Ethik-Votum 148/10 – „Registerstudie zum biologischen Erkrankungsprofil und klinischen Verlauf bei der Akuten Myeloischen Leukämie“ vom 6.7.2010, Universität Ulm). Die cDNA-Proben wurden freundlicherweise von Dr. Michael Heuser (Medizinische Hochschule Hannover) zur Verfügung gestellt.

3.2. Klonierung eines Plasmidstandards

Zur Normierung, der durch quantitative RealTime Polymerasekettenreaktion (PCR) gewonnenen Daten, wurden für die zu untersuchenden Immuncheckpoint-Gene Galectin-9, PVR und PVRL-2 Plasmidstandards verwendet, deren Syntheseschritte im Folgenden beschrieben werden.

3.2.1. Erstellung eines PCR-Produkts als Vektor-Insert

Es wurden zunächst PCR-Produkte mittels qualitativer PCR erstellt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 6 aufgeführt. Zur Amplifizierung wurden der Thermocycler T1 (Biometra, Göttingen, Deutschland) und DreamTaq-Mastermix (ThermoScientific) verwendet. Die PCR-Reaktion wurde mit den in Tabelle 7 aufgeführten Reagenzien und dem in Tabelle 8 aufgeführten Zyklusprotokoll durchgeführt. Die dadurch gewonnenen PCR-Produkte wurden mit dem Gel and PCR clean-up-Kit (Macherey Nagel, Düren, Deutschland) aufgereinigt.

3.2.2. Klonierung, Transformation und Plasmidpräparation

Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde gemäß dem Herstellerprotokoll in ein pCR 2.1-Vektorsystem kloniert (invitrogen). Die Transformation folgte gemäß den Herstellerangaben in einen kompetenten E.coli-Stamm (DH5 α , invitrogen). Die Bakteriensuspension wurde auf X-gal-beschichteten (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) selektiven Lysogeny broth (LB)-Kanamycin-Agarplatten ausplattiert und für 16h bei 37°C inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurden die vektortragenden Bakterienkolonien in Kanamycin-LB-Selektivmedium übertragen und weitere 16h bei 37°C inkubiert.

Mittels sogenannter Colony-PCR wurde überprüft, welche Kolonien plasmidtragend sind. Abschließend wurde eine Plasmidpräparation einer Übernachtskultur durchgeführt („QIAfilter Plasmid Maxi Kit“, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die jeweilige Plasmidkonzentration wurde am Nanodrop1000 (Peqlab) gemessen. Der Plasmidstock wurde bei -20°C gelagert.

3.3. Quantitative RealTime-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Zur Analyse der Genexpression von Galectin-9, PVR und PVRL-2 wurde das Verfahren der quantitativen RealTime-PCR gewählt. Die Analysen wurden mit dem LightCycler96 (Roche, Basel, Schweiz) durchgeführt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 6 aufgeführt. Andere Materialien einer RealTime-PCR-Reaktion sind in Tabelle 9 zusammengestellt. Das Zyklusprotokoll zeigt Tabelle 10. Alle Materialien wurden gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die Rohdaten wurden mittels LightCycler-Software (Version 1.1, Roche) ausgelesen.

3.3.1. Berechnung der relativen Expression

Die durch qRT-PCR gewonnenen Daten wurden auf einen GAPDH-Plasmidstandard (GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase) normiert. Hierzu wurde die von Pfaffl vorgeschlagene Methode zur Quantifizierung von RealTime-PCR-Daten verwendet (Pfaffl 2001). Zur Effizienzberechnung wurde eine Verdünnungsreihe des unter Punkt 3.2 erstellten Plasmidstandards verwendet.

3.3.2. Statistische Auswertung der durch qRT-PCR gewonnenen Daten

Die relativen Expressionsniveaus von Galectin-9, PVR und PVRL-2 wurden mit dem Gesamtüberleben der untersuchten Patienten der AMLSG-07/04-Studie durch Cox-Regression mit Rückwärtsselektion korreliert. Dies erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg) unter Anwendung der Software SPSS Statistics (Version 21, IBM, Armonk, USA).

3.4. Zellkultur: Rahmenbedingungen, Zelllinien

Alle Zellkulturversuche wurden unter Standardzellkulturbedingungen (37°C, 5% CO₂) durchgeführt. Die verwendeten Zelllinien und Medien sind in Tabelle 4 und Tabelle 5 aufgeführt.

3.4.1. Verwendete Zelllinien

Es wurden etablierte AML-Zelllinien verwendet, deren Herkunft und verwendetes Zellkulturmedium in Tabelle 4 dargestellt sind.

3.5. Protein-Expressionsbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinexpression auf Zelloberflächen wurde ein FACSCalibur (BD, Franklin Lakes, USA) verwendet. Es wurden sowohl primär nicht fluoreszenzmarkierte monoklonale Antikörper, als auch primär fluoreszenzmarkierte monoklonale Antikörper verwendet. Alle Antikörper wurden nach Zugabe zunächst 30 Minuten mit den in PBS + 10 % AB-Serum (PBS: phosphate-buffered saline; Bio Rad, München, Deutschland) befindlichen Zellen bei 5°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension bei 1200 × g 5 Minuten zentrifugiert und in PBS + 10% AB-Serum resuspendiert („waschen“). Für die nicht primär fluoreszenzmarkierten Antikörper folgte eine zweite 30-minütige Inkubation bei 5 °C mit einem fluoreszenzmarkierten anti-Maus-Antikörper und darauffolgendem Waschschrift. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Antikörper zur Proteinexpressionsbestimmung				
Zielstruktur (Klon)	Fluoreszenzmarkierung	Herkunft	Hersteller	Menge pro 2×10^6 Zellen
Galectin-9 (9M1-3)	primär, APC	Maus	Biozol (Eching, Deutschland)	4 μ L
PVR (D171)	sekundär	Maus	ThermoScientific	1 μ L
PVRL2 (L14)	sekundär	Maus	Pende et al.	2,5 μ L
Anti-Maus	primär, APC	Ziege	BD	1 μ L
Isotyp-Maus	primär, APC	Maus	BD	1 μ L
Isotyp-FITC	primär, FITC	Maus	BD	1 μ L
CD14 (M5E2)	primär, FITC	Maus	BD	2 μ L
CD33 (P67.6)	primär, PE	Maus	BD	2 μ L

Tabelle 2 - Antikörper zur Proteinexpressionsbestimmung. APC: Allophycocyanin II, FITC = Fluoresceinisothiocyanat, PE = Phycoerythrin.

3.6. Nachweis der Lyse einer Targetzellpopulation durch eine Effektorzellpopulation

Für den Nachweis der Lyse einer fluoreszenzmarkierten Targetzellpopulation (AML-Zelllinie) durch mononukleäre Zellen des peripheren Blutes gesunder, anonymer Spender (PBMC, Effektorzellpopulation) wurde ein Durchflusszytometrie (dt., engl.: fluorescence activated cell sorting, FACS)-basierter Assay verwendet. Die wichtigsten Schritte sind im Folgenden dargestellt.

3.6.1. Markierung von Targetzellen mit Fluoreszenzfarbstoff

Zur Identifizierung der Targetzellpopulation wurde diese mit CellTracker Green CMFDA (5-Chlormethylfluorescein Diazetat, invitrogen, Carlsbad, USA) fluoreszenzmarkiert. Bis zu 10×10^6 Zellen wurden zunächst 20 Minuten in einer 50 nM CellTracker-Lösung basierend auf serumfreiem Medium (RPMI 1640, Gibco, Carlsbad, USA) unter Zellkulturstandardbedingungen inkubiert. Es folgte eine 30-minütige Inkubation in RPMI 1640 (Gibco) + 10 % FBS (Fetales bovines Serum, Biochrom, Berlin, Deutschland) ebenfalls unter Zellkulturstandardbedingungen. Anschließend wurden die Zellen in frischem RPMI 1640 + 10% FBS-Medium aufgenommen und unter Zellkulturstandardbedingungen gehalten.

3.6.2. Aufreinigung von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut gesunder Spender

Die zur Gewinnung mononukleärer Zellen notwendigen Blutspendeprodukte (negativ getestet auf Cytomegalie-Virus, CMV) wurden von der Blutbank des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (Hamburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Auftrennung des peripheren Blutes erfolgte durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation. Nach der Separierung der Monozytenschicht wurde eine Erylyse (0,155M HN_4Cl + 0,01M KHCO_3 + 0,0001M EDTA-Lösung in Wasser) durchgeführt.

3.6.3. Ansetzen des Lyse-Assays

Die unter Punkt 3.6.1 und 3.6.2 vorbereiteten Zellpopulationen wurden im Verhältnis 6:1 in einer 96-Well-Platte (Falcon, Franklin Lakes, USA) zusammengeführt. Das Gesamtvolumen eines Ansatzes betrug 200 μ L. Die Gesamtzellzahl belief sich auf $1,2 \times 10^5$. Das verwendete Medium richtete sich nach der AML-Zelllinie und kann Tabelle 4 entnommen werden.

Für Versuche mit BiTE® Antikörper wurde der AMG 330 (AMGEN Research (Munich) GmbH, München, Deutschland) verwendet. Für dessen Verdünnung wurde das Zellkulturmedium der AML-Zelllinie genutzt. Der AMG 330 wurde freundlicherweise von der Firma AMGEN zur Verfügung gestellt. Die Blockade von Galectin-9, PVR und PVRL2 auf der Oberfläche von AML-Zelllinien erfolgte durch die in Tabelle 3 aufgeführten Antikörper. Diese Antikörper wurden stets unter Zellkulturstandardbedingungen 60 – 90 Minuten mit der Targetzellpopulation inkubiert bevor PBMCs und ggf. BiTE® Antikörper hinzugegeben wurden. Keiner der Antikörper war fluoreszenzmarkiert.

Antikörper des Lyse-Assays		
Zielstruktur (Klon)	Herkunft	Hersteller
Galectin-9 (9M1-3)	Maus	Biozol
PVR (D171)	Maus	ThermoScientific
PVRL-2 (L14)	Maus	Pende et al.

Tabelle 3 - Antikörper des Lyse-Assays

3.6.4. Messung und Rohdatenauswertung

Zum Messzeitpunkt erfolgte eine gleichzeitige Entnahme aller Ansätze aus den Zellkulturstandardbedingungen. Jeder Ansatz wurde unter Lichtabschluss 10 Minuten bei 5 °C mit 5 µL 7-AAD (7-Aminoactinomycin, BD) inkubiert. Die Auswertung der durch ein FACSCalibur (BD) gewonnenen Daten erfolgte durch FlowingSoftware (Version 2.5.1, Universität Turku, Finnland) und weiter in Excel 2010.

Tote Targetzellen wurden als CellTracker⁺ / 7-AAD⁺, lebende Targetzellen als CellTracker⁺ / 7-AAD⁻ definiert. In Abbildung 6 ist exemplarisch dargestellt wie die Populationen eingegrenzt wurden: in einem ersten Schritt (mittleres Diagramm) wurden alle AML-Zellen eingegrenzt. Anschließend folgte die Definition toter AML-Zellen (rechtes Diagramm).

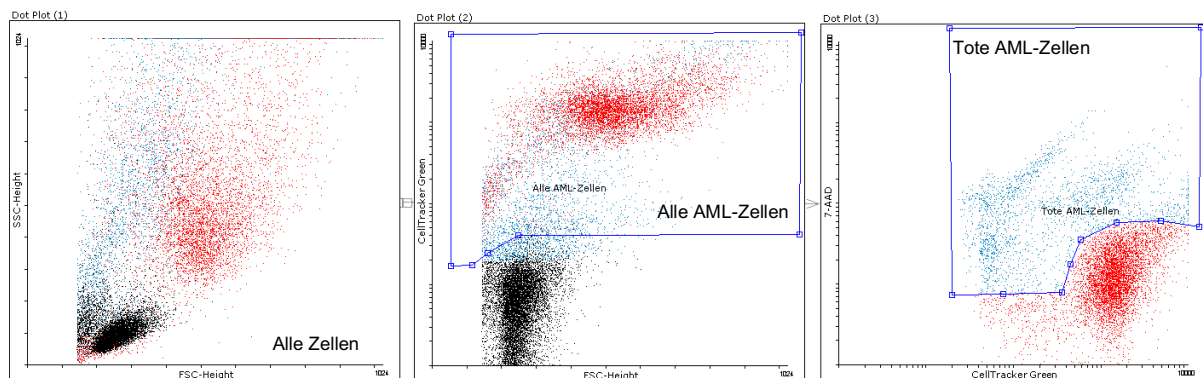


Abbildung 6 – Erster Schritt der Auswertung von FACS-Analysen: Eingrenzen der Populationen lebender und toter AML-Zellen.

Die Rohdaten wurden in Excel übertragen und der Anteil toter AML-Zellen an allen AML-Zellen berechnet. Die hierzu verwendete Formel zeigt die Zelle D2 in Abbildung 7.

	A	B	C	D
1	Dateiname	Alle AML-Zellen	Tote AML-Zellen	Anteil toter AML-Zellen an allen AML-Zellen [%]
2	Kein BiTE alleine.001	8878	608	$= (C2/B2)*100$
3	Kein BiTE alleine.002	8440	624	7,39
4	Kein BiTE alleine.003	8457	619	7,32
5	Kein BiTE + 20 µg/mL PVR-D171.003	7802	673	8,63
6	Kein BiTE + 20 µg/mL PVR-D171.001	7990	646	8,09
7	Kein BiTE + 20 µg/mL PVR-D171.002	7678	649	8,45
8				
9	BiTE alleine.001	8510	847	9,95
10	BiTE alleine.002	8326	775	9,31
11	BiTE alleine.003	8389	878	10,47
12	BiTE + 20 µg/mL PVR-D171.003	7319	1189	16,25
13	BiTE + 20 µg/mL PVR-D171.002	7190	1178	16,38
14	BiTE + 20 µg/mL PVR-D171.001	7678	1210	15,76

Abbildung 7 – Zweiter Schritt der Auswertung: Berechnung des Prozentsatzes toter AML-Zellen an allen AML-Zellen aus den Rohdaten.

Die Prozentsätze toter AML-Zellen wurden zueinander in relativen Bezug gesetzt. Alle Ansätze, die keinen BiTE® enthielten (Werte D2:D7, Abbildung 8) wurden in Bezug zu dem Ansatz, der weder BiTE® noch andere Antikörper enthielt (Werte D2:D4, Abbildung 8) gesetzt. Alle Ansätze, die BiTE® enthielten, (Werte D9:D14, Abbildung 8) wurden in Bezug zu dem Ansatz gesetzt, der nur BiTE® und keine weiteren Antikörper enthielt (Werte D9:D11, Abbildung 8).

	A	B	C	D	E	F	G
1	Dateiname	Alle AML-Zellen	Tote AML-Zellen	Anteil totter AML-Zellen an allen AML-Zellen [%]	n-fache Änderung	Mittelwert des Triplikats	Standardabweichung des Triplikats
2	Kein BiTE alleine.001	8878	609	6,85	0,953		
3	Kein BiTE alleine.002	8440	624	7,39	1,029	1,000	0,041
4	Kein BiTE alleine.003	8457	619	7,32	1,018		
5	Kein BiTE + 20 µg/mL PVR-D171.003	7802	673	8,63	1,200		
6	Kein BiTE + 20 µg/mL PVR-D171.001	7990	646	8,09	1,125	1,167	0,038
7	Kein BiTE + 20 µg/mL PVR-D171.002	7678	649	8,45	=D7/MITTELWERT(D52:D54)		
8							
9	BiTE alleine.001	8510	847	9,95	1,004		
10	BiTE alleine.002	8326	775	9,31	0,939	1,000	0,059
11	BiTE alleine.003	8389	878	10,47	1,056		
12	BiTE + 20 µg/mL PVR-D171.003	7319	1189	16,25	1,639		
13	BiTE + 20 µg/mL PVR-D171.002	7190	1178	16,38	1,653	1,628	0,033
14	BiTE + 20 µg/mL PVR-D171.001	7678	1210	15,76	1,590		

Abbildung 8 – Dritter Schritt der Auswertung: Berechnung der „n-fachen Änderung“.

Die Zusammenfassung zweier Versuche wird durch Abbildung 9 veranschaulicht. Die Werte der n-fachen Änderung aus beiden Versuchen wurden als 6-ikat zusammengefasst ausgewertet. Als Funktion der Standardabweichung wurde STABW() ausgewählt, der Mittelwert wurde durch MITTELWERT() berechnet.

	A	E	H	I	J
1	Dateiname	n-fache Änderung Versuch 1	n-fache Änderung Versuch 2	Mittelwert (6-ikat)	Standardabweichung (6-ikat)
2	Kein BiTE alleine.001	0,953	0,928		
3	Kein BiTE alleine.002	1,029	1,011	1,00	0,050
4	Kein BiTE alleine.003	1,018	1,061		
5	Kein BiTE + 20 µg/mL PVR-D171.003	1,200	1,378		
6	Kein BiTE + 20 µg/mL PVR-D171.001	1,125	1,340	1,26	=STABW(E5:E7;H5:H7)
7	Kein BiTE + 20 µg/mL PVR-D171.002	1,176	1,332		

Abbildung 9 – Vierter Schritt der Auswertung: Zusammenfassung zweier Versuche

3.6.5. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte, wenn nicht anders vermerkt, mit einem Mann-Whitney-Test zweier unabhängiger Stichproben. Bei Angaben zum Signifikanzniveau („P-Werte“) handelt es sich stets um die bei diesem Testverfahren festgestellte exakte zweiseitige Signifikanz. Als Software wurde SPSS Statistics (IBM) verwendet.

3.7. Verwendete Materialien und Zelllinien

Verwendete AML-Zelllinien und deren Referenz			
Zelllinie	Herkunft	Medium	Referenz
UKE-1	Patient mit essentieller Thrombozytose, die in eine akute myeloische Leukämie transformierte. Etabliert 2000.	Dexter Medium	Fiedler et al. 2000
Kasumi-1	Siebenjähriger japanischer Junge mit AML FAB M2 mit einem Rezidiv nach einer Knochenmarkstransplantation. Etabliert 1991.	RPMI + 20% FBS	Asou et al. 1991
OCI-M1	Leukämische Blasten eines 62-jährigen Patienten mit Erythroleukämie (FAB M6).	RPMI + 10% FBS	Papayannopoulou et al. 1988
OCI-AML 3	Peripheres Blut eines 57-jährigen Mannes mit AML FAB M4, etabliert 1987.		Tiacci et al. 2011
OCI-AML 5	Peripheres Blut eines 77-jährigen Mannes mit AML FAB M4, etabliert 1990.		Drexler et al. 1997

KG-1	Peripheres Blut eines 59-jährigen Mannes mit Erythroleukämie, die in eine AML überging. Etabliert 1977.		Koeffler und Golde 1980
HL60	Peripheres Blut einer 35-jährigen Patientin mit akuter Promyelozyten Leukämie (FAB M3). Etabliert 1976.		Dalton et al. 1988
Mono-Mac-1	Knochenmarkspunktat eines 60-jährigen Mannes mit akuter Monoblasten Leukämie. Etabliert 1981.		Ziegler-Heitbrock et al. 1988
U937	37-jähriger Mann mit generalisiertem histozytärem Lymphom. Etabliert 1976.		Sundström und Nilsson 1976
TF-1	35-jähriger Mann mit Erythroleukämie. Etabliert 1987.		Kitamura et al. 1989
THP-1	Peripheres Blut eines 1-jährigen Jungen mit akuter Promyelozyten Leukämie. Etabliert 1980.		Tsuchiya et al. 1980
SKM-1	Peripheres Blut eines Patienten mit MDS. Etabliert 1991.		Nakagawa und Matozaki 1995
MV4-11	Peripheres Blut eines 10-jährigen Jungen mit FAB-M5-Leukämie. Etabliert 1987.		Lange et al. 1987

Tabelle 4 – Verwendete AML-Zelllinien und deren Referenz. FAB = French-America-British.

Verwendete Zellkulturmedien	
Bezeichnung	Zusammensetzung
Dexter Medium	IMDM + GlutaMAX + 25mM HEPES (Gibco) + 10% FBS (Biochrom) + 10% HI Horse Serum, Herkunft: Neuseeland (Gibco) + 1µM Hydrocortison (Sigma)
RPMI + 10% FBS	RPMI 1640 + L-Glutamine (Gibco) + 10% FBS (Biochrom)
RPMI + 20% FBS	RPMI 1640 + L-Glutamine (Gibco) + 20% FBS (Biochrom)

Tabelle 5 – Verwendete Zellkulturmedien. HEPES = 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure. IMDM = Iscoves modifiziertes Dulbecco Medium.

Primersequenzen der zur Klonierung verwendeten PCR-Produkte				
Ziel-Gen	RefSeq-Nummer	Sequenz des Vorwärts-Primers (5' → 3')	Sequenz des Rückwärtst-Primers (5' → 3')	Länge des PCR-Produkts
Galectin-9	NM_009587	gtctccaggacggacttcag	caggaagcagagggtcaagg	241bp
PVR	NM_006505	agcaggagcgtggatatctg	gactgtgccagacaggaacc	206bp
PVRL2	NM_002856	gaggacgaggccaactacac	agggatgagagccaggagat	202bp

Tabelle 6 – Primersequenzen der zur Klonierung verwendeten PCR-Produkte.

Reagenzien einer PCR-Reaktion		
Reagenz	Eingesetzte Menge	Konzentration
Sigma Dream Taq Mastermix (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)	12,5µL	nicht verfügbar
Vorwärts-Primer (eurofins, Ebersberg, Deutschland)	3,125µL	0,25 pmol/mL
Rückwärts-Primer (eurofins, Ebersberg, Deutschland)	3,125µL	0,25 pmol/mL
RNAse-freies Wasser (Ambion, Darmstadt, Deutschland)	4,25µL	nicht verfügbar
cDNA (eigene Synthese)	2µL	0,08 µg/mL

Tabelle 7 - Reagenzien einer PCR-Reaktion. RNA = ribonucleic acid.

PCR-Protokoll			
Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
1	95°C	180s	keine
2	95°C	45s	35
3	55°C	30s	
4	72°C	90s	
5	72°C	600s	keine
6	4°C		∞

Tabelle 8 - PCR-Protokoll

Reagenz	Eingesetzte Menge	Konzentration
SYBR Premix ExTaq II (Tli RnaseH Plus) (TaKaRa, Kyoto, Japan)	10µL	nicht verfügbar
Vorwärts-Primer (eurofins, Ebersberg, Deutschland)	2µL	0,2 pmol/mL
Rückwärts-Primer (eurofins, Ebersberg, Deutschland)	2µL	0,2 pmol/mL
RNAse-freies Wasser (Ambion, Darmstadt, Deutschland)	4µL	nicht verfügbar
cDNA (eigene Synthese)	2µL	0,1 µg/mL

Tabelle 9 - Zusammensetzung einer RealTime-PCR-Reaktion

Zyklusprotokoll einer RealTime-PCR-Reaktion			
Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
Präinkubation	95°C	360s	keine
3-Schritt-Ampifizierung,			40
Schritt 1	95°C	15s	
Schritt 2	61°C	5s	
Schritt 3	72°C	26s	
Schmelzen,			keine
Schritt 1	95°C	10s	
Schritt 2	65°C	60s	
Schritt 3	97°C	1s	
Kühlen	37°C	∞	keine

Tabelle 10 - Zyklusprotokoll einer RealTime-PCR-Reaktion

4 - Ergebnisse

4.1. Die Rolle der Genexpression von Galectin-9, PVR und PVRL-2 in der AML

Um die Bedeutung der Genexpression von Galectin-9, PVR und PVRL-2 in der AML zu untersuchen, wurde zunächst mittels qRT-PCR das Expressionsniveau in verschiedenen Kohorten bestimmt und anschließend die relative Expression berechnet. Weiter wurden die Expressionsdaten des Patientenkollektivs der AMLSG-07/04-Studie mit klinischen Parametern korreliert. Die Ergebnisse werden im Folgenden beschrieben.

