

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. Dr. M. von Bergwelt

**Antikörper-basierte Immuntherapie in der AML:
Einfluss zytoreduktiver Substanzen auf die CD33/CD3
BiTE® - vermittelte Zytotoxizität
und Analyse der Expression von ILT3, CD244 und CD48
auf CD33 positiven AML - Zellen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Franziska Friederike Brauneck

aus

Hamburg

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Marion Subklewe

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Marcus Hentrich

Prof. Dr. med. Christof Salat

Mitbetreuung durch die

promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Felix Lichtenegger

Dr. rer. biol. hum. Christina Krupka

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 10.10.2019

Für
meinen Großvater
Prof. Dr. Manfred Brauneck

Abkürzungsverzeichnis	IV
I. Einleitung	1
I. 1. Die akute myeloische Leukämie (AML)	1
I. 1.1. Epidemiologie und Klinik	1
I. 1.2. Risikofaktoren und Pathogenese	2
I. 1.3. Klassifikation	4
I. 1.4. Diagnostik	6
I. 1.4. Therapie und Prognose.....	7
I. 1.5. Immuntherapie in der AML	8
I. 1.6. Bispezifischer CD33/CD3 - Antikörper	9
I. 1.6.1. Einflussfaktoren der CD33/CD3 BiTE® - vermittelten Zytotoxizität	10
I. 1.6.2. Ansätze für eine gesteigerte CD33/CD3 BiTE® - vermittelte Zytotoxizität.....	10
I. 1.7. Immun-Kontrollpunkte der AML.....	11
II. Aufgabenstellung	15
III. Material und Methoden	16
III. 1. Material	16
III. 1.1. Zellkultur.....	16
III. 1.1.1. Verwendete Zelllinien.....	16
III. 1.1.3. Reagenzien für Zell-Medien, Dichtegradientenzentrifugation,	17
Kryokonservierung	17
III. 1.1.4. Zellzählung.....	17
III. 1.1.5. Zellplatten.....	17
III. 1.2. Zytoreduktion der leukämischen Zellen	18
III. 1.2.1. Zytoreduktiva.....	18
III. 1.2.2. BiTE Antikörper (Bi-specific t-cell engagers).....	18
III. 1.2.3. Blockade Antikörper	18
III. 1.3. Stimulation von leukämischen Zellen	18
III. 3.1. Zytokine	18
III. 1.4. Immunologische Methoden und deren Auswertung.....	18
III. 1.4.1. Magnetic Activated Cell Sorting (MACS).....	18
III. 1.4.2. Durchflusszytometrie (FACS) zur quantitativen Bestimmung von.....	18
Oberflächenmolekülen	18
III. 1.4.3. Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) Proliferations - Assay	19
III. 1.5. Allgemein verwendete Geräte.....	19
III. 2. Methoden	20
III. 2.1. Zellkultur.....	20
III. 2.1.1. Zellkulturbedingungen und Langzeitkultursystem.....	20
III. 2.1.2. Zelllinien in Kultur	20
III. 2.1.3. <i>In vitro</i> verwendete primäre mononukleäre Blutzellen.....	20
III. 2.1.4. Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes und des	21
Knochenmarks	21
III. 2.1.5. Kryokonservierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes und des	21
Knochenmarks	21
III. 2.1.6. Auftauen von mononukleären Zellen des peripheren Blutes und des	21
Knochenmarks	21
III. 2.2. Zytoreduktion und Behandlungsprotokoll.....	21
III. 2.3. Immunologische Methoden.....	24
III. 2.3.1. Immunmagnetische Zellseparation (MACS).....	24
III. 2.3.2. Carboxyfluorescein Succinimidylester Proliferationsassay (CFSE).....	24
III. 2.3.2. Fluorescence-activated cell scanning (FACS)	25
III. 2.3.4. Zytokin-vermittelte Stimulation von AML-Zellen.....	26

III. 2.4. Statistische Analysen	26
III. 2.4.1. Patientenproben.....	26
III.. 2.4.2. Korrelation zwischen Expression und Charakteristika der Erkrankung	27
IV. Ergebnisse.....	29
IV. 1. Einfluss zytoreduktiver Substanzen auf die CD33/CD3 BiTE® -	29
vermittelte Zytotoxizität und auf die Proteinexpression von CD33	29
IV. 1.1. Einfluss von Cytarabin und Hydroxyurea auf die CD33/CD3	29
BiTE® - vermittelte lyse und Proliferation der T-Zellen	29
IV. 1.2. Einfluss von Cytarabin und Hydroxyurea auf die Proteinexpression des	34
Oberflächen-Antigens CD33	34
IV. 2. Charakterisierung der Proteinexpression von ILT3, CD244	35
und CD48 auf primären AML-Zellen <i>in vitro</i>	35
IV. 2.1. Expression von ILT3, CD244 und CD48 auf AML-Zellen bei Erstdiagnose.....	37
IV. 2.2. Einfluss von TNF α und IFN γ auf die Proteinexpression von LAG3, HVEM und	38
ILT3 <i>in vitro</i>	38
IV. 2.3. Vergleich der ILT3-, CD244- und CD48-Expression auf AML-Zellen bei	39
Erstdiagnose und im Rezidiv.....	39
IV. 2.4. Korrelation der Proteinexpression von ILT3, CD244 und CD48 mit.....	40
Patientencharakteristika (Geschlecht und Alter)	40
IV. 2.5. Korrelation der Proteinexpression von ILT3, CD244 und CD48 mit.....	41
Charakteristika der Erkrankung (Morphologie, Zytogenetik, Molekulargenetik).....	41
IV. 2.5.1. Differentielle Proteinexpression bei einzelnen Subtypen der AML.....	41
IV. 2.5.2. Korrelation der Proteinexpression von ILT3, CD244 und CD48 mit.....	42
zytogenetischen Risikogruppen.....	42
IV. 2.5.3. Korrelation der ILT3-, CD244- und CD48-Proteinexpression mit molekularen.....	43
Veränderungen.....	43
IV. 2.6. Prognostische Relevanz der ILT3-, CD244- und CD48-Expression für die AML.....	44
IV. 2.6.1. Rezidivfreies Überleben (RFÜ).....	44
IV. 2.6.2. Gesamtüberleben (GÜ).....	47
IV. 2.7. Einfluss der Blockade von ILT3 und HVEM auf die CD33/CD3 BiTE®	49
vermittelte Zytotoxizität.....	49
V. Diskussion.....	52
V. 1. Einleitung	52
V. 2. Einfluss zytoreduktiver Substanzen auf die CD33/CD3 BiTE® vermittelte.....	53
Zytotoxizität.....	53
V. 2.1. Einfluss von Hydroxyurea auf die CD33/CD3 BiTE® vermittelte T-Zellfunktion.....	53
und T-Zellproliferation	53
V. 2.2. Einfluss von Cytarabin auf die CD33/CD3 BiTE® - vermittelte T-Zellfunktion und.....	54
T-Zellproliferation.....	54
V. 2.3. Einfluss von Hydroxyurea auf die Expression von CD33 auf AML-Zellen.....	55
V. 2.4. Einfluss von Cytarabin auf die Proteinexpression von CD33 auf AML-Zellen.....	56
V. 3. Analyse der Expression von ILT3, CD48 und CD244 auf CD33+ AML-.....	57
Zellen	57
V. 3.1. Diskussion der Methoden.....	57
V. 3.2. Proteinexpression von ILT3, CD244 und CD48 auf CD33+AML-Zellen.....	57
V. 3.3. Zytokin-abhängige Proteinexpression von LAG3, HVEM und ILT3	59
V. 3.4. Korrelation der Proteinexpression von ILT3, CD244 und CD48 mit.....	60
krankheitsbezogenen Daten.....	60
V. 3.4.1. Die ILT3- und CD244-Expression ist assoziiert mit zytomorphologischen	60
Subgruppen der AML.....	60
V. 3.4.2. Die Proteinexpression von ILT3 CD244 und CD48 ist assoziiert mit	61
ungünstigen zytogenetischen Aberrationen	61

V. 3.4.3. Die Proteinexpression von ILT3, CD244 und CD48 ist assoziiert mit	62
ungünstigen molekulargenetischen Veränderungen	62
V. 3.5. Die ILT3- und CD48-Expression ist assoziiert mit einem ungünstigen Verlauf	62
der AML.....	62
V. 3.6. Die Zusätzliche Blockade von ILT3 und HVEM hat keinen Einfluss auf die	63
CD33/CD3 BiTE® Antikörper vermittelte Blastenlyse und T-Zell-Proliferation.....	63
VI. Zusammenfassung	65
Abbildungsverzeichnis.....	66
Tabellenverzeichnis.....	68
Abstracts und Poster-Präsentationen	69
Quellenverzeichnis.....	70
Danksagung	86
Eidesstatliche Versicherung.....	87

Abkürzungsverzeichnis

AE	Adverse Event
ALL	Akute lymphatische Leukämie
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
AMLCG	AML Cooperative Group
APZ	Antigenpräsentierende Zellen
ASZT	Allogene Stammzelltransplantation
BiTE	Bispezifische Antikörper (engl Bi-specific T cell engager)
CCAAT	CCAAT/Enhancer-Binding-Protein (C/EBP)
CD	Cluster of Differentiation
CEBPA	CCAAT/Enhancer Binding Protein Alpha
CFSE	6-Carboxyfluorescein (6-FAM)
cKIT	Tyrosinkinase KIT Gen, Protoonkogen
CLL	Chronische lymphozytäre Leukämie
CR	Komplette Remission
DNMT3A	DNA (Cytosine-5)-Methyltransferase 3A-Gen
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DZ	Dendritische Zellen
E:T Ratio	Effector : Target Ratio
ELN	European Leukemia Net
FAB	French American British
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FLT3	Fms-Like-tyrosine Kinase 3
GÜ	Gesamtüberleben
GÜ/OS	Gesamtüberleben/Overall Survival
GvL	Graft versus Leukemie
HVEM	Herpesvirus entry mediator
IDH1	Isocitrat Dehydrogenase
IFN γ	Interferon Gamma
IL	Interleukin
ILT3	Immunoglobulin-like transcript (ILT) 3
ITD	Interne Tandem Duplikation
K-RAS	Kirsten RA α Sarcoma Virus
LAG3	Lymphocyte-Activation Gene 3
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MFI	Mittlerer Fluoreszenzindex
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MPO	Myeloperoxidase
MRC	Medical Research Council
MRD	Minimale Resterkrankung (minimal residual disease)
mRNA	Messenger RNA
Mut	Mutiert
N-RAS	Neuroblastom RA α Sarcoma virus, Protoonkogen
NPM1	Nucleophosmin
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD-1	Programmed cell death protein 1
PVR	Poliovirus Receptor
RFÜ	Rezidivfreies Überleben
RUNX1	Runt-Related Transcription Factor 1
S-HAM	Chemotherapie-Regime mit Cytarabin und Mitoxantrim
Schema	

sAML	Sekundäre AML
scFv	Single Chain Variable Fragment
SFI	Spezifischer Fluoreszenzindex
SHP	Src Homology Region 2 Domain-Containing Phosphatase
SZT	Stammzelltransplantation
tAML	Therapieassoziierte AML
TIGIT	T Cell immunoreceptor with Ig and ITIM Domains
Tim3	T Cell immunoglobulin and Mucin-Domain Containing-3 Protein
TKD	Tyrosinkinase Domäne
TNF	Tumornekrose Faktor
TP53	Tumorprotein P53
Tregs	Regulatorische T-Zellen
V _H	Heavy Chains
V _L	Light Chains
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl. Für World Health Organization)
WT	Wild Typ
WT1	Wilms-Tumor-Gen 1

I. Einleitung

I. 1. Die akute myeloische Leukämie (AML)

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine klonale Erkrankung primitiver hämatopoetischer Zellen. Betroffen sind myeloische Vorläuferzellen (AML-Zellen), wobei die Beteiligung der myeloischen Zellreihe variabel ist. Genetische Veränderungen führen zu einem abnormalem Wachstum, Dedifferenzierung und einem verändertem Apoptoseverhalten der AML - Zellen. Durch die Ausbreitung der AML - Zellen im Knochenmark wird die gesunde Hämatopoese verdrängt, und es kommt zu einer hämatopoetischen Insuffizienz. Über die Ausschwemmung ins periphere Blut können die AML-Zellen extramedulläre Organe befallen und schädigen. Die AML ist eine akute Erkrankung, die unbehandelt innerhalb von Monaten zum Tod führt.^{1 2 3}

I. 1.1. Epidemiologie und Klinik

Im Erwachsenenalter stellt die AML mit einem Anteil von 80% die häufigste akute Leukämie dar. In Deutschland liegt die Inzidenz bei etwa 3,5/100.000/Jahr und steigt mit dem Lebensalter.^{1 9} Das mediane Erkrankungsalter liegt bei etwa 65 Jahren.^{7 8} Männer sind häufiger betroffen als Frauen (1,6 versus 1).⁹ Die Erkrankungsraten blieben in Deutschland für beide Geschlechter in den letzten Jahren stabil.⁸ Diese epidemiologischen Daten gelten nicht für Kinder.^{1 4 8 9}

Das klinische Bild der AML ist in der Regel unspezifisch. Aufgrund der hämatopoetischen Insuffizienz kann es zu einer Panzytopenie und daraus resultierenden klinischen Beschwerdebildern kommen. Leitsymptome sind bei etwa 50% der Patienten Müdigkeit, bei etwa 10% der Patienten Fieber (mit oder ohne erkennbare Infektion) und bei etwa 5% der Patienten bestehen initial Hämatome und eine Blutungsneigung.¹⁰

60% der Patienten leiden an einer Leukozytose. Hierdurch besteht die Gefahr eines Leukostase-Syndroms. Mikrozirkulationsstörungen führen zu Organschädigung. Häufigste Manifestationen sind die respiratorische Insuffizienz ggf. mit pulmonaler Hypertonie, neurologische Ausfälle und Sehstörungen bei Stauung der retinalen Venen sowie Papillenödemen. Einen weiteren hämatologischen Notfall stellt die Erstdiagnose einer akuten Promyelozytenleukämie (FAB M3) dar. Bei diesem Subtyp der AML kann es zu lebensbedrohlichen Gerinnungsstörungen kommen.⁷ AML-Zellen der Promyelozytenleukämie

exprimieren und sezernieren Gerinnungsfaktoren (z.B. tissue factor und cancer proagulants). Durch die systemische Gerinnungsaktivierung kommt es zu einer Verbrauchskoagulopathie.⁹⁴ Patienten mit einer sekundären AML (sAML) oder therapieassoziierten AML (tAML) haben häufig normale oder verminderte Leukozytenwerte im peripheren Blut.¹³ Monozytäre AML-Erkrankungen können sich extramedullär in Form von Hautinfiltraten, einer Meningeosis leukaemica, Gingivahyperplasien und Milz- und Leber-Infiltrationen manifestieren.¹⁰

I. 1.2. Risikofaktoren und Pathogenese

Es sind bislang einige Risikofaktoren bekannt, die mit der Ausbildung einer AML in Verbindung gebracht werden. Eine erhöhte Inzidenz der AML ist assoziiert mit bestimmten somatischen Chromosomenaberrationen wie der Trisomie 21 oder Erkrankungen mit einem DNS-Repair-Defekt.^{10 34} Eine Knochenmarkschädigung durch ionisierende Strahlen oder Zytostatika erhöht ebenfalls das Risiko, an einer AML zu erkranken. Zu den Zytostatika gehören unter anderem Alkylantien und Topoisomerase II-Hemmer. Innerhalb der WHO-Klassifikation stellt die AML nach vorangegangener Strahlen- oder Chemotherapie eine eigene Subgruppe dar, die therapieassoziierte AML (tAML). Weitere Risikofaktoren sind die Exposition mit Benzol, Mineralölprodukten, Farben oder Herbiziden.¹⁰ Gemäß der WHO-Klassifikation wird unterschieden zwischen einer De-novo-AML (neu entwickelten) und einer sAML. Die sAML (sekundären) bildet sich aus einer vorbestehenden hämatologischen Erkrankung. Ein erhöhtes Risiko für die Entstehung einer sAML haben das myelodysplastische Syndrom, myeloproliferative Erkrankungen, die Aplastische Anämie, das multiple Myelom und die paroxysmale Hämoglobinurie. Die sAML gilt prognostisch als ungünstig.^{5 7}

Die AML ist eine heterogene Erkrankung. Es wird angenommen, dass die Leukämogenese von veränderten myeloischen Vorläuferzellen ausgeht. Ursachen der Leukämogenese sind zytogenetische und molekulare Veränderungen, die zu einer veränderten Proliferation und Differenzierung der AML-Zellen führen. Nach dem aktuellem Kenntnisstand basiert die leukämische Transformation auf einem mehrstufigen genetischen Prozess. Entscheidend ist das gleichzeitige Auftreten mehrerer genetischer Veränderungen.^{2 11 12} Gemäß der WHO Klassifikation werden chromosomale Veränderungen und rekurrente Genmutationen auch als Klassifikationsparameter verwendet und sind prognostisch relevant.

Zytogenetik

Zytogenetisch wird unterschieden zwischen AML-Erkrankungen mit einem aberranten Karyotyp und AML-Erkrankungen mit einem normalem Karyotyp. Aberrante Karyotypen können numerische und strukturelle Veränderungen aufweisen. Zu den numerischen Chromosomenaberrationen gehören die Trisomie 8, die Monosomie 5 und 7. Die strukturellen Chromosomenaberrationen werden weiter in balancierte- und unbalancierte Translokationen unterteilt. Als prognostisch günstig gelten die balancierten Translokationen t(8;21)(q22;q22),

inv(16)(p13.1q22) t(16;16)(p11;q22), t(15;17)(q22;q21) und t(9;11)(p22;q23). Durch diese Translokationen entstehen die Fusionsgene RUNX1-RUNX1T1, CBFB-MYH1, PML-RARA, und MLLT-MLL.6 11.^{2 11 14} Die Translokation t(15;17) gilt als Beweis für eine akute Promyelozytenleukämie.^{14 23} Zu den unbalancierten Chromosomenanomalien zählen die Deletion auf Chromosom 5 und 7. Diese Veränderungen gelten prognostisch als ungünstig. Finden sich drei oder mehr zytogenetische Veränderungen in einer AML-Zelle, wird der Karyotyp als komplex aberrant bezeichnet. Ein komplex veränderter Karyotyp ist mit einer schlechten Prognose assoziiert.⁹⁵

Molekulargenetik

Neben den genannten zytogenetischen Veränderungen treten Genmutationen auf, die für die Leukämogenese wichtig sind.^{9 24} Bei Patienten mit einem normalen Karyotyp (ca. 50% der AML) ist die Molekulargenetik besonders wichtig für die Prognose, Therapie und zur Verlaufskontrolle. Bislang bekannte Mutationen betreffen die Gene NPM1, FLT3, DNMT3A, IDH1, IDH2, WT1, K-RAS, N-RAS, KIT, RUNX1, TP53, CEBPA. Bei Patienten mit AML und einem normalem Karyotyp treten die Mutationen NPM1, FLT3 ITD CEBPAa, IDH1 und IDH2 gehäuft auf.² Es hilft der Übersichtlichkeit, die Mutationen nach ihrer Funktionalität einzuteilen. Döhner et al. 2008 unterscheiden dafür in Klasse I und II Mutationen. Im Folgenden werden die für diese Arbeit relevanten Mutationen vorgestellt.

Mutationen der Klasse I führen zu einem Proliferations- und Überlebensvorteil der AML-Zellen. Mit einer Gesamthäufigkeit von ca. 30% gehören Mutationen im Bereich des **FLT3**-Gens zu den häufigsten molekularen Veränderungen der AML. Das FLT3-Gen kodiert für eine Tyrosinkinase, die wichtig für die Regulation von Apoptose und Proliferation hämatopoetischer Vorläuferzellen ist. Die häufigsten Mutationen sind Längenmutationen (interne Tandemduplikationen), die als FLT3 ITD bezeichnet werden. Weitere Mutationen befinden sich in der Tyrosinkinase-Domäne (auch als FLT3 TKD bezeichnet). Veränderungen der Tyrosinkinase-Domäne führen zu einer Hyperproliferation und Verstärkung antiapoptotischer Signale in der Progenitorzelle.^{10 12 15} Patienten mit einer FLT3 ITD-Mutation haben prognostisch ein ungünstigeres Risiko im Vergleich zu Patienten mit einem FLT3 TKD-Wildtyp.²⁵ Therapeutisch wird FLT3 bereits als Target genutzt. Die Behandlung mit den FLT3 Inhibitoren Midostaurin, Sunitinib, Sorafenib zeigte in Ergänzung zu den Standardchemotherapie-Zyklen ein verbessertes Überleben.^{11 16} Weitere Mutationen, die zu einem Proliferations- und Überlebensvorteil der betroffenen AML-Zellen führen, sind Mutationen der Tyrosinkinase *cKIT* und Mutationen des Protoonkogens RAS.^{2 11 12}

Die Mutationen der Klasse II führen zu Differenzierungsstörungen der AML-Zellen. Mit einer Gesamthäufigkeit von 15% tritt eine Mutation im **CEBPAa**-Gen auf. Das CEBPA (*CCAAT/Enhancer - Binding Proteine*)- Gen kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der für die Myelopoese wichtig ist. Die Mutation kann mono-oder biallelisch vorliegen.¹⁷ In den meisten

Fällen liegt eine biallelische CEBPAA-Mutation vor, die in Kombination mit einem normalem Karyotyp und einem FLT3-Wildtyp mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für eine komplette Remission und mit einem besseren progressionsfreien Überleben assoziiert ist.^{18 11,12 25}

Mit einer Gesamthäufigkeit von ca. 33% gehören die **NPM1**-Mutationen ebenfalls zu den häufigen Mutationen der AML. Nach aktuellem Wissensstand sind die Nucleophosmin-Proteine (NPM1) an zahlreichen Pathways beteiligt und steuern dadurch unterschiedliche zelluläre Funktionen wie z.B. mRNA-Transport, Chromatin Remodeling und Apoptose. Prognostisch scheint die NPM1-Mutation, in Kombination mit einem normalen Karyotyp, einen günstigen Einfluss auf das Erreichen einer kompletten Remission und das progressionsfreie Überleben zu haben.^{2 25} Außerdem erweist sich die NPM1-Mutation relevant für das MRD-Monitoring.²⁶ Aufgrund der vielfältigen Funktionen nimmt die NPM1-Mutation in dieser funktionellen Gliederung eine Sonderstellung ein.^{2 11 12 14 18 19}

I. 1.3. Klassifikation

Die Einteilung der AML in ihre Subtypen erfolgt gegenwärtig nach der traditionellen French-American-British-Klassifikation (FAB-Klassifikation) und der Klassifikation durch die Weltgesundheitsorganisation (WHO).^{2 7 10 18} Die FAB - Klassifikation beruht auf einer morphologischen Differenzierung und zytochemischen Aspekten der leukämischen Zellen. Gemäß der FAB-Klassifikation wird die AML unterteilt in die Subtypen M0 bis M7.^{2 13} Ein besseres Verständnis der zytogenetischen und molekulargenetischen Veränderungen führte zu der WHO-Klassifikation. In der aktuell revidierten der WHO-Klassifikation von 2008 werden sieben Subgruppen unterschieden (s. Tabelle 1 und 2).^{13 27 28 29 18}

Weitere Untersuchungen der zytogenetischen und molekularen Veränderungen hinsichtlich ihrer prognostischen Relevanz für den Verlauf einer AML-Erkrankung, führten 2010 zu der Einteilung in unterschiedliche Risiko-Gruppen. Die von der ELN (European Leukemia Net) vorgenommene Einteilung des Risikos der Erkrankung in „günstig“, „intermediär“ und „ungünstig“ (s. Tabelle 3), basiert auf zytogenetischen und genetischen Merkmalen. Diese Einteilung liegt den aktuellen europäischen Behandlungs-Richtlinien zugrunde.^{13 18}

Das Medical Research Council (MRC) veröffentlichte 2010 eine revidierte zytogenetische Klassifikation der AML (s. Tabelle 4). Als prognostisch günstig gelten balancierte Chromosomenaberrationen (s. Kapitel I 1.2. Ätiologie und Pathogenese). Ein komplex veränderter Karyotyp, aber auch einzelne numerische- und unbalancierte strukturelle Chromosomenaberrationen werden hingegen als prognostisch ungünstig gewertet (s. Kapitel I 1.2. Ätiologie und Pathogenese). Werden keine chromosomalen Veränderungen in den AML-Zellen (AML mit normalem Karyotyp) nachgewiesen, besteht ein intermediäres Risiko.^{25 30}

Tabelle 1. WHO-Klassifikation 2008 (Döhner H, et al. 2010. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults)

AML mit häufigen genetischen Veränderungen

AML mit t(8;21)(p22;q22);RUNX1-RUNX1T1
 AML mit inv(16)(p13.1;q22);or t(16;16) p13.1;q22);CBFB-MYH11 APL mit t(15;17)(p22.1;q12); PML-RARA
 AML mit t(9;11)(p22;q23)MLL3-MLL
 AML mit t(9;6)(p23;q34);DEK-NUP214
 AML mit inv(3)(p21.;q26.2)or t(3;3) (p21;q26.2);RPN1-EVI1
 AML (megakaryoblastisch) mit t(1.;22) (p13;q13);RBM15-MKL1
 AML mit NPM1-Mutation
 AML mit CEBPA-Mutation

Myelodysplasie assoziierte AML

Therapie assoziierte myeloische Neoplasie

AML ohne anderweitige Klassifikation (NOS)

AML mit minimaler Differenzierung
 AML ohne Ausreifung
 Akute myelomonozytäre Leukämie
 Akute Erythromyzytenleukämie
 Akute Megakaryoblastenleukämie
 Akute Basophilenleukämie
 Akute Panmyelose mit Myelofibrose

Myelosarkome (Chlorome)

Myeloische Leukämie bei Down Syndrom

Akute Leukämie mit nicht eindeutiger Linienzugehörigkeit

Akute undifferenzierte Leukämie
 Gemischter Phenotyp akute Leukämie mit t(9;22)(p34;q11.2);BCR-ABL1 gemischter Phenotyp
 Akute Leukämie mit t(v;11q23);MLL rearrangiert
 Gemischter Phenotyp akute Leukämie mit B myeloid, NOS
 Gemischter Phenotyp akute Leukämie mit T/myeloisch, NOS
 (NK)-Zell lymphoblastische Leukämie/lymphom

Tabelle 3. ELN-Klassifikation (Döhner H, et al., 2010, Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults)

Günstige genetische Veränderungen

t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1;
 inv(16)(p13.1;q22)
 oder t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11
 NPM1 Mutation ohne FLT3-ITD (normaler Karyotyp)
 CEBPA Mutation (normaler Karyotyp)

Intermediäre genetische Veränderungen

NPM1 und FLT3-ITD Mutation (normaler Karyotyp)
 Wildtyp NPM1 und FLT3-ITD Mutation (normaler Karyotyp))
 Wildtyp NPM1 ohne FLT3-ITD Mutation (normaler Karyotyp)
 t(9;11)(p22;q23); MLL3-MLL

Zytogenetische Veränderungen nicht klassifiziert als günstig oder ungünstig

Ungünstige genetische Veränderungen

inv(3)(q21q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1
 t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214
 t(v;11)(v;q23); MLL rearrangiert

Tabelle 2. FAB Klassifikation

M0

Akute myeloische Leukämie mit minimaler Differenzierung: unreife Blasten ohne Granulation. POX <3%, EST negativ

M1

Akute myeloische Leukämie ohne Ausreifung: weniger als 10 % reife Zellen (= Promyelozyten, Granulozyten, Monozyten), nur spärliche Granulation. POX > 3 %, EST <20 %

M2

Akute myeloische Leukämie mit Ausreifung: ≥10 % reife Zellen in der Myelopoese, weniger als 20 % Monozyten. POX > 3 % (meist deutlich positiv), EST meist schwach positiv.

M2 baso

Akute Basophilen-Leukämie

M3

Akute Promyelozyten-Leukämie: 30 % Promyelozyten (Blastenanteil of weniger) POX > 3 % (meist stark positiv), EST schwach bis mäßig positiv

M3v

Akute Promyelozyten-Leukämie, mikrogranuläre Form.

M4

Akute myelomonozytäre Leukämie: Myeloische Zellen (Blasten + Promyelozyten) > 20 %, monozytäre Zellen (Monoblasten und reife Formen) 20 % bis 80 %. POX > 3 %, EST >20 %

M4eo

Akute myelomonozytäre Leukämie mit Eosinophilie

M5a

Akute Monoblasten-Leukämie: mehr als 80 % der myeloischen Zellen sind Monoblasten bzw. Monozyten, davon sind mehr als 80 % Monoblasten oder Promonozyten. POX meist negativ bis leicht positiv, EST > 20 % (kräftig positiv)

M5b

Akute Monozyten-Leukämie: mehr als 80 % der myeloischen Zellen sind Monoblasten bzw. Monozyten, davon sind mehr als 20 % Monozyten. POX meist negativ bis leicht positiv, EST > 20 % (kräftig positiv)

M6

Akute Erythroleukämie: > 50 % aller Zellen sind Erythroblasten oder >30 % aller Blasten unter den nicht-erythrozytären Zellen sind Erythroblasten, häufig trilineäre Dysplasie. POX > 3 %, EST kann positiv sein

M7

Akute Megakaryoblasten-Leukämie: Hochgradig pleomorphe Blasten. POX < 3 %, EST kann positiv sein

Tabelle 4. MRC-Klassifikation (Döhner H, et al., 2010, Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults)

Günstiger Karyotyp

t(15;17)(q22;q12)
 t(8;21)(q22;q22)
 inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)
 (unabhängig von weiteren zytogenetischen Veränderungen)

Intermediärer Karyotyp

Alle Karyotypen, welche weder eine günstige noch eine ungünstige prognostische Bedeutung haben

Ungünstiger Karyotyp

Anomalien des Chromosoms 3q
 inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26)
 Anomalien der Chromosomen 5 oder 5q
 Anomalien der Chromosomen 7 oder 7q
 t(6;11)(q27;q23)
 t(10;11)(p11~13;q23)
 t(11q23) (ausgeschlossen: t(9;11)(p21~22;q23) und t(11;19)(q23;p13))
 t(9;22)(q34;q11)
 -17/Anomalien des kurzen Armes von Chromosom 17 (17p)
 Komplexe Veränderungen (≥ 4 klonale Anomalien)

I. 1.4. Diagnostik

Diagnostisch ist oft schon ein einfaches Blutbild wegweisend. Im Differentialblutbild kommt es zu charakteristischen Veränderungen. Die zytologische Analyse erfolgt mittels mikroskopischer Begutachtung von Ausstrichen des Knochenmark- und des peripheren Blutes. Untersucht werden das Vorkommen von myeloischen Blasten, der Zellgehalt, dysplastische Veränderungen und die Ausprägung der Resthämatopoese.³¹ Definitionsgemäß muss der Anteil von leukämischen Blasten >20% sein (WHO-Klassifikation).¹⁸ Kommt es zu einer *punctio sicca* oder es besteht der Verdacht auf ein myelodysplastisches Syndrom, sollte eine Knochenmark-Stanze erfolgen.^{13 31} Durch zytochemische Färbungen kann die Zugehörigkeit bestimmter AML-Zellen zur myeloischen Zellreihe aufgrund eines spezifischen Anfärbeverhaltens charakterisiert werden. Durch die Färbung der Myeloperoxidase (MPO) kann Granula in differenzierten myeloischen Zellen dargestellt werden. Mittels des Färbeverhaltens der unspezifischen Esterase können monozytäre Zellen detektiert werden. Aufgrund der Morphologie und Zytochemie der leukämischen Zellen kann oft bereits zwischen der Diagnose einer AML und ALL unterschieden werden.

Die immunphänotypische Charakterisierung erfolgt durch Fluoreszenzmarkierung von Zelloberflächenantigenen und intrazytoplasmatischen Antigenstrukturen. Mit dieser Diagnostik können Zellen unterschieden werden. Anhand des Antigenexpressionsmusters wird die Zuordnung der unterschiedlichen Zelllinien (myeloisch/lymphatisch, B/T-Zell, Differenzierungsstadium, leukämisch/gesunde hämatopoetische Zelle) vorgenommen.³³ Ein positiver Nachweis eines Antigens gilt ab einer Expression von >20% auf den AML-Zellen.¹³ Für einige AML-Subtypen ist die Immunphänotypisierung entscheidend. Die FAB M0 kann z.B. durch die myeloischen Antigene CD13 und oder CD117 diagnostiziert werden. Dabei ist die M0 morphologisch eine undifferenzierte AML, ohne zytochemische Veränderungen. Auch für die akute megakaryoblastäre Leukämie (FAB M7) und die akute Leukämie unklarer Linienzugehörigkeit (WHO) ist die Immunphänotypisierung diagnostisch entscheidend.^{10 20} Einige genetische Veränderungen sind mit immunphänotypischen Eigenschaften assoziiert. AML-Zellen mit einer NPM1-Mutationen exprimieren den Oberflächenmarker CD33 besonders hoch.¹⁰ Neben der Verwendung für die Erstdiagnostik, kann die Immunphänotypisierung zur Erkennung prognostisch und therapeutisch relevanter Target-Antigene dienen. Auch in der Verlaufsbeurteilung der minimalen Resterkrankung wird die Immunphänotypisierung eingesetzt.^{6 13 22}

Die zytogenetische Analyse erfolgt durch eine Chromosomenanalyse. Die Chromosomen werden lichtmikroskopisch beurteilt und oder es kann eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) durchgeführt werden. Um Veränderungen auf den Chromosomen leukämischer Zellen

(z. B. Translokationen und Inversionen) sicher zu detektieren, müssen ca. 20 - 25 vitale Zellen in der Metaphase analysiert werden.²³ Zu zytogenetischen Aberrationen siehe Kapitel I 1.2. Ätiologie und Pathogenese - Zytogenetik.

Die Diagnostik der molekulargenetischen Veränderungen erfolgt mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und nachgeschalteten Screening-Verfahren. Zu molekulargenetischen Veränderungen siehe Kapitel I 1.2. Ätiologie und Pathogenese - Molekulargenetik.

I. 1.4. Therapie und Prognose

Unbehandelt führt die AML innerhalb von wenigen Monaten zum Tod. Die Therapiewahl basiert zum einen auf der Klassifikation der vorliegenden AML (FAB, WHO, ELN und MRC) und der im weiteren Verlauf der Erkrankung bestimmten Minimalen Resterkrankung (MRD Diagnostik) sowie dem Alter und dem Allgemeinzustand des Patienten. Aktueller therapeutischer Standard sind intensive Poly-Chemotherapien. Man unterscheidet eine Induktions- von einer Konsolidierungs- und Erhaltungsphase. Ausgenommen von diese Therapieregimen sind Patienten, die nicht in kurativer Absicht therapiert werden können und Patienten mit einer Promyelozytenleukämie.

Kuratives Ziel der Induktion ist das Erreichen einer kompletten Remission (CR) der AML. Das Standard-Regime „7+3“ besteht aus einer 7-tägigen Cytarabin- und einer 3-tägigen Anthrazyklin-Gabe (z.B. Daunorubicin, Idarubicin oder Mitoxantron).¹³ Die CR ist zytomorphologisch definiert als <5% AML-Zellen im Knochenmark, <1% AML-Zellen im peripheren Blut, bei gleichzeitig ausreichend regenerierter Hämatopoese (Neutrophile $\geq 1 \times 10^9$ /L, Thrombozyten $\geq 1 \times 10^{11}$ /L).^{2 13} In Abhängigkeit von der prognostischen Gruppe (ELN) erreichen etwa 60-80% der Patienten eine CR.^{1 2} Insgesamt liefen/laufen Studien zur Verbesserung der Induktionstherapie. Die Daten der AMLCG-Studiengruppe zeigten für die Doppelinduktion (auch unter HAM als 2. Induktion, mit Hochdosis-Cytarabin) für Patienten mit Hochrisiko-AML ein verbessertes Gesamtüberleben.²

Ziel der Konsolidierungstherapie ist die Eliminierung residueller leukämischer Zellen, um die prinzipiell hohe Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs zu vermindern. Im Unterschied zur Induktion, beruht die Wahl der Postremissionstherapie auf Faktoren wie dem Rezidivrisiko, der therapieassoziierten Mortalität, sowie vorhandener Targetstrukturen. Für Patienten mit einem günstigen genetischen Risikoprofil besteht die Postremissionstherapie aus weiteren Zyklen Hochdosis - Cytarabin und einer sich daran anschließenden Erhaltungsstherapie. Bei Patienten mit einem ungünstigen oder intermediären genetischen Risiko wird die Möglichkeit einer allogenen bzw. autologen Stammzelltransplantation (SZT) geprüft.^{2 13 18 35 38} Die allogene Stammzelltransplantation (ASZT) ist bislang die effektivste Therapie, um das Rezidivrisiko zu senken. Verlaufsanalysen zeigten für AML-Patienten mit einem high risk im Vergleich

Chemotherapiekonsolidierung versus allogene Transplantkonsolidierung für weitere ein verbessertes Gesamtüberleben (GÜ, *Overall Survival OS*). Die transplantierten Patienten haben jedoch eine höhere therapieassoziierte Mortalität im Vergleich zu Patienten mit einer Chemotherapiekonsolidierung.^{2 35 36 18 38}

Das Overall-Survival für Patienten über 60 Jahren liegt bei 5-15%, für Patienten unter 60 Jahren bei 35-40%. Der Grund für die insgesamt schlechte Prognose ist, dass die meisten Patienten innerhalb der ersten 3 Jahre an einem Rezidiv erkranken.^{9 36 37} Besonders ungünstig ist ein frühes Rezidiv, das innerhalb der ersten 6 Monate auftritt. (s. Döhner et al., 2010). Für die Prognose einer AML sind sowohl AML-bezogene und Patienten-bezogene Risikofaktoren relevant. Zu den Patienten-bezogenen Risikofaktoren gehören das Alter, die Komorbidität und der Allgemeinzustand.^{18 36 13 37} Zu den AML - bezogenen Risikofaktoren gehören die Leukozyten-Werte, AML - Entwicklung aus einem MDS, zytogenetische Veränderungen (s. Kapitel I. 1. 3. Einteilung und Diagnostik) und molekulargenetische Veränderungen (s. Kapitel I 1.2. Ätiologie und Pathogenese). Den stärksten Einfluss auf die Prognose scheinen das Alter und molekulare bzw. zytogenetische Veränderungen zu haben.¹³

I. 1.5. Immuntherapie in der AML

Zu den neueren Therapiestrategien, um die Prognose der AML zu verbessern, gehören die immuntherapeutischen Ansätze. Diese beruhen auf der zunehmenden Erkenntnis der Interaktionen zwischen AML-Zellen und Immunzellen (z.B. den zytotoxischen T-Zellen). Ziel der immuntherapeutischen Strategien ist es, die antileukämische Immunität zu stärken. Die effektivste Immuntherapie für die AML stellt bis heute die ASZT dar. Nach einer Hochdosis Chemotherapie ggf. mit Bestrahlung (Konsolidierung) erhalten Patienten ein neues Immunsystem. Die transplantierten Immunzellen sollen sich gegen (residuelle) leukämische Zellen richten (Spender gegen Wirt Reaktion).^{38 39} Aufgrund der hohen Mortalität und Morbidität, sowie der Abhängigkeit von der Verfügbarkeit eines Spenders, besteht ein großer Bedarf an weiteren immuntherapeutischen Strategien für die Behandlung der AML.^{38 39} Da für die AML unterschiedliche Immune-Escape Mechanismen bekannt sind, die zu einer defekten Immunüberwachung (Immune surveillance) führen, werden immuntherapeutisch unterschiedliche Pathways genutzt bzw. untersucht. Man unterscheidet bei den immuntherapeutischen Ansätzen zwischen Strategien der aktiven Immunisierung (Vakzinierungen von Peptiden-, DZs, adoptiver T Zell-Transfer) und Strategien der passiven Immunisierung wie z.B. der Antigen-spezifischen Blockade verschiedener Immun-Kontrollpunkte um präexistierende Antigen-abhängige Immunregulationen zu verstärken.^{40 - 48}

I. 1.6. Bispezifischer CD33/CD3 - Antikörper

Antikörper-basierte immuntherapeutische Strategien in der AML fokussieren sich bislang auf die Targetstruktur CD33. Die Expressionsfrequenz liegt bei über 90% für die AML.^{49 50} Allerdings blieb der klinische Erfolg der CD33 abhängigen Antikörper-basierten Ansätze bislang begrenzt. Bekannte Beispiele dafür sind Gemtuzumab Ozogamicin (Myelotarg®), ein anti - CD33 Antikörper – Calicheamicin Konjugat und Lintuzumab (SGN-33) ein monoklonaler Antikörper.⁵¹ Bispezifische Antikörper auch als BiTE-Konstrukte (Bi-specific T-cell engager) bezeichnet, bieten eine wirksamere Möglichkeit antileukämische T-Zellen zu nutzen. Die Rekrutierung der Antigen-positiven T-Zelle erfolgt unabhängig von TZR MCH I/II Interaktionen und benötigt keine Tumor-spezifischen Peptid-Antigene.⁵¹

BiTE-Konstrukte sind aus zwei unterschiedlichen scFv - Fragmenten monoklonaler Antikörper aufgebaut. Jedes scFv-Fragment besteht dabei aus einer variablen Domäne einer V_L -und einer V_H-Kette. Die Domänen sind über eine Peptidsequenz (Linker) miteinander verbunden. Ein Paratop der BiTE-Konstrukte richtet sich gegen ein Tumor-(assoziertes-) Antigen das zweite scFv-Fragment gegen ein Antigen auf T-Zellen. Durch die Bindung kommt es zu einer Aktivierung und Expansion der Antigen-positiven T-Zelle.⁵³ Durch die Bindung von Target- und Effektor-Zelle entsteht eine lytische Synapse: durch die Freisetzung von Perforin, Granzymem und Caspasen wird die Target-Zelle lysiert.^{51 52}

Blinatumomab ist der bislang erfolgreichste BiTE. Das Konstrukt richtet sich gegen CD3 und CD19 und wurde im November 2015 in der EU zur Behandlung der bcr-abl negativen B-ALL zugelassen. Besonders effektiv zeigte sich Blinatumomab für Patienten mit einem MRD positiven Rezidiv und wenigen leukämischen Blasten.^{61 62 63}

Für die Therapie der AML wurde, analog zu Blinatumomab ein CD33/CD3 BiTE® Antikörper (AMG 330) entwickelt. Dieser richtet sich gegen CD33 auf leukämischen Blasten und gegen CD3 auf zytotoxischen T-Zellen. In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zu dem CD33/CD3 BiTE® durchgeführt, deshalb soll im Folgenden speziell auf diesen BiTE eingegangen werden.

In vitro konnte eine CD33/CD3 BiTE® - vermittelte Lyse von CD33+ AML Zelllinien (z.B. KGa, U937, HL-60) gezeigt werden. In Abwesenheit von T-Zellen wurde kein Effekt durch CD33/CD3 BiTE® auf AML-Zellen beobachtet.⁵⁴ Die maximale Lyse wurde bei CD33/CD3 BiTE® Konzentrationen von 1 ng/ml gefunden. Die CD33/CD3 BiTE® vermittelte Lyse zeigte sich auch bei primären AML-Zellen und gesunden (allogenen) T-Zellen. Die Kokulturen wurden zwischen 48 und 72 h in einem E:T Ratio 1:1 mit dem CD33/CD3 BiTE® (c=1 ng/ml) oder einem Kontroll-Antikörper behandelt und mittels FACS-Analysen ausgewertet.^{50 55} Aigner et al. definierten die myeloischen Zellen durch eine Expression von CD45+CD3-CD13+. AML-Zellen wurden durch eine Expression von CD13+CD34+ oder CD13+CD117 charakterisiert.

Aigner et al. zeigten in ihren Versuchen auch eine CD33/CD3 BiTE® - abhängige Expression von T-Zell Aktivierungsmarkern wie CD25, CD54, CD69, und CD71 auf CD8+ und CD4+ T-Zellen, eine CD33/CD3 BiTE® -abhängige Sekretion von IL-1B, IL-2, IFN γ und TNF und eine CD33/CD3 BiTE-abhängige T-Zellproliferation (CFSE-markierte T-Zellen). Dabei wurde ein unterschiedlicher Einfluss innerhalb der einzelnen T-Zellpopulationen gefunden: eine besonders starke Proliferation zeigten Effektor Gedächtnis-T-Zellen (CD45RO-CCR7-CD45RA+).^{54 55} Krupka et al. (2014) konnten in autologen Langzeitkulturen die Proliferation der T-Zellen und die CD33/CD3 BiTE®-vermittelte Lyse von primären AML-Zellen zeigen.⁵⁰
⁵⁴ Auch bei einem immundefizienten Mausmodell welches mit der AML-Zelllinie HL60 und humanen allogenen T-Zellen (CD33/CD3 BiTE® 0.5mg/kg/d i.v.) injiziert worden war, konnte die CD3/CD3 BiTE® - vermittelte Lyse der AML-Zellen durch die T-Zellen festgestellt werden.⁵¹

I. 1.6.1. Einflussfaktoren der CD33/CD3 BiTE® - vermittelten Zytotoxizität

In den präklinischen Untersuchungen zeigte sich die antileukämische Wirkung des CD33/CD3 BiTE®s abhängig von der E:T Ratio, der Target-Expression von CD33, der eingesetzten CD33/CD3 BiTE® Konzentration und der Expression koregulatorische Rezeptoren.^{54 56} Bei hohen E:T Ratios (z.B. 1:80) wurde eine verminderte CD33/CD3 BiTE® vermittelte Blasten-Lyse, im Vergleich zu Proben mit einem niedrigen E:T Ratio (z.B. 1:1), gemessen. Krupka et al. (2014) etablierten ein Langzeitkultursystem, um primäre AML-Zellen über einen längeren Expositionszeitraum beobachten zu können. In diesen AML - Langzeitkulturen zeigte sich eine E:T Ratio abhängige Wirkkinetik. Krupka et al. (2014) konnten zwar eine CD33/CD3 BiTE® - vermittelte Lyse beobachten. Bei einer hohen E:T Ratio kam es jedoch zu einer verzögerten Lyse. Der Einfluss der Target-Expression auf die BiTE-vermittelte Lyse zeigte sich sowohl für AML-Zelllinien als auch in primären AML-Proben. Die Wirkkinetik zeigte sich bei Krupka et al. (2014) auch abhängig von der Höhe der Target-Expression. Es konnte festgestellt werden, dass AML-Zellen mit hoher CD33-Expression (CD33^{bright}) innerhalb eines kürzeren Zeitraums CD33/CD3 BiTE®-vermittelt lysiert wurden im Vergleich zu CD33^{dim} AML-Zellen.^{51 50} Laszlo et al. (2013) zeigten, dass die auch die differentielle Expression koregulatorischer Immun-Kontrollpunkte wie z.B. PD1 die antileukämische Aktivität des CD33/CD3 BiTE®s beeinflussen.⁵⁷ Die CD33/CD3 BiTE® -vermittelte Lyse zeigte sich in den präklinischen Untersuchungen unabhängig von der Aktivität des ABC-Transporters (Walter et al. 2012) und einzelnen Nukleotid-Polymorphismen des CD33-Gens.^{64 51}

I. 1.6.2. Ansätze für eine gesteigerte CD33/CD3 BiTE® - vermittelte Zytotoxizität

Um die Target - Expression zu erhöhen, wurde der Einfluss von epigenetisch wirksamen Medikamenten (z.B. Azacytidin, Panobinostat) auf die Expression von CD33 auf AML-AML-Zellen untersucht. Laszlo et al. (2013) zeigten eine CD33/CD3 BiTE® -abhängige verstärkte CD33- Expression für einige AML-Zelllinien (KG-1a und OCI-AML3).⁵⁸ Präklinisch konnte der

Einfluss koregulatorischer Rezeptoren auf die Wirksamkeit des CD33/CD3 BiTE® festgestellt werden, so dass aktuell die zusätzliche Checkpoint-Blockade in Kombination mit dem CD33/CD3 BiTE® untersucht wird. Erfolgreiche Kombinationsstrategien sind die zusätzliche Blockade der TIGIT/PVR/PVRL2 Achse oder der PD1/PD-L1/PD-L2 Achse bei AML-Zelllinien und primären AML-Zellen.^{59 60}

Zusammenfassend und im Hinblick auf geplante klinische Studien ist aufgrund der Vordaten davon auszugehen, dass die Zytotoxizität des CD33/CD3 BiTE®s durch unterschiedliche Faktoren gesteigert werden kann. Durch eine verbesserte Wirksamkeit soll klinisch eine verkürzte Expositionsdauer erreicht werden. Für AML-Patienten mit einer hohen AML-Blastenlast, Lymphopenie und einer geringen Target-Expression von CD33 ist dies wichtig, da die Expositionsdauer des CD33/CD3 BiTE®s mit der Toxizität korreliert.⁵⁸ Für Blinatumomab zeigten sich lebensbedrohliche *Adverse Events (AE)* wie das Tumorlysesyndrom (bei Patienten mit einer hohen Tumorlast). Die Zytokin-Freisetzung, die zu unterschiedlichen Schweregraden des Cytokine-Release-Syndroms führt, korrelierte mit der T-Zellproliferation und erhöhten Serum Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine wie IL6 und IFN γ .^{54 55 56}

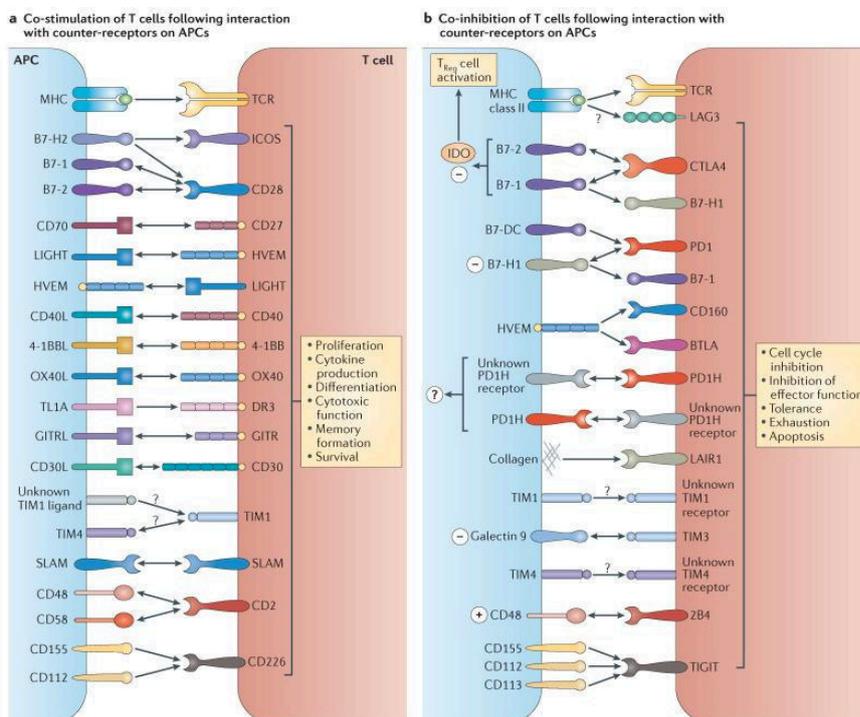


Abb. 1 Koregulatorische Interaktionen zwischen T-Zellen und Antigenpräsentierenden Zellen (APC). Chen L, 2013
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3786574/figure/F1/> (Stand 06. 06. 2016)

I. 1.7. Immun-Kontrollpunkte der AML

T-Zellen können über ihren T-Zell-Rezeptor (TZR) Antigene erkennen, die ihnen von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) auf MHC II Molekülen präsentiert werden. Das durch die

Bindung entstehende Signal bzw. die T-Zellaktivierung wird durch Immun-Kontrollpunkte (immune checkpoints) koreguliert. Immun-Kontrollpunkte bestehen aus Interaktionen zwischen Ligand- und Rezeptor - Molekülen auf APZs und T-Zellen. Die Immun-Kontrollpunkte haben einen Einfluss auf die Aktivierung, Differenzierung und Effektorfunktion von T-Zellen⁶⁵ In den letzten Jahren wurde die Bedeutung dieser koinhibitorischen Interaktionen in der immunologischen Kontrolle von Tumoren - beziehungsweise in der Resistenz von Tumoren - gegenüber dem Immunsystem (immune escape) erkannt und therapeutisch versucht, die antitumorale Immunität durch die Blockade verschiedener Immun-Kontrollpunkte (checkpoint blockade) zu verbessern.

Auf AML-Zellen wurde die Expression von CD86, CD40, CD274 (= PD-L1), CD275 (= B7-H2) und CD200 beschrieben. Überlebensanalysen zeigten für die Expression von CD86 und CD275 einen Einfluss auf die Prognose der Patienten. Die Expression der Checkpoint Moleküle CD86, CD274, CD276 (= B7-H3) und HVEM zeigte eine Korrelation mit spezifischen zytogenetischen und molekularen Charakteristika der AML. Die Expression der zugehörigen Interaktionspartner auf T-Zellen (z.B. PD-1, CD244 = 2B4, und Tim-3,) wurde bei AML-Erstdiagnosen ebenfalls gemessen. Es konnte eine differentielle Expression für PD1 und Tim3 im Verlauf der AML-Erkrankung, insbesondere bei Rezidiven nach allogener Stammzelltransplantation, gefunden werden. AML-Zellen zum Zeitpunkt des Rezidivs exprimieren zudem LAG3. Die verstärkte Expression koinhibitorischer Immun-Kontrollpunkte existiert nicht nur bei malignen Erkrankungen, sondern wurde zunächst in Verbindung mit funktionellen Defiziten bei chronischen viralen Infektionen beschrieben und geht einher mit einer s.g. T-Zellerschöpfung (t cell exhaustion).^{66 - 73}

Die in dieser Arbeit untersuchten **Immun-Kontrollpunkte** werden im Folgenden genauer beschrieben.