4.1.1. Studienteilnehmer AMLSG-07/04

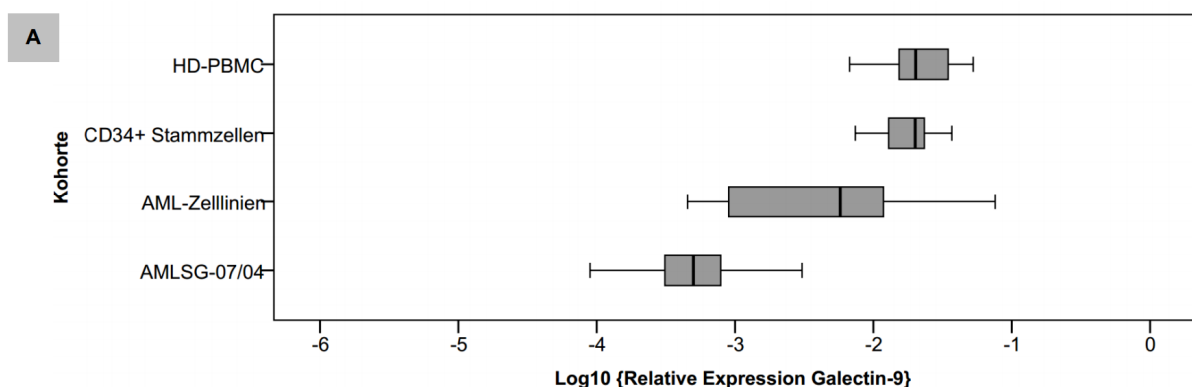
Übliche Informationen zu der analysierten Studienkohorte („AMLSG-07/04“) sind in Tabelle 11 zusammengestellt. Die Einteilungen des Karyotyps erfolgte in drei Risikogruppen - angelehnt an die ELN-Klassifikation (siehe oben).

Charakteristika der untersuchten Studienkohorte AMLSG-07/04	
In die Analyse eingeschlossene Teilnehmer	140
Geschlecht (Anteil in %)	73 (52 %) weiblich, 67 (48 %) männlich
Alter bei Studieneinschluss	Jünger als oder gleich 60 Jahre: 137 Älter als 60 Jahre: 3
Karyotyp	18 (13 %) günstig 72 (51 %) normal 40 (29 %) ungünstig 10 (7 %) nicht verfügbar
medianes Gesamtüberleben (Bereich) [Tage]	1020 (4 – 2997)
medianes rückfallfreies Überleben (Bereich) [Tage]	593 (3 – 2970)
medianes ereignisfreies Überleben (Bereich) [Tage]	213 (4 – 2997)

Tabelle 11 – Charakteristika der untersuchten Studienkohorte AMLSG-07/04. Die Gruppe des Karyotyps „normal“ umfasst die Patienten, die nach ELN-Klassifikation als Intermediate-I oder Intermediate-II eingestuft sind.

4.1.2. Relative Expression von Galectin-9, PVR und PVRL-2 in verschiedenen Kohorten

Eine Übersicht der für Galectin-9 gewonnenen Expressionsdaten gibt Abbildung 10A. Ein Überblick über die Signifikanzniveaus gibt Abbildung 10B. Die Kohorte gesunder PBMC-Spender enthält $n = 20$, die CD34+ Stammzellkohorte $n = 14$, die Kohorte der Zelllinien $n = 14$, und das Patientenkollektiv $n = 139$ Proben.



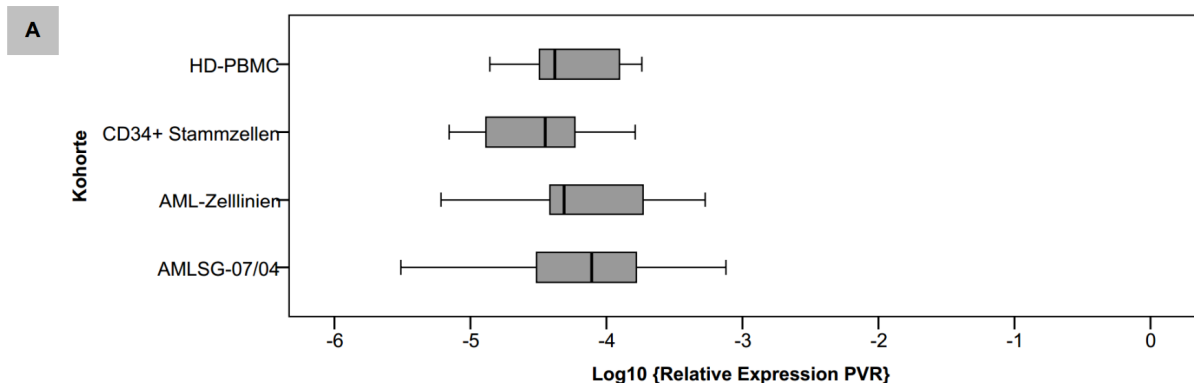
B		HD-PBMCs	CD34+ Stammzellen	AML-Zelllinien	Patientenkollektiv AMLSG-07/04
	HD-PBMCs	-	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	CD34+ Stammzellen	< 0,001	-	< 0,05	< 0,01
	AML-Zelllinien	< 0,001	< 0,05	-	0,35
	Patientenkollektiv AMLSG-07/04	< 0,001	< 0,01	0,35	-

Abbildung 10 – relative Expression von Galectin-9 (A) und Signifikanzniveau der Unterschiede (B) verschiedener Kohorten. HD-PBMC: Healthy-donor PBMC, PBMCs gesunder Spender.

Als HD-PBMC (engl. für Healthy donor peripheral blood mononuclear cells) wird die Gesamtheit mononukleärer Zellen im peripheren Blut, also Lymphozyten und Monozyten, bezeichnet. Vergleicht man die Gruppen gesunder Spender (CD34+ Stammzellen, HD-PBMCs) mit der AML-Gruppe (Patientenkollektiv AMLSG-07/04, AML-Zelllinien), so waren signifikante Unterschiede festzustellen. Es unterschieden sich beispielsweise die Galectin-9-Expressionsniveaus in PBMCs gesunder Spender von denen in AML-Patienten auf einem signifikanten Niveau. Weiter zeigte sich, dass zwischen den AML-Zelllinien und dem Patientenkollektiv keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression bestehen und dass zwischen gesunden Stammzellen (CD34+) und gesunden ausdifferenzierten Zellen (HD-PBMC) signifikante Unterschiede in der Galectin-9-Expression zu finden sind.

Es ist also davon auszugehen, dass sowohl die maligne Transformation als auch die reguläre Ausdifferenzierung eine Änderung in der Galectin-9-Expression nach sich ziehen.

Für PVR wurden mit gleicher Methodik die Expressions- (Abbildung 11A) und Signifikanzniveaus (Abbildung 11B) erfasst. Die Kohorte gesunder PBMC-Spender enthält $n = 20$, die CD34+ Stammzellkohorte $n = 13$, die Kohorte der Zelllinien $n = 13$, und das Patientenkollektiv $n = 140$ Proben.

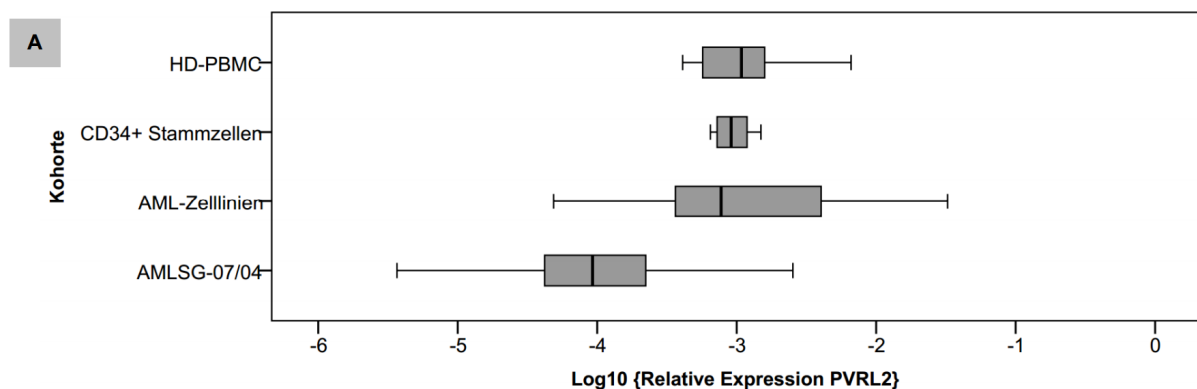


B		HD-PBMCs	CD34+ Stammzellen	AML-Zelllinien	Patientenkollektiv AMLSG-07/04
	HD-PBMCs	-	0,80	< 0,05	0,42
	CD34+ Stammzellen	0,80	-	0,18	0,80
	AML-Zelllinien	< 0,05	0,18	-	0,09
	Patientenkollektiv AMLSG-07/04	0,42	0,80	0,09	-

Abbildung 11 - relative Expression von PVR (A) und Signifikanzniveau der Unterschiede (B) verschiedener Kohorten.

Für PVR kann im Vergleich der Expressionsniveaus in PBMCs gesunder Spender (HD-PBMC) und AML-Zelllinien ein signifikanter Expressionsunterschied festgestellt werden. Im Vergleich zweier Patientenkohorten (HD-PBMC, AMLSG-07/04) kann der Unterschied zwischen Gesunden und Kranken nicht bestätigt werden. Weiter ist im Vergleich der CD34⁺-Stammzellkohorte und der HD-PBMC-Kohorte kein differenzierungsabhängiger Unterschied in der Genexpression von PVR zu sehen.

Für PVRL-2 wurden ebenfalls Expressionsdaten erhoben (Abbildung 12A) und Signifikanzniveaus berechnet (Abbildung 12B). Die Kohorte gesunder PBMC-Spender enthält $n = 18$, die CD34⁺ Stammzellkohorte $n = 12$, die Kohorte der Zelllinien $n = 14$, und das Patientenkollektiv $n = 141$ Proben.



B	HD-PBMCs	CD34+ Stammzellen	AML-Zelllinien	Patientenkollektiv AMLSG-07/04
HD-PBMCs	-	< 0,001	< 0,001	< 0,001
CD34+ Stammzellen	< 0,001	-	1,00	0,56
AML-Zelllinien	< 0,001	1,00	-	0,33
Patientenkollektiv AMLSG-07/04	< 0,001	0,56	0,33	-

Abbildung 12 - Relative Expression von PVRL-2 (A) und Signifikanzniveau der Unterschiede (B) verschiedener Kohorten.

Im Vergleich gesunder ausdifferenzierter (HD-PBMC) und transformierter Zellen (AML-Zelllinien, AMLSG-07/04) lässt sich für PVRL-2 ein signifikanter Unterschied feststellen ($P < 0,001$). Kein signifikanter Unterschied besteht hingegen zwischen CD34⁺-Stammzellen und AML-Zelllinien beziehungsweise (bzw.) AML-Patienten. Weiter lässt sich vermuten, dass ein reifungsabhängiger Unterschied in der Genexpression besteht, da zwischen CD34⁺-Stammzellen und PBMCs gesunder Spender (HD-PBMC) ein signifikanter Unterschied festzustellen ist. Zwischen den als transformiert geltenden Kohorten der AML-Zelllinien und AMLSG-07/04 besteht kein signifikanter Unterschied in der PVRL-2-Expression.

4.1.3. Bedeutung der relativen Expression von Galectin-9, PVR und PVRL-2 für AML-Patienten

Zunächst wurde untersucht, ob Korrelationen zwischen der relativen Expression der drei Immuncheckpoint-Gene bestehen. Hierzu wurde eine bivalente Korrelationsanalyse nach Pearson durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 dargestellt.

Korrelation der relativen Expression verschiedener Gene nach Pearson			
	Galectin-9	PVR	PVRL-2
Galectin-9	-	0,009 ($P = 0,918$)	0,18 ($P < 0,05$)
PVR	0,009 ($P = 0,918$)	-	0,827 ($P < 0,001$)
PVRL-2	0,18 ($P < 0,05$)	0,827 ($P < 0,001$)	-

Tabelle 12 – Korrelation der relativen Expression verschiedener Gene nach Pearson. Die Werte sind als Korrelationskoeffizient (2-seitiges Signifikanzniveau) angegeben.

Aus der Tabelle geht hervor, dass zwischen der Expression von Galectin-9 und PVRL-2 eine schwache, und doch signifikante und zwischen der Expression von PVR und PVRL2 eine sehr starke und signifikante lineare Korrelation besteht.

4.1.3.1. Zusammenhang zwischen klinischen Parametern und Genexpressionsniveaus

Hierbei soll untersucht werden welchen Einfluss die Genexpression von Galectin-9, PVR und PVRL-2 auf das Gesamtüberleben, das ereignisfreie Überleben und das rückfallfreie Überleben der Patienten der AMLSG-07/04-Studie hat. Es wurde eine Cox-Regression mit manueller Rückwärtsselektion durchgeführt. Die Werte der relativen Expression wurden zur Basis 10 logarithmiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 dargestellt.

A Cox-Regression: untersuchte Einflussfaktoren

Galectin-9-Expressionsniveau (Log_{10})
PVR-Expressionsniveau (Log_{10})
PVRL-2-Expressionsniveau (Log_{10})
Karyotyp (günstig, normal, ungünstig)
FLT3-Status (ITD und TKD)
Alter

B Einflussfaktoren auf das Gesamtüberleben (OS), alle Faktoren

Einflussfaktor	Hazard Ratio (HR)	95%-Konfidenzintervall	Signifikanzniveau
Galectin-9	0,67	0,54 - 0,84	< 0,001
PVR	1,63	1,21 - 2,12	0,001
Karyotyp	2,10	1,39 - 3,15	< 0,001

C Einflussfaktoren auf das Gesamtüberleben (OS), ohne PVR

Einflussfaktor	Hazard Ratio (HR)	95%-Konfidenzintervall	Signifikanzniveau
Galectin-9	0,68	0,55 - 0,85	0,001
PVRL-2	1,58	1,17 - 2,13	< 0,01
Karyotyp	2,00	1,34 - 2,98	0,001

D Einflussfaktoren auf das ereignisfreie Überlebensintervall (EFS), alle Faktoren

Einflussfaktor	Hazard Ratio (HR)	95%-Konfidenzintervall	Signifikanzniveau
Galectin-9	0,73	0,58 - 0,92	< 0,01
PVR	1,54	1,10 - 2,15	< 0,05
Karyotyp	2,35	1,55 - 3,58	< 0,001

E Einflussfaktoren auf das ereignisfreie Überlebensintervall (EFS), ohne PVR

Einflussfaktor	Hazard Ratio (HR)	95%-Konfidenzintervall	Signifikanzniveau
Galectin-9	0,74	0,60 - 0,92	< 0,01
PVRL-2	1,46	1,10 - 1,99	< 0,05
Karyotyp	2,32	1,54 - 3,50	< 0,001

F Einflussfaktoren auf das rückfallfreie Überlebensintervall (RFS), alle Faktoren

Einflussfaktor	Hazard Ratio (HR)	95%-Konfidenzintervall	Signifikanzniveau
Galectin-9	0,67	0,50 - 0,90	< 0,01
PVR	1,66	1,12 - 2,48	< 0,05
Karyotyp	1,79	1,09 - 2,94	< 0,05

G Einflussfaktoren auf das rückfallfreie Überlebensintervall (RFS), ohne PVR

Einflussfaktor	Hazard Ratio (HR)	95%-Konfidenzintervall	Signifikanzniveau
Galectin-9	0,71	0,53 - 0,94	< 0,05
PVRL-2	1,47	1,00 - 2,16	< 0,05
Karyotyp	1,76	1,09 - 2,84	< 0,05

Abbildung 13 – Einflussfaktoren auf das Gesamtüberleben (OS; B, C), ereignisfreie Überleben (EFS; D, E) und rückfallfreie Überleben (RFS; F, G) in der AMLSG-07/04-Kohorte. ITD = Internal tandem repeat, TKD = Tyrosinkinasedomäne, HR = Hazard ratio.

Um die Ergebnisse in Bezug zu bekannten Einflussfaktoren setzen zu können, wurde neben der Genexpression von Galectin-9, PVR und PVRL-2 auch das Alter, der Karyotyp und der FLT3-Status in die Analyse einbezogen.

Nur wenn PVR nicht in die Analyse eingeschlossen wird, kann der Einfluss von PVRL-2 ermittelt werden. Daher sind in

Abbildung 13B, D und F Analysen mit allen Faktoren und in C, E und G Analysen ohne PVR dargestellt. Dieser Umstand erklärt sich möglicherweise mit der starken positiven Korrelation der Expression von PVR und PVRL-2. Wie in Tabelle 12 dargestellt, beträgt der Korrelationskoeffizient der PVR- und PVRL-2-Expression nach Pearson 0,827.

Der FLT3-Status und das Alter der Patienten ist in allen Analysen bereits im ersten Schritt nicht signifikant und wurde folglich aus der Analyse ausgeschlossen. Da nur drei Patienten ein Alter über 60 Jahren aufwiesen, ist dies erwartungsgemäß.

Über alle Analysen hinweg zeigt sich, dass ein ungünstiger Karyotyp, unter den untersuchten Faktoren, der größte negative Prädiktor für das OS, EFS und das RFS ist. Ein Patient mit einem normalen Karyotyp hat innerhalb eines Jahres in etwa eine doppelt so große Wahrscheinlichkeit zu sterben (OS), ein Ereignis zu erleiden (EFS) oder ein Rezidiv zu bekommen (RFS) wie ein Patient mit einem günstigen Karyotyp. Gleiches gilt für den Vergleich eines normalen mit einem ungünstigen Karyotyp. Es zeigt sich weiter, dass das HR in Analysen mit und ohne PVR relativ konstant ist. Auch die verschiedenen Endpunkte werden durch den Karyotyp ähnlich stark beeinflusst, wobei der Einfluss auf das RFS am geringsten (HR \approx 1,8) und auf das EFS (HR \approx 2,3) am größten ist.

Für Galectin-9 zeigt sich über alle Analysen und Endpunkte hinweg eine protektive Rolle. Eine Verzehnfachung der mRNA-Expression (mRNA engl. für messenger ribonucleic acid) bedeutet eine Reduktion des Risikos um 33% (HR \approx 0,67) im nächsten Jahr zu sterben (OS), eine Reduktion um 26% (HR \approx 0,74) im nächsten Jahr ein Ereignis zu erleiden (EFS) und eine Reduktion um zirka 31% (HR \approx 0,69) im nächsten Jahr ein Rezidiv zu entwickeln (RFS).

PVR und PVRL-2 sind bezogen auf alle untersuchten Endpunkte negative Prädiktoren. Bei einer Einbeziehung beider Expressionsniveaus in die Cox-Regression bleibt immer PVR als unabhängiger Einflussfaktor auf die Endpunkte übrig, wohingegen PVRL-2 im zweiten Schritt ausgeschlossen werden muss. Das HR von PVR ist für alle Endpunkte 5-9% höher als das von PVRL-2.

Bei einer Verzehnfachung der mRNA-Expression von PVR steigt das Risiko im nächsten Jahr zu sterben (OS) um 63%, ein Ereignis zu erleiden (EFS) um 54% und ein Rezidiv zu entwickeln (RFS) um 66%.

Bei einer Verzehnfachung der mRNA-Expression von PVRL-2 hingegen steigt das Risiko im nächsten Jahr zu sterben um 58%, ein Ereignis zu erleiden um 46% und ein Rezidiv zu entwickeln um 47%.

Zusammenfassend führt für alle Endpunkte eine Verzehnfachung der Expression von Galectin-9 zu einer Risikoreduktion um ein Drittel, während eine Verzehnfachung der Expression von PVR oder PVRL-2 eine 1,5-fache Risikosteigerung bedeutet.

4.2. Auswirkung von Galectin-9, PVR und PVRL-2 auf die Lyse von Tumorzellen

Es wurde der Einfluss von Galectin-9, PVR und PVRL-2 auf die spezifische Lyse von Tumorzellen durch PBMCs gesunder Spender ermittelt. Hierzu wurde der unter Punkt 3.6 beschriebene Assay verwendet.

4.2.1. Proteinexpression auf verschiedenen Zelltypen

Zunächst wurden orientierend die Proteinexpressionsniveaus der drei Immuncheckpoint-Liganden auf PBMCs und AML-Zelllinien bestimmt. In Tabelle 13 ist der Anteil Protein-positiver Zellen und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) dargestellt.

Während PVR und PVRL-2 zu einem hohen Prozentsatz und in hoher Dichte auf allen AML-Zelllinien vorhanden sind, schwankt die Expression von Galectin-9 deutlich, wobei die Dichte auf den Zellen durchweg wesentlich geringer ist als die von PVR und PVRL-2. Im Vergleich zu den untersuchten AML-Zelllinien exprimieren PBMCs gesunder Spender zu etwa gleichem Anteil und in etwa gleicher Dichte Galectin-9. Die Immuncheckpoint-Liganden PVR und PVRL-2 sind deutlich seltener und weniger dicht exprimiert.

Diese Ergebnisse sind für Antikörperversuche zu beachten, da sich die Effizienz der Blockade von Immuncheckpoint-Liganden möglicherweise auch durch ein quantitativ verändertes Expressionsmuster beeinflussen lässt und gegebenenfalls die Antikörperkonzentration angepasst werden muss.

Proteinexpression von Galectin-9, PVR und PVRL-2 auf AML-Zelllinien und PBMCs			
	Galectin-9 % positive Zellen (MFI)	PVR % positive Zellen (MFI)	PVRL-2 % positive Zellen (MFI)
AML-Zelllinien			
HL60 <i>n</i> = 2	49,3 (40)	99,8 (1562)	99,7 (1148)
UKE-1 <i>n</i> = 2	82,4 (44)	99,4 (1499)	99,3 (3231)
Kasumi-1 <i>n</i> = 2	59,5 (42)	99,5 (1437)	99,6 (1196)
MV4-11 <i>n</i> = 2	87,9 (61)	99,9 (2471)	99,9 (3193)
KG-1 <i>n</i> = 2	61,1 (12)	99,2 (474)	99,6 (566)
THP-1 <i>n</i> = 2	65,1 (24)	99,6 (1490)	99,8 (528)
MOLM-13 <i>n</i> = 2	32,9 (40)	99,8 (764)	99,7 (1185)
<i>Durchschnitt</i>	62,6 (38)	99,6 (1385)	99,7 (1578)
Mononukleäre Zellen gesunder Spender			
PBMCs <i>n</i> = 4	57 (38)	52 (53)	40 (47)

Tabelle 13 – Proteinexpression von Galectin-9, PVR und PVRL-2 auf AML-Zelllinien und PBMCs.

4.2.2. Andere Einflussfaktoren auf die AML-Zellyse

4.2.2.1. BiTE®-Konzentration

In einem FACS-basierten Assay wurde zunächst ein orientierender Versuch zur BiTE®-Konzentration durchgeführt. Ziel ist es zum einen die Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der Lyse mit BiTE®-Antikörper und damit eine der Literatur entsprechende Funktion sicherzustellen und zum anderen die minimale Konzentration des BiTE® Antikörpers zu finden, bei der das Gleichgewicht zwischen Zellwachstum und Zellyse zur Zellyse verschoben ist. Dies soll in den Versuchen mit Immuncheckpoint-Antikörpern helfen auch kleinere Effekte sichtbar zu machen. Hierzu wurden die Zelllinien KG-1, MV4-11, MOLM-13 und Kasumi-1 über 24h und 48h mit BiTE®-Konzentrationen von 1pg/mL bis 500pg/mL inkubiert und der Anteil toter AML-Zellen an allen AML-Zellen (= relative Zellyse) im Verhältnis zur Messung zu Versuchsbeginn bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt.

Zu erkennen ist, dass alle vier Zelllinien konzentrations- und inkubationszeitabhängig von mononukleären Zellen gesunder Spender lysiert werden. Dabei findet sich die Grenze zu einer signifikanten Lyse überwiegend bei 100 pg/mL BiTE®. Nach 24 Stunden variiert die n-fache Änderung des Prozentsatzes toter AML-Zellen an allen AML-Zellen im Vergleich zum Ausgangswert in der Gruppe mit 100pg/mL BiTE® von 2,1-fach (Kasumi-1) bis 3,7-fach (UKE-1).