Das **CD33** (Siglec-3)-Antigen gehört zu den Sialinsäure bindenden Rezeptoren. CD33 besteht aus zwei extrazellulären Domänen (IgV und IgC2). Intrazellulär findet sich eine Aminosequenz (immunoreceptor tyrosine based inhibitory motif (ITIM)). Liganden von CD33 sind Sialinsäuren. Über eine intrazelluläre Tyrosin-Phosphorylierung kommt es zu einer Aktivierung der SHP-1- und SHP-2-Phosphatasen über welche weitere Signalkaskaden ausgelöst werden. Für die CD33 Siglec-Mitglieder wurden inhibitorische Funktionen bei der Regulation von inflammatorischen Prozessen und Immunantworten beschrieben.^{39 40 41} Der transmembranäre Rezeptor wird hauptsächlich auf myeloischen Zellreihen exprimiert. In über 99% von 621 AML Erstdiagnosen beschrieben Krupka et al. (2014) eine positive Expression des membranständigen Glykoproteins CD33 auf AML-Zellen. Auch zum Zeitpunkt des AML-

Rezidivs wurde die CD33-Expression nachgewiesen. Auch für Patienten mit einer ursprünglich CD33 negativen AML konnte beobachtet werden, dass leukämische Zellen im Rezidiv CD33 exprimieren. CD33 wird ebenfalls auf leukämischen Stammzellen exprimiert. Die Expressionshöhe liegt deutlich über von gesunden hämatopoetischen Stammzellen ($p=0,047$).^{50 74}

Das **ILT3** (CD85k)-Antigen ist ein Oberflächenprotein und gehört zu den immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs (ITIM). Der ILT3-Rezeptor besitzt eine zytoplasmatische Aminosequenz, welche nach Aktivierung (Bindung durch ILT3-Liganden) phosphoryliert wird. Die weitere Signaltransduktion erfolgt ebenfalls über die Tyrosin-Phosphatasen SHP-1 und SHP-2. Für den ILT3-Rezeptor wurden sowohl eine koinhibitorische Funktion als auch eine Funktion bei der Antigen-Aufnahme der APCs beschrieben. Der ILT3-Rezeptor wird auf APZs (Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen) exprimiert. Die ILT3-Expression wurde jedoch auch auf unreifen myeloischen Zellen (AML M4/M5) als auch auf lymphatischen Zellen (CLL und t-ALL) beschrieben. Eine chronische Antigen-Stimulation führte bei regulatorischen T-Zellen *in vitro* zu einer verstärkten Induktion von ILT3 auf APZs. Die verstärkte ILT3-Expression war assoziiert mit einer Differenzierung von T-Zellen zu anergen CD4+T-Zellen und CD8+T-Zellen (TRegs).⁷⁵⁻⁷⁹

Das **HVEM**-Antigen (herpes virus entry mediator), auch bekannt als TNFRSF14 (tumor necrosis factor receptor superfamily member 14), gehört zur den TNF-Rezeptoren. An den HVEM-Rezeptor binden Liganden wie LIGHT (Protein der TNF-Familie), Lymphotoxin-a, BTLA (B and T-lymphocyte attenuator) und CD160. Die Bindung von LIGHT und Lymphotoxin-a führt zu kostimulatorischen Signalen, während BTLA und CD160 koinhibitorisch wirken. Nach dem derzeitigen Kenntnisstand überwiegen die Wirkungen von BTLA und CD160. BTLA wird in unterschiedlichen Tumorentitäten verstärkt exprimiert. Der Rezeptor wird auf der Zelloberfläche von nicht-aktivierten B- und T-Lymphozyten auf APZs und auf Endothelzellen exprimiert. Die HVEM-Expression wurde auch auf leukämischen Lymphozyten gefunden.⁸⁰

Das **LAG3**-Antigen (Lymphocyte-activation protein 3) wird auch als CD223 bezeichnet und gehört zu der Immunglobulin (Ig) Superfamilie. Der Immune-Checkpoint-Rezeptor besteht aus 4 extrazellulären Ig Domänen und einem Transmembranprotein. Der Ligand von LAG3 ist das MHC-II-Protein. Die Expression wurde auf CD4+ und (exhausted) CD8 +T-Lymphozyten gefunden. Ursprünglich wurde der Rezeptor hauptsächlich für regulatorischen T-Zellen beschrieben. Die Expression wurde jedoch auch auf hämatopoetischen (myeloischen) Zellen gefunden. Für CD4+T-Zellen scheint die zusätzliche LAG3-Expression einen antiproliferativen Effekt zu haben. Eine besonders starke LAG3-Expression zeigten *in vitro* die CD4+TRegs.

Dies konnte auch in Versuchen mit LAG3 (-/-) Mäusen gezeigt werden. Ähnlich wie bei HVEM ist von unterschiedlichen Funktionen des LAG3-Proteins auszugehen. Überwiegend scheint jedoch der inhibitorische Einfluss auf die MHC-II-vermittelte T-Zell-Antwort zu sein.⁸¹⁻⁸⁷

Das **CD244**-Antigen (2B4, NAIL=NK cell activation inducing ligand) gehört zu den Immunglobulinen der SLAM-Familie. Nach aktuellem Kenntnisstand interagiert CD244 mit dem Immunglobulin **CD48** (B-lymphocyte activation marker, BLAST-1). Das Oberflächenprotein gehört ebenfalls zu der SLAM-Familie und ist über einen Glykosylphosphatidyl-Inositol-Anker mit der Zellmembran verbunden. Die Interaktion zwischen CD48 und seinem „high-affinity“-Rezeptoren CD244 sind komplex. Es wurden bisher sowohl stimulatorische wie inhibitorische Funktionen beschrieben. Die CD244/CD48-Achse reguliert die Aktivität von NK-Zellen und CTLs, insbesondere die Regulation und Differenzierung von Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen. CD244 wird auf NK-Zellen, T-Zellen, Eosinophilen, Mastzellen und DCs exprimiert. Die CD48-Expression wurde zuerst auf lymphozytären Zellen beschrieben. CD48 scheint jedoch auf allen Leukozyten exprimiert werden zu können. Seine Expression wurde auch auf hämatopoetischen Stammzellen festgestellt. *In vitro* wurde gezeigt, dass in Tumorzellen die CD48-Expression mit einer stärkeren NK-Zell-Aktivität assoziiert ist. Für die CD244-Expression wurde - unabhängig von der Expression von CD48 – inhibitorische Einflüsse auf proinflammatorische Immunreaktionen gefunden. Bei CD244-/- Mäusen wurde *ex vivo* eine stärkere Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine durch zytotoxische T-Zellen festgestellt.^{88 - 93}

II. Aufgabenstellung

Die Arbeit gliedert sich in folgende zwei Teilprojekte:

Der Einfluss des E:T Ratios und der Target-Expression auf die CD33/CD3 BiTE® s medierte Zytotoxizität wurde bereits gezeigt. Wir nahmen an, dass eine vorgeschaltete zytoreduktive Phase vor der CD33 BiTE Therapie für AML-Patienten (vor allem mit Leukozyten >30 000/ μ l) bei gleicher Wirksamkeit und kürzerer CD33/CD3 BiTE® Exposition die Inzidenz und Schwere Zytokin-vermittelter Toxizität reduzieren kann. Die Zytoreduktion sollte jedoch die T-Zellfunktion- oder die Target-Antigen-Expression nicht beeinträchtigen. Daraus ergeben sich folgende Fragen:

1. Beeinträchtigt eine Vorphase mit Cytarabin oder Hydroxyurea die CD33 BiTE medierte Zytotoxizität und Proliferation von CD3+T-Zellen?
2. Haben Cytarabin oder Hydroxyurea Einfluss auf die CD33-Expression auf AML-Zellen?

Basierend auf den Vorkenntnissen der Arbeitsgruppe von Frau Professor Subklewe wurden in dieser Arbeit die Immun-Kontrollpunkte ILT3, CD244, CD48, HVEM und LAG3 auf AML-Zellen charakterisiert:

1. Finden sich Differenzen im Expressionsprofil oben genannter Immun-Kontrollpunkte auf AML-Zellen bei Erstdiagnose und Rezidiv?
2. Korreliert die Expression der Immun-Kontrollpunkte mit genetischen Charakteristika der Erkrankung (Molekulargenetik, Zytogenetik)?
3. Haben die Immun-Kontrollpunkte prognostische Relevanz für die AML?
4. Kann durch TNFa und IFNy-Stimulation die Expression von LAG3, ILT3 und HVEM auf AML Zellen verändert werden?
5. Verbessert die zusätzliche Blockade von ILT3 und HVEM die Wirksamkeit des CD33/CD3 BiTE® Antikörpers?

III. Material und Methoden

III. 1. Material

III. 1.1. Zellkultur

III. 1.1.1. Verwendete Zelllinien

Zell-Linie	Ursprung	Hersteller	Zytogenetik	Molekulargenetik	Positive Immun-fluoreszenz
HL-60	DSMZ ACC 3	AML FAB M2 PB; 35 Jahre; W	Humaner hyperdiploider Karyotyp XX, -X, -X, -8, -8, -16, -17, -17, +18, +22, +2 mar, ins(1;8) (p?31;q24hrs) x2, der (5) t(5;17) (q11;q11)x2, add (6)(q27)x2, der(9) del(9)(p13)t(9;14) (q?22;q?22) x2, der(14)t(9;14) (q?22;q?22)x2, der(16)t(16;17) (q22;q22)x1-2, add(18)(q21)	MYC Gen; c-myc Amplicons	CD4 + CD13 + CD15 + CD33 +
KG1-alpha	DMSZATCC CCL-246.1	AML (promyelo-Blasten, Makrophagen) BM;59 Jahre; M	Humaner hauptsächlich diploider Karyotyp, 5% polyploid - 46(44-47)<2n>X/XY, +8, +11, -12, -17, -20, der(5;17)(q10;q10)del(5)(q?11q?13), del(7) (q22q35), i(8q), der(8) t(8;12) (p11;q13) add(8) (q24), i(11q), add(16) (q13/21), der(19) t(14;19) (q11;q13), add(20) (p13)	Fusionsgen: FGFR1OP2-FGFR1 (OP2-FGFR1)	CD13 + CD15 + CD33 + CD34 +
MLOM-13	DSMZ ACC 554	AML FAB M5a (RAEB); PB; 20 Jahre; M	humaner hyperdiploider Karyotyp: mit 4% Polyploidie – 51 (48-52) <2n>XY, +8, +8, +8, +13, del (8) (p1?p2?), ins (11;9) (q23;p22p23)	FLT3 ITD; CBL delta Exon 8; MLL-MLLT3 (MLL-AF9) Fusionsprotein	CD4 + CD13 (+) CD15 + cyCD68 +
MV4-11	DSMZ ACC 12	AML FAB M5; PB;10 Jahre; M	Humaner Karyotyp: XY (46-48); +8, +18, +19, -21, t(4;11)(q21;q23)	FLT3 ITD (internal tandem duplication) t(4;11);Fusionsgen MLL -AFF1 (MLL-AF4) MLL-AF AFF1 (MLL-AF4)	CD4 + CD13 + CD15 + CD33 +
OCI-AML3		AML FAB M4; PB; 57 Jahre; M	humaner hyperdiploider Karyotyp; -48(45-50)<2n>X/XY, +1, +5, +8, der(1) t(1;18) (p11;q11), i(5p), del (13) (q13q21), dup (17) (q21q25) - sideline with r(Y)x1-2 - homozygot für RB1	NPM1; DNMT3A R882C;	CD4 + CD13 + CD15 + CD34 + cyCD68 +
PL-21	DSMZ ACC 536	AML (refraktäre APL) PB; 24 Jahre; M	Humaner hyperdiploider Karyotyp, -93(83-96)<4n>XXYY, +3, +5, +5, +6, +6, +7, -9, -10, -11, -12, +13, -14, -17, -21, +22, +22, + mar, del(1) (p11), i(5p) x2-3, der(6) t(6;15) (p25;q24), der(13) ins(13;13) (q32;q?q?) x3-4	FLT3 ITD; Monozyten-spezifische Esterase	CD4 + CD13 + CD15 + CD33 + CD34 +cyCD68 +

III. 1.1.2. Zellmedien

Zelllinien-Kulturmedium (R10)	RPMI 1640 (500ml) 1% Hepes 1% Pen/Strep/L-Glutamin 10%ml FBS (hitze-inaktiviert)
Blastenmedium MS5	Alpha Mem (500ml) 12,5% Horseserum (hitzeinaktiviert) 12,5% FBS(hitzeinaktiviert) 5,5% Penicillin/Strep/L-Glutamin 5%Hepes
Blastenmedium für Langzeitkultur	Blastenmedium sie MS5 Medium (%00ml) 20ng/ml IL3, 20ng/ml G-CSF 20ng/ml TPO,

	57,4µM β-Mercaptoethanol
Kryomedium für Kryokonservierung	20% DMSO
Zelllinien-Kulturmedium (R10)	RPMI 1640 (500ml) 1% Hepes 1% Pen/Strep/L-Glutamin 10%ml FBS (hitze-inaktiviert)

III. 1.1.3. Reagenzien für Zell-Medien, Dichtegradientenzentrifugation, Kryokonservierung

RPMI 1640 Medium	W: L-Glutamine W:2 g/l NaHCO ₃ PAN Biotech, Aidenbach/BRD
Alpha MEM Eagle	W: L-Glutamine W: Ribonucleosides W: Deoxyribonucleosides 2,2 g/l NaHCO ₃ Pan Biotech, Aidenbach/BRD
FKS/FBS	GIBCO, Life Technologies, Eggenstein/BRD
DPBS	W: Calcium W: Magnesium PAN Biotech, Aidenbach/BRD
BSA	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach/BRD
EDTA	0,5M GIBCO, Life Technologies, Eggenstein/BRD
Formaldehyd	37% Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe/BRD
Pen/Strep/l-Glutamin	Penicillin: 10 000U/ml Streptomycin: 10 000 µg/ml L-Glutamin: 29,2 mg/ml 1:1005,5ml(n:100)
Hepes	1 Molar GIBCO, Life Technologies, Eggenstein/BRD
Rekombinantes humanes IL3	0,1µg/µl PeproTech Germany, Hamburg/BRD
Rekombinantes humanes TPO	0,1µg/µl PeproTech Germany, Hamburg/BRD
G-CSF	0,1µg/µl PeproTech Germany, Hamburg/BRD
β-2 Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, München/BRD
Ficoll	1,077g/ml Biochrome AG, Berlin/BRD
DMSO	SERVA Electrophoresis GMBH, Heidelberg/BRD

III. 1.1.4. Zellzählung

Neubauerzählkammer	Invitrogen, Darmstadt, BRD
Trypanblau (0,4%ig, in Kochsalzlösung)	GIBCO Life Technologies, Eggenstein/ BRD

III. 1.1.5. Zellplatten

Zellkulturplatten, 12-Well-Platten, Rundboden	Becton Dickinson Labware, Heidelberg/ BRD
Zellkulturplatten, 24-Well-Platten, Rundboden	Becton Dickinson Labware, Heidelberg/ BRD
Zellkulturplatten, 48 Well-Platten Rundbogen	Becton Dickinson Labware, Heidelberg/ BRD

III. 1.2. Zytoreduktion der leukämischen Zellen

III. 1.2.1. Zytoreduktiva

Hydroxyurea	0,1g/2ml H ₂ O Sigma-Aldrich, St. Louis/USA
Cytosine- β -D-arabinofuranoside (Cytarabine)	0,1g/2ml H ₂ O Sigma-Aldrich, St. Louis/USA

III. 1.2.2. BiTE-Antikörper (Bi-specific t-cell engagers)

AMG 330	AMGEN Reserach Munich, München/BRD
Kontroll-Antikörper	AMGEN Reserach Munich, München/BRD

III. 1.2.3. Blockade-Antikörper

Purified anti-human CD270(HVEM)	500 μ g/ml Biolegend
Anti-Human CD85k (ILT3)	1mg/ml eBioscience, San Diego, CA/USA

III. 1.3. Stimulation von leukämischen Zellen

III. 3.1. Zytokine

Rekombinantes humanes INF- γ	0,2 mg/ml oder 1mg/ml Pepro Tech Germany, Hamburg/BRD
Rekombinantes humanes TNF-alpha	Aliquots á 50 μ l (c=10 μ g/ml) aktuell: 0,01MG/ML? R&D Systems

III. 1.4. Immunologische Methoden und deren Auswertung

III. 1.4.1. Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)

MACS-Säulen (MS Columns) und Magnetständer	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach/ BRD
Beads: human CD3-Microbeads anti-PE-Microbeads	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach/ BRD
Biotin Antikörper	
DPBS	PAN Biotech GmbH, Aidenbach/BRD
Bovines Serum Albumin (BSA Stock Solution, pH 7,2)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach/ BRD
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, pH 8,0, 0,5M)	Gibco, Invitrogen, Paisley/UK

III. 1.4.2. Durchflusszytometrie (FACS) zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen

FACS-Puffer:	DPBS + 0,5% BSA + 2mM EDTA
Fixationspuffer für FACS:	FACS-Puffer + 2% Formaldehyd
FcR Blocking Reagent, human	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach/BRD
LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit	Invitrogen, Darmstadt/BRD
Durchflusszytometer: FACS Calibur	BD Biosciences San José/USA

FlowJo 9.9 Software	Becton Dickinson, Heidelberg/BRD
---------------------	----------------------------------

Antikörper gegen	Konjugierter Fluoreszenzfarbstoff	Klon	Hersteller
anti-human CD2	APC	RPA-2.10	Biolegend San Diego, CA/USA
anti-mouse/rat CD29	APC/Cy7	HMB1-1	eBioscience, San Diego, CA/USA
CD33	PE-Cy7	WM-53	Biolegend San Diego, CA/USA
ILT3	PE	ZM4.1	Biolegend San Diego, CA/USA
HVEM	PE	122	eBioscience, San Diego, CA/USA
LAG3	PE-Cy7	3DS223H	Biolegend San Diego, CA/USA
CD244	PE/APC	C1.7	Beckman Coulter Deutschland, Krefeld/BRD
CD48	FITC		Biolegend San Diego, CA/USA
Tim3	Brilliant violet (BV)	F38-2E2	Biolegend San Diego, CA/USA
CD200	PE	OX108	BD Biosciences, San José, CA/USA
CD86	PacBlue	IT2.2	eBioscience, San Diego, CA/USA

Isotyp Kontrollen	Konjugierter Fluoreszenzfarbstoff	Klon	Hersteller
mlgG	APC	MOPC-21	Biolegend San Diego, CA/USA
mlgG1	APC	P3.6.2.8.1	Biolegend San Diego, CA/USA
mlgG1	APC/Cy7	MOPC-21	Biolegend San Diego, CA/USA
mlgG1	Brilliant violet (BV)	MOPC-21	Biolegend San Diego, CA/USA
mlgG k	PE	MOPC-21	Biolegend San Diego, CA/USA
mlgG1	PE-Cy5	MOPC-21	Biolegend San Diego, CA/USA
mlgG1	PE-Cy7	MOPC-21	Biolegend San Diego, CA/USA
mlgG1	FITC	P3.6.2.8.1	eBioscience, San Diego, CA/USA
mlgG2b	PB	MPC-11	Biolegend San Diego, CA/USA

III. 1.4.3. Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) Proliferations - Assay

Cell Trace CFSE Cell Proliferation Kit	Invitrogen, Darmstadt/BRD
--	---------------------------

III. 1.5. Allgemein verwendete Geräte

Lamina-flow Werkbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen/BRD
Zentrifuge Multifuge 3 s-r	Thermo scientific, Waltham/USA
Mikroskop DM IL	Leica, Solms/BRD
Zellzähler Countess	Invitrogen, Darmstadt/BRD
FACS Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg/BRD
Vortexer Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia/USA
Wasserbad ED 13	Julaba, Seelbach/BRD
Mr. Frosty™ Gefrierbehälter	Thermo scientific, Waltham/USA
Kühl und Gefrierschränke	Liebherr, Bulle/CH

III. 2. Methoden

III. 2.1. Zellkultur

III. 2.1.1. Zellkulturbedingungen und Langzeitkultursystem

Alle Zellen wurden in einem entsprechenden Zellkulturmedium bei 37°C in 5%iger CO₂-Atmosphäre und 95%iger Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die verwendeten AML-Zelllinien wurden in dem Zellkulturmedium R10 (RPMI 1640, 1% HEPES, 1% Penicillin/Streptomycin/Glutamin, 10% FCS (fetales Kälberserum, hitze-inaktiviert)) inkubiert. Für primäre AML-Zellen wurde ein spezielles Blastenmedium (Alpha MEM, 12,5% FCS, 12,5% Pferde-Serum und 5,5% Penicillin/Streptomycin/Glutamin) verwendet. Für eine bessere Viabilität der Langzeitkulturen wurden dem Blastenmedium die Zytokine rhG-CSF (rekombinanter humaner Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor), IL-3 (Interleukin 3), TPO (Thrombopoetin) und β-Mercaptoethanol zugefügt, jeweils in einer Konzentration von 20 ng/ml. Die AML-Zellen wurden auf einen Feederlayer, wie von Krupka et al. (2016 und 2014) beschrieben, auf bestrahlte MS-5-Zellen ausgesät.^{50 60} Es wurde an Sterilwerkbänken mit laminarem Luftstrom gearbeitet und steriles Material verwendet.

III. 2.1.2. Zelllinien in Kultur

In den Versuchen wurden unterschiedliche AML-Zelllinien verwendet: OCI-AML3, MOLM-13, HL60, PL21, MV4-11 (s. Material 1.1.). Die Kultivierung erfolgte in Zellkulturflaschen mit 75 cm² Oberfläche in 20 ml Suspension. Die Zellen wurden alle 3 Tage in einem Verhältnis 1:2 bis 1:5 gesplittet und auf diese Weise je nach Zelllinie in Konzentrationsbereichen zwischen 0,1 x 10⁶ und 2 x 10⁶/ml in Kultur gehalten. Als Kulturmedium wurde R10 verwendet (s. Kapitel II 2.1.1.).

III. 2.1.3. *In vitro* verwendete primäre mononukleäre Blutzellen

Primär mononukleäre leukämische Blutzellen des Knochenmarks (BMMCs) wurden durch Punktion des Beckenkamms, periphere Blutzellen (PBMCs) von AML-Patienten oder gesunden Spendern durch eine periphere Venenpunktion gewonnen. Die verwendeten primären AML-Zellen stammten von Patienten mit der Erstdiagnose einer AML. Die verwendeten primären Zellen wurden vor Therapiebeginn entnommen. Primäres Zellmaterial wurde entweder direkt am Abnahmetag verwendet oder als kryokonservierte Probe aufgetaut. Bei einem Patienten wurde nach Ende der Therapie mit Cytarabin zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten venöses Blut entnommen.

III. 2.1.4. Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes und des Knochenmarks

Mononukleäre Zellen wurden durch eine Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Das periphere Blut wurde 1:2, das Knochenmark 1:3 mit PBS verdünnt und auf einen Ficoll (Trennlösung aus synthetischen Saccharose-Polymeren) aufgeschichtet. Durch die anschließende Zentrifugation (RT, 2000 rpm, 30min, Geschwindigkeitserhöhung 9, Bremse 9) trennten sich die PBMCs und BMMCs aufgrund der unterschiedlichen Dichte nach ihrer Bewegungsgeschwindigkeit im Ficoll von den Erythrozyten und verblieben als weißlicher Leukozytenfilm zwischen Plasma und Ficoll. Von dort konnten sie mit einer Pasteur-Pipette abgenommen und in 50ml kaltem Medium gepoolt werden. Es folgten zwei weitere Wasch-Schritte (Zentrifuge auf 1800 rpm bzw. 550 rpm eingestellt). Die Zellen wurden direkt weiterverarbeitet oder kryokonserviert.

III. 2.1.5. Kryokonservierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes und des Knochenmarks

Für die Kryokonservierung erfolgte eine Zellzahlbestimmung der PBMCs und BMMCs und die Aufnahme in 100% FBS in einer Konzentration von $1,25-2,5 \times 10^7$ Zellen/ml (entsprechend $1 - 2 \times 10^7$ Zellen je Kryoröhrchen, Minimum: 5×10^6). Jeweils 800 μ l der Zellsuspension wurden in ein Kryoröhrchen gegeben, ergänzt durch ein Freeze Medium (80% FBS, 20% DMSO) in einem Verhältnis 1:1. In einer sog. „Mister Frosty“ - Box wurden die Kryoröhrchen über 5-12 Tage bei -80°C gelagert bevor sie in flüssigen Stickstoff bei -196°C transferiert wurden.

III. 2.1.6. Auftauen von mononukleären Zellen des peripheren Blutes und des Knochenmarks

Das Auftauen der PBMCs erfolgte in einem 37°C warmen Wasserbad. Die Zellsuspension wurde in ein Falcon überführt und langsam mit 10ml erwärmten Zellmedium (s. Kapitel II 2.1.1.) aufgefüllt. Um zytotoxisches DMSO (Dimethylsulfoxid) zu entfernen, erfolgte eine Zentrifugation bei 550g/min. Das Zell-Pellet wurde in unserem Blastenmedium (s. Kapitel II 2.1.1.) resuspendiert. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Zellzählung (s. Kapitel II 1.1.4.) und die weitere Prozessierung in Abhängigkeit von den geplanten Versuchen.

III. 2.2. Zytoreduktion und Behandlungsprotokoll

In der vorliegenden Arbeit wird der Effekt von Cytarabin (AraC) und Hydroxyurea (Litalir) auf die T-Zellproliferation und Aktivierung untersucht. Beide Substanzen gehören zu den gängigen

zytoreduktiven Substanzen in der AML-Therapie. Die gewählten Konzentrationen wurden aufgrund publizierter Serumkonzentrationen von Patienten unter Therapie ausgewählt.

Als Kernstück der Induktionstherapie aber auch der Konsolidierung zählt Cytarabin in Deutschland zu den wichtigsten Chemotherapeutika, die in der AML Anwendung finden. Als Isomer des Nukleosids Cytidin wirkt Cytarabin als Antimetabolit und wird nach seiner Phosphorylierung in die aktive Form Cytosinarabinosidtriphosphat, anstelle von Cytosintriphosphat während der Replikation, in die DNA eingebaut.¹¹⁸ Die klinisch verabreichten Konzentrationen variieren in den verschiedenen Studien-Protokollen. Aktuell werden Konzentrationen zwischen 100 und 3000 mg/m² eingesetzt.¹⁰⁴ Entsprechend der Bandbreite an klinisch eingesetzten Konzentrationen differieren die *in vitro* eingesetzten bzw. gemessenen Cytarabin-Konzentrationen zwischen 0,01-100 µM/1x10⁶. Aufgrund der außerordentlich hohen Zytotoxizität bei 100 µM entschieden wir uns - *in vitro* - für die Cytarabin-Konzentrationen 10 µM, 20 µM und 40 µM.¹⁰⁵⁻¹¹⁶

Hydroxyurea (Litalir) ist ein Ribonukleotid-Reduktasehemmer, der die DNS-Synthese zellzyklusspezifisch in der G1/S-Phase hemmt, und zur Zytoreduktion eingesetzt wird.^{119 120} Nach derzeitigem Kenntnisstand ist die Anwendung von Hydroxyurea kurzfristig wirksam. Die Anwendung führt zu keiner zytogenetischen Remission und hat keine Auswirkung auf den Progress der AML-Erkrankung. In Deutschland wird Hydroxyurea hauptsächlich bei myeloproliferativen Erkrankungen, bei der CML und der Sichelzellanämie angewendet.¹²⁰⁻¹²⁶ Die klinische Dosierung beträgt zwischen 15-40 mg/kgKG täglich.¹²⁷ In Anlehnung an die therapeutisch üblichen Serum-Konzentrationen und von der NCCN empfohlen Hydroxyurea-Konzentration verwendeten wir *in vitro* die Konzentrationen 10 µM, 100 µM und 1000 µM.¹²⁸⁻¹³⁵ Die Umrechnung der Stoffmengen erfolgte mithilfe eines Konzentrationrechners (<http://biotechnet-mps.de/bkbt/stoffkonzrechner.html>).

Die allogenen HD T-Zellen (CD3 positive HD T-Zellen) stammten aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes gesunder Spender. Die Isolierung der T-Zellen erfolgte durch negative Selektion und Dichtegradientenzentrifugation (s. Kapitel II 2.3.) Die allogenen T-Zellen wurden in dem Zellmedium R10 aufgenommen und über 72 h mit den zytoreduktiven Substanzen (in den unterschiedlichen Konzentrationen) inkubiert. Dabei erfolgte die Substanz-Gabe sowie ein Mediumwechsel alle 24 h Stunden. Als Kontrolle wurden unbehandelte HD T-Zellen der jeweiligen Spender verwendet. Nach Ablauf der 72 h wurden die behandelten T-Zellen CFSE gefärbt (s. Kapitel II. 2.3.2), um die Proliferation bestimmen zu können. Anschließend wurden die gefärbten HD T-Zellen in eine Kokultur mit einer AML-Zelllinie (HL60) in einem Effektor-Target-Verhältnis von 1:1 gegeben. Es erfolgte eine FACS-Analyse an d0 (72 h Post-

Zytoreduktion), um die Zellzahl von CD33+ AML-Zellen und CD3+ T-Zellen zu bestimmen. Die Kokultur wurde sowohl mit wie auch ohne den Einsatz des CD33/CD3 BiTE® Antikörpers (5ng/ml) kultiviert. Nach weiteren 72 h konnte per FACS-Analyse die CD33/CD3 BiTE®-vermittelte Lyse der CD33+ AML-Zellen und die CD3+ T-Zellproliferation gemessen werden. Dafür wurden die Zellzahlen der CD33 positiven- und der CD3 positiven Zellen bestimmt. Um die differentiellen Zellzahlen zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu quantifizieren, wurde der fold change berechnet. Dafür wurde die Anzahl der T-Zellen nach 144 h (d3 Post-Zytoreduktion) durch die Anzahl von T-Zellen nach 72 h (d0 Post-Zytoreduktion) dividiert.

III. 2.3. Immunologische Methoden

III. 2.3.1. Immunmagnetische Zellseparation (MACS)

Die immunmagnetische Zellseparation (Magnetic activated cell sorting, MACS) ist eine Methode, mit der Zellen mittels Antikörper gegen ein bestimmtes Oberflächenmolekül magnetisch sortiert werden können. Dabei unterscheidet man zwischen einer Positiv- und Negativselektion. Bei der Positivselektion werden diejenigen Zellen mit magnetischen Beads gelabelt, die das Molekül auf ihrer Oberfläche exprimieren. Bei der Negativselektion jene, die das Molekül nicht aufweisen. Im Rahmen unserer Untersuchungen erfolgte die Separation der T-Zellen mittels einer Negativselektion mit einem Pan-T-Zell-Isolation-Kit. Mononukleäre Blutzellen wurden durch eine Ficoll gestützte Zentrifugation aus venösem peripherem Blut isoliert, oder es wurden direkt PBMCs bzw. BMMCs verwendet. Für die T-Zell-Separation wurde die Zellzahl der PBMCs bzw. der BMMCs bestimmt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen mit einem Pan-T-Zell-Biotin-Antikörper Cocktail (Lösung verschiedener Biotin-konjugierter monoklonaler anti-human Antikörper gegen CD14, CD15, CD16, CD19, CD34, CD36, CD56, CD123 und CD235a) in einer Konzentration $10 \mu\text{l}/1 \times 10^7$ Zellen angefärbt und zusätzlich mit einer Puffer-Lösung $40 \mu\text{l}/1 \times 10^7$ Zellen verdünnt. Der Ansatz wurde bei $2-8^\circ\text{C}$ für 5 min. inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation erfolgte eine zweite Färbung der PBMCs/BMMCs mit einem Pan-T-Zell-Micro-Bead Cocktail (monoklonale Antikörper, Anti-Biotin und anti-CD61) in einer Konzentration $20 \mu\text{l}/1 \times 10^7$ Zellen und einer zusätzlichen Buffer-Verdünnung von $30 \mu\text{l}/1 \times 10^7$ Zellen. Nach einer zweiten Inkubation von 10 min. bei $2-8^\circ\text{C}$ konnten die gelabelten T-Zellen mit Hilfe von sog. LS Columns magnetisch isoliert werden.

III. 2.3.2. Carboxyfluorescein Succinimidylester Proliferationsassay (CFSE)

Um die T-Zellproliferation *in vitro* messen zu können, wurde eine Carboxyfluorescein Succinimidylester (CFSE) Markierung durchgeführt. Carboxyfluorescein bindet kovalent an Aminogruppen von Zellproteinen. Dadurch werden Zellen fluoreszenz -markiert und optisch detektierbar. Teilt sich eine CFSE markierte Zelle, tragen deren Tochterzellen die Hälfte der Anzahl Carboxyfluorescein markierter Moleküle. Die Abnahme der Zell-Fluoreszenz kann durchflusszytometrisch festgestellt werden und gibt Aufschluss über die Zellteilung bzw. die Zellproliferation. Die T-Zellen wurden in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in erwärmtem PBS + 0,1% BSA suspendiert. $2,5 \mu\text{M}$ CFSE (entspricht $0,5 \mu\text{L}/\text{ml}$ Zellsuspension) wurden an die Falconwand pipettiert. Nach Durchmischung des Ansatzes wurden die T-Zellen bei 37°C für 10 min. inkubiert. Nach 5-minütiger Zentrifugation, folgte eine weitere Inkubation, auf Eis für 5 min. Die folgenden 2 Waschdurchgänge (Einstellung der Zentrifuge: 9,9, 550 g,

5 min, 4°C) erfolgten unter Zugabe von jeweils dem 5-fachen Volumen des kalten Zellmediums R10.

III. 2.3.2. Fluorescence-activated cell scanning (FACS)

Die Messung der Expression koregulatorischer Oberflächen-Antigene auf AML-Zellen und T-Zellen erfolgte durchflusszytometrisch. Anhand von FACS-Analysen (fluorescent activated cell sorting, FACS) können Fluoreszenz-markierte Zellen je nach Färbeverhalten sortiert werden. Gegen Oberflächen-Antigene gerichtete Antikörper, an die ein Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt ist, erlauben die spezifische Zuordnung des jeweiligen Fluoreszenz-Farbstoffes zu einem bestimmten Zell-Antigen. Die einzelnen Zellen werden nacheinander an Laserstrahlen vorbeigeführt. Das dabei entstehende Streulicht bzw. das Fluoreszenz-Signal wird von einem Detektor ausgewertet. Eine simultane Analyse der relativen Zellgröße (im Forward-Scatter, FSC), der Granularität (im Side-Scatter, SSC), sowie verschiedener Fluoreszenz-gefärbter Zell-Antigene ist möglich. Neben der spezifischen Fluoreszenz wird auch die entsprechende Fluoreszenz-Intensität gemessen.

In unseren Versuchen wurden pro Ansatz bzw. pro FACS-Röhrchen ca. 1×10^6 Zellen /ml eingesetzt. Die Zellen wurden mit Fluoreszenz-markierten monoklonalen Antikörpern in 100µl FACS-Puffer inkubiert (s. Material II 1.4.2. Durchflusszytometrie (FACS) zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen. Die optimale Antikörper-Konzentration wurde entweder vom Hersteller übernommen oder durch Titration in unserer Arbeitsgruppe ermittelt. Um tote Zellen auszuschließen, verwendeten wir einen Live/Dead-Marker (0,5 µl/ 1×10^6 Zellen; LIVE/DEAD fixable Aqua Dead Cell Stain Kit, invitrogen, REF L34966). Um unspezifische Bindungen zwischen der Fc-Region der Antikörper mit Rezeptoren auf der Zelloberfläche zu verhindern, wurde vor dem Färben ein Fc-Block durchgeführt und damit die Fc-Bindestellen auf der Zelloberfläche abgesättigt. Zur Kontrolle unspezifischer Bindungen und für die genaue Einstellung der Parameter am Durchflußzytometer dienen Isotyp-Kontrollen. Hierzu wurden Antikörper mit identischem IgG-Isotyp und Fluoreszenzfarbstoff verwendet. Diese Antikörper wiesen keine spezifischen Bindestellen der Oberflächenantigene auf. Die angefärbten Zellen wurden an einem BD-LSR II Flow Cytometer gemessen. Die Analyse erfolgte mit der Software Flowjo (9.8.). Bei den Auswertungen wurde stets dieselbe Gating-Strategie angewendet. Im Forward-/Side-Scatter wurde zunächst eine Begrenzung (Gate) um die zu analysierenden Zellpopulationen vorgenommen, um die AML-Zellen und die T-Zelle identifizieren zu können. Dieses Gating erfolgte sowohl in der Messdatei der Isotypkontrollen als auch in der Messdatei mit den gefärbten Antigenen. In dem Gate der zu analysierenden Zellen wurde ein weiteres Gate zur Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen gesetzt. Wobei die Zellen mittels des LIVE/DEAD - Markers unterschieden wurden. Um die Expression der Oberflächen-

Antigene zu quantifizieren, wurde der spezifische Fluoreszenzindex (SFI) berechnet. Dazu wurde zunächst die Höhe der unspezifischen Fluoreszenz-Signale bestimmt, die nicht durch die Antikörper-Antigen-Bindung zustande kommen, sondern z.B. durch Bindung des Fc-Rezeptors der Antikörper an die Zelloberfläche oder durch Interaktionen von Zellstrukturen mit den Fluorochromen.¹³⁶ Dazu wurde die mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) der Isotypkontrollen- Antikörper (IgG1) auf den Zellen des Blastengates mithilfe der FlowJo Software berechnet. Zur Berechnung der MFI wurde das arithmetische Mittel der Fluoreszenz-Signale ermittelt. Dann wurde der MFI-Wert des Antikörpers in dem Blastengate (z.B. CD33+AML-Zellen, CD3+T-Zellen) bestimmt. Der spezifische Fluoreszenzindex (Specific fluorescence index, SFI) wurde durch Division des MFI-Werts des Antikörpers durch den MFI-Wert der Isotypkontrolle ermittelt. Die Oberflächen-Antigen-Expression wurde als positiv eingestuft, wenn die mediane Fluoreszenz mindestens 1,5-fach höher lag als bei der entsprechenden Isotypkontrolle (SFI = 1,5). Kriterium der Proben um in die statischen Auswertungen aufgenommen zu werden, war eine Viabilität von mind. 30% im Vergleich zu der jeweiligen unbehandelten Kontrolle.

III. 2.3.4. Zytokin-vermittelte Stimulation von AML-Zellen

Für die Stimulation von AML-Zelllinien in ihrem Kulturmedium R10 und primäre PBMCs bzw. BMNCs von AML-Patienten in ihrem Blastenmedium in einer Konzentration 1×10^6 Zellen / ml in einer 24-Well Mikrotiterplatte kultiviert. Die Zellen wurden für 24 h bei 37°C in einer Atmosphäre von 95 %O₂ und 5 %CO₂ intubiert. Die Stimulation erfolgte mit TNFa (c=5 ng/ml) und IFN γ (c=500 U/ml) alle 24 h. Als Kontrolle verwendeten wir nicht stimulierte AML-Zellen

III. 2.4. Statistische Analysen

III. 2.4.1. Patientenproben

Für die Analyse des Expressionsprofils koregulatorischer Moleküle auf AML - Zellen wurden in dem zweiten Teilprojekt dieser Arbeit Daten von 280 Patienten ausgewertet, bei denen zwischen 2012 und 2015 in der Medizinischen Klinik und Poliklinik III des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München die Diagnose einer AML gestellt wurde. Bei dem Patientenkollektiv handelte es sich um 243 AML-Erstdiagnosen und 37 Patienten mit einem AML-Rezidiv.

Im Labor für Leukämiediagnostik der Medizinischen Klinik und Poliklinik III wurde die Immunphänotypisierung mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen der Proben

durchgeführt. In dieser Arbeit wurde die durchflusszytometrisch ermittelte Expression der Marker ILT3, CD48 und CD244 (MFI und SFI) berechnet und ausgewertet. Dabei erfolgte die Berechnung der MFI- und der SFI-Werte mit der Software Flowjo (genaue Durchführung s. Abs. II 2.2.3.).

Weiter wurden in dieser Arbeit folgende Patientencharakteristika erhoben: Alter, Geschlecht, Erstdiagnose/Rezidiv, Gesamtzahl der Leukozyten, Thrombozyten und der Blasten-Anteil. Quellen dafür waren das KAS-und SAP-Verwaltungsprogramm der Medizinischen Klinik und Poliklinik III, Grosshadern. Daten von Patienten, die in diesen Programmen nicht erfasst waren, wurden durch Fragebögen, welche an die behandelten Ärzte geschickt wurden, erhoben. Da nicht alle Patienten hinsichtlich der FAB-, WHO-, MRC- und ELN-Klassifikation eingeordnet waren, erfolgte die Einordnung, soweit diese aufgrund der Daten möglich war, in die Klassifikationsschemata im Rahmen dieser Arbeit.

Als klinische Verlaufparameter wurden der Zeitpunkt des letzten Follow Up, erhaltene Induktionstherapie und der Therapiestart, komplette Remission (CR), Early Blast Clearance, Stammzelltransplantation, erhaltene Konsolidierung und gegebenenfalls der Zeitpunkt des Exitus des Patienten erfasst. Dies erfolgte ebenfalls auf der Grundlage der oben genannten Quellen.

Zu den Patienten lagen in den meisten Fällen detaillierte zytogenetische und molekulargenetische Charakterisierungen vor, ermittelt durch konventionelles zytogenetisches Banding, Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) und Mutationsanalysen von FLT3, NPM1, CEBPA und MLL, JAK2 und AML1 (Quelle siehe oben). Diese Daten wurden für die Korrelationsanalysen verwendet.

III. 2.4.2. Korrelation zwischen Expression und Charakteristika der Erkrankung

Zur Analyse des Datensatzes wurde die Version 22.0 des SPSS-Statistik-Programms gewählt. Bei der Erfassung von Häufigkeiten wurden Parameter wie der Median, Mittelwert, Minimum und Maximum verwendet.

Mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests wurde in dieser Arbeit die Verteilung von Häufigkeiten (Marker-Expression ja/nein) innerhalb kategorialer Variablen (wie zB. dem Geschlecht männlich/weiblich) untersucht. Voraussetzung für die Durchführung des Chi-Quadrat-Test war, dass die Variablen kategorial skaliert und die erwartete Häufigkeit in jeder Kategorie mind.1 betrug.

Die Rangkorrelationsanalyse nach Spearman wurde angewendet, um den linearen Zusammenhang zweier mindestens ordinalskaliert Variablen zu untersuchen. Z.B. wurde die Korrelation zwischen den einzelnen Marker-Expressionen bzw. die Korrelation der Marker-Expression, u.a. mit dem Alter der Patienten, ausgewertet.

Die Korrelation zwischen Marker-Expression und zytogenetischen oder molekulargenetischen Parametern (z.B. FLT3 mutiert ja/nein, komplex aberranter Karyotyp ja/nein, MRC good/intermediär/adverse risk) wurden durch den Mann-Whitney-U-Test – auch "Wilcoxon Rangsummen-Test" genannt - untersucht. Mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests konnte festgestellt werden, ob die zentralen Tendenzen unabhängiger Stichproben voneinander verschieden sind. Dieses Testverfahren ist das nichtparametrische Äquivalent zum t -Test. Das Testverfahren wurde also für Datensätze angewendet, die die Voraussetzungen für ein parametrisches Verfahren nicht erfüllten. Die abgebildeten Balkendiagramme stellen die Daten als Mittelwert (\pm Standardfehler) dar. Ein Großteil der Daten wird als Box-Whisker-Plot präsentiert. Dabei zeigt die Box den Median sowie das erste und dritte Quartil. Die Whiskers zeigen den niedrigsten und den höchsten Wert im 1,5-fachen Interquartil-Abstand vom Median an. „Ausreißer“-Werte werden als kleine Kreise außerhalb dargestellt.

Für die Analyse der Überlebenszeitdaten wurde das Gesamtüberleben (Overall survival, OS) und das Rezidivfreie Überleben (RFÜ) mit der Kaplan-Meier-Methode bestimmt. Das Rezidivfreie Überleben (RFÜ) wurde definiert als Zeitraum zwischen dem Erreichen der CR und dem Progress der AML. Das Gesamtüberleben (GÜ) wurde als Zeitspanne zwischen CR und dem Exitus des Patienten, unabhängig von der Todesursache, definiert. Das arithmetische Mittel der Überlebenszeiten wurde errechnet, indem die Überlebenszeiten aller Personen addiert und diese Summe durch die Zahl der Personen dividiert wurde. Für den Median der Überlebenszeit wurde in dieser Arbeit der Zeitpunkt ermittelt, bei dem das Ereignis (Rezidiv, Tod) bei 50% der Patienten eingetreten war. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Log-Rank-Tests berechnet. Als signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0.05$ (zweiseitig) für alle statistischen Tests angenommen.

IV. Ergebnisse

IV. 1. Einfluss zytoreduktiver Substanzen auf die CD33/CD3 BiTE® - vermittelte Zytotoxizität und auf die Proteinexpression von CD33

IV. 1.1. Einfluss von Cytarabin und Hydroxyurea auf die CD33/CD3 BiTE® - vermittelte Lyse und Proliferation der T-Zellen

Basierend auf den bisherigen Ergebnissen zu dem bispezifischen CD33/CD3 BiTE® Antikörper wurde in dieser Arbeit der Einfluss der zytoreduktiven Substanzen Cytarabin und Hydroxyurea auf HD T-Zellen und autologe T-Zellen untersucht. Ziel der Untersuchungen war, eine Substanz zu identifizieren, die zytoreduktiv auf AML-Zellen wirkt, dabei aber die T-Zellen nicht beeinträchtigt. Durch die niedrigere E:T Ratio sollte die CD33/CD3 BiTE® vermittelte T-Zellproliferation und Lyse von AML-Zellen gesteigert werden.

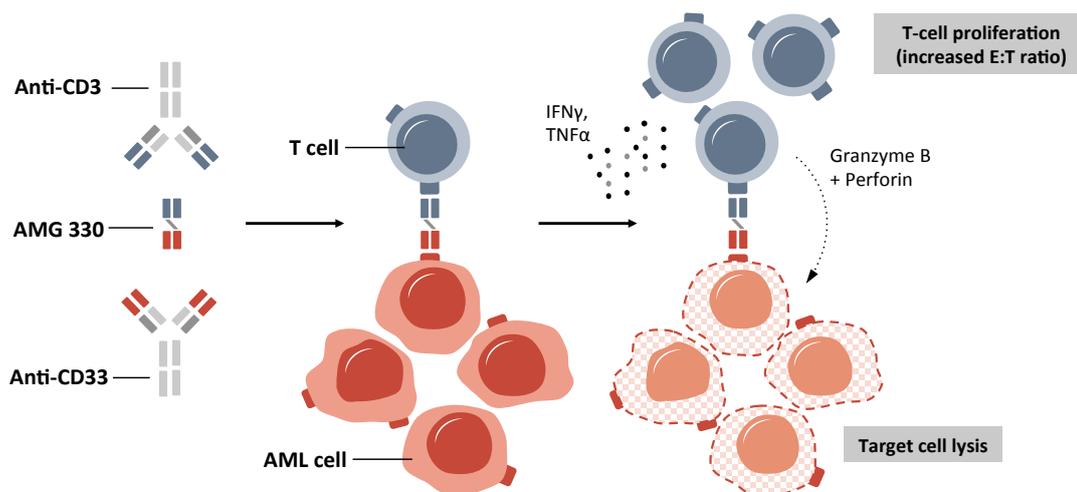
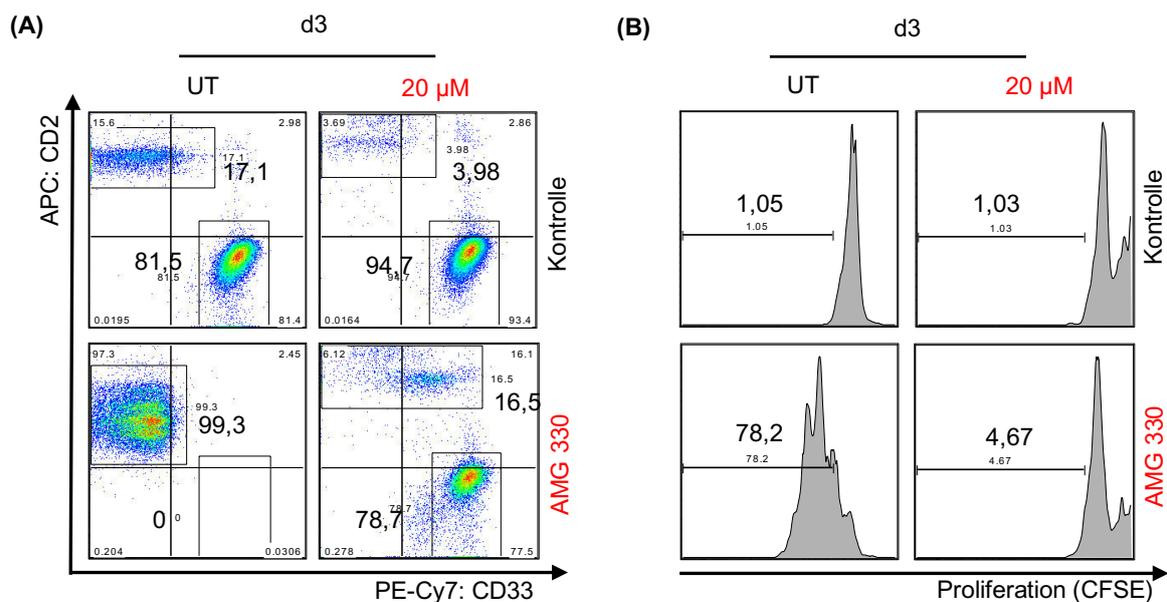


Abb. 2 Prinzip der CD33/CD3 BiTE® - vermittelten Lyse von AML Zellen. (Krupka C, 2015, <http://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/news/aml/bite/>; Stand 24. 05. 2016)

Die Untersuchungen mit allogenen T-Zellen (HD T-Zellen) und AML-Zelllinien zeigten für die Vorbehandlung mit Cytarabin über 72h in der nachgeschalteten Kokultur mit HL60- und KG1a-Zellen (E:T Ratio 1:1), einen deutlichen Funktionsverlust der zytotoxischen CD2+T-Zellen (Abb. 2A). Mit Cytarabin behandelte HD T-Zellen zeigten eine Dosis-abhängige Beeinträchtigung der T-Zell-Funktion (Lyse der HL60-Zellen: UT 99.63% vs. 10 μ M 22.77% vs. 20 μ M 31.44% vs. 40 μ M 37.1%; n=3; Abb. 3A, C) und eingeschränkte T-Zellproliferation

im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (UT 65.53% vs. 10 μ M 5.32% vs. 20 μ M 3,84% vs. 40 μ M. 0.323; n=3; Abb. 3B, C).

Um einen Methodenartefakt auszuschließen und die Zytotoxizität unterschiedlicher Cytarabin-Konzentrationen weiter zu untersuchen, verglichen wir die Anwendung von Cytarabin (10 μ M, 20 μ M und 40 μ M) - einmal pro 72 h vs. einmal pro 24 h (insgesamt dreimaliger Mediumwechsel). Nach einer 72-stündigen Cytarabin-Inkubation und weiteren 72 h in Kokultur mit HL60-Zellen konnten wir keinen signifikanten Unterschied der Zytotoxizität zwischen den unterschiedlichen Cytarabin-Anwendungen feststellen. Die mit Cytarabin behandelten HD T-Zellen zeigten eine beeinträchtigte CD33/CD3 BiTE®-vermittelte Zytotoxizität (Lyse der HL60 Zellen) und eine verminderte T-Zellproliferation im Vergleich zu den Kontrollen (nicht grafisch dargestellt).



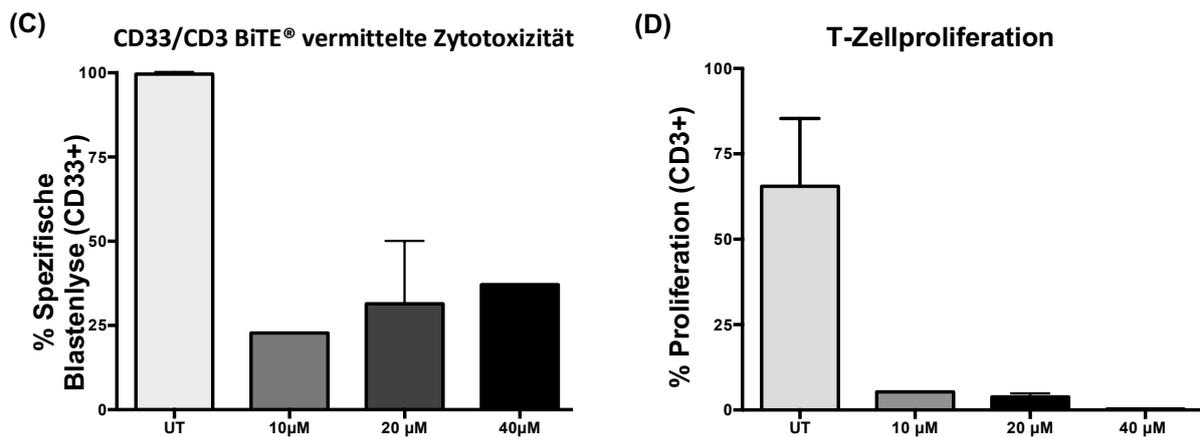


Abb. 3 Einfluss von Cytarabin (10-40 µM) auf die CD33/CD3 BiTE® - vermittelte Lyse von AML-Zellen und T-Zellproliferation (A - D)

Wir erhielten zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten peripheres venöses Blut von einem AML-Patienten, nachdem dieser in der Klinik mit Hochdosis-Cytarabin (im Rahmen seiner Konsolidierung) behandelt worden war.

In der ersten Probe (PBMCs), abgenommen drei Tage nach Ende der Chemotherapie, konnten wir *ex vivo* in unserem Langzeit-Kultursystem keine relevante autologe T-Zell-Proliferation oder Lyse der AML-Zellen erkennen, auch nicht unter der Gabe des CD33/CD3 BiTE® Antikörpers (Lyse der AML-Zellen am Tag 12: 30%; T-Zell-Expansion (fold change zu Tag 0): 0,9). Unter der Gabe des Zytokins IL2 (500U/ml) zeigte sich im Verlauf ab Tag 18 eine Regeneration der autologen T-Zellen (Abb. 4A -C).