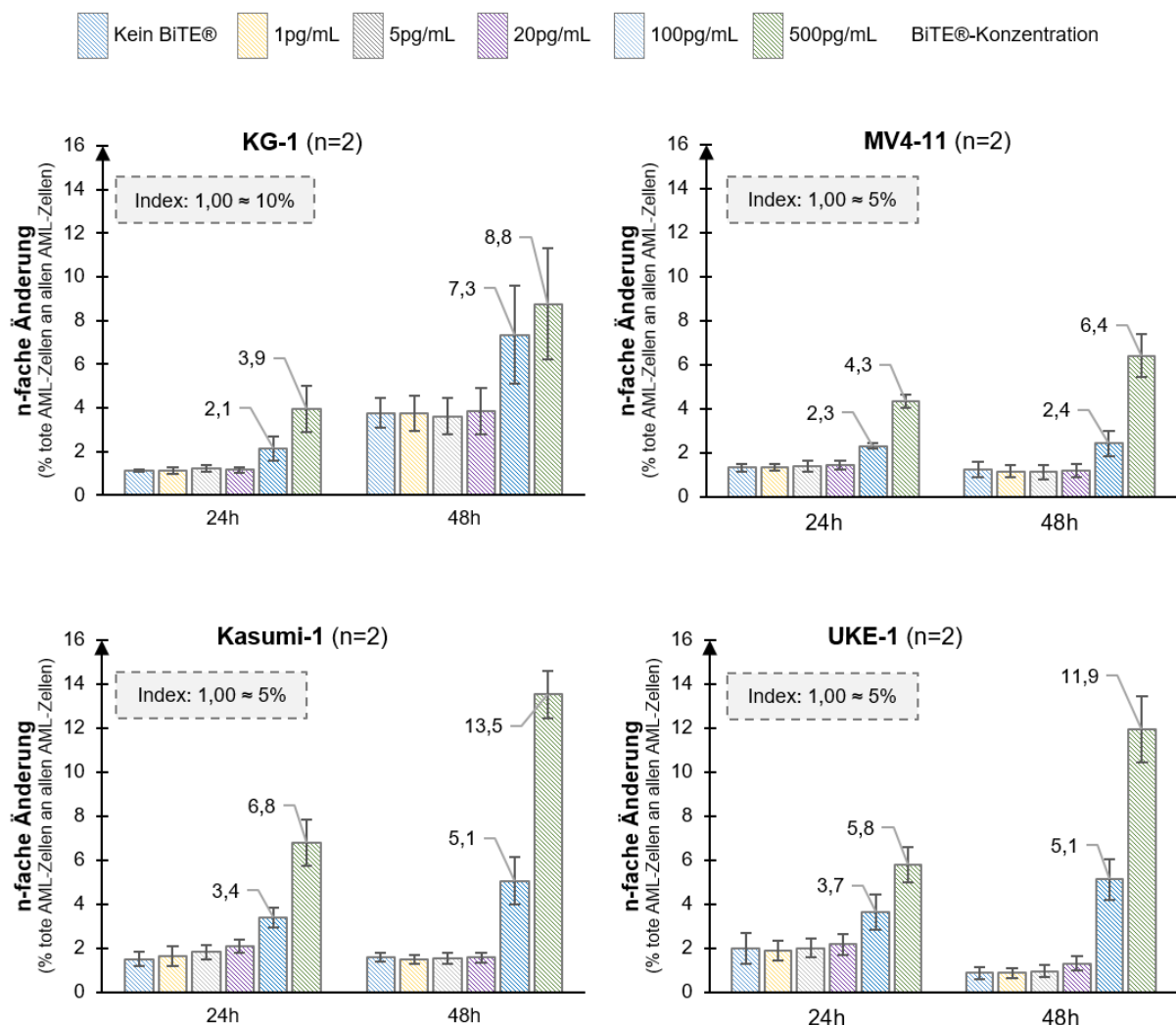


Abbildung 14 – BiTE®-Titration mit verschiedenen Zelllinien. Die Ergebnisse wurden zur 0h-Messung ins Verhältnis gesetzt.

4.2.2.2. Immunzellspender

Betrachtet man die Lyse von KG-1-Zellen durch Immunzellen verschiedener Spender (vergleiche Abbildung 15), so wird deutlich, dass der Anteil lysierter Zellen auch durch den Immunzellspender

maßgeblich beeinflusst wird. Die Abhängigkeit vom Immunzellspender kann, trotz Einhaltung der Zellkulturrahmenbedingungen während der Auftrennung nach Ficoll, auch in weiteren Versuchen beobachtet werden. Betrachtet man alle 12 Messwerte einer Gruppe (3 Messwerte je Immunzellspender und Gruppe) zusammen, zeigt sich, dass die Standardabweichung des Mittelwertes mit steigender BiTE®-Konzentration zunimmt: In der Gruppe ohne BiTE® beträgt der Mittelwert 1,40 und die Standardabweichung 0,13, in der Gruppe 100pg/mL BiTE® beträgt der Mittelwert 1,92 und die Standardabweichung 0,26 und in der Gruppe 1000pg/mL BiTE® beträgt der Mittelwert 2,91 und die Standardabweichung 0,39.

Daher müssen, anders als geplant, bei den Versuchen mit Immuncheckpoint-Antikörpern die Gruppen „ohne BiTE®“ und „mit BiTE®“ jeweils gruppenintern normalisiert werden, das heißt (d.h.) alle Ansätze mit Immuncheckpoint-Antikörpern, die keinen BiTE® enthalten, werden auf „ohne BiTE®“, alle die BiTE® enthalten auf „BiTE® alleine“ normalisiert (Umsetzung der Normalisierung siehe Punkt 3.6.4).

Für Versuche mit Immuncheckpoint-Antikörpern wurde eine BiTE®-Konzentration von 100 pg/mL und eine Inkubationszeit von 24 Stunden gewählt.

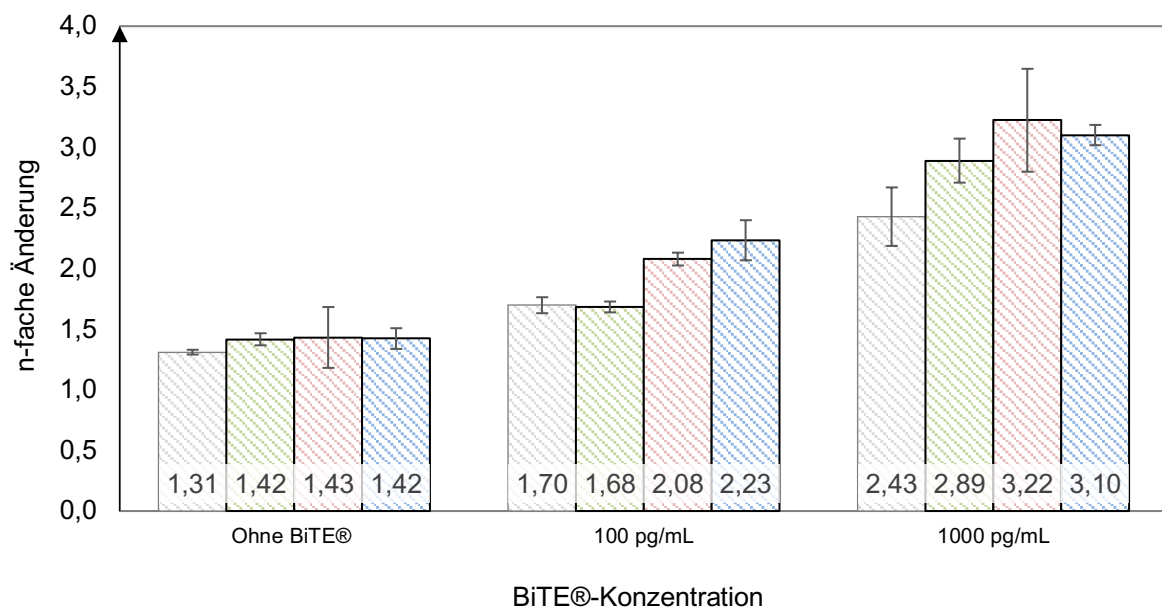


Abbildung 15 – Effekt von verschiedenen Immunzellspendern auf die Lyse von Kasumi-1-Zellen. Dargestellt sind Werte einer 24h-Messung relativ zur Messung zu Versuchsbeginn (0h-Messung entspricht 1,00). Den jeweiligen Mischansätzen aus Immunzellen und Kasumi-1-Zellen wurden unterschiedliche Mengen BiTE® Antikörper zugefügt. Die Durchführung erfolgte parallel an einem Versuchstag, sodass alle Kasumi-1-Zellen aus dem gleichen Pool stammten.

4.2.3. Blockade von Immuncheckpoint-Liganden

4.2.3.1. Nachweis der Spezifität der beobachteten Lyse

Zunächst sollte überprüft werden, ob es durch die Verwendung von Antikörpern zu einer Fc-vermittelten Lysesteigerung der AML-Zelllinien-Zellen im Sinne einer Antikörper-abhängigen Zellzytotoxizität (ADCC, engl.: antibody dependent cellular cytotoxicity) kommt. Hierzu wurde ein anti-hCD117-Antikörper (Antikörper, der humanes CD117 erkennt, entspricht anti-c-Kit) in ähnlicher Konzentration wie die Immuncheckpoint-Antikörper (50µg/mL und 10µg/mL) eingesetzt und die Zelllyse in Parallelansätzen mit PVRL-2-L14 („Positivkontrolle“) bestimmt. In Vorarbeiten konnte Dr. Jasmin Wellbrock in Zusammenarbeit mit dem FACS-Routinelabor zeigen, dass CD117 nicht auf PBMCs gesunder Spender, jedoch auf einigen AML-Zelllinien exprimiert wird und, dass sich in Proliferationsversuchen selbst bei einer Konzentration von 50µg/mL nur geringe Auswirkungen auf die Vitalität durch die Blockade von c-Kit ergeben (Daten nicht gezeigt).

Für die Versuche wurde eine c-Kit hochexprimierende Zelllinie, Kasumi-1, und eine c-Kit niedrigexprimierende Zelllinie, UKE-1, gewählt (vergleiche Abbildung 16).

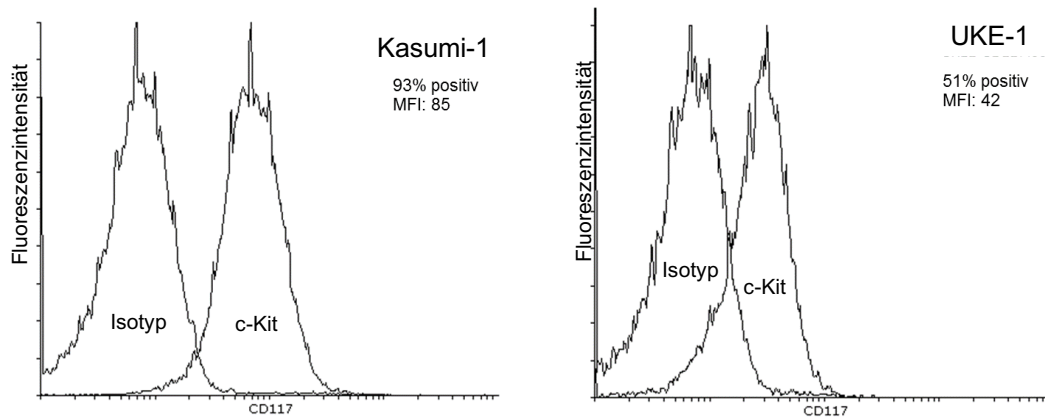
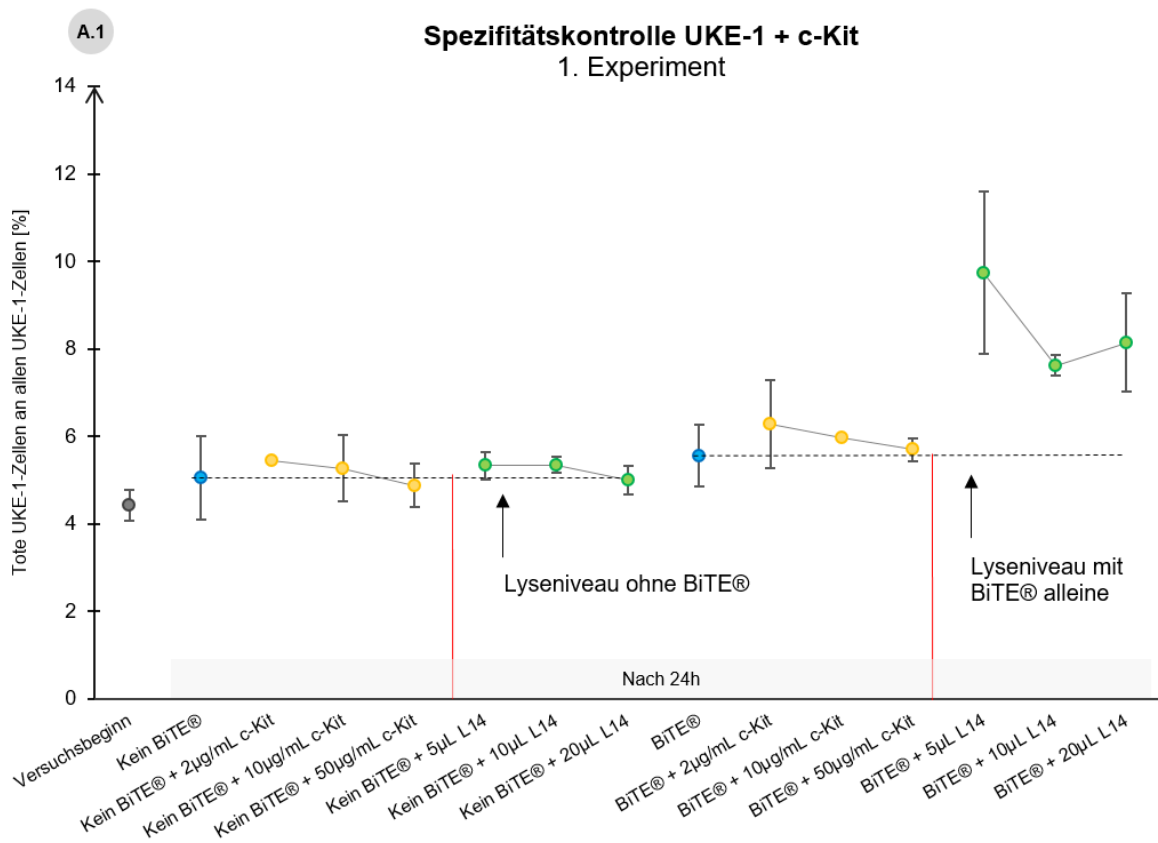
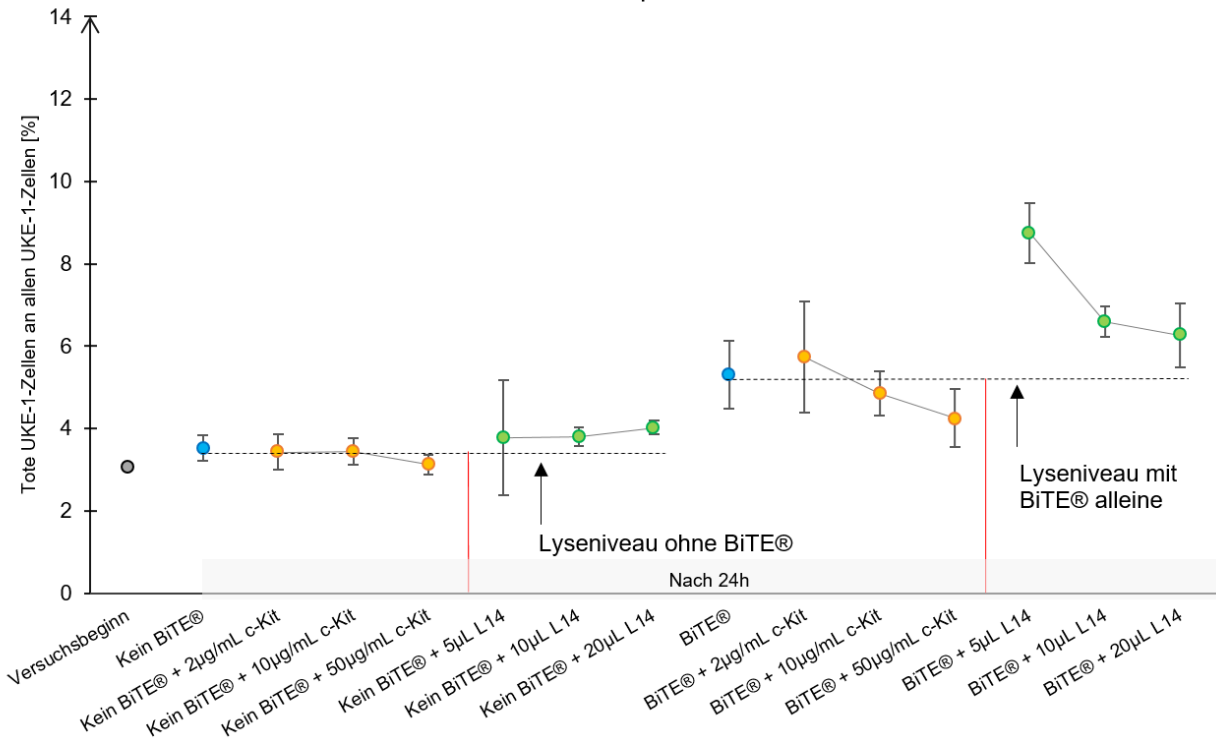


Abbildung 16 – Expression von c-Kit (CD117) auf Kasumi-1- und UKE-1-Zellen. Dargestellt ist eine exemplarische FACS-Messung von Isotyp- und c-Kit-Antikörper.



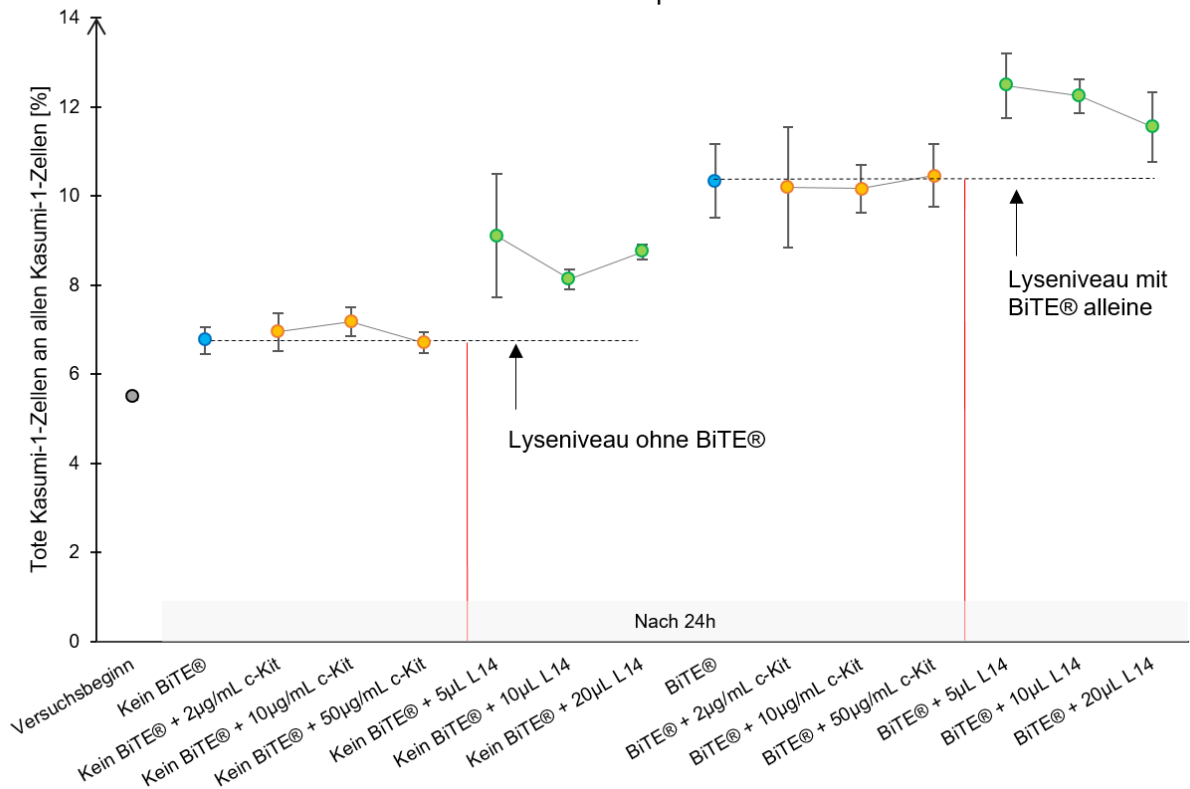
A.2

Spezifitätskontrolle UKE-1 + c-Kit 2. Experiment



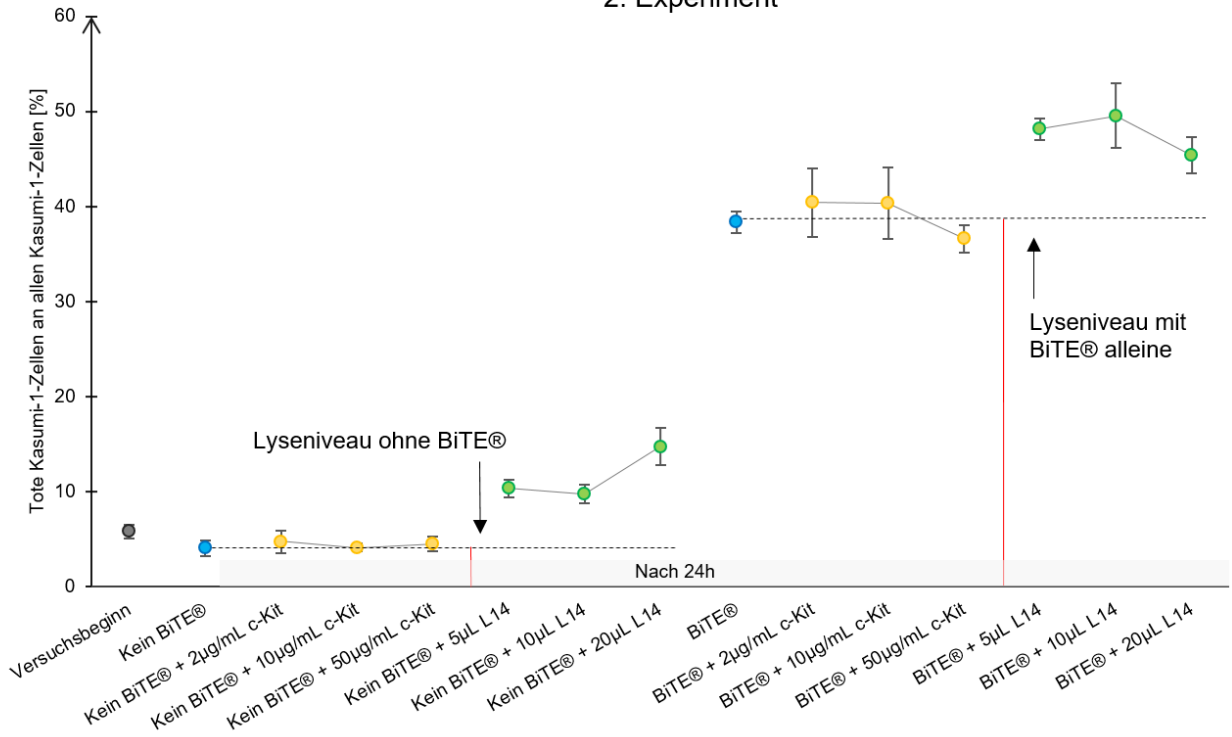
B.1

Spezifitätskontrolle Kasumi-1 + c-Kit 1. Experiment



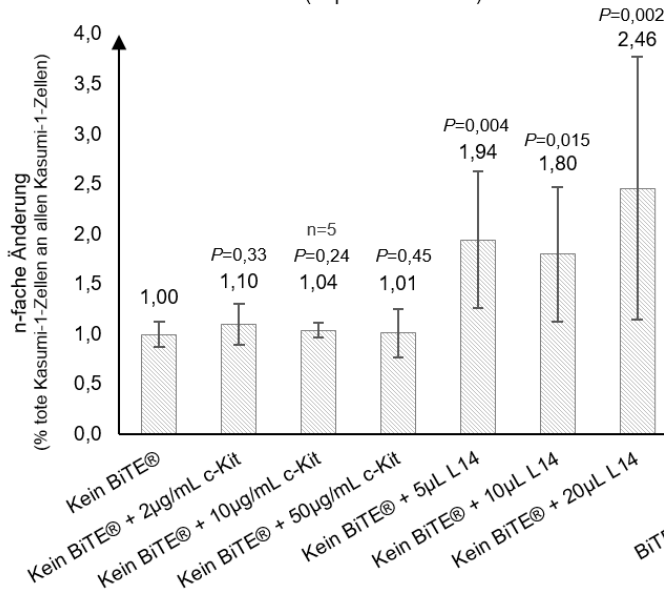
B.2

Spezifitätskontrolle Kasumi-1 + c-Kit 2. Experiment

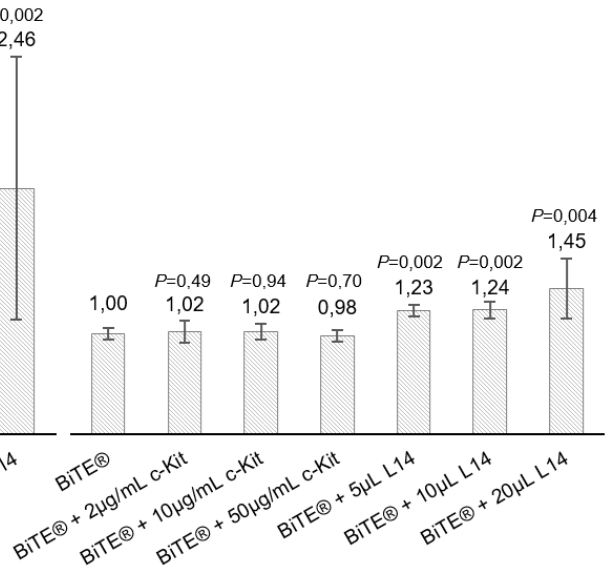


C Kombinierte Ergebnisse für Kasumi-1

C.1 Gruppe ohne BiTE®, nach 24h (Experimente 1 + 2)