In der zweiten Probe (PBMCs), nach einem Chemotherapie-freien Intervall von sechs Tagen, zeigte sich im Vergleich zu der Kontrolle eine signifikant höhere CD33/CD3 BiTE®-vermittelte Lyse der AML-Zellen und T-Zellproliferation (Lyse der AML-Zellen am Tag 12: 61%; fold change der T-Zellproliferation zu d0: 3.1; Abb. 4C, D).

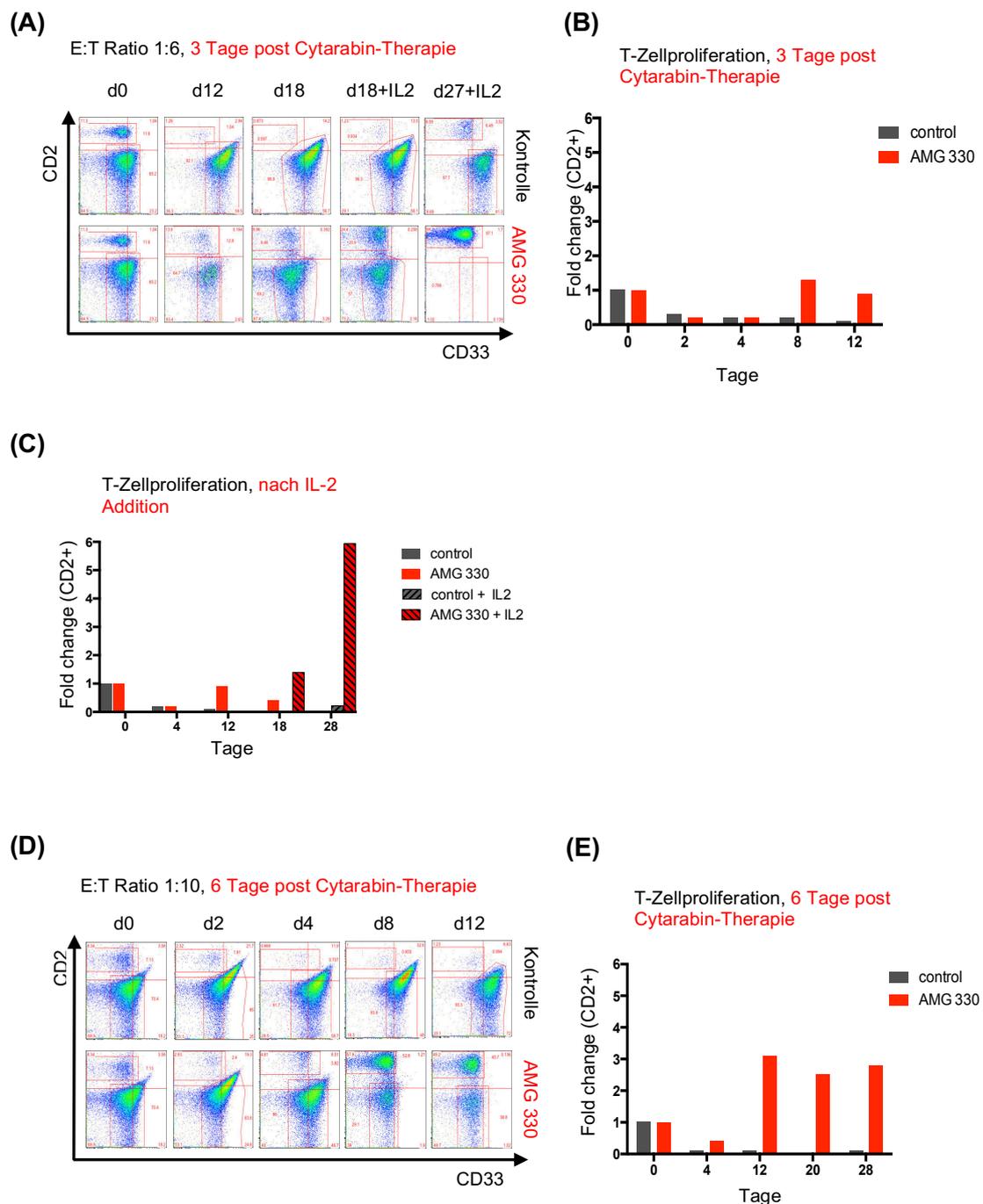


Abb. 4 Reversible Beeinträchtigung der T-Zellproliferation *ex vivo* nach drei Cytarabin-freien Tagen (A-C) und nach sechs Cytarabin-freien Tagen (D,E)

Für Hydroxyurea zeigten unsere Untersuchungen mit allogenen (HD) T-Zellen und AML-Zelllinien (im Unterschied zu Cytarabin) bei Konzentrationen bis zu 1000 μ M keinen negativen Einfluss auf die CD33/CD3 BiTE[®]-vermittelte Lyse der AML-Zellen (Lyse der HL60Zellen: UT 99.4% vs. 10 μ M 93.21% vs. 100 μ M 95.789% vs. 1000 μ M 99.78%; Abb. 5A, C). Es konnte

kein Einfluss auf die Proliferation der allogenen HD T-Zellen festgestellt werden (UT 76.2% vs. 10 μ M 74% vs. 100 μ M 73.83% vs. 1000 μ M 70.5%; n=4; Abb. 5B)

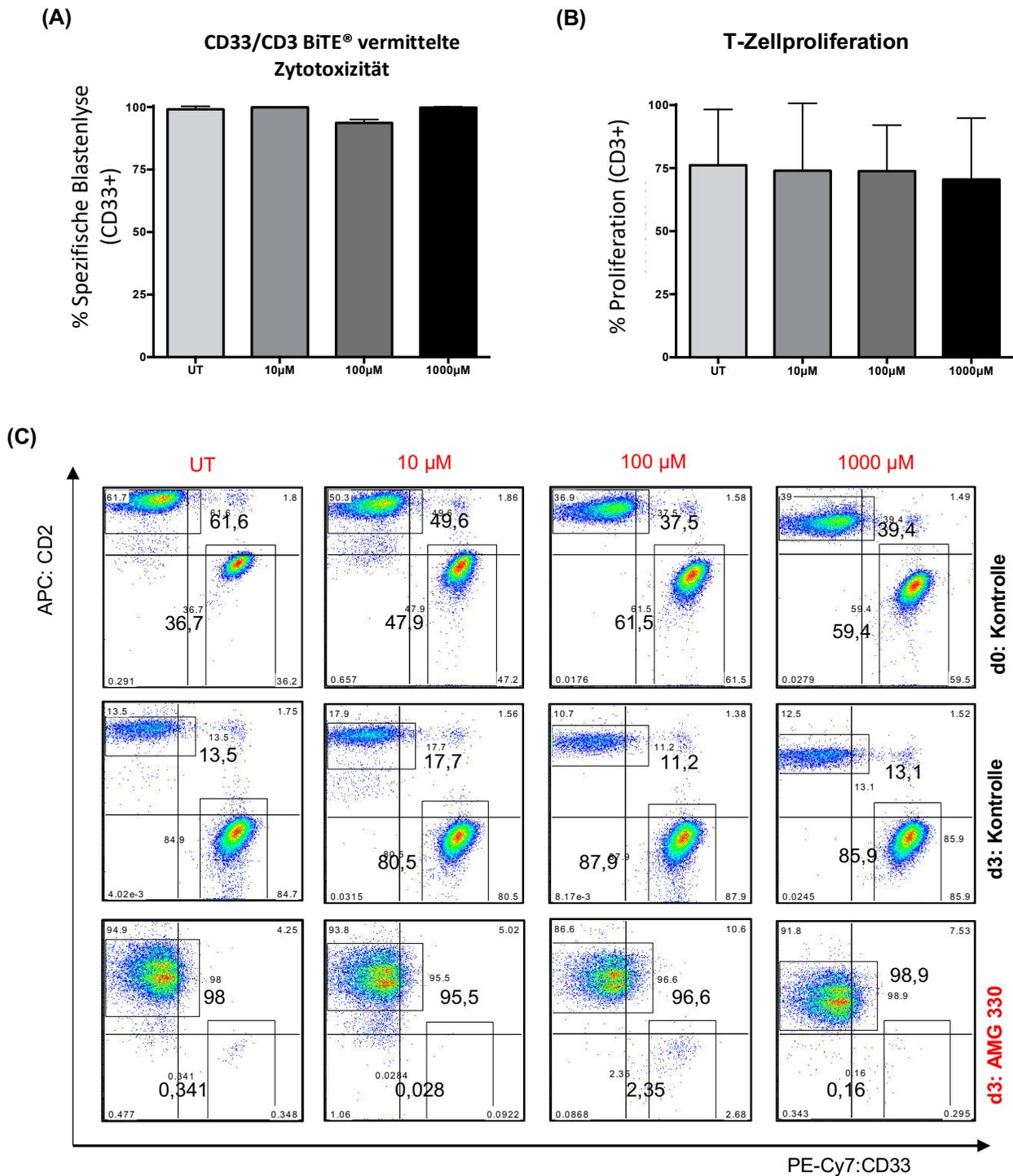


Abb. 5 Einfluss von Hydroxyurea (10 μ M;100 μ M und 1000 μ M) auf die CD33/CD3 BiTE[®] -vermittelte Lyse von AML-Zellen (A und C) und T-Zellproliferation (B)

IV. 1.2. Einfluss von Cytarabin und Hydroxyurea auf die Proteinexpression des Oberflächen-Antigens CD33

Wie in der Einleitung bereits beschrieben wurde, haben Untersuchungen gezeigt, dass das Level der CD33-Expression auf den Blasten positiv mit der Lysekinetik des CD33/CD3 BiTE® Antikörper korreliert. Sowohl AML-Zelllinien als auch primäre AML-Zellen wurden für 72 h mit Cytarabin (10 μ M; 20 μ M und 40 μ M) und Hydroxyurea (10 μ M, 100 μ M und 1000 μ M) inkubiert. Die Expression von CD33 wurde an d 3 mittels FACS-Analysen bestimmt und mit der unbehandelten Kontrolle verglichen. Verwendet wurden die AML-Zelllinien HL60, KG-1a, MOLM-13, OCI-AML3, PL21 und MV-4. Die Substanz-Gabe erfolgte alle 24 h.

Hydroxyurea zeigte *in vitro* bei den AML-Zelllinien OCI-AML3, HL60, KG-1a, MOLM, PL21 und MV4-11 keinen signifikanten Einfluss auf die CD33-Expression.

Bei insgesamt 14 Patienten mit einer AML-Erstdiagnose wurde der Einfluss von Hydroxyurea untersucht (von fünf AML-Patienten PBMCs und von neun Patienten BMMCs). Unsere Untersuchungen ergaben eine konstitutive Proteinexpression für CD33, unabhängig von der Anwendung und Konzentration von Hydroxyurea (medianer SFI (CD33): UT 26,35 vs. 10 μ M 36.7 vs. 100 μ M 30.37 vs. 1000 μ M 33.2; n=14; Abb. 6A, C).

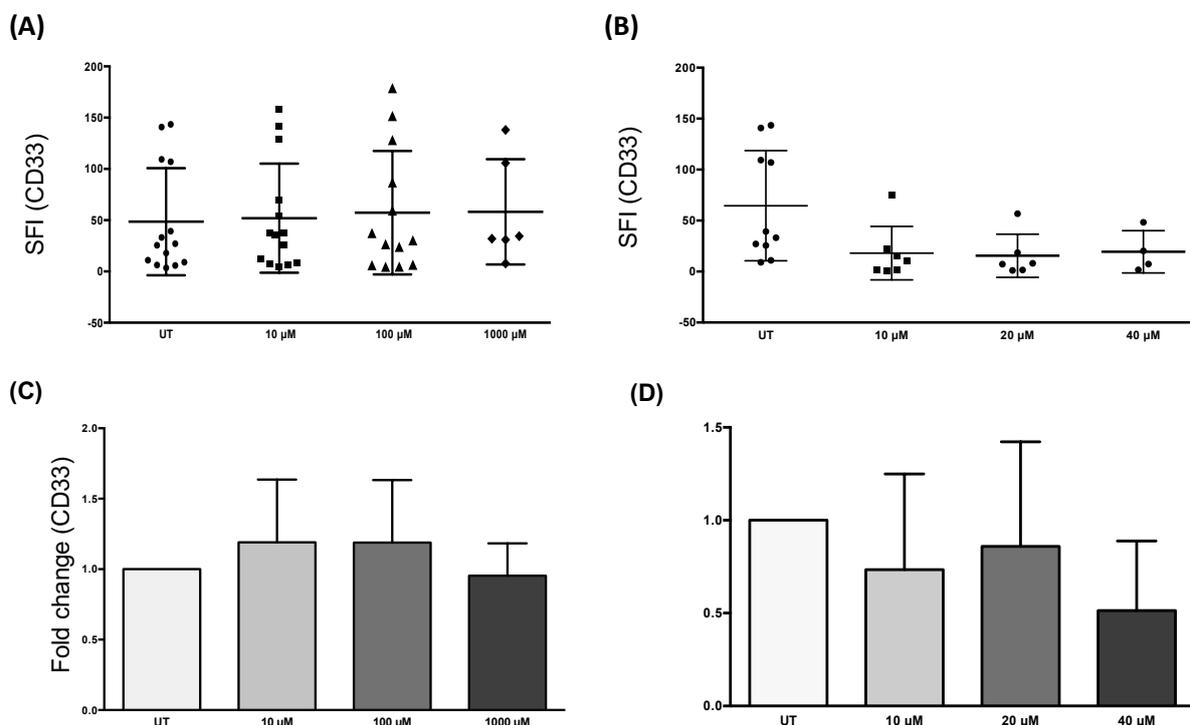


Abb. 6 Einfluss von Hydroxyurea (A und C) und Cytarabin (B und D) auf die CD33-Proteinexpression auf primären AML- Zellen *ex vivo*. SFI (CD33) Werte (A und B) und CD33 Fold change (C und D)

Die Inkubation mit Cytarabin führte bei den AML-Zelllinien ab einer Konzentration von 10 μM zu einer Viabilität von unter 30% im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen, so dass die Auswertung der CD33-Expression nicht valide ist. Nur für die AML-Zelllinie KG-1a konnte die Proteinexpression (Viabilität der Zellen > 30%) ausgewertet werden. Hier zeigte sich eine konstitutive Proteinexpression (SFI (CD33): UT 7.67 vs. 10 μM 6.527 vs. 20 μM 7.23 vs. 40 μM 6.2; n=1).

Für die Untersuchungen mit primären AML-Zellen wurden von drei Patienten PBMCs und von fünf Patienten BMMCs mit Cytarabin inkubiert. Die primären AML-Zellen zeigten der nach 72-stündigen Cytarabin-Behandlung eine höhere Viabilität (>30%). Wie für die AML-Zelllinie KG-1a wurde jedoch kein Einfluss auf die CD33 Proteinexpression festgestellt (medianer SFI (CD33): UT 27.11 vs. 10 μM 10.66 vs. 20 μM 7.65 vs 40 μM 13.82; Abb. 6B, D).

IV. 2. Charakterisierung der Proteinexpression von ILT3, CD244 und CD48 auf primären AML-Zellen *in vitro*

Im zweiten Teilprojekt dieser Arbeit wird die Expression der koregulatorischen Moleküle ILT3, CD48 und CD244 auf AML-Zellen untersucht. Dabei wurde die Expression der koregulatorischen Marker auf CD33+ AML-Zellen ausgewertet. Die Immunphänotypisierung erfolgte mittels durchflusszytometrischer Messungen im Labor für Leukämiediagnostik der Medizinischen Klinik und Poliklinik III, Uniklinikum Grosshadern. Die Proteinexpression wurde zum Zeitpunkt der Erstdiagnose als auch bei Patienten mit einem AML-Rezidiv gemessen. In dieser Arbeit wurden die gemessenen Daten mittels der Software FloJow berechnet und ausgewertet. Es wurden Korrelationsanalysen zwischen Proteinexpression und Charakteristika der Erkrankung (Morphologie, Zytogenetik, Molekulargenetik) durchgeführt. Ebenso erfolgte eine Analyse der prognostischen Bedeutung oben genannter Moleküle (s. Kapitel II. 2.4. Statistische Analysen).

Die Charakteristika der analysierten AML-Patienten sind den folgenden Tabellen zu entnehmen und wurden für die im folgenden Analysen und Auswertungen verwendet:

Patienten für ILT3 - Proteinanalyse			<i>n</i> _{insg.} =153	medianer SFI
Alter	Median		65 (18-92)	3,1
Geschlecht	weiblich		69 (45)	0,8
	männlich		84 (55)	1,1
FAB			<i>n</i> =140 (%)	medianer SFI
M0			6 (4)	12,1
M1			38 (27)	3,2
M2			26 (19)	1,6
M3			6 (4)	1,9
M4			14 (10)	14,9
M5			17 (12)	20,9
M6			2 (1)	100,0
sAML:MDS/sAML			25 (18)	2,4
aAML:tAML			3 (2)	2,8
sAML:CMML			3 (2)	1,4
Zytogenetik			<i>n</i> =140 (%)	medianer SFI
t(8;21)			6 (4)	1,2
inv(16)/t(16;16)(p13;q22)			6 (4)	18,4
normaler Karyotyp			65 (46)	2,4
t(11;1)(q23;p13)t(11;19)(q23;13)			3 (2)	32,2
t(11;19)(q23;13)				
Veränderungen nicht klassifiziert als günstig oder ungünstig			30 (21)	5,2
komplexer Karyotyp			28 (21)	9,0
Andere ungünstige Veränderungen			2 (1)	7
Mutationen			<i>n</i> =52 (%)	medianer SFI
NPM1 mut, FLT3 wt (CN)			22 (42)	13,5
NPM1 mut, FLT3-ITD (CN)			22 (42)	1,2
NPM1 wt, FLT3-ITD (CN)			8 (15)	49,5
MRC			<i>n</i> =141 (%)	medianer SFI
günstig			12 (8,5)	2,7
intermediär			91 (64,5)	3,6
ungünstig			38 (27)	16,7
ELN			<i>n</i> =140 (%)	medianer SFI
günstig			18 (13)	2,0
intermediär			85 (61)	3,1
ungünstig			37 (26)	16,5
Patienten für CD244 - Proteinanalyse			<i>n</i> _{insg.} =162	medianer SFI
Alter	Median		64 (18-92)	19,2
Geschlecht	weiblich		70 (43%)	19,2
	männlich		92 (57%)	20,6
FAB			<i>n</i> =148 (%)	medianer SFI
M0			12 (8)	50,4
M1			41 (28)	23,8
M2			28 (19)	19,2
M3			6 (4)	10,3
M4			15 (10)	15,6
M5			13 (9)	10,1
M6			2 (1)	67,3
sAML:MDS/sAML			25 (17)	27,6
aAML:tAML			3 (2)	13,8
sAML:CMML			3 (2)	17,4
Zytogenetik			<i>n</i> =146 (%)	medianer SFI
t(8;21)			6 (4)	23,3
inv(16)/t(16;16)(p13;q22)			4 (3)	21
normaler Karyotyp			69 (47)	18,6
t(11;1)(q23;p13)t(11;19)(q23;13)			3 (2)	17,5
Veränderung nicht klassifiziert als günstig oder ungünstig			32 (22)	14,4
komplexer Karyotyp			29 (20)	22,0
Andere ungünstige Veränderungen			3 (2)	60,5
Mutationen			<i>n</i> =59 (%)	medianer SFI
NPM1 mut, FLT3 wt (unabhängig v. Karyotyp)			29 (49)	9,3

NPM1 mut, FLT3-ITD (unabhängig v. Karyotyp)			18 (31)	19,4
NPM1 wt, FLT3-ITD (unabhängig v. Karyotyp)			12 (20)	18,9
MRC			<i>n</i> =150 (%)	medianer SFI
günstig			13 (8)	16,7
intermediär			97 (65)	17,4
ungünstig			40 (27)	23,0
ELN			<i>n</i> =149 (%)	medianer SFI
günstig			19 (13)	19,3
intermediär			91 (61)	16,5
ungünstig			39 (26)	23,9
Patienten für CD48 - Proteinanalyse			<i>n</i> _{insg.} =145	medianer SFI
Alter	Median		64 (18-92)	1,8
Geschlecht	weiblich		61 (42%)	1,8
	männlich		84 (58%)	1,8
FAB			<i>n</i> =127 (%)	medianer SFI
M0			6 (5)	7,6
M1			35 (28)	1,9
M2			24 (19)	1,4
M3			5 (4)	1,5
M4			14 (11)	1,5
M5			12 (9)	2,9
M6			2 (1)	8,9
sAML:MDS/sAML			23 (18)	2,6
sAML:tAML			3 (2)	1,8
sAML:CMML			3 (2)	1,9
Zytogenetik			<i>n</i> =137 (%)	medianer SFI
t(8;21)			5 (4)	1,4
inv(16)/t(16;16)(p13;q22)			3 (2)	4,6
normaler Karyotyp			61 (45)	3,1
t(11;1)(q23;p13)t(11;19)(q23;13)			3 (2)	7,4
Veränderung nicht klassifiziert als günstig oder ungünstig			34 (25)	4,3
komplexer Karyotyp			29 (21)	4,8
Andere ungünstige Veränderungen			2 (1)	15,8
Mutationen			<i>n</i> =42 (%)	medianer SFI
NPM1 mut, FLT3 wt (Karyotyp normal)			16 (38)	1,3
NPM1 mut, FLT3-ITD (Karyotyp normal)			21 (50)	1,2
NPM1 wt, FLT3-ITD (Karyotyp normal)			5 (12)	1,9
MRC			<i>n</i> =136 (%)	medianer SFI
günstig			10 (7,4)	1,6
intermediär			91 (67)	1,7
ungünstig			35 (26)	2,4
ELN			<i>n</i> =141 (%)	medianer SFI
günstig			16 (11)	1,7
intermediär			91 (65)	1,8
ungünstig			34 (24)	2,2

Tabelle 4. Charakteristika der Patienten für ILT3 – Proteinanalyse

Tabelle 5. Charakteristika der Patienten für CD244 – Proteinanalyse

Tabelle 6. Charakteristika der Patienten für CD48 – Proteinanalyse

IV. 2.1. Expression von ILT3, CD244 und CD48 auf AML-Zellen bei Erstdiagnose

Die ILT3-Expression konnte *ex vivo* für 153 AML-Erstdiagnosen ausgewertet werden. Eine positive ILT3-Proteinexpression wurde in 63% der Fälle festgestellt. Die positive Proteinexpression wurde ab einem SFI von $\geq 1,5$ angenommen (s. Kapitel III. 2.4. Statistische Analysen). Der mediane SFI (ILT3) betrug 3,139. Die SFI-Werte lagen zwischen 0,4 und 203,870 (Abb. 7A). Die CD244-Expression wurde bei 162 AML-Erstdiagnosen ausgewertet. Eine positive CD244-Expression konnte bei 97,4 % der AML-Patienten gefunden werden (Abb. 7B). Der mediane SFI (CD244) betrug 19,2. Die SFI (CD244)-Werte lagen zwischen 0,80 und 231. Die CD48-Proteinexpression wurde bei 145 AML-Patienten mit einer Erstdiagnose ausgewertet. Es wurde für 59,3 % der AML-Patienten eine positive Expression nachgewiesen (Abb. 7C). Der mediane SFI (CD48) betrug 1,8. Die SFI (CD48)-Werte lagen zwischen 0,84 und 149,3.

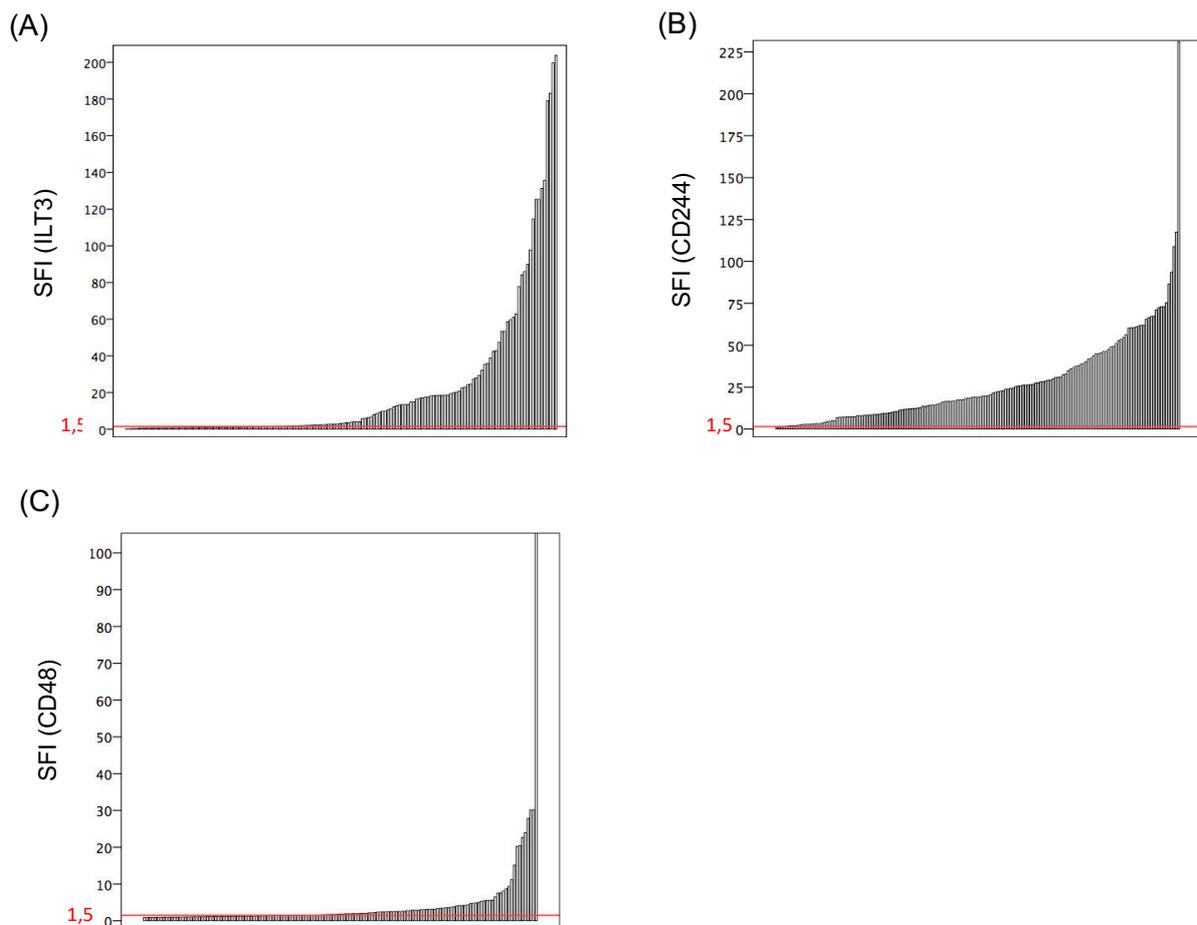


Abb. 7 Proteinexpression von ILT3 (A), CD244 (B) und CD48 (C) *ex vivo* auf CD33+AML-Zellen von AML-Patienten mit einer Erstdiagnose

IV. 2.2. Einfluss von TNF α und IFN γ auf die Proteinexpression von LAG3, HVEM und ILT3 *in vitro*

Es wurde bereits gezeigt, dass die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle durch Zytokine induzierbar ist.^{113 157} Wir untersuchten den Einfluss der Zytokin-Stimulation von TNF- α (c=5ng/ml) und IFN- γ (500U / ml) auf AML-Zelllinien als auch auf primäre AML-Zellen. Für die Kontrolle wurden nicht stimulierte Zellen inkubiert. Nach 24 h Zytokin-Aktivierung erfolgte die Analyse der Expression in der Durchflusszytometrie. Die Expression wurde durch den fold change im Vergleich zu der entsprechenden unbehandelten Kontrollprobe gemessen.