C.2 Gruppe mit BiTE®, nach 24h (Experimente 1 + 2)



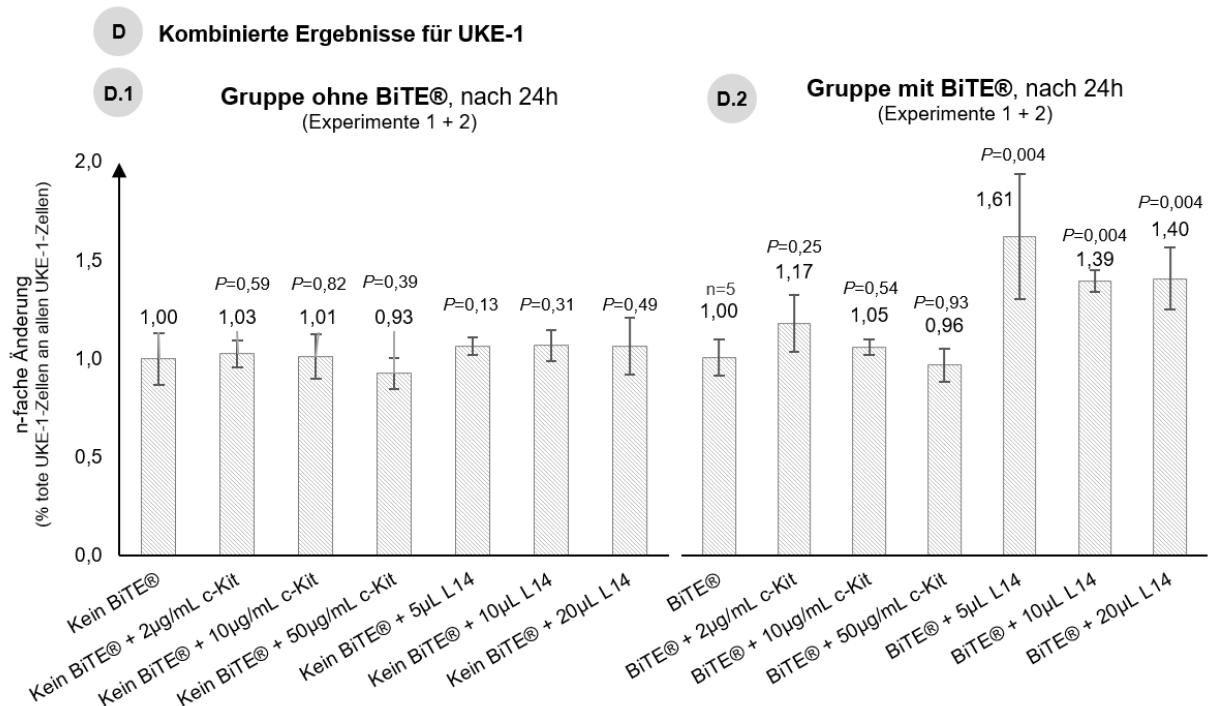


Abbildung 17 – Einfluss von ADCC auf die AML-Zellyse in einem gemischten Ansatz. Die Einzelversuchsübersichten mit der Darstellung des Anteils toter AML-Zellen an allen AML-Zellen finden sich in Abschnitt A.1 und A.2 für UKE-1 und in B.1 und B.2 für Kasumi-1. Die Kombination der Versuche ist nach Zelllinie in Abschnitt C und D als n-fache Änderung (engl.: fold-change) dargestellt. Die BiTE®-Konzentration betrug 100pg/mL. Die Signifikanzniveaus („P-Wert“) beziehen sich jeweils auf „Kein BiTE®“ (Abschnitte C.1, D.1) bzw. „BiTE®“ (Abschnitte C.2, D.2).

In Abbildung 17 dargestellt sind die Ergebnisse der Spezifitätskontrolle. Die kombinierten Versuchsergebnisse in den Abschnitten C und D (Abbildung 17) verdeutlichen, dass es zu keinem signifikanten Anstieg der Lyse durch den Einsatz eines c-Kit-Antikörpers kommt. Hingegen führt der PVRL-2-L14-Antikörper mit Kasumi-1 sowohl mit als auch ohne BiTE® zu einem signifikanten Anstieg der Lyse. Dies zeigte sich auch für UKE-1 in der Gruppe mit BiTE® (Abschnitt D.2). In der Gruppe ohne BiTE® kann weder durch Verwendung eines c-Kit-Antikörpers noch des PVRL-2-L14-Antikörpers ein signifikanter Lyseanstieg beobachtet werden.

Alle im Folgenden dargestellten Effekte durch die Blockade von PVR, PVRL-2 und Galectin-9 sind mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht auf eine ADCC zurückzuführen.

4.2.3.2. Wirkung von PVR auf die Targetzellyse

Der PVR-blockierende Antikörper D171 wurde in Konzentrationen von 4µg/mL und 20µg/mL eingesetzt. Als Targetzellen wurden MV4-11- und KG-1-Zellen genutzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 zusammengefasst.

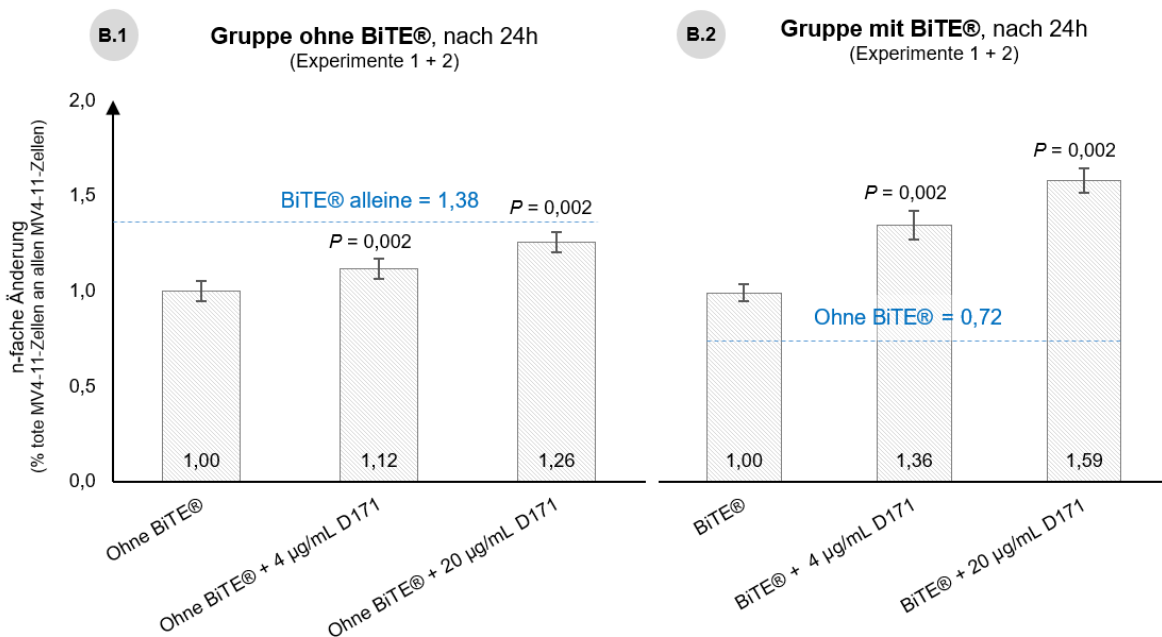
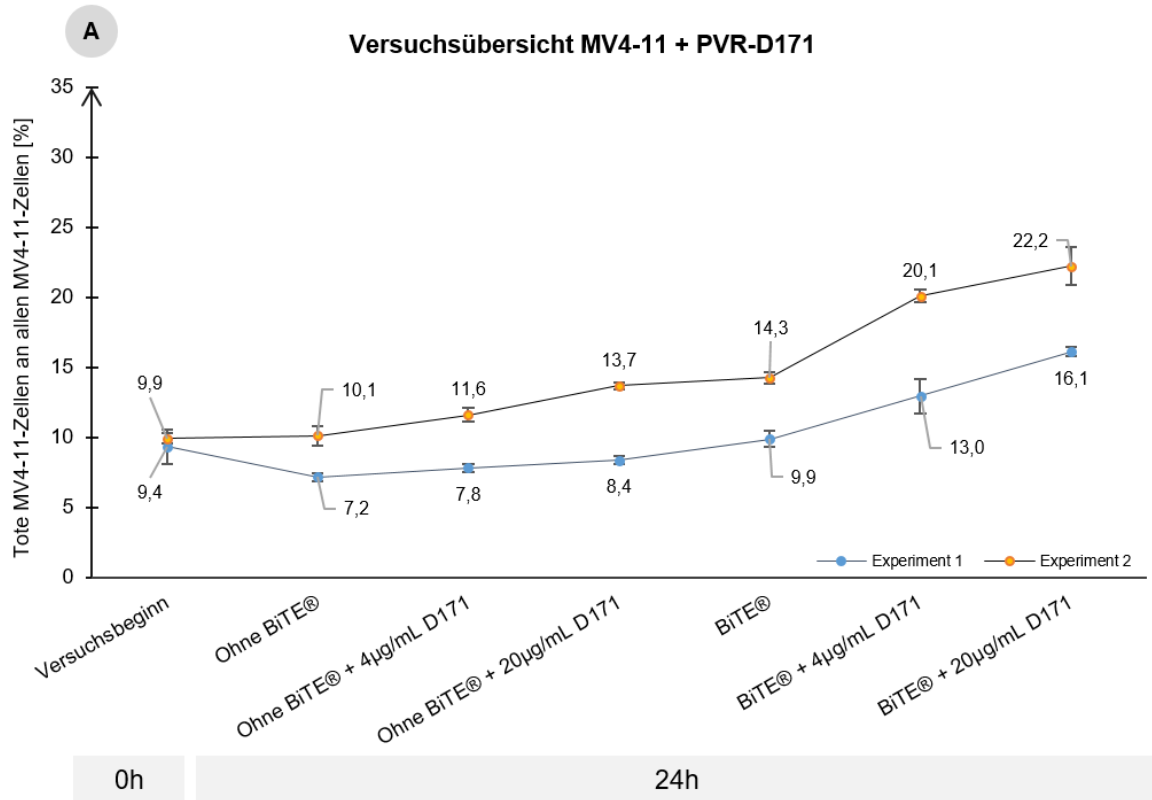
Es kann gezeigt werden, dass die Blockade von PVR zu einem signifikanten Anstieg der Zellyse führt. Weiter kann gezeigt werden, dass die Verwendung von D171 in hoher Konzentration ohne BiTE® zu einem vergleichbar hohen Lyseeffekt führt wie die Einzelbehandlung mit BiTE®. Für MV4-11 kann eine Konzentrationsabhängigkeit der Lysesteigerung festgestellt werden, d.h. die Ansätze mit 4µg/mL D171 und 20µg/mL D171 unterschieden sich signifikant (ohne BiTE®: $P = 0,015$; mit BiTE®: $P = 0,002$).

Deutlich wird außerdem, dass sich bei der Zugabe von BiTE® additive Effekte ergeben. So ist bei beiden Zelllinien die Lyse in Kombinationsansätzen mit BiTE® und D171 höher als in der Einzelbehandlung mit BiTE® und diese wiederum höher als in den Gruppen ohne BiTE®.

Nicht eindeutig kann festgestellt werden, ob bei gleichbleibender D171-Konzentration die Zugabe von BiTE® den Lyseeffekt des D171 verstärkt. Während bei MV4-11 die Zugabe von 20µg/mL ohne Verwendung von BiTE® zu einer Lysesteigerung von durchschnittlich 26% führt, wird bei Verwendung

des BiTE® dieser Effekt auf 59% erhöht (Abbildung 18 B.1, B.2). Ähnliches gilt auch für eine D171-Konzentration von 4µg/mL. Hingegen wird bei Verwendung von KG-1-Zellen ein größerer lysesteigernder Effekt ohne BiTE® beobachtet (58% im Gegensatz zu 34%).

Bei der Betrachtung des Anteils apoptotischer AML-Zellen (Abbildung 18 A, C) wird deutlich, dass die Kombinationstherapie (BiTE® + 20µg/mL D171) zwar bei beiden Zelllinien den stärksten Kill bewirkt, jedoch der Therapieeffekt unterschiedlich groß ist. Die maximale Therapie vergrößert den Anteil toter AML-Zellen bei MV4-11 um den Faktor 1,7 – 2,2 und bei KG-1 um den Faktor 5,6 – 7.



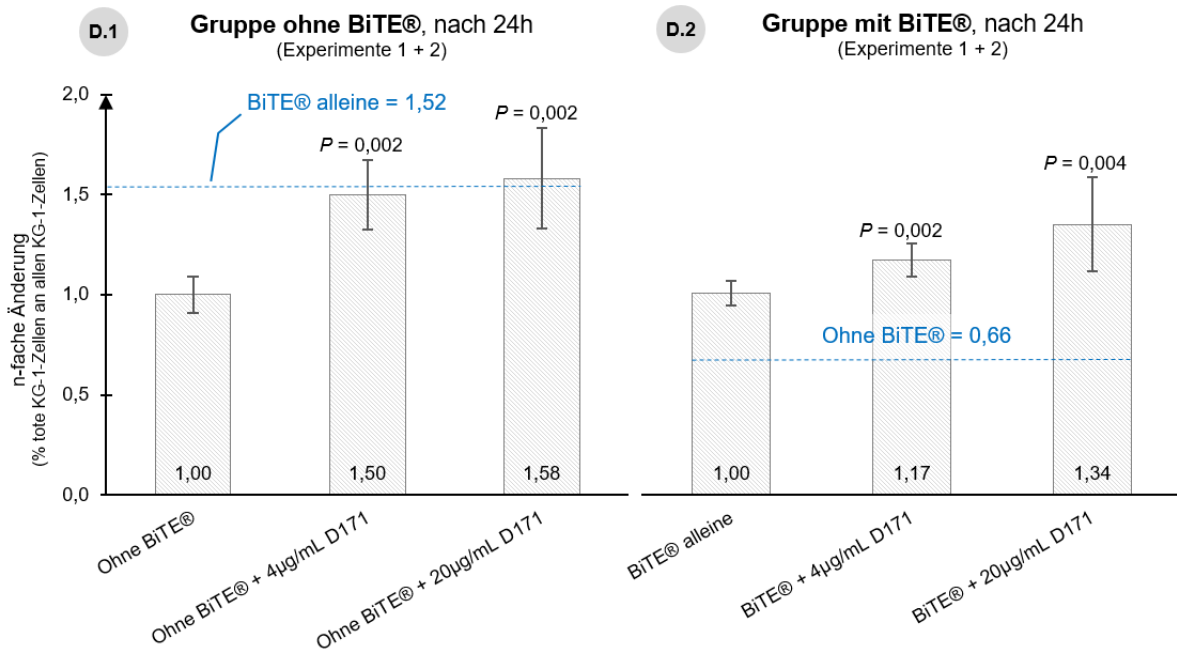
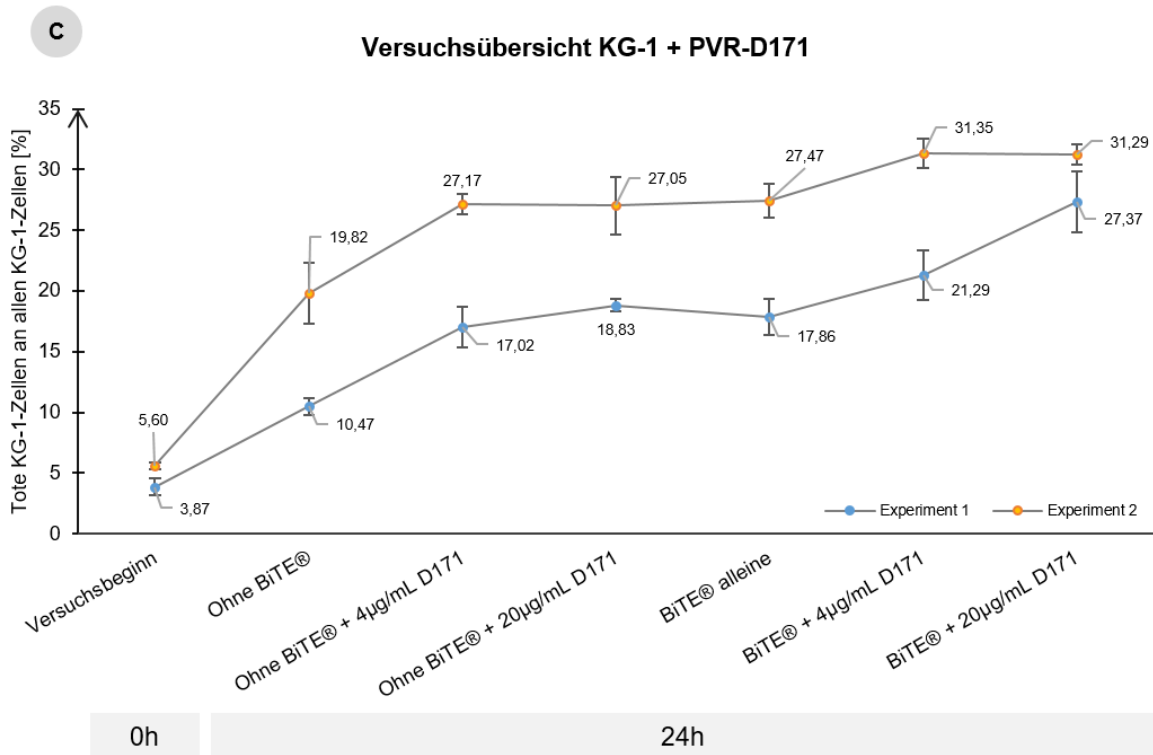


Abbildung 18 – Quantitative Effekte der PVR-Blockade auf die Immunantwort gegen MV4-11 und KG-1. Für jeden Einzelversuch sind die Anteile toter AML-Zellen an allen AML-Zellen im Versuchsverlauf dargestellt (Abschnitt A, C). Die Kombinationen der Versuche sind in den Abschnitten B.1 und B.2 sowie D.1 und D.2 dargestellt. Die angegebenen Signifikanzniveaus („P-Werte“) beziehen sich auf den Ansatz „Ohne BiTE®“ (B.1, D.1) oder „BiTE® alleine“ (B.2, D.2). Die BiTE®-Konzentration betrug 100 pg/mL.

4.2.3.3. Wirkung von PVRL-2 auf die Targetzellyse

Der PVRL-2-bindende Antikörper L14 wurde in Volumina von 5µL, 10µL und 20µL verwendet, um die Wirkung von PVRL-2 auf MV4-11-, Kasumi-1- und UKE-1-Zellen zu blockieren. Da es sich um einen

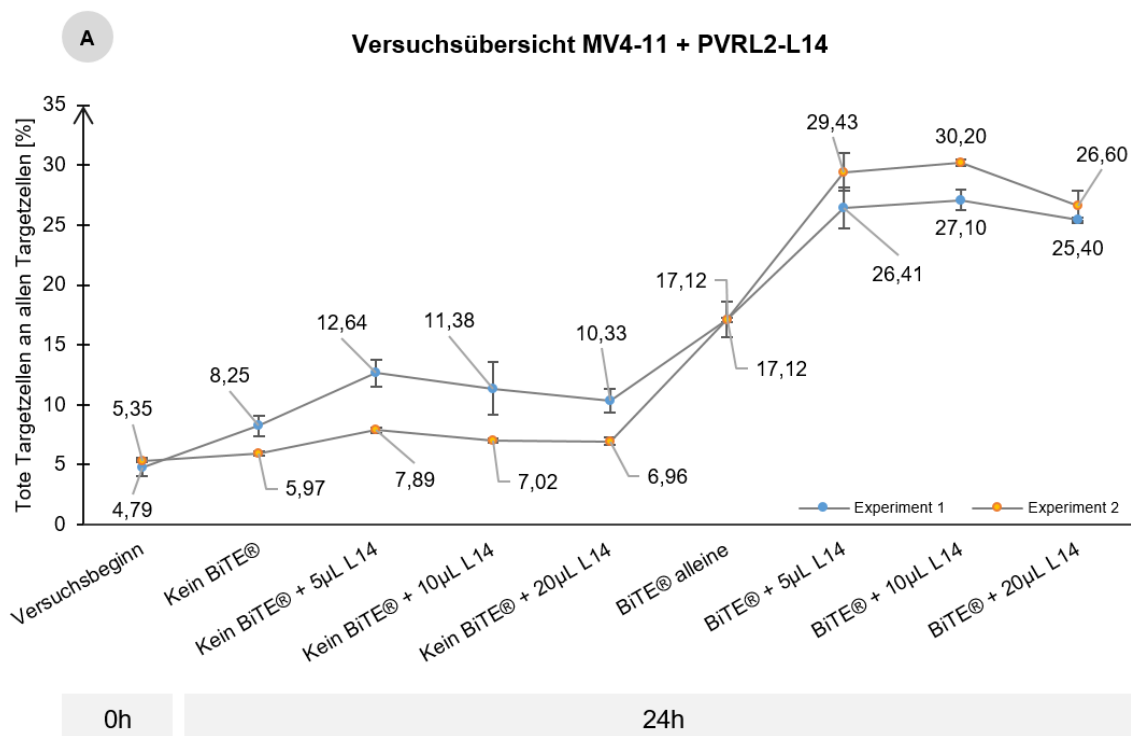
nicht-kommerziellen Antikörper handelt ist keine Konzentration bekannt, jedoch wurde für alle Versuche ein großer Pool von Hybridomüberstand verwendet, sodass die Konzentration konstant war. Die Effekte der PVRL-2-Blockade auf die Targetzelllyse sind in Abbildung 19 zusammengefasst. Mit Kasumi-1 wurden insgesamt drei Experimente durchgeführt, wobei lediglich Experiment 1 und 3 in die Beurteilung mit einfließen, da Experiment 2 einen ungeklärt großen Effekt des BiTE® Antikörpers aufwies.