Der Einfluss von TNF- α und IFN- γ auf die Expression von HVEM, ILT3 und LAG3 wurde auf den AML-Zelllinien HL60, KG-1a, MOLM, OCI, PL21 und MV-4 gemessen. Nach 24 h proinflammatorischer Stimulation konnte eine signifikant verstärkte Expression der Marker LAG3 und HVEM gemessen werden ($p=0.01$; $p=0.03$; $n=3$; Abb. 8A, B und Abb. 9A, B). Für ILT3 wurde *in vitro* keine Veränderung der Proteinexpression festgestellt ($p=0.56$; $n=3$).

Die primären CD33+AML-Zellen entstammten Patienten mit unbehandelten AML-Erstdiagnosen (von fünf Patienten PBMCs, von neun Patienten BMMCs). Nach 24-stündiger Zytokin-Stimulation konnten wir *in vitro* auf primären CD33+AML-Zellen eine verstärkte LAG3-Expression messen. ($p=0.025$; $n=4$; Abb. 8B). Für die HVEM-Proteinexpression konnte in sechs von 10 Fällen eine induzierbare Expression beobachtet werden ($p=0.274$; $n=10$; Abb. 9B). Die ILT3-Proteinexpression zeigte sich auch *ex vivo* unverändert nach einer 24-stündigen Zytokin-Aktivierung ($p=0.9375$; $n=6$).

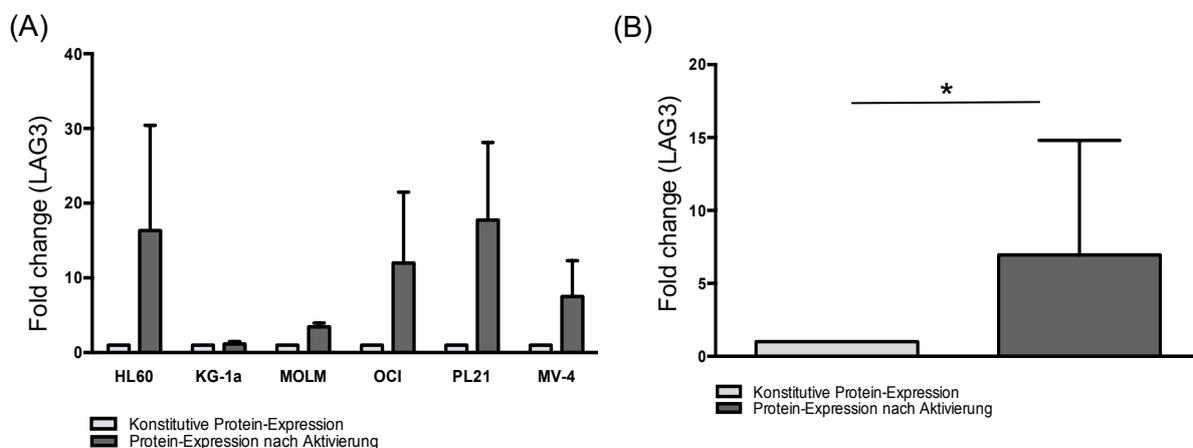


Abb. 8 Einfluss von TNF α und IFN γ auf die LAG3-Proteinexpression auf AML-Zelllinien (A) und primären AML-Zellen (B)

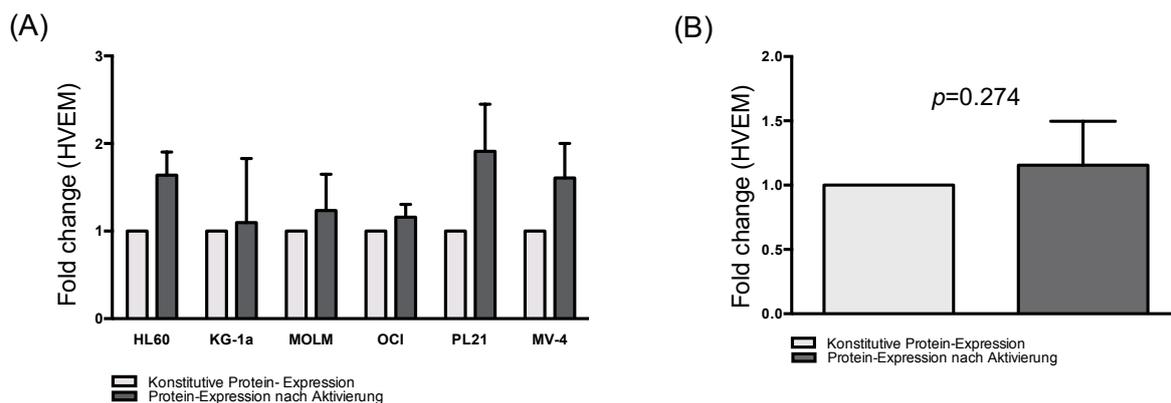


Abb. 9 Einfluss der von TNF α und IFN γ auf die HVEM-Proteinexpression auf (A) AML-Zelllinien und (B) primären AML-Zellen

IV. 2.3. Vergleich der ILT3-, CD244- und CD48-Expression auf AML-Zellen bei Erstdiagnose und im Rezidiv

Um die Expression von ILT3, CD244 und CD48 im zeitlichen Verlauf der Erkrankung analysieren zu können, wurde die Proteinexpression *in vitro* auch auf CD33+AML-Zellen von Patienten mit einem AML-Rezidiv (PBMCs und BMMCs) gemessen. Bei den analysierten Proben der Rezidiv-Erkrankungen handelte es sich um andere Patienten (gegenüber der Erstdiagnose). Es wurde kein signifikanter Unterschied der Proteinexpression für ILT3 (medianer SFI (ILT3) 3,139; n=153 vs. medianer SFI (ILT3) 2,00; n=49; $p = 0,667$; Abb. 10A), für CD244 (medianer SFI (CD244) 18,49; n=162 vs. SFI (CD244) 20,20; n=29; $p= 0,58$; Abb. 10C) und für CD48 (medianer SFI (CD48) 1,63; n=145 vs. medianer SFI (CD48) 1,69; n=29; $p = 0,723$; Abb. 10E) im Vergleich von Erstdiagnose vs. Rezidiv gefunden.

Bei einigen Patienten erhielten wir sowohl CD33+AML-Zellen (BMMCs) zum Zeitpunkt der Erstdiagnose als auch zum Zeitpunkt des Rezidivs. Bei 4 von 5 Patienten zeigte sich *ex vivo* im Rezidiv eine verminderte ILT3- und CD48-Expression ($p=0,125$ und $p=0,125$; Abb.10B, D). Für die CD244-Expression konnte zum Zeitpunkt des Rezidivs kein Unterschied im Vergleich zur Erstdiagnose festgestellt werden (n=8; $p=0,38$; Abb. 10)

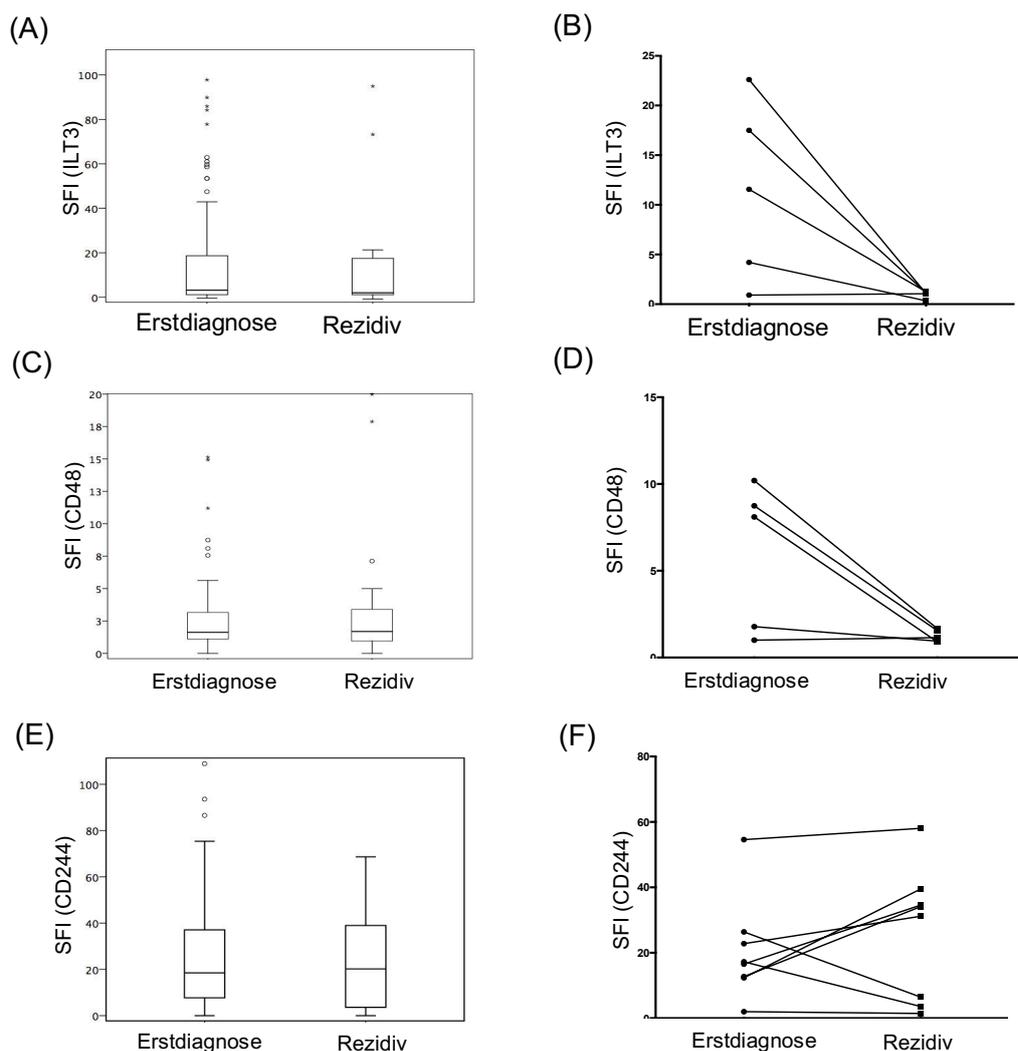


Abb. 10 Vergleich der ILT3, CD48 und CD244-Expression von AML- Zellen bei Erstdiagnose und Rezidiv. Ungepaarter AML-Patienten Subgruppen-Vergleich (A, C und E) und bei 8 Patienten Vergleich der Proteinexpression im Verlauf der Erkrankung (B,D und F)

IV. 2.4. Korrelation der Proteinexpression von ILT3, CD244 und CD48 mit Patientencharakteristika (Geschlecht und Alter)

Wir untersuchten den Zusammenhang der Proteinexpression von ILT3, CD244 und CD48 mit den Patientencharakteristika Geschlecht und Alter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose. Für ILT3 wurden 153 Patienten ausgewertet, für CD244 162 und für CD48 145 Patienten. Die Untersuchungen ergaben keinen Zusammenhang zwischen der Proteinexpression der Marker ILT3, CD244 und CD48 und dem Geschlecht ($p=0,427$; $p=0,897$ und $p=0,450$).

Ebenso zeigte sich die Expression der Moleküle ILT3, CD244 und CD48 unabhängig vom Alter der Patienten (Patienten ≤ 70 Jahre vs. Patienten ≥ 70 Jahren ($p=0,605$; $p=0,674$ und $p=0,987$).

IV. 2.5. Korrelation der Proteinexpression von ILT3, CD244 und CD48 mit Charakteristika der Erkrankung (Morphologie, Zytogenetik, Molekulargenetik)

IV. 2.5.1. Differentielle Proteinexpression bei einzelnen Subtypen der AML

In dem folgenden Kapitel wird der Zusammenhang der Expression von ILT3, CD244 und CD48 mit morphologischen Charakteristika und zyto- bzw. molekulargenetischen Merkmalen der AML *ex vivo* untersucht. Hierfür wurden die unterschiedlichen Klassifikationssysteme der AML verwendet.

Der zytomorphologische Vergleich der einzelnen FAB-Subtypen im Hinblick auf die Marker-Expression ergab eine differentielle Proteinexpression für die FAB-Subtypen M5, M0 und für die sekundären AML-Erkrankungen. Unsere Analysen zeigten eine signifikante stärkere ILT3-Expression auf CD33+AML-Zellen von FAB-M5 Patienten im Vergleich zu den restlichen FAB-Subtypen (FAB-M5 medianer SFI (ILT3) 20,89; $n=17$ vs. restliche FAB-Fälle medianer SFI (ILT3) 0,95; $n=123$; $p=0,01$; Abb. 11A). CD244 wurde auf leukämischen FAB-M5 Zellen schwächer, im Vergleich mit anderen FAB-Subtypen, exprimiert (FAB-M5 medianer SFI (CD244) 10,1; $n=13$ vs. restliche FAB-Typen medianer SFI (CD244) 19,8; $n=135$; $p=0,026$; nicht grafisch dargestellt). Für CD33+AML-Zellen des FAB-M0-Subtyps wurde hingegen eine höhere CD244-Expression im Vergleich zu den restlichen FAB-Subtypen gefunden (FAB-M0 medianer SFI(CD244) 50,39; $n=12$ vs. restliche FAB-Fälle medianer SFI(CD244) 18,8; $n=136$; $p=0,06$; Abb. 11B) Auch für Patienten mit einer sekundären AML-Erkrankung aus einem myelodysplastischen Syndrom (sAML:MDS) konnte eine stärkere CD244-Expression im Vergleich zu den restlichen FAB-Subtypen gefunden werden (sAML:MDS medianer SFI (CD244) 27,61; $n=25$ vs. restliche FAB-Fälle medianer SFI (CD244) 17,5; $n=123$; $p=0,06$; Abb. 11C).

Für die WHO-Klassifikation zeigte sich eine differentielle Proteinexpression für CD33+AML-Zellen mit Myelodysplasie-assoziierten Eigenschaften und mit rekurrenten genetischen Aberrationen. Der Vergleich der einzelnen Subtypen ergab eine signifikant stärkere CD244-Expression auf CD33+AML- Zellen mit myelodysplastischen Eigenschaften (AML mit Myelodysplasie-assoziierten Eigenschaften medianer SFI (CD244) 25,01; $n=31$ vs. restliche

WHO-Subtypen medianer SFI (CD244) 17,46; $n=115$; $p=0,026$; Abb. 11D). AML-Patienten der Subgruppe mit rekurrenten genetischen Aberrationen (gemäß WHO) zeigten hingegen eine signifikant verminderte CD244-Expression (AML mit rekurrenten genetischen Aberrationen medianer SFI(CD244) 14,41; $n=43$ vs. restliche WHO-Subtypen Median SFI (CD244) 21,53; $n=103$; $p=0,035$; nicht grafisch dargestellt).

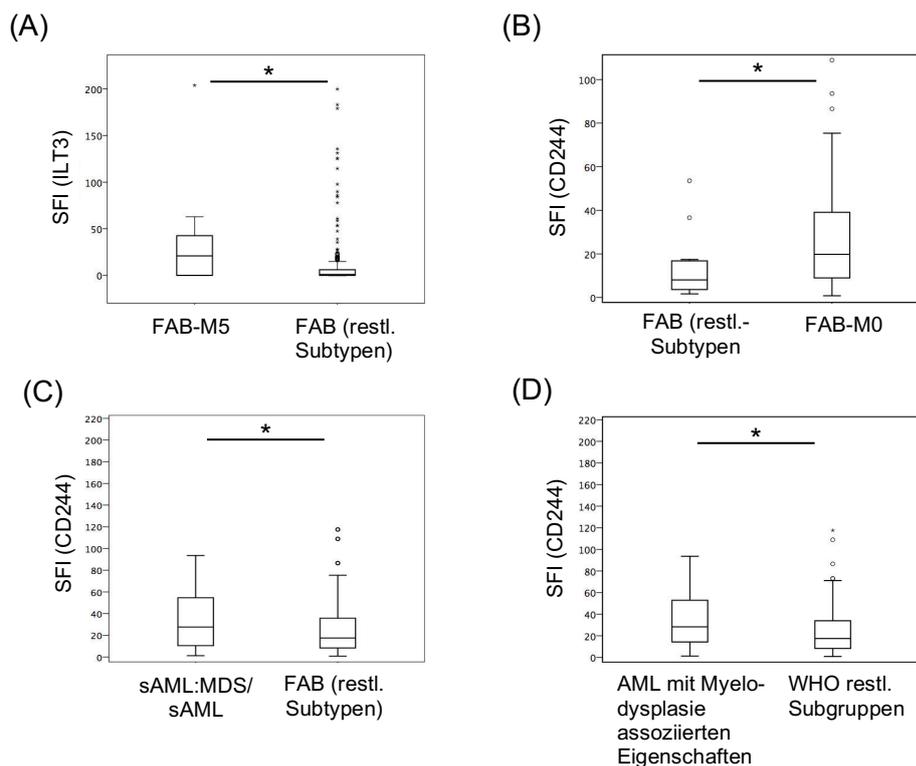


Abb. 11

Korrelation der Proteinexpression von ILT3 und CD244 mit morphologischen (A und B), zytogenetischen, (C und D) Veränderungen

IV. 2.5.2. Korrelation der Proteinexpression von ILT3, CD244 und CD48 mit zytogenetischen Risikogruppen

Die Marker wurden auch im Hinblick auf ihre prognostische Relevanz untersucht. Dafür wurden Korrelationsanalysen zwischen der Proteinexpression und den einzelnen Subgruppen der Risikoklassifikationssysteme MRC und ELN durchgeführt.

Unsere Untersuchungen zeigten eine signifikant stärkere ILT3- und CD48-Expression mit ungünstigen zytogenetischen Veränderungen: Für AML-Patienten mit einem ungünstigen MRC-Risikoprofil konnte eine deutlich höhere ILT3-Proteinexpression im Vergleich zu Patienten mit einem intermediären und einem günstigen Risiko festgestellt werden (medianer

SFI (ILT3) 16,685; n= 38; vs. medianer SFI (ILT3) 2,38; n=103; $p= 0,005$; Abb. 12A). Ebenso wurde eine höhere CD48-Proteinexpression auf CD33+AML-Zellen mit ungünstigen molekulargenetischen Veränderungen gemäß der MRC-Risikoklassifikation gefunden im Vergleich zu den intermediären bzw. günstigen Veränderungen (medianer SFI (CD48) 2,4; n= 35 vs. medianer SFI (CD48) 1,7; n=101; $p= 0,011$; Abb. 12B). Für die CD244-Proteinexpression wurde kein signifikanter Zusammenhang mit einzelnen Risikogruppen gefunden. Der zytogenetische Vergleich von AML-Patienten mit einem komplex veränderten Karyotyp vs. normalem Karyotyp ergab eine signifikant stärkere Expression von ILT3 und CD48 für Patienten mit einem komplex veränderten Karyotyp (medianer SFI (ILT3) 9,05; n= 28 vs. medianer SFI (ILT3) 1,49; n=64; $p= 0,0075$; Abb. 12C und medianer SFI (CD48) 4,8; n= 29 vs. medianer SFI (CD48) 3,1; n=61; $p= 0,02$; Abb. 12D).

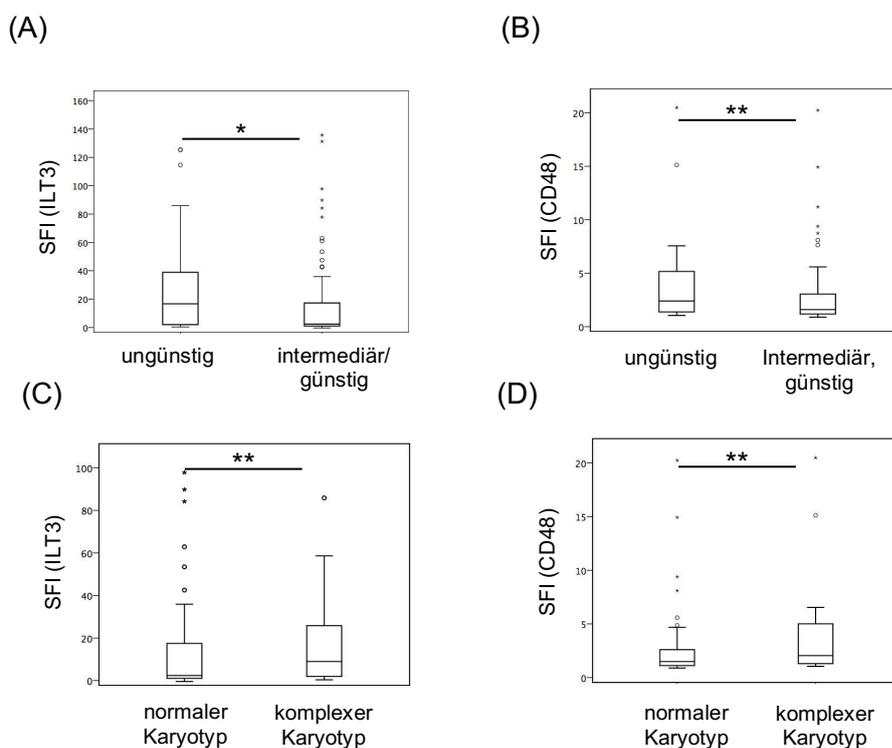


Abb. 12 Proteinexpression von ILT3 (A und C) und CD48 auf (B) auf AML-Zellen unterschiedlicher zytogenetischer Risikogruppen (MRC)

IV. 2.5.3. Korrelation der ILT3-, CD244- und CD48-Proteinexpression mit molekularen Veränderungen

In unseren Analysen untersuchten wir den Zusammenhang der Proteinexpression von ILT3, CD244 und CD48 mit molekularen Veränderungen. Für die FLT3-Mutation (*Internal tandem*

repeat sg. FLT3 ITD) und die NPM1 Mutation (NPM1 mut) konnte eine differentielle Proteinexpression von ILT3 und CD48 gefunden werden. Andere Mutationen (MLL-PTD, FLT3-TKD, KITD816 und CEBPA-bi/mono-allelisch) wurden ebenfalls untersucht, zeigten jedoch keine Korrelation mit der Proteinexpression. In der untersuchten Kohorte hatten 24% der Patienten eine ITD im FLT3-Gen und 32% der Patienten eine Mutation im NPM1-Gen.

Für ILT3 konnte eine höhere Proteinexpression auf CD33+AML-Zellen mit einer NPM1-Mutation, einem FLT- Wildtyp und einem normalen Karyotyp festgestellt werden (Median SFI 13,50, n=22; vs. NPM1-Wildtyp, FLT3 ITD oder NPM1 mutiert, FLT3 ITD Median SFI 3,015; n=30; $p=0,067$; nicht grafisch dargestellt). Für Patienten mit einer ITD im FLT3-Gen, einem NPM1-Wildtyp und normalem Karyotyp wurde eine höhere CD48-Proteinexpression im Vergleich zu Patienten mit einer Mutation im NPM1-Gen, und einer FLT3 ITD gefunden (medianer SFI 1,9; n=12; vs. medianer SFI 1.2; n=21; $p=0,007$; nicht grafisch dargestellt).

IV. 2.6. Prognostische Relevanz der ILT3-, CD244- und CD48-Expression für die AML

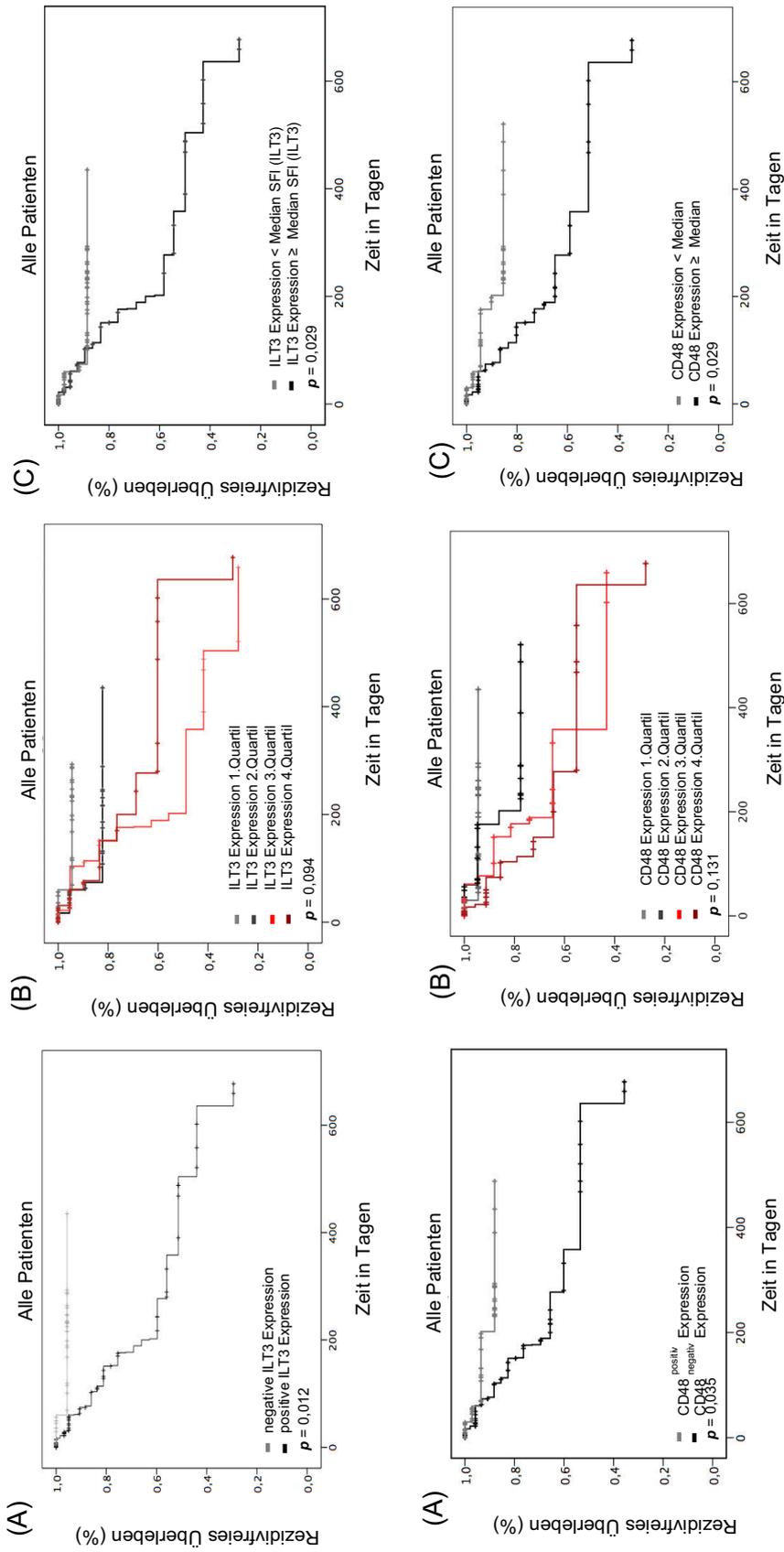
IV. 2.6.1. Rezidivfreies Überleben (RFÜ)

Für 108 von 153 Patienten mit einer AML-Erstdiagnose und bekannter ILT3-Expression konnte der klinische Verlauf festgestellt werden, ob ein Rezidiv innerhalb des Beobachtungszeitraums (07/2013 bis 02/2016) eintrat. Für Patienten mit einer positiven ILT3-Expression wurde ein kürzeres RFÜ im Vergleich zu Patienten festgestellt, die kein ILT3 auf ihren CD33+AML-Zellen exprimierten (mittleres RFÜ (ILT3^{positiv}) 406 Tage; medianer SFI (ILT3^{positiv}) 15,73; n=63 vs. mittleres RFÜ (ILT3^{negativ}) innerhalb unseres Beobachtungszeitraums nicht erreicht; SFI (ILT3^{negativ}) 0,926; n=45; $p=0,028$, Abb. 13A). Der Median des RFÜ lag für ILT3-positive Patienten bei 504 Tagen. Innerhalb der Gruppe der ILT3-negativen Patienten wurde der Median des RFÜ innerhalb unseres Beobachtungszeitraums nicht erreicht. Der Einfluss ILT3-Expression wurde weiter untersucht, in dem das RFÜ von Patienten mit unterschiedlich hoher ILT3-Proteinexpression verglichen wurde. Dazu erfolgte eine Einteilung der Patienten in Quartile, abhängig von der Stärke ihrer ILT3-Proteinexpression (1. Quartil n=26; 2. Quartil n=26; 3. Quartil n=27; 4. Quartil n=29). In unseren Analysen konnten wir ein unterschiedliches RFÜ in Abhängigkeit von der Proteinexpressionshöhe feststellen ($p=0,094$; Abb. 13B). Weiter wurden die 134 Patienten in zwei Gruppen geteilt: Patienten mit einem SFI (ILT3) \geq des medianen SFI (ILT3)-Werts und Patienten mit einem SFI(ILT3) $<$ des medianen SFI(ILT3)-Wertes. Im Vergleich konnte für Patienten mit einem SFI (ILT3) \geq des medianen SFI (ILT3)-Werts ein kürzeres RFÜ festgestellt werden (mittleres RFÜ 391 Tage; n=56 vs. mittleres RFÜ noch nicht

erreicht; $n=52$; $p=0,029$; Abb. 13C). Insgesamt erkrankten 21 von 63 (33%) Patienten mit positiver ILT3-Proteinexpression und 1 von 45 (2%) Patienten ohne ILT3-Proteinexpression an einem Rezidiv.