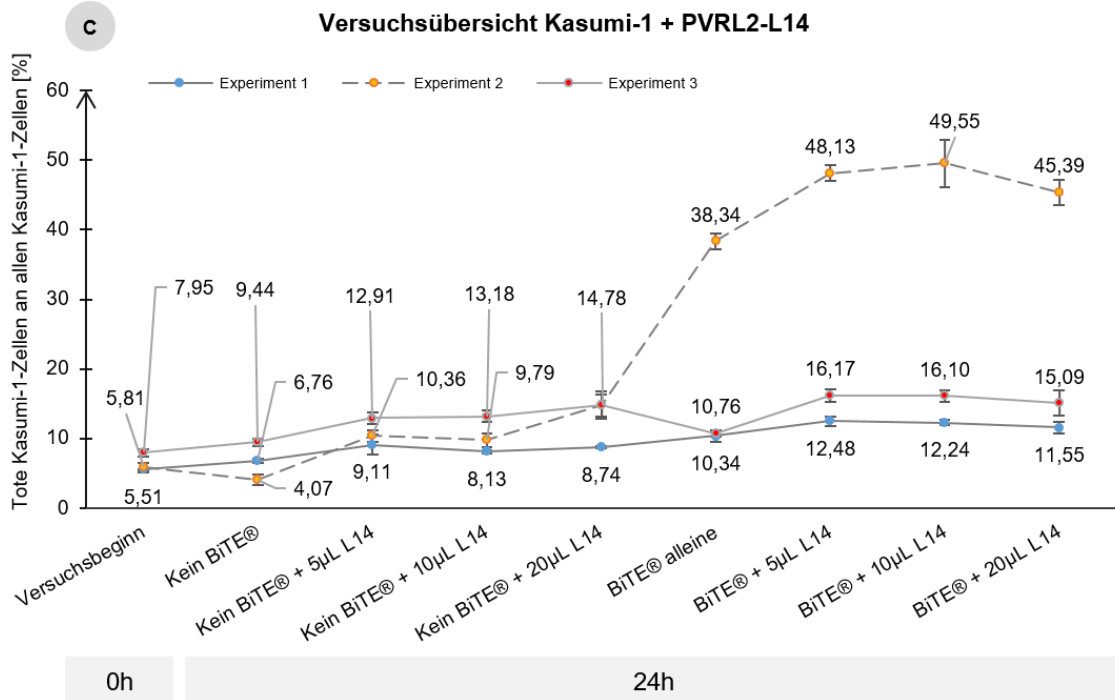
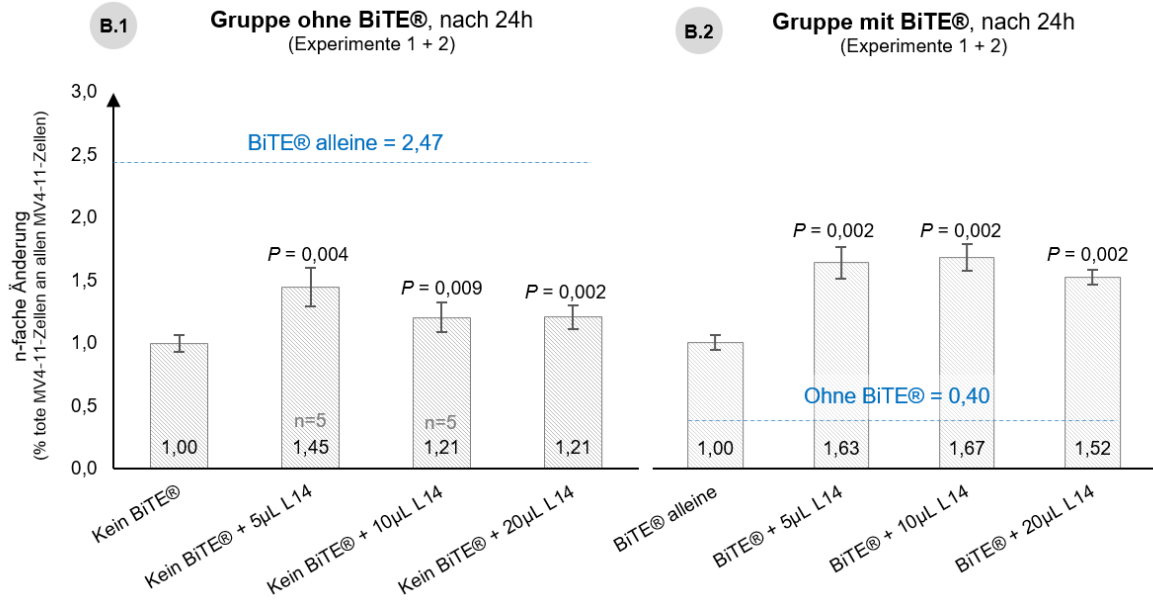
Die Hinzugabe von L14 führt bei allen Zelllinien - mit Ausnahme der Gruppe „ohne BiTE®“ bei UKE-1 - zum Anstieg der Zellyse. Bei Kasumi-1 führt die Einzelbehandlung mit L14 zu einem annähernd so großen Anstieg der Zellyse wie mit BiTE® alleine. Für Kasumi-1 und UKE-1 ist der Effekt des L14 alleine deutlich geringer als der der Einzelbehandlung mit BiTE®.

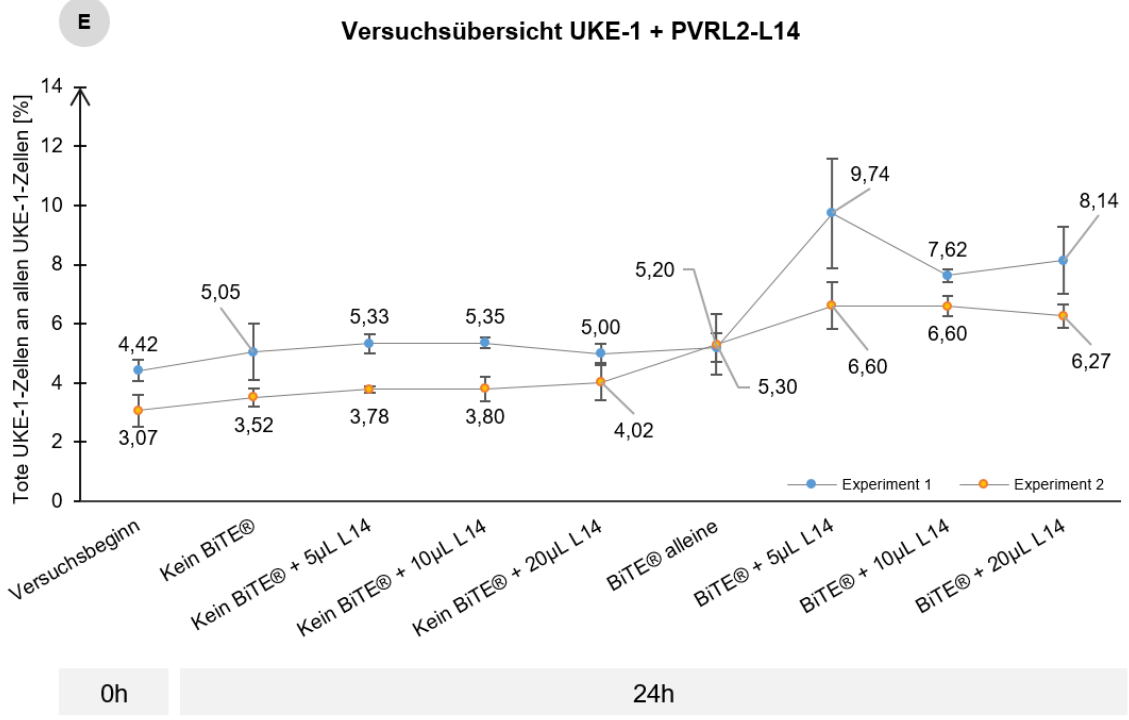
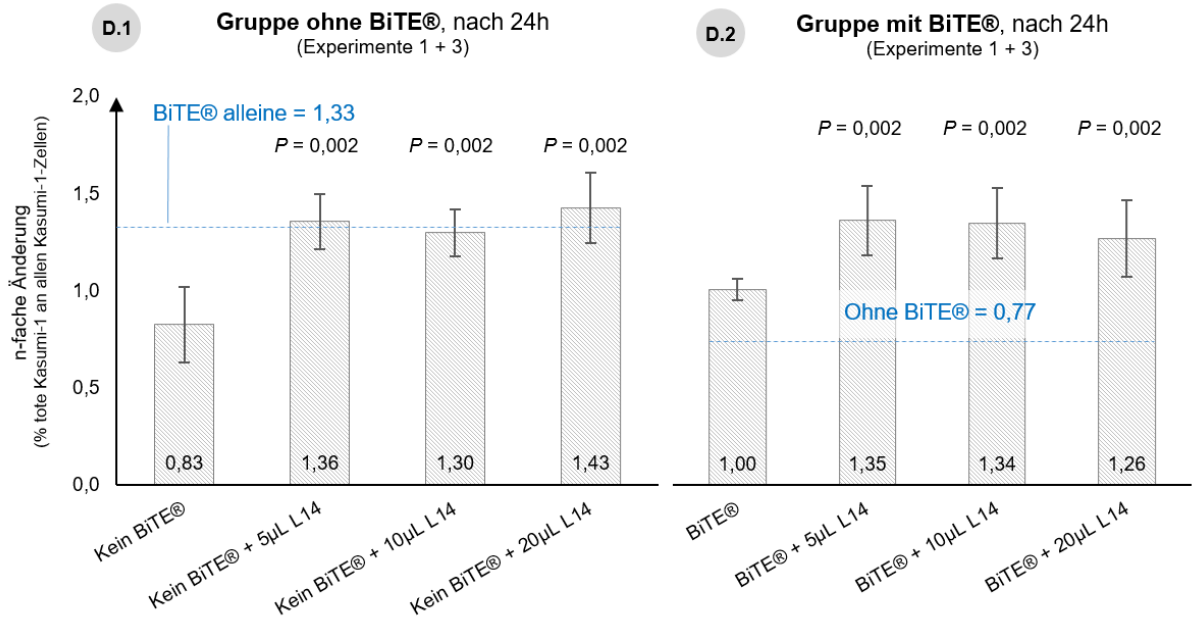
Weiter kann keine Konzentrationsabhängigkeit festgestellt werden, d.h. die Ansätze ± BiTE® mit 5µL / 10µL / 20µL L14 weisen keinen statistisch signifikanten Unterschied auf.

Außer für Kasumi-1 können additive Effekte des BiTEs beobachtet werden. Steigert die Verwendung von 20µL L14 die Lyse von MV4-11-Zellen um durchschnittlich 21%, so vergrößert sich dieser Effekt bei Hinzugabe des BiTE® Antikörpers auf 52%. Ähnlich verhält es sich bei UKE-1: hier wird aus einem nicht-signifikanten Effekt von 6% Lysesteigerung mit 20µL L14 ohne BiTE® ein signifikanter Effekt von 40% Lysesteigerung bei Zugabe der BiTE® Antikörperkonstrukte.

Die Effekte der Maximalbehandlung (BiTE® + 20µL L14) auf den Anteil toter AML-Zellen an allen AML-Zellen ist unterschiedlich. Im Vergleich zum Versuchsbeginn führt die Maximalbehandlung bei UKE-1 zu einer Erhöhung des Anteils um Faktor 1,8 – 2, bei Kasumi-1 um Faktor 2,1 – 2,6 und bei MV4-11 um Faktor 5 – 5,3.







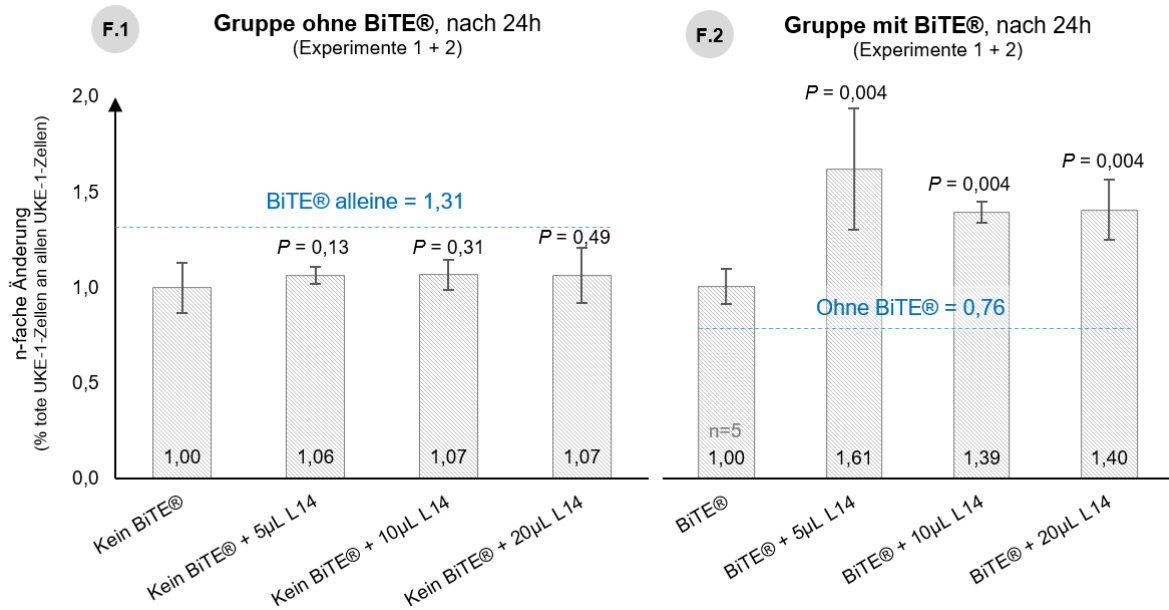
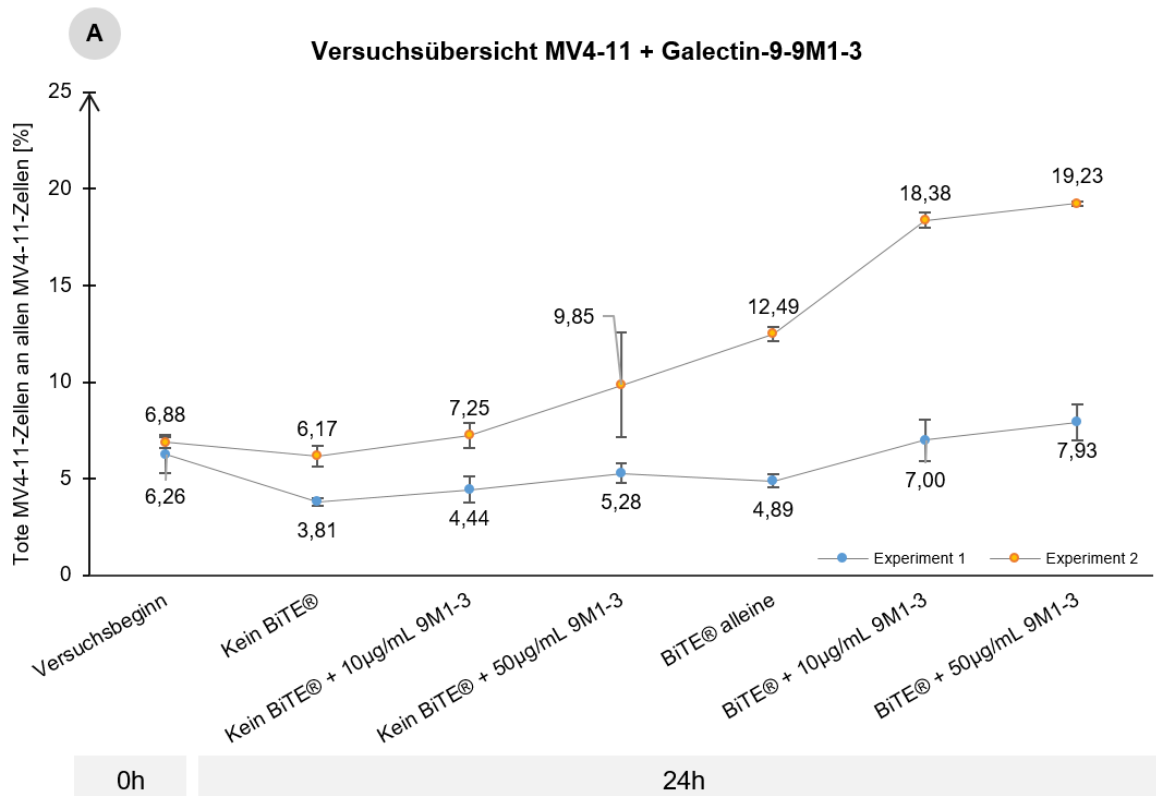
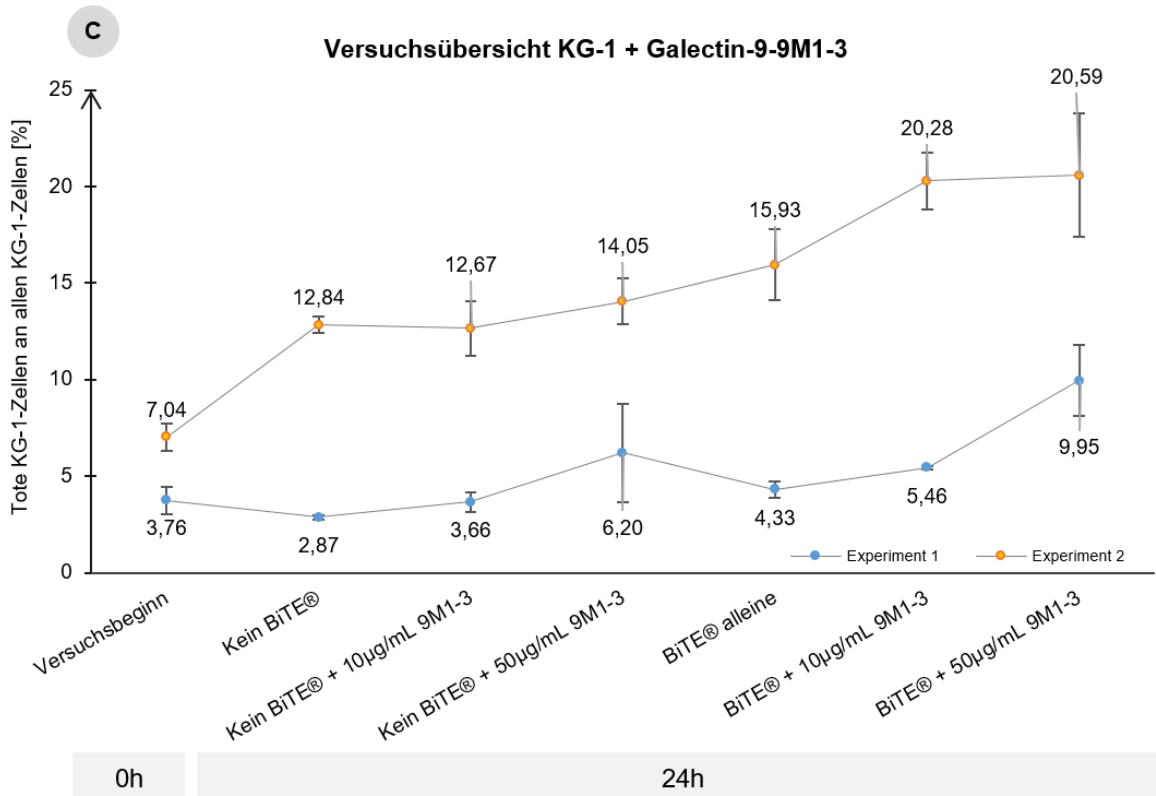
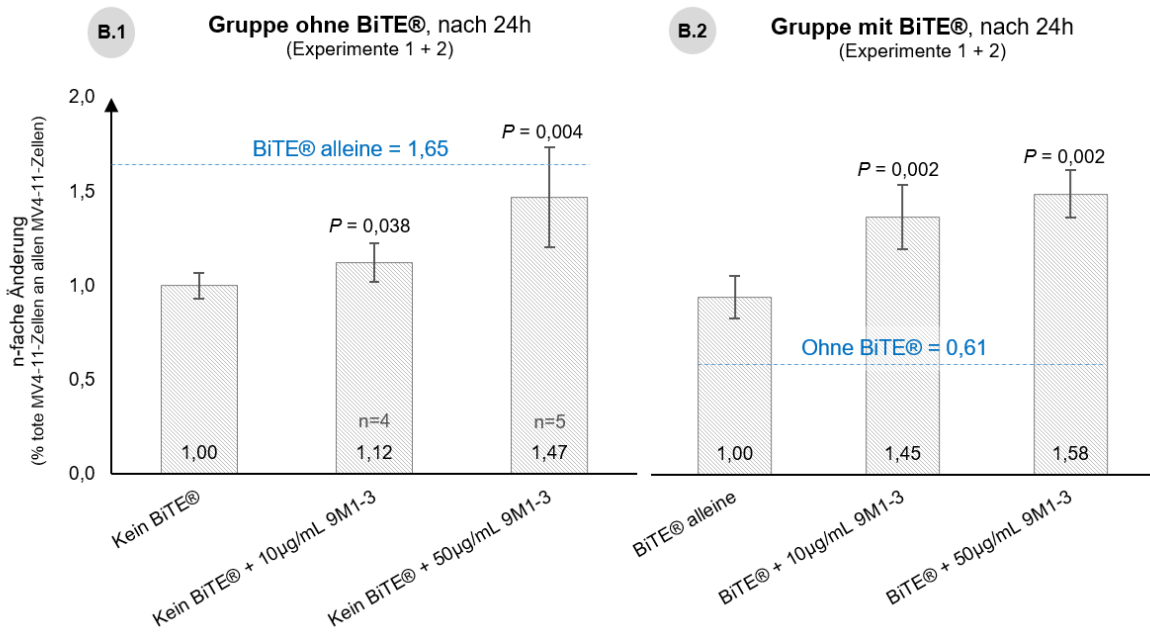


Abbildung 19 - Quantitative Effekte der PVRL2-Blockade auf die Immunantwort gegen MV4-11, Kasumi-1 und UKE-1. Für jeden Einzelversuch sind die Anteile toter AML-Zellen an allen AML-Zellen im Versuchsverlauf dargestellt (Abschnitt A, C, E). Die Kombinationen der Versuche sind in den Abschnitten B.1, B.2, D.1, D.2, F.1 und F.2 dargestellt. Die angegebenen Signifikanzniveaus („P-Werte“) beziehen sich auf den Ansatz „Ohne BiTE®“ (B.1, D.1, F.1) oder „BiTE® alleine“ (B.2, D.2, F.2). Die BiTE®-Konzentration betrug 100 pg/mL.

4.2.3.4. Wirkung von Galectin-9 auf die Targetzelllyse

Der Galectin-9-bindende Antikörper 9M1-3 wurde in Konzentrationen von 10µg/mL und 50µg/mL eingesetzt. Als Targetzellen wurden MV4-11- und KG-1-Zellen verwendet. Die Ergebnisse der Versuche sind in Abbildung 20 zusammengefasst.





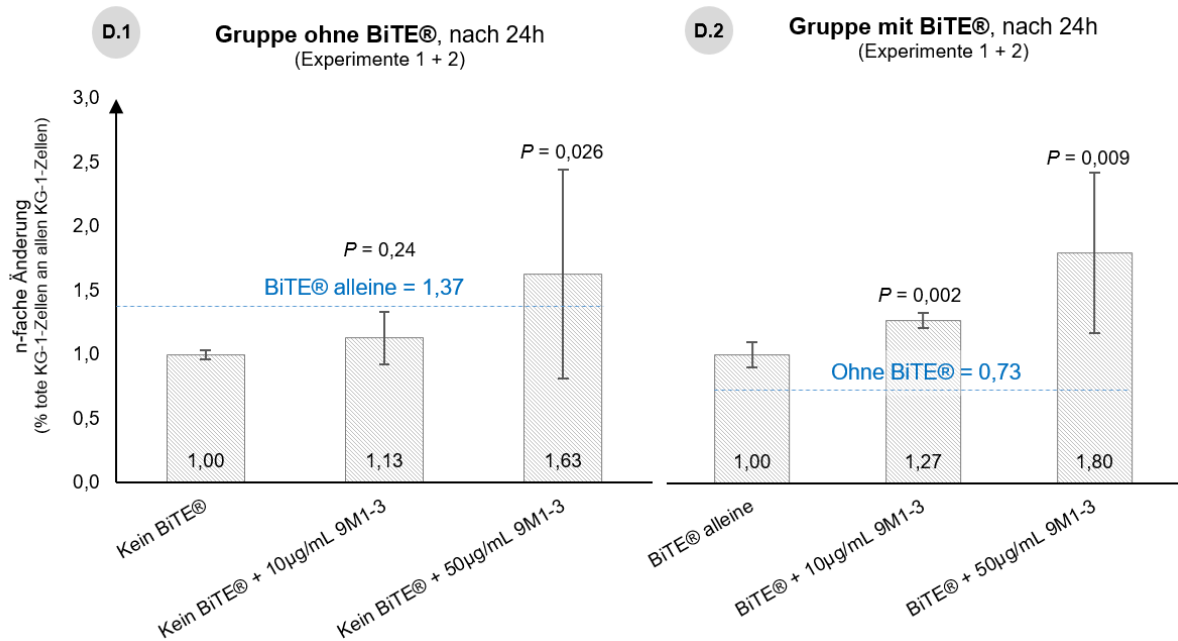


Abbildung 20 – Quantitative Effekte der Galectin-9-Blockade auf die Immunantwort gegen MV4-11 und KG-1. Für jeden Einzelversuch sind die Anteile toter AML-Zellen an allen AML-Zellen im Versuchsverlauf dargestellt (Abschnitt A, C). Die Kombinationen der Versuche sind in den Abschnitten B.1 und B.2 sowie D.1 und D.2 dargestellt. Die angegebenen Signifikanzniveaus („P-Werte“) beziehen sich auf den Ansatz „Ohne BiTE®“ (B.1, D.1) oder „BiTE® alleine“ (B.2, D.2). Die BiTE®-Konzentration betrug 100 pg/mL.

Wird die hohe Konzentration von 9M1-3 eingesetzt, führte diese stets zur signifikanten Steigerung der Targetzellyse. Die Hinzugabe der niedrigen Konzentration führt mit BiTE® oder bei Verwendung von MV4-11-Zellen, nicht jedoch bei der Verwendung von KG-1-Zellen, zu einer signifikanten Lysesteigerung.

Die lysesteigernde Wirkung unterscheidet sich zwischen den Gruppen niedriger und hoher Konzentration lediglich für MV4-11 ohne BiTE® signifikant ($P = 0,032$).

Die Höhe der Lysesteigerung ist durch Zugabe von 9M1-3-Antikörper ohne BiTE® geringer als durch Zugabe von BiTE® alleine.

Es zeigen sich außerdem additive Effekte bei Verwendung des BiTE® Antikörpers. Bei MV4-11-Zellen bewirkt die Zugabe von BiTE® bei Verwendung von 10µg/mL 9M1-3 eine Erhöhung der Lysesteigerung von 12% auf 45%. Für 50µg/mL fällt der Unterschied geringer aus: 47% ohne BiTE® im Vergleich zu 58% mit BiTE®. Diese Tendenz bestätigt sich durch die Ergebnisse mit KG-1-Zellen.

Der Effekt der Maximalbehandlung (BiTE® + 50µg/mL 9M1-3) auf den Anteil toter AML-Zellen an allen AML-Zellen ist für beide Zelllinien ähnlich: Im Vergleich zum Versuchsbeginn steigt der Anteil bei KG-1-Zellen um den Faktor 2,6 – 2,9 und bei MV4-11-Zellen um den Faktor 1,3 – 2,8.

5 - Diskussion

Gegenstand dieser Arbeit ist die Rolle der Immuncheckpoint-Liganden Galectin-9, PVR und PVRL-2 als prognostische Marker in der AML und deren Einflussnahme auf die Immunsurveillance. Bisher konnte im Zusammenhang der AML keinem der Immuncheckpoint-Liganden eindeutig eine therapeutische Bedeutung zugewiesen werden. Es wird vermutet, dass die Oberflächenexpression von Galectin-9, PVR und PVRL2 einen bedeutenden Effekt auf die Aktivierung von T-Zellen hat (siehe Abschnitte 2.3.3.1, 2.3.3.2, 2.3.3.3).

5.1. Reflektion der verwendeten Methoden

Grundlage der Korrelationsanalyse zwischen der Genexpression von Galectin-9, PVR und PVRL-2 und klinischen Parametern war die Erhebung durch qRT-PCR. Diese Methode ist weit verbreitet und gilt als sensitive Methode für einen quantitativen RNA-Nachweis. Für die Weiterverarbeitung der Rohdaten wurde ein heute übliches Verfahren, die Auswertung nach Pfaffl, gewählt. Die mathematische Weiterverarbeitung auf diesem Wege sieht eine Normierung der Expressionsdaten gegen eine unbehandelte Kontrolle vor. Da in dieser Arbeit ein Vergleich von Expressionsdaten innerhalb einer Studienkohorte erfolgte (alle Patienten waren AML-Patienten und wurden nach vergleichbarem Studienprotokoll therapiert), wurden die Expressionsdaten auf einen GAPDH-Plasmidstandard normiert, wobei als Bezugswert eine Plasmidkonzentration von 1 fg/mL verwendet wurde. Die Nutzung eines Plasmidstandards hat gegenüber der Verwendung einer „unbehandelt“-Kontrolle in dieser Applikation keine Nachteile, da sie ebenso eine Effizienzbestimmung und damit einen Ausgleich der Intraversuchsvariabilität ermöglicht.

Dadurch, dass alle Plasmidstandards bei gleicher Konzentration ähnliche C_T -Werte (engl. Cycle of threshold; Beschreibt den Zeitpunkt ab dem das PCR-Gerät ein Fluoreszenzsignal oberhalb der Grundfluoreszenz detektiert) und Effizienzen aufwiesen, konnte davon ausgegangen werden, dass es keine artifizialen Unterschiede in den Expressionsniveaus, beispielsweise durch unterschiedlich gut bindende Primer, gab.

Zur Erhebung der Expressionsdaten wurde genetisches Material eines Teils des AMLSG-07/04-Kollektivs verwendet. Bezogen auf Geschlecht und Karyotyp entspricht die Auswahl einem üblichen AML-Kollektiv. Die Patienten waren bei Erstdiagnose jedoch zum Großteil jünger als 60 Jahre. Dies ist sinnvoll, da die meisten in-vitro-Studien mit Patientenmaterial jüngerer Patienten durchgeführt werden.

Im Rahmen der Korrelationsanalyse von Expressionsdaten und klinischen Parametern gelang es auf Grund einer großen Streuung der Expressionsniveaus für keines der untersuchten Gene, Gruppen niedrig- und hochexprimierender Patienten zu bilden. Eine Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier war nicht möglich, deshalb wurde eine Cox-Regression durchgeführt. Bei dieser Analyse ergibt sich ein sogenanntes Hazard ratio (HR), welches Rückschlüsse auf den Einfluss auf das Überleben zulässt.

Auf Grundlage der Ergebnisse des AMLSG-07/04-Kollektivs sollte durch in-vitro-Versuche mit Antikörpern geklärt werden, welche Auswirkungen die Blockade von Galectin-9, PVR und PVRL-2 durch Antikörper auf die Tumorzelllyse hat. Neben einer spezifischen Antigen-vermittelten Lyse kommt bei der Verwendung eines Antikörpers in Kombination mit Zellen der unspezifischen Immunabwehr auch eine antikörper-vermittelte Zellzytotoxizität („ADCC“; engl. Antibody-dependent cell cytotoxicity; Smits et al. 2009) vor. Dabei erkennen Makrophagen und andere Immunzellen den Fc-Teil eines Antikörpers und lysieren die an ihn gebundene Zelle. Eine Fc-vermittelte Zelllyse sollte insbesondere ausgeschlossen werden, da die Gesamtheit mononukleärer Zellen (einschließlich NK-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen) für die funktionalen Assays verwendet wurde.

Um sicherzustellen, dass die beobachteten Effekte der Immuncheckpoint-Antikörpern spezifisch und nicht Fc-vermittelt waren, wurde zunächst ein Oberflächenprotein gesucht, das bisher nicht mit Immuncheckpoints in Verbindung gebracht wurde und vorzugsweise auf AML-Zelllinien und nicht auf PBMCs exprimiert wird. Dr. Jasmin Wellbrock hat in Zusammenarbeit mit dem FACS-Routine-Labor

(II. Medizinische Klinik, UKE, Hamburg) CD15, CD65 und CD117 als geeignete Zielstrukturen identifiziert. Auch nach ausführlicher Suche konnten weder für CD15 noch für CD65 geeignete, den Immuncheckpoint-Antikörpern klassengleiche, Natriumazid-freie Antikörper gefunden werden, sodass CD117 übrigblieb.

CD117 kommt auf einigen Zelllinien, nicht jedoch auf PBMCs, vor (unpublizierte Daten). Die Blockade von CD117 durch einen Antikörper verhindert die Bindung von Stemcell factor an die Zelle, der als essentieller hämatopoetischer Proliferationsligand für unreife hämatopoetische Zellen gilt (Rönstrand 2004). Denkbar ist, dass es durch die Blockade von CD117 zur Apoptoseinduktion kommt. Diese Effekte konnten allerdings in Proliferationsversuchen von Dr. Jasmin Wellbrock nicht gezeigt werden (unpublizierte Daten).

Für die Spezifitätskontrolle wurde eine CD117-hoch- (Kasumi-1) und eine niedrigexprimierende Zelllinie (UKE-1) gewählt.

Der verwendete FACS-basierte Assay zur Bestimmung der spezifischen Lyse ist neben einem Chromium-Freisetzungssassay ein im Zusammenhang mit BiTE® Antikörperkonstrukten häufig eingesetztes Verfahren. Im Gegensatz zum Chromium-Freisetzungssassay handelt es sich um ein nicht-radioaktiveres Verfahren und wird daher häufig bevorzugt.

5.2. BiTE® Antikörper als Grundlage einer Immuntherapie

BiTE® Antikörperkonstrukte sind bispezifische Antikörper, die seit einiger Zeit in der Therapie, beispielsweise der akuten lymphatischen Leukämie (ALL), eingesetzt werden und bisher erfolgsversprechende Studienergebnisse lieferten (Goekbuget et al. 2014b). In zwei wesentlichen Punkten ist der BiTE® Antikörper einer herkömmlichen Chemotherapie überlegen. Während sich die Wirkung der Chemotherapie vor allem auf schnell proliferierende Gewebe erstreckt, zu denen neben dem Tumorgewebe beispielsweise auch Schleimhäute gehören (Kieseritzky 2014), führt ein BiTE® zu einer weitgehend tumorspezifischen Immunantwort (Aigner et al. 2013; Arndt et al. 2013a). Die Spezifität hängt davon ab, auf welchen Geweben das Zielantigen des BiTE® Antikörpers exprimiert wird. So zeigten sich beim Einsatz von Blinatumomab (CD3-CD19-BiTE®) im Zusammenhang der ALL reversible Nebenwirkungen wie ein Zytokin-Freisetzungssyndrom oder Enzephalopathie (Goekbuget et al. 2014b). Aus einer Studie von Topp et al. mussten nur knapp 5% der Studienteilnehmer auf Grund von Nebenwirkungen ausgeschlossen werden (Topp et al. 2011). ALL-Patienten, die noch eine nachweisbare minimale Resterkrankung aufweisen, haben ein kurzfristig sehr hohes Rezidivrisiko (Grubovikj et al. 2012). In dieser Situation können BiTE® Antikörperkonstrukte residuale Tumorzellen eliminieren. Goekbuget et al. konnte zeigen, dass vorbehandelte MRD-positive Patienten, die sich in der ersten CR befanden, nach Blinatumomab-Therapie zu 82% MRD-negativ waren (Goekbuget et al. 2014a).

Der Einsatz eines BiTE® Antikörpers stellt also unter wenigstens zwei Gesichtspunkten eine interessante Therapieoption dar: Verringerung der Nebenwirkungsstärke, damit eventuell Eignung für ältere Patienten und im Allgemeinen Senkung des Rezidivrisikos und Verlängerung des Gesamtüberlebens.

Im Zusammenhang der AML wird zurzeit an dem Einsatz eines CD3-CD33-BiTE® Antikörpers gearbeitet. In *in-vitro*- und Maus-*in-vivo*-Studien konnte bereits die Wirksamkeit demonstriert werden (Laszlo et al. 2014; Krupka et al. 2014; Arndt et al. 2013b; Arndt et al. 2013a; Aigner et al. 2013).

Als Grundlage eines neuen Therapieansatzes für die akute myeloische Leukämie wird in dieser Arbeit der Einsatz eines CD3-CD33-BiTE® Antikörpers gewählt. In Titrationsversuchen konnte übereinstimmend mit Literatur von Laszlo et al., Arndt et al., Krupka et al. und Aigner et al. gezeigt werden, dass die BiTE®-induzierte Targetzelllyse sowohl konzentrations- als auch inkubationszeitabhängig ist. Dabei bewegten sich die Konzentrationen, die zu einer effektiven Lyse nötig waren, in Übereinstimmung mit der Literatur, im ng/mL-Bereich. Es konnte also gezeigt werden, dass in dem Setting dieser Arbeit der Einsatz eines BiTE® Antikörpers zu einem signifikanten Anstieg der Lyse von verschiedenen AML-Zelllinien führte.

5.3. Die Rolle von Immuncheckpoint-Liganden in der Immuntherapie

Immuncheckpoints sind zentrale Schnittstellen von Signalwegen, die an der Aktivierung von Effektorzellen beteiligt sind. Durch Immuncheckpoint-Liganden kann dort Einfluss auf den Aktivierungsprozess genommen werden. Diese Liganden werden häufig auf Tumorzellen exprimiert (vergleiche Abschnitt 2.3.3). Meist resultiert aus der Bindung eines Immuncheckpoint-Liganden an eine Effektorzelle eine Blockade der Immunantwort gegen Tumorzellen.

Bekannte Immuncheckpoint-Moleküle sind CTLA-4 und PD1. In klinischen Studien konnte bereits nachgewiesen werden, dass die Blockade der Liganden mittels Antikörper zu einer Verbesserung des Gesamtüberlebens von chemotherapierefraktären Melanompatienten führt (Eigentler et al. 2014). Im Zusammenhang der AML konnte durch die Blockade von CTLA-4 ähnliche Effekte demonstriert werden (Davids et al. 2016), der Einfluss einer Blockade von PD-1 bei AML-Patienten wird zurzeit in klinischen Phase-I- und Phase-II-Studien untersucht (Studienregisternummer: NCT02464657). Andere, in der AML relevante, Immuncheckpoint-Liganden werden benötigt, um die Heilungschancen weiter zu steigern.

Ziel dieser Arbeit war es, diese zwei unabhängig voneinander erfolgreichen Therapiekonzepte zu kombinieren und mögliche Kombinationseffekte zu erkennen. Als theoretische Grundlage galt die Überlegung, dass BiTE® Antikörper T-Zellen unabhängig von Immuncheckpoint-Signalen aktivieren (Offner et al. 2006). Jedoch können weiterhin aktivierungsblockierende Signale über Immuncheckpoint-Liganden bestehen, wodurch möglicherweise ein Teil der T-Zellen trotz BiTE® nicht aktiviert wird. Zu prüfen galt es also auch, ob durch die Blockade von Immuncheckpoint-Liganden in Kombination mit BiTE® Antikörperkonstrukten die Zelllyse noch weiter gesteigert werden kann.

In Vorbereitung auf diese Arbeit zeigte Frau Dr. Jasmin Wellbrock, dass Galectin-9 und PVR einen signifikanten Einfluss auf das Überleben der Patienten in Studien von Verhaak et al. hatten, wobei Galectin-9 sich ebenfalls positiv und PVR negativ auf die Prognose auswirkte. Weitere Literaturrecherchen ergaben, dass sich die Funktionen von PVR und PVRL-2 häufig ähneln. Um deren Relevanz in der AML zu untersuchen, wurde zunächst das Expressionsniveau der drei Liganden in einem AML-Patientenkollektiv mit klinischen Parametern korreliert. Anschließend sollte die Arbeitshypothese in Kombinationsversuchen von BiTE®- und Immuncheckpoint-Antikörpern geprüft werden.

Im Folgenden werden die Ergebnisse diskutiert und in Bezug zu Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen gesetzt.

Sind Antikörper an die äußere Zellmembran gebunden kann dies zur Aktivierung von Immunzellen mit konsekutiver Lysierung führen. Diesen Vorgang bezeichnet man als ADCC. Wird, wie in dieser Arbeit, mit Antikörpern und Immunzellen gearbeitet, muss zunächst sichergestellt werden, dass eine beobachtete Lyse von Zielzellen nicht durch den Effekt der ADCC zustande kommt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Verwendung eines CD117-Antikörpers zu keinem signifikanten Anstieg der Zelllyse führte. Somit war davon auszugehen, dass die Fc-vermittelte Lyse bei den beobachteten Effekten nur eine untergeordnete Rolle spielte und Synergien mit dem BiTE® Antikörper durch die Beeinflussung der Liganden-Rezeptor-Interaktion zustande kam. Die beobachtete Lyse konnte als spezifisch angesehen werden.

Die Analyse ergab, dass eine hohe Galectin-9-Expression ein unabhängiger protektiver prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben in der untersuchten Kohorte war. Dieses Ergebnis sprach im Kontext der Immunsurveillance dafür, dass Galectin-9 eine Aktivierung von Effektorzellen begünstigt. Mit einer protektiven Rolle von Galectin-9 ließ sich in Einklang bringen, dass das Expressionsniveau in gesunden Individuen im Vergleich zu Patienten der AMLSG-07/04-Kohorte signifikant höher war.

Mit dieser Rolle nicht vereinbaren ließen sich *in-vitro*-Ergebnisse, die zeigten, dass eine antikörpervermittelte Blockade von Galectin-9 auf AML-Zelllinien zu einer Erhöhung der Targetzelllyse führte. Dies widerspricht der Theorie, dass eine hohe Expression von Galectin-9 die

Anti-Leukämie-Immunsurveillance begünstigt und dadurch die Entstehung einer Leukämie unwahrscheinlicher wird.

Auch in der Literatur sind die Modalitäten unter denen Galectin-9 seine Wirkung entfaltet Gegenstand aktueller Forschung. Es wird diskutiert, dass Galectin-9 auf verschiedene Effektorzellen unterschiedliche regulierende Wirkungen entfaltet. So werden T_{H1}-Zellen konzentrationsabhängig aktiviert und T_{H2}-Zellen mit steigender Galectin-9-Konzentration apoptotisch (Su et al. 2011). Galectin-9 stimuliert NK-Zellen in Anwesenheit von Makrophagen (Nobumoto et al. 2009). Es wird vermutet, dass beide Effektorzelltypen in die Tumorelimination involviert sind (Schmiedel et al. 2013; Barrett und Le Blanc 2010). Die Diskrepanz zwischen der Beobachtung, dass eine hohe Galectin-9 Expression einen positiven Effekt auf das mediane Überleben der Patienten hat und unseren *in vitro* Versuchen lässt sich möglicherweise durch ein unterschiedliches Gleichgewicht zwischen inhibierenden Signalen auf T-Zellen und aktivierenden Signalen auf NK-Zellen erklären. Das bedeutet, dass Galectin-9 die Zytolyse durch NK-Zellen fördert und die durch T-Zellen hemmt. Da möglicherweise im Patienten der NK-Zell-Effekt bedeutsamer ist als der T-Zell-Wirkung, würde die NK-Zell bedingte Immunantwort zu einem besseren Überleben der Patienten führen.

Auf zellulärer Ebene kann ein unterschiedliches Verhältnis von aktiven und funktionsfähigen T- zu NK-Zellen *in-vivo* und *in-vitro* vorliegen und damit die oben beschriebene Diskrepanz erklären. Zum anderen ist denkbar, dass die Bindung des Galectin-9-Antikörpers im Zellkulturversuch eine sterische Änderung bewirkt, die die Erkennung der AML-Zelle durch einen Effektorzelltyp begünstigt. Nicht außer Acht gelassen werden sollte die Tatsache, dass zahlreiche Splicingvarianten von Galectin-9 vorhanden sind und diese unterschiedliche Wirkungen haben könnten (Heusschen et al. 2013). Würden in so einem Fall nicht alle Splicingvarianten durch den Antikörper blockiert, könnte die beobachtete Diskrepanz entstehen. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die NK-aktivierende Wirkung von Galectin-9 auch vom zellulären Umfeld („Microenvironment“) abhängt, also Galectin-9-stimulierte Makrophagen benötigt werden, um NK-Zellen indirekt zu aktivieren (Nobumoto et al. 2009). Diese könnten im Zellkulturansatz - im Gegensatz zur Patientenprobe - in geringerer Konzentration vorhanden sein und somit die Effektorzellaktivierung nicht oder nur noch eingeschränkt stimulieren.

Die Literatur verdeutlicht, dass die Wirkungsentfaltung von Galectin-9 einem komplexen Regulationsmechanismus unterliegt, der bis jetzt nicht bekannt ist.

Für PVR und PVRL-2 konnte durch die Expressionsanalyse gezeigt werden, dass es sich um negative Prädiktoren für alle untersuchten Endpunkte (OS, EFS, RFS) im AMLSG-07/04-Kollektiv handelte. Eine Verzehnfachung der mRNA-Expression bedeutete in etwa ein 1,5-faches Risiko für einen der Endpunkte. Interessant ist, dass der gleichzeitige Einschluss von PVR und PVRL-2 dazu führte, dass PVRL-2 die Signifikanz als Einflussfaktor verlor. Bereits in vorangegangenen Analysen des Kollektivs von Verhaak et al. konnte PVRL-2 nicht als unabhängiger prognostischer Faktor bestätigt werden. Eine mögliche Erklärung für das AMLSG-07/04-Kollektiv ist in der starken positiven linearen Korrelation der Genexpression von PVR und PVRL-2 zu sehen. Dadurch, dass eine hohe PVR-Expression häufig mit einer hohen PVRL-2-Expression einherging, war es unmöglich zu zeigen, dass beide Expressionsniveaus unabhängig voneinander einen Einfluss auf die untersuchten Endpunkte hatten, wodurch bedingt der stärkere Einflussfaktor – ausgedrückt durch ein größeres HR - in der multivariaten Analyse bestehen blieb.

Für PVRL-2 konnte gezeigt werden, dass das Expressionsniveau auf PBMCs gesunder Spender signifikant höher war als in dem Patientenkollektiv AMLSG-07/04. Dies ist in Einklang zu bringen mit der Theorie, dass PVRL-2 die Immunsurveillance hemmt und somit gesunde PBMCs vor einer Immunantwort geschützt sind. Bei den Leukämiezellen sind die mit höherer Expression von PVRL-2 vor der Immunüberwachung getarnt und diese Patienten besitzen deshalb eine schlechtere Prognose. Kongruent zu den Ergebnissen der Überlebensanalysen zeigten sich *in-vitro*-Versuchsergebnisse. Dort wurde deutlich, dass eine Antikörper-vermittelte Blockade von PVR oder PVRL-2, in Kombination mit der Verwendung eines BiTE® Antikörpers, auf KG-1- und MV4-11-Zellen zu einem Anstieg der Lyse führte.

Gegenstand aktueller Forschung ist die Interaktion von PVR und PVRL-2 mit verschiedenen immunmodulatorischen Rezeptoren. Von besonderem Interesse ist die Interaktion von PVR und

PVRL-2 mit DNAM-1 und TIGIT. So führte die Bindung von DNAM-1 zu einer Aktivierung von NK-Zellen (Pende et al. 2005) während die Bindung von TIGIT zu einer Inaktivierung von NK- und T-Zellen führte (Stanietsky et al. 2009). Bereits Stanietsky et al. konnte zeigen, dass eine höhere Bindungsaffinität zu TIGIT besteht und somit die immuninhibitorischen Eigenschaften von PVR und PVRL-2 in bisher bekannten *in-vitro*-Modellen erklären. In der Literatur wird betont, dass zwar die Wirkung einzelner Rezeptor-Liganden-Interaktionen bekannt sind, jedoch das Verständnis um das Gleichgewicht verschiedener Rezeptor-Liganden-Interaktionen bisher allenfalls grundlegend besteht. So lässt sich vermuten, dass die Kenntnis dieses Gleichgewichts ein wichtiger Schritt zum erfolgreichen Einsatz der Immuntherapie mit Checkpoint-Antikörpern ist.