Das RFÜ konnte für 115 von 161 Patienten mit bekannter CD244-Expression ausgewertet werden. Aufgrund der sehr geringen Anzahl an CD244-negativen Patienten ($n=4$) im Vergleich zu der Gruppe von CD244-positiven Patienten ($n=111$) ließ sich keine vergleichende Aussage hinsichtlich des Einflusses der positiven Proteinexpression auf das RFÜ treffen. Für die weitere Untersuchung des Einflusses der CD244-Expression auf das RFÜ wurden Vergleichsgruppen gebildet. Die Patienten wurden in Quartile, abhängig von der Stärke ihrer CD244-Protein-Expression unterteilt (1. Quartil $n=30$; 2. Quartil $n=27$; 3. Quartil $n=29$; 4. Quartil $n=29$). Es konnten keine Unterschiede des RFÜs für die einzelnen Gruppen gefunden werden ($p=0,11$; nicht grafisch dargestellt). Erwartungsgemäß zeigte sich auch kein Unterschied im RFÜ für Patienten mit einem SFI (CD244) \geq des medianen SFI (CD244)-Werts vs. Patienten mit einem SFI (CD244) $<$ des Median-Wertes ($n=58$ vs. $n=57$; $p=0,19$; nicht grafisch dargestellt). 21 von 115 (29%) der Patienten mit einer positiven CD244-Proteinexpression und 2 von 4 (50%) Patienten mit einer negativen CD244-Proteinexpression erkrankten an einem Rezidiv.

Für die Untersuchung des Einflusses der CD48-Proteinexpression auf das RFÜ konnten die Daten von 101 der 145 AML-Patienten analysiert werden. Dabei exprimierten 57 Patienten CD48 auf ihren CD33+AML-Zellen und 44 Patienten hatten keine Proteinexpression (definiert als SFI $<1,5$). Patienten mit einer CD48-Proteinexpression zeigten ein kürzeres RFÜ gegenüber Patienten auf deren CD33+AML-Zellen kein CD48 exprimiert wurde (mittleres RFÜ(CD48^{positiv}) 435 Tage; medianer SFI 5,84; $n=57$ vs. mittleres RFÜ(CD48^{negativ}) noch nicht erreicht; medianer SFI 1,19; $n=44$; $p=0,035$; Abb 14A). Der Vergleich des RFÜs von Patienten - abhängig von ihrer CD48-Proteinexpressionshöhe - miteinander (Einteilung anhand Quartile) ergab keinen Unterschied (1. Quartil $n=25$; 2. Quartil $n=26$; 3. Quartil $n=25$; 4. Quartil $n=25$; $p=0,131$; Abb.14B). Allerdings wurde für Patienten mit einer CD48-Expression \geq des medianen SFI (CD48) im Unterschied zu Patienten mit einer CD48-Expression $<$ des medianen SFI (CD48) ein kürzeres RFÜ beobachtet (mittleres RFÜ 425 Tage; $n=51$ vs. mittleres RFÜ noch nicht erreicht; $n=50$; $p=0,029$; Abb. 14C). Innerhalb der Patientengruppe mit einer positiven CD48-Proteinexpression erkrankten 15 von 57 (26%) Patienten und innerhalb der Patientengruppe mit negativer Proteinexpression 12 von 51 (7%) Patienten an einem Rezidiv.



IV. 2.6.2. Gesamtüberleben (GÜ)

In dieser Arbeit konnte bei 134 von 153 Patienten mit einer AML-Diagnose und bekannter ILT3-Expression das Gesamtüberleben (GÜ) innerhalb des Beobachtungszeitraums analysiert werden. Eine positive ILT3-Expression war assoziiert mit einem schlechteren Gesamtüberleben (mittleres GÜ (ILT3^{positiv}) 582,4 Tage; medianer SFI 16,5; n=89 vs. mittleres GÜ (ILT3^{negativ}) noch nicht erreicht; medianer SFI(ILT3) 0,83; n= 45; $p=0,028$; Abb. 15A). Der Median des GÜ wurde in beiden Gruppen (Patienten mit ILT3^{positiv} - Expression und Patienten mit ILT3^{negativ} – Expression) nicht erreicht. Um den Einfluss der ILT3-Expression auf das GÜ genauer zu analysieren, wurden die Patienten, abhängig von der Proteinexpression, in Quartile unterteilt (1.Quartil n=34; 2.Quartil n=34; 3. Quartil n=31; 4.Quartil n=35) und miteinander verglichen. Hier konnte für keine der vier Gruppen ein eindeutiger Einfluss auf das Gesamtüberleben gefunden werden ($p=0,18$; nicht grafisch dargestellt). Es erfolgte der Vergleich zwischen Patienten mit einer hohen ILT3-Expression vs. niedriger ILT3-Expression. Ab einem SFI (ILT3)-Wert \geq des 75% Perzentils wurde die Proteinexpression als ILT3^{high} - Expression gewertet. Eine Proteinexpression $<$ des 75. Perzentils wurde als ILT3^{low} gewertet. Im Vergleich von ILT3^{high} und ILT3^{low} exprimierenden Patienten konnte ebenfalls kein Unterschied im GÜs gefunden werden (mittleres GÜ(ILT3^{high}) 371 Tage; medianer SFI(ILT3^{high}) 75,51; n=36 vs. mittleres GÜ (ILT3^{low}) noch nicht erreicht; medianer SFI(ILT3^{low}) 1,94; n=98; $p= 0,096$, Abb.15B). Innerhalb des Beobachtungszeitraums verstarben 34 von 89 Patienten (38%) mit einer positiven ILT3-Expression und 8 von 45 Patienten (17%) mit einer negativen ILT3-Proteinexpression.

In unseren Untersuchungen wurde für die zytogenetisch ungünstige Risikogruppe gemäß MRC-Klassifikation im Vergleich mit der intermediären und der günstigen Risikogruppe eine höhere ILT3-Proteinexpression nachgewiesen. Erwartungsgemäß konnten wir in der Patientengruppe mit einem ungünstigen Risiko ein schlechteres Gesamtüberleben feststellen ($p=0.068$; Abb. 15C). Ausgehend von den Ergebnissen der Korrelationsanalysen, untersuchten wir die ILT3-Proteinexpression innerhalb der ungünstigen MRC-Subgruppe weiter. Im Vergleich konnte für Patienten mit einem ungünstigen MRC-Risiko und einer ILT3^{high} -Expression jedoch kein signifikant schlechteres GÜ gegenüber Patienten mit einem ungünstigem MRC-Risiko und einer ILT3^{low}-Expression festgestellt werden (mittleres GÜ (ILT3^{high}) 245 Tage; n=14 vs. mittleres GÜ (ILT3^{low}) noch nicht erreicht; n=24; $p=0,26$, Abb.15D).

Nachdem unsere Analysen des RFÜ keinen Zusammenhang zwischen der CD244-Proteinexpression und dem RFÜ ergeben hatten, zeigte sich auch keine Assoziation zwischen

der CD244-Proteinexpression und dem GÜ. Für 125 AML-Patienten mit bekannter CD244-Expression konnte aufgrund der sehr geringen Anzahl an CD244-negativen Patienten (n=4) im Vergleich zu der Gruppe von CD244-positiven Patienten (n=121) keine vergleichende Aussage hinsichtlich des Einflusses der positiven Proteinexpression auf das GÜ getroffen werden. Es zeigten sich jedoch weder im Vergleich von Patienten der einzelnen CD244-abhängigen Quartil-Gruppen miteinander (1. Quartil n=40; 2. Quartil n=22; 3. Quartil n=31; 4. Quartil n=32; $p=0,251$), noch im Vergleich der Patienten mit einer CD244-Expression \geq vs. $<$ des medianen SFI(CD244)-Werts, signifikante Unterschiede im GÜ (n=62 vs. n=63; $p=0,26$; nicht grafisch dargestellt). Innerhalb des Beobachtungszeitraums verstarben 35 von 121 (29%) Patienten mit einer positiven CD244-Proteinexpression, und 2 von 4 (50%) Patienten mit einer negativen CD244-Proteinexpression.

Im Unterschied zu dem negativen Einfluss von der CD48-Expression auf das RFÜ, den unsere Überlebenszeitanalysen ergeben hatten, konnten wir keinen Einfluss der CD48-Expression auf das GÜ feststellen. Für die CD48-Proteinexpression wurde bei 125 AML-Patienten mit bekannter CD48-Expression das GÜ analysiert. Weder im Vergleich des GÜs zwischen CD48-positiven und CD48-negativen Patienten (n=74 vs. n=51; $p=0,45$), noch im Vergleich von Patienten mit CD48^{high} und CD48^{low}-Expression zeigte sich ein Unterschied (n=31 vs. n=94; $p=0,857$;). Innerhalb der Patientengruppe mit einer positiven CD48-Proteinexpression verstarben 25 von 74 (33%) Patienten und innerhalb der Patientengruppe mit negativer Proteinexpression 12 von 51 (23%) Patienten.

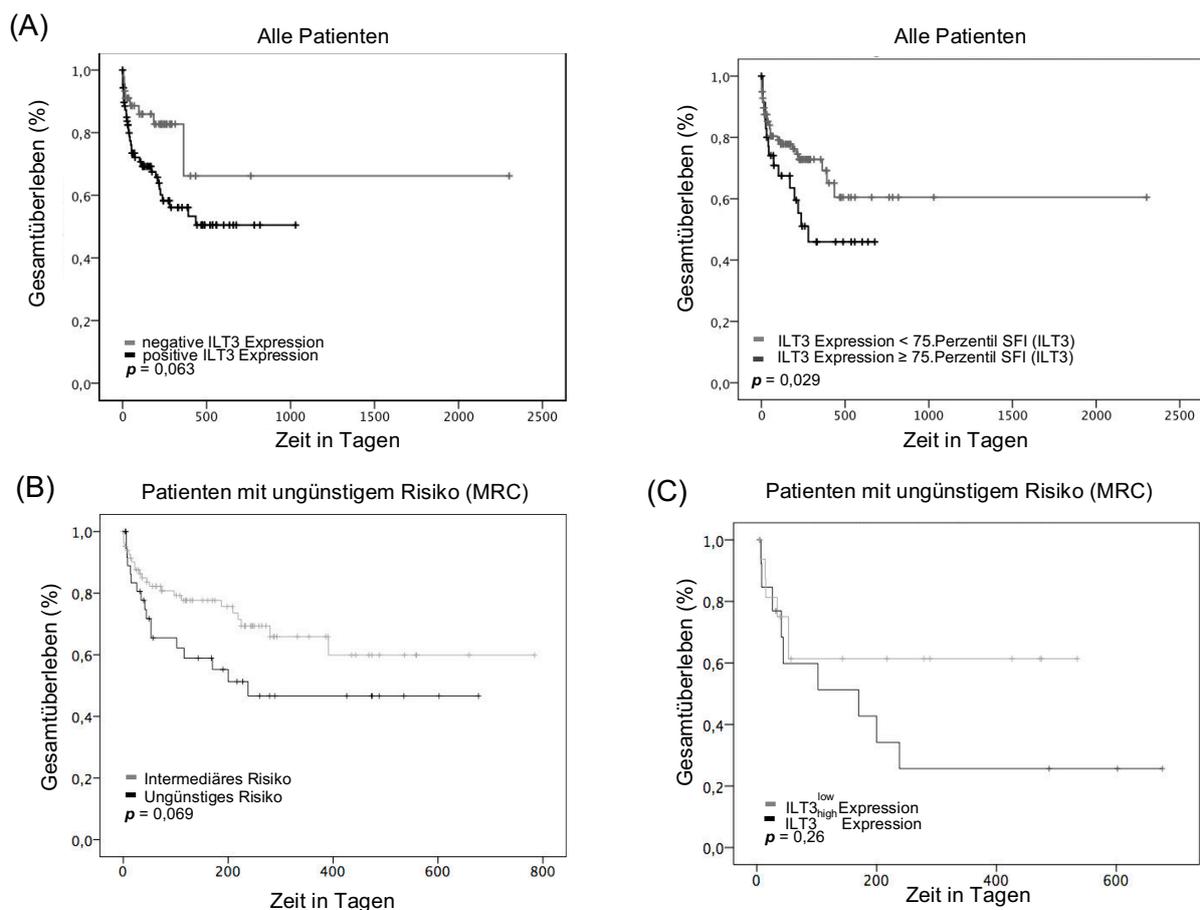


Abb. 15 Gesamtüberleben (RFÜ) von AML-Patienten mit ILT3-Proteinexpression (A und B). Vergleich des Gesamtüberlebens von Patienten mit einem ungünstigen Risiko (gemäß MRC) und ILT3^{high}-Expression vs. ILT3^{low}-Expression (B und C)

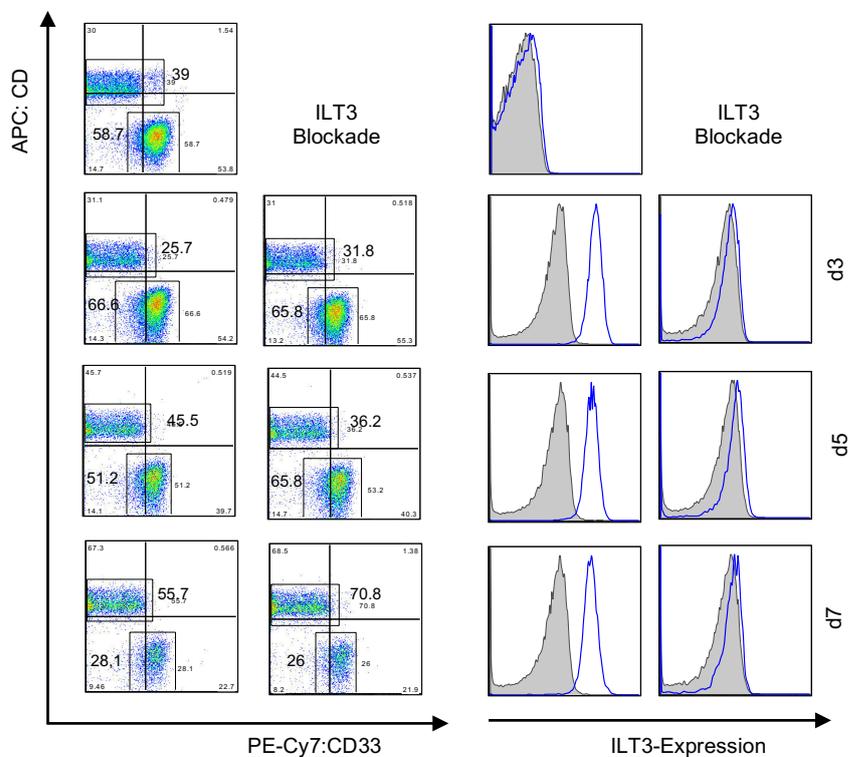
IV. 2.7. Einfluss der Blockade von ILT3 und HVEM auf die CD33/CD3 BiTE® vermittelte Zytotoxizität

Allogene T-Zellen wurden mit Zellen einer AML-Zelllinie (OCI/MOLM) oder primären AML-Zellen über sieben Tage in einer Kokultur in einer E:T Ratio von 1:1 analysiert. Die Kokulturen wurden mit dem CD33/CD3 BiTE® Antikörper (5ng/ml) bzw. mit einem Kontroll-Antikörper kultiviert. ILT3 und HVEM wurden mittels eines neutralisierenden Antikörpers blockiert (jeweils $c=0.125\mu\text{g/ml}$). Mithilfe von FACS-Analysen erfolgten an Tag 3, 5 und 7 Messungen der CD33/CD3 BiTE® -vermittelte Lyse der AML-Zellen und die T-Zellproliferation.

Die zusätzliche Blockade von ILT3 auf OCI-Zellen und MOLM13 Zellen zeigte keinen Unterschied in der CD33/CD3 BiTE®-vermittelten Lyse der AML-Zellen im Vergleich zu der alleinigen CD33/CD3 BiTE® Antikörper-Behandlung ($p=0,77$; $n=3$; Abb. 16A, B). Durch die zusätzliche Blockade von ILT3 auf primären AML-Zellen (BMNCs) mit autologen T-Zellen

konnte eine verbesserte CD33/CD3 BiTE®-vermittelten Lyse der AML-Zellen durch die zusätzliche ILT3 Blockade erzielt werden ($p=0,0358$; $n=3$; Abb. 16D). Die zusätzliche Blockade von ILT3 in dem autologen Setting zeigte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die T-Zellproliferation ($p=0.4$; $n=3$; Abb. 16E). Für die zusätzliche Blockade von HVEM konnten wir keinen Einfluss auf die CD33/CD3 BiTE®-vermittelte Lyse der AML-Zellen oder die T-Zellproliferation bei AML-Zelllinien und primären AML-Zellen feststellen ($p=0,33$; $n=3$ und $p=0.9$; $n=3$; nicht grafisch dargestellt).

(A) HD T - Zellen + AML-OCI Zellen



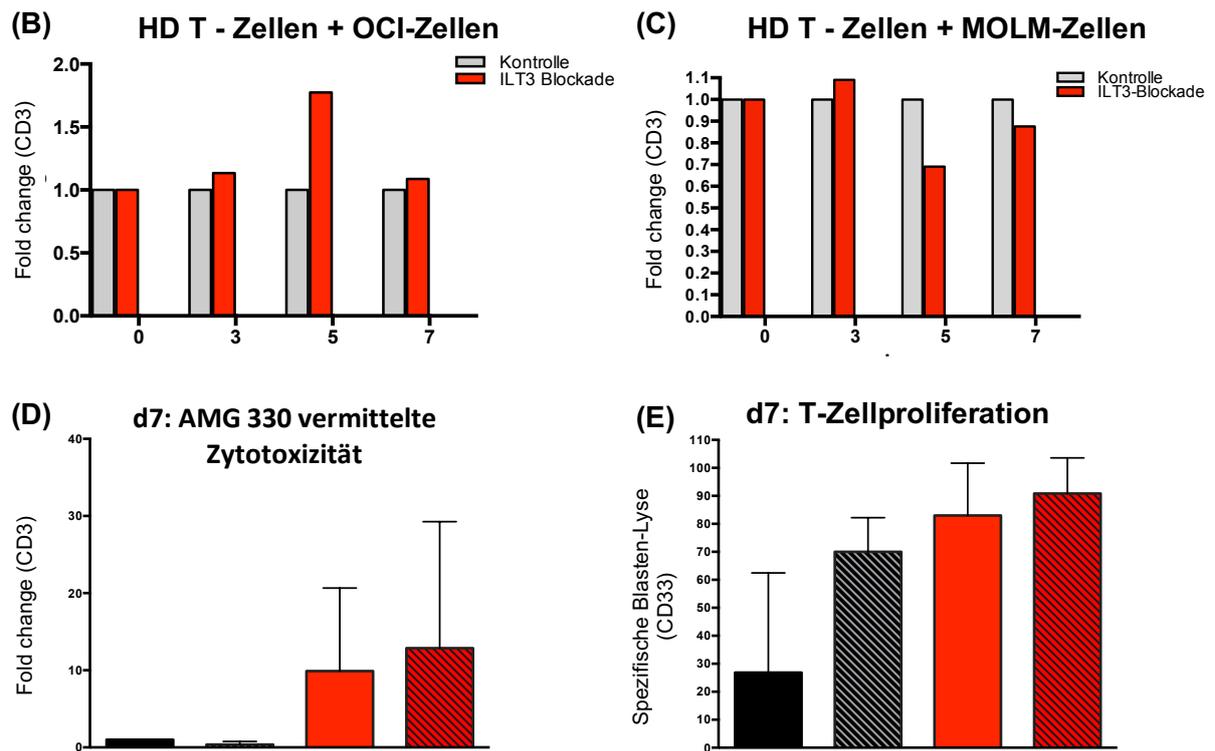


Abb. 16 Effekt der Blockade des ILT3-Proteins auf die CD33/CD3 BiTE® vermittelte Lyse von AML-Zellen Blasten (A-E)

V. Diskussion

V. 1. Einleitung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Strategien zur Verbesserung der CD33/CD3 BiTE® vermittelten Zytotoxizität untersucht und die Proteinexpression von ILT3, CD244 und CD48 auf CD33+AML-Zellen charakterisiert. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Cytarabin aufgrund der starken Beeinträchtigung der T-Zellen nicht als vorgeschaltete Zytoreduktion für die CD33/CD3 BiTE®-Therapie geeignet ist. Für Hydroxyurea konnte weder eine Beeinträchtigung der CD33/CD3 BiTE® vermittelten Lyse oder T-Zellproliferation, noch ein Einfluss auf die Proteinexpression von CD33 auf AML-Zellen festgestellt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit trugen zu der Aufnahme von Hydroxyurea in das Studienprotokoll der klinischen Phase-I-Studie zu AMG330 (NCT02520427) mit bei, und es erfolgte eine Patentanmeldung für die Kombination von Hydroxyurea und den CD33/CD3 BiTE® für die Behandlung der AML.¹³⁹

Erstmals wurde gezeigt, dass ILT3, CD244 und CD48 abhängig von zytomorphologischen und zytogenetischen auf AML-Zellen exprimiert werden. Eine signifikant hohe ILT3-Expression konnte auf CD33+AML-Zellen der Monoblastenleukämie festgestellt werden. Eine hohe Expression des CD244-Proteins wurde auf Zellen sekundärer AML-Erkrankungen, AML mit minimaler Differenzierung und auf AML-Zellen mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen gemessen. Zytogenetische Aberrationen des Karyotypen gehören zu den wichtigsten krankheitsbezogenen Prognosefaktoren für die AML. In der Patientenkohorte zeigte sich eine signifikant hohe ILT3- und CD48-Proteinexpression auf CD33+AML-Zellen mit einem komplex aberranten Karyotyp, im Vergleich zu AML-Zellen mit anderen zytogenetischen Veränderungen bzw. einem normalen Karyotyp. Diese Assoziation mit ungünstigen zytogenetischen Veränderungen bestätigte sich im Vergleich der unterschiedlichen Risikogruppen gemäß des MRCs miteinander. In den molekulargenetischen Analysen konnte eine hohe Proteinexpression von ILT3 und CD48 auf CD33+AML-Zellen mit Mutationen im NPM1- und im FLT3-Gen festgestellt werden. Der ungünstige Einfluss der ILT3 und CD48-Proteinexpression konnte auch bei den Analysen des GSÜs und des RFÜs festgestellt werden. Die Proteinexpression von ILT3- und CD48 war assoziiert mit einem schlechteren klinischen Verlauf der AML.

V. 2. Einfluss zytoreduktiver Substanzen auf die CD33/CD3 BiTE® vermittelte Zytotoxizität

V. 2.1. Einfluss von Hydroxyurea auf die CD33/CD3 BiTE® vermittelte T-Zellfunktion und T-Zellproliferation

Krupka et al. (2014) hatten gezeigt, dass ein niedriges E:T Ratio zu einer Steigerung der Lysekinetik des CD33/CD3 BiTE® Antikörpers führt. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Cytarabin und Hydroxyurea auf T-Zellen *ex vivo* untersucht. Ziel der Untersuchungen war, eine Zytoreduktion zu identifizieren, die zytoreduktiv auf AML-Zellen wirkt, die T-Zellen jedoch nicht beeinträchtigt, um das E:T Ratio zu erhöhen und die CD33/CD3 BiTE® vermittelte Zytotoxizität zu steigern. Durch die verbesserte Effektivität des CD33/CD3 BiTE®s sollte eine verkürzte Anwendungsdauer erreicht und eine Reduktion des Nebenwirkungsprofils erzielt werden. Wir wählten für unsere Untersuchungen Cytarabin und Hydroxyurea aus, da beide Substanzen in der AML im klinischen Alltag zur Zytoreduktion eingesetzt werden, und die Substanzen sich in ihrem Wirkungsprofil und ihrer Zytotoxizität voneinander unterscheiden (s. Kapitel II. 2.2. Zytoreduktion und Behandlungsprotokoll).