Unter dem Gesichtspunkt einer Kombinationstherapie stellte sich die Frage, ob sich die Effekte von BiTE® Antikörperkonstrukten und Immuncheckpoint-Antikörpern addieren oder wohlmöglich sogar in der Kombination verstärken. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten wiesen an einigen Stellen darauf hin, dass durch die Zugabe des BiTE® Antikörpers die Wirkung der Immuncheckpoint-Antikörper verstärkt wurde, also der Kombinationseffekt größer war als die Summe der Einzeleffekte. Ein Synergismus wurde allerdings nicht formal bewiesen.

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass die Kombinationsbehandlung aus einem CD3-CD33-BiTE® Antikörperkonstrukt und Immuncheckpoint-Antikörpern gegen Galectin-9, PVR und PVRL-2 sich in diesen ersten *in-vitro*-Kombinationsversuchen als effizientere Therapieform im Vergleich zu den Einzelbehandlungen darstellten. Weitere *in-vitro*-Versuche zu der Kombination mehrerer Immuncheckpoint-Antikörper und die Bestätigung der Ergebnisse in primären Patientenproben können nächste Schritte darstellen. Als ein alternatives »Proof of principle« können dabei auch Ansätze dienen, die die Immuncheckpoint-Liganden auf Genebene ausschalten.

6 - Zusammenfassung

6.1. Deutsch / German

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine bösartige Neoplasie des hämatopoetischen Systems. Als Erstlinientherapie findet eine Kombinationschemotherapie Anwendung. Unter dieser Therapie kommt es in zirka 50% der Fälle zu einem Rezidiv. Als Grund hierfür werden residuale Tumorzellen angesehen. Um diese residualen Tumorzellen zu erreichen, nutzen immuntherapeutische Ansätze das körpereigene Immunsystem. Therapeutika, wie BiTE®- (*engl. bispecific t-cell engager*) und Immuncheckpoint-Antikörper, erleichtern die Aktivierung von Effektorzellen. In der vorliegenden Arbeit sollte die prognostische Relevanz und therapeutische Eignung der Immuncheckpoint-Liganden Galectin-9, PVR und PVRL-2 im Rahmen der AML unter Berücksichtigung von Kombinationseffekten mit einem BiTE® Antikörper untersucht werden.

Die prognostische Relevanz der mittels PCR gemessenen Expression der drei Gene wurde anhand des AMLSG-07/04-Kollektivs untersucht. Hierbei ergab die Analyse, dass eine hohe Galectin-9-Expression ein positiver Prädiktor für das Gesamtüberlebens-, das ereignisfreie Überlebens- und das rückfallfreie Überlebensintervall war. Eine Verzehnfachung der mRNA-Expression ging mit einer Risikoreduktion von zirka 30% für die Endpunkte einher. Für PVR und PVRL-2 bedeutet eine Verzehnfachung der mRNA-Expression eine Risikosteigerung zwischen zirka 50% und zirka 60% für alle Endpunkte und war somit ein negativer Prädiktor.

Im Zellkulturversuch wurde untersucht, ob die Blockade der Immuncheckpoint-Liganden auf AML-Zelllinien zu einer Steigerung der spezifischen Lyse durch Effektorzellen führte. Um zusätzlich Synergismen mit einem CD3-CD33-BiTE® Antikörperkonstrukt zu untersuchen, wurden Parallelansätze mit und ohne BiTE® durchgeführt. Als Messgröße konnte in einem FACS-basierten Analyseverfahren der Anteil toter AML-Zellen unter allen AML-Zellen etabliert werden, sodass ein Vergleich von Ergebnissen verschiedener Versuchstage und verschiedener Zelllinien möglich war.

Sowohl die Blockade von Galectin-9 als auch von PVR führte zu einem signifikanten Anstieg der spezifischen Lyse. Ausgehend vom jeweiligen Referenzwert (ohne BiTE® / mit BiTE® alleine) führte die Zugabe eines blockierenden Antikörpers in der Gruppe ohne BiTE® in der Regel zu einem geringeren Anstieg der spezifischen Lyse als in der Gruppe mit BiTE® – der kombinierte Effekt von BiTE® und Immuncheckpoint-Liganden-Antikörper war also größer als die Summe der Einzeleffekte, ein synergistischer Effekt wurde nicht formal belegt. Auch durch die Blockade von PVRL-2 kam es bei der Mehrzahl der untersuchten Zelllinien zu einem signifikanten Anstieg der spezifischen Lyse. Hingegen konnten additive Effekte durch den Einsatz des BiTE® Antikörpers nur bei einigen Zelllinien gezeigt werden. Für die drei verwendeten Antikörper wurde in der Regel kein statistischer Zusammenhang zwischen Konzentration und spezifischer Lyse beobachtet.

Die Funktionen der in dieser Arbeit untersuchten Immuncheckpoint-Moleküle werden aktuell in der Literatur diskutiert. Es sind für Galectin-9, PVR und PVRL-2 sowohl positive als auch negative regulatorische Effekte auf Immunzellen beschrieben.

Die Ergebnisse von Versuchen mit PVR und PVRL-2 unterstützten sowohl durch die PCR-Daten als auch durch die Zellkulturversuche die These, dass die Expression als Nettoeffekt eine Inaktivierung von Effektorzellen begünstigt.

Die Ergebnisse von Galectin-9 unterstützten durch die Überlebensanalyse die These, dass Galectin-9 einen aktivierenden Effekt auf Immunzellen hatte, hingegen sprachen *in-vitro*-Versuche für eine Inhibition von T-Zellen. Der klinisch beobachtete positive Effekt auf das Gesamtüberleben könnte möglicherweise auf der Wirkung von NK Zellen beruhen.

Hängt die Wirkung von PVR und PVRL-2 im Wesentlichen mit der Rezeptor-Liganden-Interaktion zusammen, wird bei Betrachtung der Literatur deutlich, dass der Effekt von Galectin-9 auch in besonderem Maße von dem „Microenvironment“, also der rezeptorpräsentierenden Zelle und anderen Umgebungsfaktoren, abhängt. Die Diskrepanz der Ergebnisse zwischen dem Überleben des AMLSG-Kollektiv und der *in-vitro*-Versuche könnten mit Unterschieden im Microenvironment zusammenhängen.

Sowohl das Konzept des BiTE® Antikörpers als auch der Immuncheckpoint-Antikörper werden bei anderen Tumorentitäten bereits in klinischen Studien erfolgreich eingesetzt. Die Daten dieser Arbeit lassen vermuten, dass die untersuchten Immuncheckpoint-Liganden Galectin-9, PVR und PVRL-2 ein erfolgsversprechendes therapeutisches Target darstellen. Es zeigen sich außerdem Hinweise, dass eine Kombinationstherapie aus BiTE® Antikörperkonstrukten und Immuncheckpoint-Liganden-Antikörper besser gegen eine AML wirken könnte als die Einzeltherapien.

Zur weiteren Validierung der Ergebnisse dieser Arbeit könnte ein alternativer Ansatz ohne Antikörper gewählt werden. So könnten durch Knock-out der Immuncheckpoint-Liganden-Gene die Hypothese überprüft werden. Weiterhin könnten die Versuche mit primären Patientenproben anstelle der Zelllinien sinnvoll sein. Um allgemeine Aussagen ableiten zu können, sollte ein besonderer Fokus auf das Microenvironment und dessen Unterschied zwischen Patienten gelegt werden.

6.2. Englisch / English

The acute myeloid leukemia is a malignant neoplasia of the hematopoietic system. First-line therapy includes a combination of chemotherapeutic drugs. With this therapy, there is a relapse rate of approximately 50%. Residual malignant cells are likely to be the cause of relapse. Immunotherapeutic approaches make use of the patients own immune system, e.g. BiTE®-antibody constructs help immune cells to recognize and kill malignant cells. This research study will determine the influence of the immune checkpoint ligands Galectin-9, PVR and PVRL-2 in regard of the acute myeloid leukemia and will also be looking for additional effects when using the AMG330-BiTE® antibody construct.

The prognostic relevance of Galectin-9, PVR and PVRL-2 was studied within the AMLSG-07/04 cohort using PCR. A high expression of Galectin-9 was a positive predictor regarding the OS, EFS and RFS. In contrast a high expression of PVR and PVRL-2 was a negative predictor for OS, EFS and RFS.

In cell-cultural studies it was investigated whether the antibody-mediated blocking of Galectin-9, PVR and PVRL-2 increased the specific lysis of AML-cell lines and what the effect of using a BiTE® antibody might be. Primary endpoint was the amount of dead AML cells in relation to all AML cells which allows to compare different days of investigation and different cell lines.

The blocking of Galectin-9 surface proteins as well as PVR surface proteins lead to a significant increase in specific lysis of AML cells. Considering the two groups (without BiTE® / with BiTE®) the killing effect was larger in the group using BiTE® antibodies, yet a synergism could not be verified. When blocking PVRL-2 surface proteins by antibodies the specific lysis increased as well but there was no difference between the groups using BiTE® antibodies or no BiTE® antibodies.

A correlation between blocking-antibody concentration and killing effects could not be seen.

Reviewing the literature there is an ongoing discussion about the role of all three immune checkpoint ligands. For Galectin-9, PVR and PVRL-2 there are immune stimulating as well as inhibiting functions described.

Results of PCR and cell cultural experiments for PVR and PVRL-2 suggests that the expression of these two proteins on the surface of malignant cells lead to the inhibition of effector cells. Regarding the results for Galectin-9 the PCR data suggests immune stimulating effects while the the cell cultural data leads to an inhibitory effect of the surface expression of Galectin-9. We attribute these disconfirming results to the difference of the microenvironment in AMLSG cohort and cell culture. The microenvironment is a key point when it comes to discussing the function of Galectin-9 because some immune cells seems to increase the stimulating effect of Galectin-9 while others do not or even inhibit immune effects especially of CD8+ T cells. The function of PVR and PVRL-2 does not seem to be as much dependent of the microenvironment as it is for Galectin-9.

BiTE® antibodies and immune checkpoint blocking antibodies are present in clinical practice today. The results of this study suggest that Galectin-9, PVR and PVRL-2 are an interesting target in AML therapy as well as in the combination with BiTE® antibodies. Further studies, especially with a second "proof-of-principle" are needed to confirm the attributed functions.

7 - Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
AML	Akute myeloische Leukämie
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AMLSG	Studiengruppe Akute myeloische Leukämie
APC	Farbstoff: Allophycocyanin 11 Alternativ: engl.: Antigen presenting cell
ADCC	engl.: antibody-dependent cellular cytotoxicity; dt.: Antikörper-vermittelte Zellzytotoxizität
anti-hCD117	humaner Antikörper der CD117 erkennt
B	
B7	entspricht CD80/CD86
BiTE®	engl.: Bispecific T-cell engager
bzw.	beziehungsweise
C	
CR	engl.: Complete remission; dt.: komplette Remission
c-Kit	Tyrosinkinase Kit (entspricht CD117)
CEBPA	engl. CCAAT-enhancer-binding protein alpha; dt. CCAAT-verstärkendes-Bindungsprotein alpha
CD	engl.: Cluster of differentiation
CTLA-4	engl.: cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4; entspricht CD152
cDNA	engl.: circular DNA; dt.: zirkuläre DNS
CMFDA	5-Chloromethylfluorescein Diazetat
CMV	Cytomegalie Virus
C _t -Wert	Wert des Cycle of threshold; Der PCR-Zyklus ab dem die Fluoreszenzintensität über der des Grundsignals detektiert werden kann
D	
DNA	engl.: desoxyribonucleic acid; dt.: Desoxyribonukleinsäure
DNAM-1	engl.: DNAX accessory molecule-1 (entspricht CD226)
DNMT3A	DNA Cytosin-5 Methyltransferase 3A
d.h.	das heißt
E	
ELN	European LeukemiaNet
EFS	engl.: event-free survival; dt.: Ereignisfreies Überleben
F	
FLT3	engl.: Fms-like tyrosine kinase 3; dt.: Fms-ähnliche Tyrosinkinase 3 (entspricht CD135)
FLT3-ITD	engl.: FLT3-Internal tandem duplication
FLT3-TKD	FLT3-Tyrosinkinasedomäne
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FACS	engl.: fluorescence activated cell sorting
FBS	Fetales bovines Serum
FAB	French-American-British
G	
GVL-Reaktion	engl.: Graft-versus-leukemia-Reaktion; dt.: Spender-gegen-Leukämie-Reaktion
GVH-Reaktion	engl.: Graft-versus-Host-Reaktion dt.: Spender-gegen-Empfänger-Reaktion
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
H	
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HD-PBMC	engl.: healthy donor PBMC; dt.: PBMC gesunder Spender
HR	hazard ratio; Vergleicht die Eintretenswahrscheinlichkeit zweier Ereignisse
I	
ICP	Immuncheckpoint
IL-2	Interleukin 2
IMDM	Iscoves modifiziertes Dulbecco Medium
ITD	Internal tandem domain

L	
LAA	Leukämie-assoziierte Antigene
LB	Lysogeny broth
M	
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MPS	Myeloproliferatives Syndrom
MHC	engl.: Major histocompatibility complex
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
N	
NPM-1	Nukleophosmin-1
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
O	
OS	engl.: overall survival; dt.: Gesamtüberleben
P	
PD1	engl.: Programmed death-1
PDL-1	engl.: Programmed-death-ligand-1
PVR	Poliovirusrezeptor
PVRL-2	engl.: Poliovirusreceptor-like protein 2
PCR	engl.: Polymerase chain reaction; dt.: Polymerasekettenreaktion
PBS	engl.: phosphate-buffered saline
PE	Phycocerythrin
PBMC	engl.: peripheral blood mononuclear cells
Q	
qRT-PCR	qualitative Real-Time-PCR
R	
RNA	engl.: Ribonucleic acid; dt.: Ribonukleinsäure
RFS	engl.: relapse-free survival; dt.: Rückfallfreies Überleben
S	
sog.	sogenanntes
T	
T _c -Zelle	Killer-T-Zelle, entspricht CD8-positive T-Zelle
TZR	T-Zell-Rezeptor
TIM-3	engl.: T-cell immunoglobulin and mucin domain-3
TKD	Tyrosinkinase-Domäne
TIGIT	T cell Ig and ITIM domain
W	
WHO	engl.: World health organisation; dt.: Weltgesundheitsorganisation
X	
x-gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
Ziffern und Sonderzeichen	
7-AAD	7-Aminoactinomycin
∞	unendlich
±	mit und ohne
Einheiten	
Da	Dalton [u, Da]; Atomare Masseneinheit; 1 u ≡ 1 Da ≈ 1,66 x 10 ⁻²⁷ Kg
°C	Grad Celsius [θ]; Temperatur; abgeleitet von der SI-Einheit Kelvin
g	Gewichtskraft; auf der Erde gilt näherungsweise g = 9,81 m/s ²
L	Liter [L]; Volumen; 1 L ≡ 0,001 m ³
M	Molar [c]; 1 M ≡ 1 mol/L
s	Sekunde(n) [t]; SI-Basiseinheit
h	Stunde(n) [t]; 1h ≡ 3600s
SI-Präfixe	
Die SI-Präfixe wurden entsprechend den internationalen Konventionen gebraucht.	

8 - Literaturverzeichnis

- Aigner, M.; Feulner, J.; Schaffer, S.; Kischel, R.; Kufer, P.; Schneider, K. et al. (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. In: *Leukemia* 27 (5), S. 1107–1115. DOI: 10.1038/leu.2012.341.
- Amadori, Sergio; Suci, Stefan; Selleslag, Dominik; Aversa, Franco; Gaidano, Gianluca; Musso, Maurizio et al. (2016): Gemtuzumab Ozogamicin Versus Best Supportive Care in Older Patients With Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia Unsuitable for Intensive Chemotherapy: Results of the Randomized Phase III EORTC-GIMEMA AML-19 Trial. In: *J Clin Oncol* 34 (9), S. 972–979. DOI: 10.1200/JCO.2015.64.0060.
- Arber, Daniel A.; Orazi, Attilio; Hasserjian, Robert; Thiele, Jurgen; Borowitz, Michael J.; Le Beau, Michelle M. et al. (2016): The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. In: *Blood* 127 (20), S. 2391–2405. DOI: 10.1182/blood-2016-03-643544.
- Arndt, C.; Bonin, M. von; Cartellieri, M.; Feldmann, A.; Koristka, S.; Michalk, I. et al. (2013a): Redirection of T cells with a first fully humanized bispecific CD33–CD3 antibody efficiently eliminates AML blasts without harming hematopoietic stem cells. In: *Leukemia* 27 (4), S. 964–967. DOI: 10.1038/leu.2013.18.
- Arndt, C.; Feldmann, A.; Bonin, M. von; Cartellieri, M.; Ewen, E-M; Koristka, S. et al. (2013b): Costimulation improves the killing capability of T cells redirected to tumor cells expressing low levels of CD33: description of a novel modular targeting system. In: *Leukemia* 28 (1), S. 59–69. DOI: 10.1038/leu.2013.243.
- Asou, H.; Tashiro, S.; Hamamoto, K.; Otsuji, A.; Kita, K.; Kamada, N. (1991): Establishment of a human acute myeloid leukemia cell line (Kasumi-1) with 8;21 chromosome translocation. In: *Blood* 77 (9), S. 2031–2036.
- Barrett, A. J.; Le Blanc, K. (2010): Immunotherapy prospects for acute myeloid leukaemia. In: *Clin Exp Immunol* 161 (2), S. 223–232. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2010.04197.x.
- Bottino, C.; Castriconi, R.; Pende, D.; Rivera, P.; Nanni, M.; Carnemolla, B. et al. (2003): Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as Cell Surface Ligands for the Human DNAM-1 (CD226) Activating Molecule. In: *J Exp Med* 198 (4), S. 557–567. DOI: 10.1084/jem.20030788.
- Brunetti, Lorenzo; Gundry, Michael C.; Goodell, Margaret A. (2016): DNMT3A in Leukemia. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=28003281>, zuletzt aktualisiert am 09.01.2017, zuletzt geprüft am 09.01.2017, 12:00 Uhr.
- Buchbinder, Elizabeth; Desai, Anupam (2016): CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. In: *Am J Clin Oncol* 39 (1), S. 98–106. DOI: 10.1097/COC.0000000000000239.
- Büchner, Thomas; Hiddemann, Wolfgang; Berdel, Wolfgang E.; Wormann, Bernhard; Schoch, Claudia; Fonatsch, Christa et al. (2003): 6-Thioguanine, cytarabine, and daunorubicin (TAD) and high-dose cytarabine and mitoxantrone (HAM) for induction, TAD for consolidation, and either prolonged maintenance by reduced monthly TAD or TAD-HAM-TAD and one course of intensive consolidation by sequential HAM in adult patients at all ages with de novo acute myeloid leukemia (AML): a randomized trial of the German AML Cooperative Group. In: *J Clin Oncol* 21 (24), S. 4496–4504. DOI: 10.1200/JCO.2003.02.133.
- Burnett, A.; Wetzler, M.; Lowenberg, B. (2011): Therapeutic Advances in Acute Myeloid Leukemia. In: *J Clin Oncol* 29 (5), S. 487–494. DOI: 10.1200/JCO.2010.30.1820.

- Burnett, Alan K.; Hills, Robert K.; Milligan, Donald W.; Goldstone, Anthony H.; Prentice, Archibald G.; McMullin, Mary-Frances et al. (2010): Attempts to Optimize Induction and Consolidation Treatment in Acute Myeloid Leukemia: Results of the MRC AML12 Trial. In: *J Clin Oncol* 28 (4), S. 586–595. DOI: 10.1200/JCO.2009.22.9088.
- Byun, Ja Min; Kim, Young Jin; Yoon, Hwi-Joong; Kim, Si-Young; Kim, Hee-Je; Yoon, Jaeho et al. (2016): Cytogenetic profiles of 2806 patients with acute myeloid leukemia—a retrospective multicenter nationwide study. In: *Ann Hematol* 95 (8), S. 1223–1232. DOI: 10.1007/s00277-016-2691-1.
- Caron, P. C.; Jurcic, J. G.; Am Scott; Finn, R. D.; Divgi, C. R.; Graham, M. C. et al. (1994): A phase 1B trial of humanized monoclonal antibody M195 (anti-CD33) in myeloid leukemia: specific targeting without immunogenicity. In: *Blood* 83 (7), S. 1760–1768. Online verfügbar unter <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/83/7/1760.full.pdf>.
- Cassileth, P. A.; Harrington, D. P.; Hines, J. D.; Oken, M. M.; Mazza, J. J.; McGlave, P. et al. (1988): Maintenance chemotherapy prolongs remission duration in adult acute nonlymphocytic leukemia. In: *J Clin Oncol* 6 (4), S. 583–587.
- Christen, Philipp; Jaussi, Rolf; Benoit, Roger (2016): Biochemie und Molekularbiologie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, zuletzt geprüft am 27.08.2016.
- Dalton, W. T.; Ahearn, M. J.; McCredie, K. B.; Freireich, E. J.; Stass, S. A.; Trujillo, J. M. (1988): HL-60 cell line was derived from a patient with FAB-M2 and not FAB-M3. In: *Blood* 71 (1), S. 242–247.
- Davids, Matthew S.; Kim, Haesook T.; Bachireddy, Pavan; Costello, Caitlin; Liguori, Rebecca; Savell, Alexandra et al. (2016): Ipilimumab for Patients with Relapse after Allogeneic Transplantation. In: *N Engl J Med* 375 (2), S. 143–153. DOI: 10.1056/NEJMoa1601202.
- Dennis, M.; Russell, N.; Hills, R. K.; Hemmaway, C.; Panoskaltis, N.; McMullin, M. F. et al. (2015): Vosaroxin and vosaroxin plus low-dose Ara-C (LDAC) vs low-dose Ara-C alone in older patients with acute myeloid leukemia. In: *Blood* 125 (19), S. 2923–2932. DOI: 10.1182/blood-2014-10-608117.
- Deutsches Krebsforschungszentrum (Hg.) (2015): Immunsystem - Bedeutung bei Krebs. Deutsches Krebsforschungszentrum. Online verfügbar unter <https://www.krebsinformationsdienst.de/grundlagen/immunsystem.php>, zuletzt aktualisiert am 16.01.2015, zuletzt geprüft am 28.08.2016, 12:00 Uhr.
- Döhner, H.; Estey, E. H.; Amadori, S.; Appelbaum, F. R.; Buchner, T.; Burnett, A. K. et al. (2010): Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. In: *Blood* 115 (3), S. 453–474. DOI: 10.1182/blood-2009-07-235358.
- Dombret, H.; Seymour, J. F.; Butrym, A.; Wierzbowska, A.; Selleslag, D.; Jang, J. H. et al. (2015): International phase 3 study of azacitidine vs conventional care regimens in older patients with newly diagnosed AML with 30% blasts. In: *Blood* 126 (3), S. 291–299. DOI: 10.1182/blood-2015-01-621664.
- Drexler, H. G.; Zaborski, M.; Quentmeier, H. (1997): Cytokine response profiles of human myeloid factor-dependent leukemia cell lines. In: *Leukemia* 11 (5), S. 701–708. Online verfügbar unter <http://www.nature.com/leu/journal/v11/n5/abs/2400633a.html>, zuletzt geprüft am 27.05.2015.
- Eigentler, T. K.; Schlaak, M.; Hassel, J. C.; Loquai, C.; Stoffels, I.; Gutzmer, R. et al. (2014): Effectiveness and Tolerability of Ipilimumab: Experiences From 198 Patients Included in a Named-Patient Program in Various Daily-Practice Settings and Multiple Institutions. In: *J Immunother* 37 (7), S. 374–381, zuletzt geprüft am 06.08.2014.
- Fiedler, W.; Henke, R. P.; Ergün, S.; Schumacher, U.; Gehling, U. M.; Vohwinkel, G. et al. (2000): Derivation of a new hematopoietic cell line with endothelial features from a patient with transformed myeloproliferative syndrome: a case report. In: *Cancer* 88 (2), S. 344–351.