Die Vorbehandlung mit Hydroxyurea führte zu keinem Funktionsverlust der HD T-Zellen *in vitro* im Vergleich zu unbehandelten HD T-Zellen. Bei Hydroxyurea Konzentrationen von bis zu 1000 µM konnten wir keine Beeinträchtigung der CD33/CD3 BiTE® - vermittelten Lyse der AML-Zellen feststellen. Für 1000 µM Hydroxyurea lag die durchschnittlich CD33/CD3 BiTE® - vermittelte Lyse der AML-Zellen noch bei >99%. Im Vergleich zu 100 µM und 10 µM Hydroxyurea wurde bei 1000µM eine höhere CD33/CD3 BiTE®-vermittelte Zytotoxizität beobachtet. Wobei es sich bei der Zunahme der Zytotoxizität um ein Artefakt handeln kann, die Fallzahlen unserer Versuche waren zu gering, um diese Frage beantworten zu können. Allerdings führte Hydroxyurea *in vitro* nach 72 h zu einer dosisabhängigen Beeinträchtigung der T-Zellproliferation im Vergleich zu unbehandelten HD T-Zellen. Der Einfluss von Hydroxyurea auf T-Zellen wurde bislang bei HIV und Sichelzellanämie und myeloproliferativen Erkrankungen untersucht. Benito et al. (2007) konnten bei HD T-Zellen von gesunden Spendern und bei T-Zellen von HIV-Patienten *in vitro* ebenfalls eine Dosis-abhängig verminderte T-Zellproliferation feststellen. Wie in unseren Untersuchungen auch zeigte sich bei Benito et al. (2007) kein signifikanter Einfluss auf die T-Zellfunktion.^{134 135} Target-Struktur von Hydroxyurea sind die Ribonukleotidreduktasen und weitere Metalloproteasen. Singh et al. (2016) konnten feststellen, dass zum Zeitpunkt der S-Phase im Zellzyklus die höchsten Level an Ribonuklotidreduktasen bestehen. Zellen in der S-Phase hatten eine höhere Hydroxyurea-Sensitivität im Vergleich zu anderen Zellzyklus-Phasen.¹⁵³ Eine Hypothese für den geringen Effekt von Hydroxyurea auf allogene HD-T-Zellen könnte sein, dass Tumorzellen durch

Mutationen im Bereich Zellzyklus-regulierender Gene (p53) aufgrund fehlender Checkpoint Kontrollen unkontrolliert proliferieren und gestörte S-Phasen haben.^{154 155} Dadurch könnten die höheren Level an Ribonukleotidreduktasen bzw. Metalloproteasen entstehen, die die Sensitivität der Zellen für Hydroxyurea erhöhen.

V. 2.2. Einfluss von Cytarabin auf die CD33/CD3 BiTE® - vermittelte T-Zellfunktion und T-Zellproliferation

Mit Cytarabin *in vitro* behandelte HD T-Zellen zeigten sowohl eine eingeschränkte T-Zellproliferation als auch eine deutlich verminderte CD33/CD3 BiTE®-vermittelte Lyse der AML-Zellen. Es wurde keine Korrelation zwischen der Konzentrationshöhe von Cytarabin und der Beeinträchtigung der HD T-Zellproliferation oder der CD33/CD3 BiTE®-vermittelten Lyse festgestellt. Aufgrund der schlechten Zellviabilität und der geringen Fallzahl ist die Aussagefähigkeit der Ergebnisse limitiert. *In vitro* Untersuchungen von Ersvaer et al. (2015) und Li W et al. (2013) zeigten ähnliche Ergebnisse für Cytarabin-Konzentrationen von 0,1-44µM *in vitro*. Die Behandlung mit Cytarabin führte ebenfalls zu einer Beeinträchtigung der T-Zellfunktion. Allerdings zeigten Ersvaer et al. (2015) eine Dosis-abhängig verminderte Viabilität der Zellen. In den Essays wurde eine Dosis-abhängig steigende Fraktion apoptotischer Zellen gemessen.^{112 113} Die für unsere Untersuchungen verwendeten T-Zellen wurden von vier unterschiedlichen Spendern gewonnen. Innerhalb der Spender unterschied sich die Wirkung von Cytarabin auf die T-Zellen. Das ist insofern interessant, als dass es für Cytarabin bis heute in der klinischen Anwendung noch eine große Breite an eingesetzten Konzentration gibt. Eine Ursache dafür ist auch, dass Patienten unterschiedlich auf Cytarabin ansprechen und Unterschiede in der Toxizität zu finden sind.^{113 114} Die Mechanismen für dieses Phänomen sind noch ungeklärt. Das Zytostatikum ist ein Analogon des Nukleosids Cytosin und kann statt Cytosintriphosphat in den DNA-Strang eingebaut werden. Cytarabin wird durch die Deoxycytidin-Kinase und andere Nukleotid-Kinasen zu einem Inhibitor der DNA-Polymerase metabolisiert. Der Abbau erfolgt über eine Pyrimidin-Nukleosid-Deaminase zu einem Uracil-Derivat. Es gibt *in vitro* Untersuchungen die nahelegen, dass das Gleichgewicht von beteiligten Kinasen und Deaminasen ein wichtiger Faktor in der Sensitivität der Effektor-Zellen für die Wirksamkeit von Cytarabin ist. Ein Ungleichgewicht könnte dazu führen, dass eine höhere Dosis von Cytarabin nicht automatisch zu einer größeren Menge des aktiven Metaboliten in der Zelle führt. Gati et al. (1997) diskutierten auch die unterschiedliche Expression von Transport-Molekülen hinsichtlich ihrer Ursächlichkeit für die unterschiedliche Wirkung von Cytarabin auf leukämische Zellen.^{108 109 110 111}

Um einen Methoden-Artefakt auszuschließen und den Einfluss unterschiedlicher Cytarabin-Konzentrationen weiter zu untersuchen, verglichen wir die einmalige Cytarabin-Gabe vs. der dreimaligen Cytarabin-Gabe (von 10µM, 20µM und 40µM). Wir konnten keinen Unterschied in der Zytotoxizität und Blastenlyse feststellen. Möglicherweise auch aufgrund der oben angeführten Gründe.

Die Untersuchung der autologen T-Zellen eines AML-Patienten, welcher zuvor Cytarabin in unserer Klinik erhalten hatte, zeigte eine zeitabhängig reversible T-Zellfunktion. Diese Reversibilität *in vitro* lässt annehmen, dass ein Regenerationsprozess nach der Cytarabin-Therapie stattfinden konnte. Bei diesen Beobachtungen ist aufgrund der eingeschränkten Fallzahl nur von einer begrenzten Aussagemöglichkeit auszugehen. Die Regeneration *in vitro* der T-Zellen innerhalb von Tagen ist interessant, der Zeitverlust im Hinblick auf eine geplante zytoreduktive Vorphase für den CD33/CD3 BiTE® Antikörper jedoch ungünstig.

V. 2.3. Einfluss von Hydroxyurea auf die Expression von CD33 auf AML-Zellen

In präklinischen Untersuchungen wurde der Einfluss der CD33-Expression auf die Wirkkinetik des CD33/CD3 BiTE®s. gezeigt. Die Rolle der Target-Expression wurde auch für andere (BiTE)-Antikörper-basierte Immuntherapien festgestellt. Aktuelle Daten zu Blinatumomab zeigen, dass die Target-Expression sich im Verlauf der Therapie ändern kann.¹⁵⁷ Für zytoreduktive Therapien wurden ebenfalls bereits immun-modulatorische Wirkungen beschrieben. Ein Einfluss von Hydroxyurea bzw. Cytarabin auf die CD33-Expression wäre im Hinblick auf eine nachgeschaltete CD33/CD3 BiTE® Anwendung ungünstig.

Wir konnten keinen Einfluss von Hydroxyurea auf die Expression von CD33 feststellen. Die Behandlung mit Hydroxyurea über 72 h zeigte weder für AML-Zelllinien noch für primäre AML-Zellen eine abhängige CD33-Expression. Der fehlende Einfluss von Hydroxyurea wurde unabhängig von der CD33 Ausgangs-Expressionshöhe und der eingesetzten Hydroxyurea-Konzentrationen festgestellt. Für MOLM und MV4-11 ist eine hohe Expression (SFI (CD33) 205 und 410) bekannt, während KG1a zu den CD33 schwächer exprimierenden Zelllinien gehört (SFI (CD33) 96,61). Es liegen keine vergleichbaren Untersuchungen vor, die den Einfluss von Hydroxyurea auf die CD33-Expression von CD33+AML-Zellen zeigen. Benito et al. (2007) zeigten *in vitro* für CD4+T-Zellen eine veränderte Expression von CD25, CD38 und CD69 in Abhängigkeit von der Hydroxyurea-Konzentration. Die T-Zellen wurden ebenfalls mit 10 µM, 100 µM und 1000 µM Hydroxyurea über 72 h inkubiert.¹²³ Die untersuchten Zellen entstammten gesunden Spendern und HIV-Patienten. Für beide Gruppen konnte - eine verminderte Expression von CD25 und CD38 sowie eine verstärkte Expression von CD69 festgestellt werden. Der Aktivierungsmarker CD69 war assoziiert mit einer gesteigerten T-

Zellfunktion. Lova et al. (2005) beschrieben neben der Dosis-abhängigen Beeinträchtigung der T-Zellproliferation ebenfalls eine verstärkte Expression von Aktivierungsmarkern auf CD4+ T-Zellen als auch eine verstärkte Sekretion von Zytokinen durch einzelne T-Zell-Subgruppen. Die Untersuchungen wurden jedoch ebenfalls mit T-Zellen von HIV-Patienten durchgeführt.¹⁴⁰ Sie lassen eine immunogene Wirkung von Hydroxyurea auf hämatopoetische Zellen vermuten. Wir nehmen an, dass die immunogene Wirkung von Hydroxyurea jedoch keinen Einfluss auf die Oberflächen-Expression von CD33 auf AML-Zellen hat.

V. 2.4. Einfluss von Cytarabin auf die Proteinexpression von CD33 auf AML-Zellen

Die starke Zytotoxizität von Cytarabin führte bei den AML-Zelllinien HL60, MOLM, PL21, OCI und MV4 ab einer Konzentration von 10 μM bereits zu einer Zell-Viabilität unter 30%. Aufgrund der von uns angewendeten Gating-Strategie wurden die Daten der Proteinexpression auf diesen Zellen nicht als valide gewertet, so dass keine Aussage über den Einfluss von Cytarabin auf die CD33-Expression von AML-Zelllinien getroffen werden kann. Im Unterschied zu AML-Zelllinien zeigten primäre AML-Zellen *in vitro* nach 72-stündiger Cytarabin-Behandlung eine Zell-Viabilität von >30%. Auf den primären AML-Zellen konnte kein Unterschied in der CD33-Expression festgestellt werden. Der fehlende Einfluss war unabhängig von der Ausgangs-Expression von CD33 auf den Zellen und unabhängig von der Cytarabin-Konzentration. Dass Cytarabin eine immunogene Wirkung auf AML-Zellen hat, zeigten Yang et al. (2009). *In vitro* führte die Cytarabin-Gabe zu einer verstärkten Expression von Mitgliedern der B7 Familie (CD80, CD86) auf K562-Zellen. In der Literatur gibt es deutliche Unterschiede der eingesetzten Cytarabin-Konzentration, bei denen eine veränderte Protein-Expressionen gefunden wurde. So beobachteten Yank et al. (2009) eine veränderte Proteinexpression bei Konzentrationen von 0,25 μM , Ersvraer et al. (2015) bei Cytarabin-Konzentrationen von 44 μM .^{134 129} In einem C1498-Mausmodell zeigten Gibbins et al. (2014) auf CD8+ und CD4+ T-Zellen nach 3 mg Cytarabin eine verstärkte CD44-Expression. Die Untersuchungen wurden mit der AML-Zelllinie C1498 durchgeführt, die in C57BL/6 Mäuse vakziniert wurde.¹³³

V. 3. Analyse der Expression von ILT3, CD48 und CD244 auf CD33+ AML-Zellen

V. 3.1. Diskussion der Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurde die Proteinexpression von ILT3, CD244 und CD48 in einer Patientenkohorte bestimmt. Die Messung der Proteinexpression erfolgte auf Proteinebene bei 211 AML-Patienten mittels Durchflusszytometrie. Um den Zusammenhang der Proteinexpression zu untersuchen, wurden demographische (Alter, Geschlecht) und krankheitsbezogene Daten (Zytomorphologie, Zytogenetik, Molekulargenetik und Krankheitsverlauf) erhoben und ausgewertet. Die Messung der Proteinexpression erfolgte stets zum gleichen Zeitpunkt, AML-Erstdiagnose bzw. der AML-Rezidivdiagnose, so dass vergleichbare Bedingungen zwischen den beiden Gruppen gewährleistet waren. Allerdings bestand ein deutlicher Unterschied zwischen der Fallzahl von Erstdiagnose und Rezidiv (ILT3 n=49; CD244 n=29; CD48 n=26 vs. AML-Erstdiagnosen ILT3 n=153; CD244 n=162 CD48 n=145). In der Gruppe der AML-Erstdiagnosen wurden für die CD244- und CD48-Proteinexpression sechsmal so viele Patienten untersucht. Die geringe Fallzahl war für die Subgruppenanalysen von Nachteil bzw. führte zu eingeschränkt aussagefähigen Ergebnissen. Anzumerken ist, dass Patienten mit einer akuten Promyelozytenleukämie (APL) nicht in die Analysen einbezogen wurden, da es für den Vergleich der klinischen Verlaufsdaten wichtig war, dass die AML-Patienten vergleichbar behandelt wurden. Davon wurde ausgegangen, da alle Patienten mit einer AML-Erstdiagnose im Rahmen von Studien der AMLCG-Studiengruppe (n=112) bzw. nach deren Therapieempfehlung (n=50) behandelt wurden. Bei AML-Rezidivkrankungen konnte die Wahl der Salvage-Chemotherapie bis auf Einzelfälle nicht erhoben werden: 10 AML-Patienten erhielten eine Stammzelltransplantation, bei 10 Patienten lagen keine Daten zur Salvagetherapie vor und 29 Patienten erhielten während des Beobachtungszeitraums eine Salvage-Chemotherapie.

V. 3.2. Proteinexpression von ILT3, CD244 und CD48 auf CD33+AML-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Proteinexpression von ILT3, CD244 und CD48 zum Zeitpunkt der AML-Erstdiagnose und zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose durchflusszytometrisch bestimmt. In unserer Kohorte wurde die ILT3-Proteinexpression in 60% aller AML-Patienten festgestellt. Wie in unseren Subgruppenanalysen konnten Dobrowolska et al. (2012) eine ILT3 Expression von 100% auf monozytären myeloiden AML-Zellen zeigen.¹⁴¹ De Goje et al. (2015) untersuchten die ILT3-Expression auf Zellen von NSCLC-Patienten. Die Proteinexpression lag bei Goje et al. deutlich über der von uns

gefunden ILT3-Expression: medianer SFI (ILT3) 7,399 vs. medianer SFI (ILT3) 3,139. Gründe dafür können die unterschiedliche Herkunft der Zellen, und Unterschiede in den durchflusszytometrischen Analysen sein. De Goje et al. (2015) verglichen die ILT3-Expression zusätzlich mit der ILT3-Expression auf gesunden myeloischen Zellen und fanden eine signifikant höhere Expression auf den malignen Zellen.⁷⁶

Für CD244 wurden im Vergleich zu ILT4 und CD48 die höchsten Expressionslevel festgestellt (medianer SFI(CD244)18,49 vs. ILT3 (medianer SFI(ILT3) 3,14 vs. CD48 medianer SFI (1,63)). Wir verglichen die CD244-Expression nicht mit gesunden Zellen, jedoch mit der Expression der koregulatorischen Oberflächen-Proteine CD48, ILT3, ILT4, TIM3 und CD86, die ebenfalls auf CD33+AML-Zellen exprimiert werden. Hier zeigte sich für CD244 ebenfalls die höchste Proteinexpression. Das CD244-Protein wurde bei 97% der Patienten exprimiert und hatte damit die höchste Expressions-Frequenz. Kiel et al. (2005) zeigten die Expression von CD244 und CD48 ebenfalls auf leukämischen Progenitorzellen (MPPs). Die Frequenz von CD244 wurde jedoch nicht bestimmt.¹⁴² Oguro et al. (2013) untersuchten den CD48- und CD244-Status (und weitere Marker der SLAM-Familie) um MPPs in Subgruppen einteilen zu können. Eine positive CD244- und CD48-Expression fand sich auf hämatopoetische Stammzellen und ebenfalls auf MPPs.¹⁴³

Lewis et al. (2016) zeigten für Patienten mit einem Multiplen Myelom in 90% eine CD48 Proteinexpression auf malignen Plasma-Zellen (90/100 Patienten).¹⁴⁴ Elias et al. (2014) konnten bei AML-Zellen mit den Translokationen PML-RARA und AML1-ETO eine verminderte CD48-Expresison im Vergleich zu AML-Zellen ohne die Translokationen feststellen. Diese Ergebnisse zeigten sich in unserer Subgruppenanalyse nicht reproduzierbar.

In dieser Arbeit wurde erstmals die Proteinexpression auf AML-Zellen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose mit dem der Rezidivdiagnose verglichen. Im Vergleich der beiden Gruppen konnten wir keine Unterschiede der Proteinexpression finden. Dobrowolska et al. (2013) konnten *in vitro* ebenfalls eine konstitutive ILT3-Expression auf monozytären myeloiden Zellen von Patienten mit einer therapieresistenten oder rezidierten AML-Erkrankung feststellen.¹⁴¹ Wir konnten für acht Patienten die Marker im Verlauf zu unterschiedlichen Zeitpunkten messen. Bei diesen Patienten wurde eine verminderte ILT3- und CD48 Proteinexpression zum Zeitpunkt des Rezidivs gefunden. Da der Vergleich unzusammenhängender Stichproben von AML-Patienten mit einer Erstdiagnose vs. Rezidiv jedoch keinen Unterschied für die Expression der drei Marker ergeben hatte, kann es sich bei der verminderten ILT-3 und CD48-Expression aufgrund der limitierten Fallzahl auch um „Ausreißer“ handeln.

V. 3.3. Zytokin-abhängige Proteinexpression von LAG3, HVEM und ILT3

Proinflammatorische Zytokine können zu einer veränderten Expression von Immun-Checkpoints führen. Krupka et al. (2016) zeigten *in vitro* für primäre AML-Zellen, dass die CD33/CD3 BiTE® - vermittelte T-Zellaktivierung über die Freisetzung von Zytokinen zu einer verstärkten Expression von PD-L1 führen kann. Dabei waren die Zytokine Interferon- γ (IFN γ) und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF α) verantwortlich für die veränderte Proteinexpression. Die zusätzliche Blockade der PD-1/PD-L1-Interaktion führte zu einer verstärkten CD33/CD3 BiTE®- Antikörper vermittelten Lyse als auch zu einer verstärkten T-Zellproliferation.⁶⁰ In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von IFN γ und TNF α für die Expression weiterer koregulatorischer Oberflächenproteine untersucht. Wir wählten ILT3, HVEM und LAG3 aufgrund ihrer - bereits beschriebenen - prognostischen Relevanz für die AML. Unsere Untersuchungen zeigten eine induzierbare Expression von LAG3- und HVEM auf CD33+AML-Zellen sowohl auf AML-Zelllinien als auch auf CD33+ primären AML-Zellen. Für ILT3 konnte kein Unterschied der Expression nach der Zytokin-aktivierung festgestellt werden.

Für **LAG3** konnten wir die höchsten Zytokin-abhängigen Expressionsunterschiede feststellen. Im Unterschied zu *AML-Zelllinien* beobachteten wir für primäre CD33+AML-Zellen *in vitro* einen geringeren Einfluss von TNF α und IFN γ auf die Proteinexpression. Aufgrund der limitierten Fallzahlen (n=10 und n=3) müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden um unsere Ergebnisse zu validieren. Unsere Daten zeigen aber, dass LAG3 auf CD33+AML-Zellen exprimiert werden kann, nicht nur auf T-Lymphozyten. Untersuchungen in der Arbeitsgruppe von Frau Professor Subklewe zu der LAG3-Expression hatten im Vorfeld gezeigt, dass LAG3 auf CD3+ T-Zellen von Patienten mit einem AML-Rezidiv exprimiert wird. Bankey et al. (2010) konnten die Zytokin-abhängige LAG3-Expression auf Neutrophilen feststellen.¹⁴⁶ Nguyen et al. (2015) und Huang et al. (2015) konnten ebenfalls ein Zytokin-abhängige Expression von LAG3 *in vitro* zeigen. In ihren Untersuchungen konnte durch die Blockade von LAG3 und PD-1 eine signifikant verbesserten T-Zell-Effektor-Funktion erzielt werden, was ein verzögertes Tumorwachstum zur Folge hatte.^{145 147}

Für **HVEM** wurde in der Literatur eine konstitutive Expression auf nicht aktivierten B- und T-Lymphozyten beschrieben. Im Vergleich zu anderen koregulatorischen Proteinen wird HVEM auf der Oberfläche von AML-Zellen eher schwach exprimiert.⁸⁰ Für HVEM wurde in unseren Untersuchungen für alle untersuchten AML-Zelllinien eine induzierbare Expression nach 24-stündiger Zytokin-Aktivierung festgestellt. Diese zeigte sich unabhängig vom Ausgangswert der CD33-Proteinexpression. Für primäre AML-Zellen wurde ebenfalls ein geringerer Zytokin-

Einfluss festgestellt. Aufgrund der geringen Fallzahl kann hier nur von einer begrenzenden Aussagefähigkeit ausgegangen werden. Es liegen keine vergleichbaren Untersuchungen vor.

Für **ILT3** wurde, im Unterschied zu LAG3 und HVEM, kein Einfluss der Zytokin-Stimulation auf die Proteinexpression festgestellt, weder auf AML-Zelllinien noch auf primären AML-Zellen. Andere Studien zeigten eine induzierbare Expression von ILT3. Allerdings handelte es sich bei den Stimulanzen nicht um die von uns eingesetzten Zytokine und nicht um CD33+AML-Zellen. Brenk et al. (2009) beobachteten auf DZs - verursacht durch einen Mangel an Tryptophan - eine verminderte Proteinexpression.¹⁴⁸ Stallone et al. (2014) beobachteten ebenfalls eine induzierbare Proteinexpression von ILT3 nach Gabe von Rapamycin, einem Immunsuppressivum.¹⁴⁹¹⁴³ Dobrowolska et al. (2013) zeigten für maligne Zellen von NSCLC-Patienten mit einer positiven ILT3-Expression - im Unterschied zu ILT3 negativen Zellen - eine Interaktion mit T-Zellen, die zu einer verminderten Produktion von IFN γ , IL-2, Granzym-B und Perforin führte.¹⁴¹

V. 3.4. Korrelation der Proteinexpression von ILT3, CD244 und CD48 mit krankheitsbezogenen Daten

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Korrelationsanalysen mit krankheitsbezogenen Daten (Zytomorphologie, Zytogenetik und Molekulargenetik) diskutiert. In den Analysen konnte keine Korrelation der Proteinexpression mit demographischen Variablen (Alter, Geschlecht) festgestellt werden. Zu dieser Fragestellung liegen aktuell keine Vergleichsdaten vor. Da in unsere Auswertung 162 Proben von AML-Patienten eingeschlossen wurden, kann hier von einer repräsentativen Aussage ausgegangen werden.

V. 3.4.1. Die ILT3- und CD244-Expression ist assoziiert mit zytomorphologischen Subgruppen der AML

Um den Zusammenhang zwischen der Proteinexpression und zytomorphologischen Veränderungen zu untersuchen, wurde die Expression innerhalb der einzelnen FAB-Subtypen miteinander verglichen. CD33+ AML-Zellen von Patienten mit einer Monoblasten-Leukämie (FAB M5) zeigten höhere ILT3- und verminderte CD244-Expressionslevel im Vergleich zu den anderen Subgruppen. Auf CD33+ AML-Zellen mit minimaler Differenzierung (FAB-M0), sowie auf Zellen sekundärer AML-Erkrankungen ergaben unsere Analysen eine signifikant hohe CD244-Expression. Die erhöhte ILT3-Expression auf monozytären AML-Zellen wurde auch

bei den morphologischen Untersuchungen von Dobrowolska et al. (2013) gefunden.¹⁴¹ Für CD244 und CD48 wurde die Proteinexpression auf AML-Zellen erstmalig mit zytomorphologischen Subgruppen untersucht.

V. 3.4.2. Die Proteinexpression von ILT3 CD244 und CD48 ist assoziiert mit ungünstigen zytogenetischen Aberrationen

Bei AML-Patienten der Subgruppe mit Myelodysplasie-assoziierten Eigenschaften wurde eine hohe CD244-Expression auf CD33+AML-Zellen gefunden. In der Literatur umfasst diese Subgruppe 25-35% aller AML-Patienten.¹⁵⁸ Wir konnten bei unserer Patientenkohorte bei 27% der Patienten einen solchen Subtyp finden. Aktuelle Daten zeigen, dass Patienten mit einer AML mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen insgesamt älter (>60 Jahre) sind und ein kürzeres Gesamtüberleben haben.¹⁵⁸ In unseren Untersuchungen konnten wir keine Assoziation mit dem Alter oder dem Gesamtüberleben feststellen. Für die AML mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen wurden spezifische MDS-assoziierte Genmutationen wie SRSF2 identifiziert.¹⁵⁸ In unseren Untersuchungen wurden diese Mutationen nicht untersucht, aber es wurde für das CD244-Protein keine Korrelation mit den für die De-novo AML typischen Mutationen (NPM1, ITD FLT3) gefunden.

Für ILT3 und CD48 konnten keine Unterschiede in der Expression zwischen den einzelnen WHO-Subgruppen gefunden werden. Elias et al. (2014) hatten für AML-Zellen mit den Translokationen t(15;17) (q24;q21), t(8;21)(q22;q22) eine verminderte CD48-Expression gefunden.¹⁴⁴ Diese Veränderungen gehören zu der Subgruppe der rekurrenten genetischen Aberrationen. Wir konnten in dieser Subgruppe keine verminderte CD48-Expression finden. Unter den zytogenetischen Aspekten stellt der Karyotyp der Leukämiezellen derzeit einen der wichtigsten Prognoseparameter der AML dar (s. Kapitel I 1.2. Risikofaktoren und Pathogenese). Ein komplex aberranter Karyotyp gehört zu den ungünstigen zytogenetischen Veränderungen gemäß der MRC-Klassifikation. Unsere Korrelationsanalysen zeigten für AML-Zellen mit komplex verändertem Karyotyp eine signifikant höhere ILT3-Expression im Vergleich zu Zellen mit normalem Karyotyp. Bei dem Vergleich der Marker-Expression zwischen den einzelnen MRC-Risikogruppen konnte ebenfalls eine erhöhte ILT3- als auch eine erhöhte CD48-Expression für Patienten mit einem ungünstigen Risiko gefunden werden. Diese Assoziation der Proteinexpression mit ungünstige Veränderungen konnte auch in einem verkürzten Überleben der Patienten festgestellt werden. Die Daten zeigen für die ILT3- und CD48-Proteinexpression insgesamt einen ungünstigen Einfluss für die AML.

V. 3.4.3. Die Proteinexpression von ILT3, CD244 und CD48 ist assoziiert mit ungünstigen molekulargenetischen Veränderungen

In dieser Arbeit wurde der Mutationstatus der Gene NPM1, FLT3 und CEBPA erhoben und erstmals mit der Proteinexpression von ILT3