Goekbuget, Nicola; Dombret, Hervé; Bonifacio, Massimiliano; Reichle, Albrecht; Graux, Carlos; Havelange, Violaine et al. (2014a): BLAST: A Confirmatory, Single-Arm, Phase 2 Study of Blinatumomab, a Bispecific T-Cell Engager (BiTE®) Antibody Construct, in Patients with Minimal Residual Disease B-Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). In: *Blood* 124 (21), S. 379.

Goekbuget, Nicola; Kantarjian, Hagop; Brüggemann, Monika; Stein, Anthony; Bargou, Ralf C.; Dombret, Hervé et al. (2014b): An Evaluation of Molecular Response in a Phase 2 Open-Label, Multicenter Confirmatory Study in Patients (pts) with Relapsed/Refractory B-Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia (r/r ALL) Receiving Treatment with the BiTE® Antibody Construct Blinatumomab. In: *Blood* 124 (21), S. 3704.

Goldstone, Anthony H.; Burnett, Alan K.; Wheatley, Keith; Smith, Alastair G.; Hutchinson, R. Michael; Clark, Richard E. (2001): Attempts to improve treatment outcomes in acute myeloid leukemia (AML) in older patients: the results of the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. In: *Blood* 98 (5), S. 1302–1311. DOI: 10.1182/blood.V98.5.1302.

Grimwade, D.; Walker, H.; Harrison, G.; Oliver, F.; Chatters, S.; Harrison, Christine J. et al. (2001): The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML). Analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. In: *Blood* 98 (5), S. 1312–1320. DOI: 10.1182/blood.V98.5.1312.

Grubovikj, R. M.; Alavi, A.; Koppel, A.; Territo, M.; Schiller, G. J. (2012): Minimal Residual Disease as a Predictive Factor for Relapse after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant in Adult Patients with Acute Myeloid Leukemia in First and Second Complete Remission. In: *Cancers* 4 (2), S. 601–617. DOI: 10.3390/cancers4020601.

Heusschen, Roy; Griffioen, Arjan W.; Thijssen, Victor L. (2013): Galectin-9 in tumor biology: A jack of multiple trades. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1836 (1), S. 177–185. DOI: 10.1016/j.bbcan.2013.04.006.

Hodi, F. Stephen; O'Day, Steven J.; McDermott, David F.; Weber, Robert W.; Sosman, Jeffrey A.; Haanen, John B. et al. (2010): Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. In: *N Engl J Med* 363 (8), S. 711–723. DOI: 10.1056/NEJMoa1003466.

Hope, Kristin J.; Jin, Liqing; Dick, John E. (2003): Human acute myeloid leukemia stem cells. In: *Arch Med Res* 34 (6), S. 507–514. DOI: 10.1016/j.arcmed.2003.08.007.

Horowitz, M. M.; Gale, R. P.; Sondel, P. M.; Goldman, J. M.; Kersey, J.; Kolb, H. J. et al. (1990): Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. In: *Blood* 75 (3), S. 555–562, zuletzt geprüft am 18.01.2015, 12:00 Uhr.

Juliusson, Gunnar; Antunovic, Petar; Derolf, Asa; Lehmann, Soren; Mollgard, Lars; Stockelberg, Dick et al. (2009): Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. In: *Blood* 113 (18), S. 4179–4187. DOI: 10.1182/blood-2008-07-172007.

Kampa-Schittenhelm, Kerstin Maria; Heinrich, Michael Charles; Akmut, Figen; Dohner, Hartmut; Dohner, Konstanze; Schittenhelm, Marcus Matthias (2013): Quizartinib (AC220) is a potent second generation class III tyrosine kinase inhibitor that displays a distinct inhibition profile against mutant-FLT3, -PDGFRA and -KIT isoforms. In: *Mol Cancer* 12 (0), S. 19. DOI: 10.1186/1476-4598-12-19.

Kaplan, Gerado; Racaniello, Vincent (1991): Down regulation of poliovirus receptor RNA in HeLa cells resistant to poliovirus infection. In: *J Virol* 65 (4), S. 1829–1835.

Kataoka, Keisuke; Shiraishi, Yuichi; Takeda, Yohei; Sakata, Seiji; Matsumoto, Misako; Nagano, Seiji et al. (2016): Aberrant PD-L1 expression through 3'-UTR disruption in multiple cancers. In: *Nature* 534 (7607), S. 402–406. DOI: 10.1038/nature18294.

Kieseritzky, Katrin von (2014): Die Chemotherapie. Deutsche Krebsgesellschaft. Berlin. Online verfügbar unter <http://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/therapieformen/chemotherapie.html>, zuletzt aktualisiert am 10.09.2014, zuletzt geprüft am 08.10.2016, 12:00 Uhr.

Kim, Y. K.; Kim, H. N.; Lee, SR; Ahn, J. S.; Yang, D. H.; Lee, J. J. et al. (2010): Prognostic significance of nucleophosmin mutations and FLT3 internal tandem duplication in adult patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia. In: *K J Hema* 45 (1), S. 36–45. DOI: 10.5045/kjh.2010.45.1.36.

Kitamura, T.; Tange, T.; Terasawa, T.; Chiba, S.; Kuwaki, T.; Miyagawa, K. et al. (1989): Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin. In: *J Cell Physiol* 140 (2), S. 323–334. DOI: 10.1002/jcp.1041400219.

Koeffler, H. P.; Golde, D. W. (1980): Human myeloid leukemia cell lines: a review. In: *Blood* 56 (3), S. 344–350.

Königshoff, Melanie; Brandenburger, Timo (2012): Kurzlehrbuch Biochemie. 3., überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme (KURZLEHRBUCH).

Konopleva, Marina; Pollyea, Daniel A.; Potluri, Jalaja; Chyla, Brenda; Hogdal, Leah; Busman, Todd et al. (2016): Efficacy and Biological Correlates of Response in a Phase II Study of Venetoclax Monotherapy in Patients with Acute Myelogenous Leukemia. In: *Cancer Discov* 6 (10), S. 1106–1117. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-16-0313.

Krupka, Christina; Kufer, Peter; Kischel, Roman; Zugmaier, Gerhard; Bögeholz, Jan; Köhnke, Thomas et al. (2014): CD33 target validation and sustained depletion of AML blasts in long-term cultures by the bispecific T-cell-engaging antibody AMG 330. In: *Blood* 123 (3), S. 356–365.

Lange, Beverly; Valtieri, Mauro; Santoli, Daniela; Caracciolo, Daniele; Mavilio, Fulvio; Gemperlein, Ingrid et al. (1987): Growth Factor Requirements of Childhood Acute Leukemia: Establishment of GM-CSF-Dependent Cell Lines. In: *Blood* 70 (1), S. 192–199. Online verfügbar unter <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/70/1/192.full.pdf?sso-checked=true>, zuletzt geprüft am 15.01.2015, 12:00 Uhr.

Laszlo, G. S.; Gudgeon, C. J.; Harrington, K. H.; Dell'Aringa, J.; Newhall, K. J.; Means, G. D. et al. (2014): Cellular determinants for preclinical activity of a novel CD33/CD3 bispecific T-cell engager (BiTE) antibody, AMG 330, against human AML. In: *Blood* 123 (4), S. 554–561. DOI: 10.1182/blood-2013-09-527044.

Löwenberg, B.; Suci, S.; Archimbaud, E.; Haak, H.; Stryckmans, P.; Cataldo, R. de et al. (1998): Mitoxantrone versus daunorubicin in induction-consolidation chemotherapy--the value of low-dose cytarabine for maintenance of remission, and an assessment of prognostic factors in acute myeloid leukemia in the elderly: final report. European Organization for the Research and Treatment of Cancer and the Dutch-Belgian Hemato-Oncology Cooperative Hovon Group. In: *J Clin Oncol* 16 (3), S. 872-881. Online verfügbar unter <http://jco.ascopubs.org/content/16/3/872.full.pdf>.

Löwenberg, Bob; Ossenkoppele, Gert J.; van Putten, Wim; Schouten, Harry C.; Graux, Carlos; Ferrant, Augustin et al. (2009): High-Dose Daunorubicin in Older Patients with Acute Myeloid Leukemia. In: *N Engl J Med* 361 (13), S. 1235–1248. DOI: 10.1056/NEJMoa0901409.

Lübbert, Michael; Rüter, Björn H.; Claus, Rainer; Schmoor, Claudia; Schmid, Mathias; Germing, Ulrich et al. (2012): A multicenter phase II trial of decitabine as first-line treatment for older patients with acute myeloid leukemia judged unfit for induction chemotherapy. In: *Haematologica* 97 (3), S. 393-401. DOI: 10.3324/haematol.2011.048231.

Mayer, R. J.; Davis, R. B.; Schiffer, C. A.; Berg, D. T.; Powell, B. L.; Schulman, P. et al. (1994): Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. Cancer and Leukemia Group B. In: *N Engl J Med* 331 (14), S. 896–903. DOI: 10.1056/NEJM199410063311402.

- McClune, Brian L.; Weisdorf, Daniel J.; Pedersen, Tanya L.; Tunes da Silva, Gisela; Tallman, Martin S.; Sierra, Jorge et al. (2010): Effect of age on outcome of reduced-intensity hematopoietic cell transplantation for older patients with acute myeloid leukemia in first complete remission or with myelodysplastic syndrome. In: *J Clin Oncol* 28 (11), S. 1878–1887. DOI: 10.1200/JCO.2009.25.4821.
- Motzer, Robert J.; Escudier, Bernard; McDermott, David F.; George, Saby; Hammers, Hans J.; Srinivas, Sandhya et al. (2015): Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. In: *N Engl J Med* 373 (19), S. 1803–1813. DOI: 10.1056/NEJMoa1510665.
- Mulford, Deborah A.; Jurcic, Joseph G. (2004): Antibody-based treatment of acute myeloid leukaemia. In: *Exp Opin Biol Ther* 4 (1), S. 95–105. DOI: 10.1517/14712598.4.1.95.
- Nakagawa, T.; Matozaki, S. (1995): The SKM-1 leukemic cell line established from a patient with progression to myelomonocytic leukemia in myelodysplastic syndrome (MDS)-contribution to better understanding of MDS. In: *Leuk Lymphoma* 17 (3-4), S. 335–339. DOI: 10.3109/10428199509056841.
- Nobumoto, Atsuya; Oomizu, Souichi; Arikawa, Tomohiro; Katoh, Shigeki; Nagahara, Keiko; Miyake, Minoru et al. (2009): Galectin-9 expands unique macrophages exhibiting plasmacytoid dendritic cell-like phenotypes that activate NK cells in tumor-bearing mice. In: *Clin Immunol* 130 (3), S. 322–330. DOI: 10.1016/j.clim.2008.09.014.
- Offner, Sonja; Hofmeister, Robert; Romaniuk, Andrea; Kufer, Peter; Baeuerle, Patrick A. (2006): Induction of regular cytolytic T cell synapses by bispecific single-chain antibody constructs on MHC class I-negative tumor cells. In: *Mol Immunol* 43 (6), S. 763–771. DOI: 10.1016/j.molimm.2005.03.007.
- Ohtake, Shigeki; Miyawaki, Shuichi; Fujita, Hiroyuki; Kiyoi, Hitoshi; Shinagawa, Katsuji; Usui, Noriko et al. (2011): Randomized study of induction therapy comparing standard-dose idarubicin with high-dose daunorubicin in adult patients with previously untreated acute myeloid leukemia: the JALSG AML201 Study. In: *Blood* 117 (8), S. 2358–2365. DOI: 10.1182/blood-2010-03-273243.
- Papayannopoulou, T.; Nakamoto, B.; Kurachi, S.; Tweeddale, M.; Messner, H. (1988): Surface antigenic profile and globin phenotype of two new human erythroleukemia lines: characterization and interpretations. In: *Blood* 72 (3), S. 1029–1038.
- Pende, D. (2005): 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). In: *Blood* 105 (5), S. 2066–2073. DOI: 10.1182/blood-2004-09-3548.
- Pende, Daniela; Bottino, Cristina; Castriconi, Roberta; Cantoni, Claudia; Marcenaro, Stefania; Rivera, Paola et al. (2005): PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as ligands of the human DNAM-1 (CD226) activating receptor: involvement in tumor cell lysis. In: *Mol Immunol* 42 (4), S. 463–469. DOI: 10.1016/j.molimm.2004.07.028.
- Pfaffl, M. W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. In: *Nucleic Acids Res* 29 (9), e45.
- Rai, K. R.; Holland, J. F.; Glidewell, O. J.; Weinberg, V.; Brunner, K.; Obrecht, J. P. et al. (1981): Treatment of acute myelocytic leukemia: a study by cancer and leukemia group B. In: *Blood* 58 (6), S. 1203–1212. Online verfügbar unter <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/58/6/1203.full.pdf>.
- Rönstrand, L. (2004): Signal transduction via the stem cell factor receptor/c-Kit. In: *Cell Mol Life Sci* 61 (19-20), S. 2535–2548. DOI: 10.1007/s00018-004-4189-6.
- Schadendorf, D.; Hodi, F. S.; Robert, C.; Weber, J. S.; Margolin, K.; Hamid, O. et al. (2015): Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. In: *J Clin Oncol* 33 (17), S. 1889–1894. DOI: 10.1200/JCO.2014.56.2736.

- Schlenk, R. F.; Benner, A.; Hartmann, F.; del Valle, F.; Weber, C.; Pralle, H. et al. (2003): Risk-adapted postremission therapy in acute myeloid leukemia: results of the German multicenter AML HD93 treatment trial. In: *Leukemia* 17 (8), S. 1521–1528. DOI: 10.1038/sj.leu.2403009.
- Schmiedel, Benjamin Joachim; Nuebling, Tina; Steinbacher, Julia; Malinowska, Alexandra; Wende, Constantin Maximilian; Azuma, Miyuki et al. (2013): Receptor activator for NF- κ B ligand in acute myeloid leukemia: expression, function, and modulation of NK cell immunosurveillance. In: *J Immunol* 190 (2), S. 821–831. DOI: 10.4049/jimmunol.1201792.
- Smith, A.; Howell, D.; Patmore, R.; Jack, A.; Roman, E. (2011): Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the Haematological Malignancy Research Network. In: *British J* 105 (11), S. 1684–1692. DOI: 10.1038/bjc.2011.450.
- Smits, E. L.J.M.; Berneman, Z. N.; Van Tendeloo, V. F.I. (2009): Immunotherapy of Acute Myeloid Leukemia: Current Approaches. In: *Oncologist* 14 (3), S. 240–252. DOI: 10.1634/theoncologist.2008-0165.
- Stanietsky, Noa; Simic, Hrvoje; Arapovic, Jurica; Toporik, Amir; Levy, Ofer; Novik, Amit et al. (2009): The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity. In: *PNAS* 106 (42), S. 17585–17863. Online verfügbar unter www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0903474106.
- Statistisches Bundesamt (Hg.) (2016): Abfrage der GENESIS-Online Datenbank Ergebnis - 23211-0001. Statistisches Bundesamt. Online verfügbar unter https://www-genesis.destatis.de/genesis/online/data.jsessionid=65745263172276CD207EF517A7262479.tomcat_GO_1_2?operation=abrufabelleBearbeiten&levelindex=1&levelid=1461077855281&auswahloperation=abrufabelleAuspraegungAuswaehlen&auswahlverzeichnis=ordnungsstruktur&auswahlziel=werteabruf&selectionname=23211-0001&auswahltext=%23STODUR1-TODESURS08%2CTODESURS30%2CTODESURS09%2CTODESURS29&werteabruf=Werteabruf, zuletzt geprüft am 19.04.2016, 14:15 Uhr.
- Stein, Eytan M.; DiNardo, Courtney; Altman, Jessica K.; Collins, Robert; DeAngelo, Daniel J.; Kantarjian, Hagop M. et al. (2015): Safety and Efficacy of AG-221, a Potent Inhibitor of Mutant IDH2 That Promotes Differentiation of Myeloid Cells in Patients with Advanced Hematologic Malignancies: Results of a Phase 1/2 Trial. In: *Blood* 126 (23), S. 323.
- Stock, Wendy; Thirman, Michael J (2014): Pathogenesis of acute myeloid leukemia. Unter Mitarbeit von Richard A. Larson und Rebecca F. Connor. Hg. v. UpToDate. UpToDate. Alphen aan den Rijn. Online verfügbar unter http://www.uptodate.com/contents/pathogenesis-of-acute-myeloid-leukemia?topicKey=HEME%2F4493&elapsedTimeMs=0&source=search_result&searchTerm=akute+myeloische+leuk%C3%A4mie&selectedTitle=8%27E150&view=print&displayedView=full, zuletzt geprüft am 20.07.2016, 11:00 Uhr.
- Stone, Richard M.; Mandrekar, Sumithra; Sanford, Ben L.; Geyer, Susan; Bloomfield, Clara D.; Dohner, Konstanze et al. (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 Myeloid Leukemia (AML) Patients (pts) Age 18-60 with FLT3 Mutations (mut): An International Prospective Randomized (rand) P-Controlled Double-Blind Trial (CALGB 10603/RATIFY [Alliance]). In: *Blood* 126 (23), S. 6.
- Su, E. W.; Bi, S.; Kane, L. P. (2011): Galectin-9 regulates T helper cell function independently of Tim-3. In: *Glycobiology* 21 (10), S. 1258–1265. DOI: 10.1093/glycob/cwq214.
- Sundström, C.; Nilsson, K. (1976): Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). In: *Int J Cancer* 17 (5), S. 565–577.
- Tiacci, E.; Spanhol-Rosseto, A.; Martelli, M. P.; Pasqualucci, L.; Quentmeier, H.; Grossmann, V. et al. (2011): The NPM1 wild-type OCI-AML2 and the NPM1-mutated OCI-AML3 cell lines carry DNMT3A mutations. In: *Leukemia* 26 (3), S. 554–557. DOI: 10.1038/leu.2011.238.

- Topalian, Suzanne L.; Drake, Charles G.; Pardoll, Drew M. (2012): Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. In: *Curr Opin Immunol* 24 (2), S. 207–212. DOI: 10.1016/j.coi.2011.12.009.
- Topp, Max S.; Kufer, Peter; Gökbüget, Nicola; Goebeler, Mariele; Klinger, Matthias; Neumann, Svenja et al. (2011): Targeted therapy with the T-cell-engaging antibody blinatumomab of chemotherapy-refractory minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukemia patients results in high response rate and prolonged leukemia-free survival. In: *J Clin Oncol* 29 (18), S. 2493–2498. DOI: 10.1200/JCO.2010.32.7270.
- Tsuchiya, S.; Yamabe, M.; Yamaguchi, Y.; Kobayashi, Y.; Konno, T.; Tada, K. (1980): Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). In: *Int J Cancer* 26 (2), S. 171–176.
- UniProtKB/Swiss-Prot (Hg.) (1990): PVR_HUMAN. P15151. UniProtKB/Swiss-Prot (182). Online verfügbar unter <http://www.uniprot.org/uniprot/P15151>, zuletzt aktualisiert am 07.09.2016, zuletzt geprüft am 25.09.2016, 16:00 Uhr.
- UniProtKB/Swiss-Prot (Hg.) (2014): Galectin-9. UniProtKB/Swiss-Prot. Online verfügbar unter http://www.uniprot.org/uniprot/O00182#section_name, zuletzt aktualisiert am 06.07.2016, zuletzt geprüft am 29.07.2014, 13:00 Uhr.
- Vardiman, J. W.; Thiele, J.; Arber, D. A.; Brunning, R. D.; Borowitz, M. J.; Porwit, A. et al. (2009): The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. In: *Blood* 114 (5), S. 937–951.
- Vardiman, James W.; Harris, Nancy Lee; Brunning, Richard D. (2002): The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. In: *Blood* 100 (7), S. 2292–2302. DOI: 10.1182/blood-2002-04-1199.
- Varki, Ajit; Cummings, Richard D.; Esko, Jeffrey D.; Freeze, Hudson H.; Stanley, Pamela; Marth, Jamey D. et al. (2009): Symbol nomenclature for glycan representation. In: *Proteomics* 9 (24), S. 5398–5399. DOI: 10.1002/pmic.200900708.
- Verhaak, R. G.W.; Wouters, B. J.; Erpelinck, C. A.J.; Abbas, S.; Beverloo, H. B.; Lugthart, S. et al. (2009): Prediction of molecular subtypes in acute myeloid leukemia based on gene expression profiling. In: *Haematologica* 94 (1), S. 131–134. DOI: 10.3324/haematol.13299.
- Walzog, Barbara; Fandrey, Joachim (2010): Blut: Ein flüssiges Organsystem. In: Rainer Klinke, Hans-Christian Pape, Armin Kurtz und Stefan Silbernagl (Hg.): Physiologie. 6., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 241f.
- Whitman, Susan P.; Ruppert, Amy S.; Marcucci, Guido; Mrozek, Krzysztof; Paschka, Peter; Langer, Christian et al. (2007): Long-term disease-free survivors with cytogenetically normal acute myeloid leukemia and MLL partial tandem duplication: a Cancer and Leukemia Group B study. In: *Blood* 109 (12), S. 5164–5167. DOI: 10.1182/blood-2007-01-069831.
- Zhu, Chen; Anderson, Ana C.; Schubart, Anna; Xiong, Huabao; Imitola, Jaime; Khoury, Samia J. et al. (2005): The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. In: *Nat Immunol* 6 (12), S. 1245–1252. DOI: 10.1038/ni1271.
- Ziegler-Heitbrock, H. W.; Thiel, E.; Fütterer, A.; Herzog, V.; Wirtz, A.; Riethmüller, G. (1988): Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. In: *Int J cancer* 41 (3), S. 456–461.

9 - Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Walter Fiedler, für die Möglichkeit, diese sehr interessante Fragestellung zu bearbeiten sowie die technischen Einrichtungen des Labors zu nutzen. Ferner möchte ich mich bei ihm für den kritischen Gedankenaustausch und das stets offene Ohr sowie den Umgang auf Augenhöhe bedanken.

Mein Dank gilt auch meiner naturwissenschaftlichen Betreuerin, Frau Dr. rer. nat. Jasmin Wellbrock, die bei wichtigen Fragen und in entscheidenden Momenten zur Stelle war und mir bei jeder Fragestellung geholfen hat, egal ob es sich um eine schwierige wissenschaftliche Entscheidung zu den Experimenten oder um das Gegenrechnen von Konzentrationsangaben handelte.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Herrn Prof. Dr. med. Carsten Bokemeyer für die Möglichkeit, diese Promotionsarbeit in der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik des UKE anfertigen zu dürfen und alle technischen Einrichtungen nutzen zu können.

Mein persönlicher Dank gilt Herrn Dr. med. Gerhard Nordholt (Zentrum für Diagnostik, UKE) für die kurzfristige und unkomplizierte Unterstützung durch laborchemische Untersuchungen bei der Überprüfung einiger projektbezogener Fragestellung.

Durch viel Engagement und zahlreiche praktische Tipps unterstütze mich Dr. med. Panagiotis Karagiannis.

Für die stetige Unterstützung meiner Arbeit und das Einarbeiten in neue Methoden möchte ich mich bei Frau Marianne Klokow, Frau Gabi Vohwinkel, Herrn Hauke Stamm und Frau PD Dr. rer. nat. Leticia Oliveira-Ferrer (Gynäkologisches Forschungslabor, UKE) sowie allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Angiogenese bedanken.

Mein besonderer Dank für die große Geduld während der Datenerhebung gilt meiner Familie und Partnerin, für die es sicherlich nicht immer einfach war, Sorgen zu teilen oder Verständnis für lange Arbeitszeiten zu haben.

Für die Bereitstellung des cDNA-Probenmaterials danke ich Herrn PD Dr. med. Michael Heuser (Klinik für Hämatologie, Hämostaseologie, Onkologie und Stammzelltransplantation, Medizinische Hochschule Hannover), für die Hilfe bei der statistischen Auswertung Herrn Eik Vettorazzi (Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie, UKE) und für die finanzielle Unterstützung der Liselotte Beutel Stiftung.

Für die Bereitstellung des BiTE®-Antikörpers und zahlreiche hilfreiche Tipps danke ich Frau Katie Newhall, Ph. D. sowie Herrn Dr. med. Roman Kischel und der AMGEN Research (Munich) GmbH.

Der Blutbank des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf danke ich für die Bereitstellung der Blutspendeprodukte.

10 - Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

11 - Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: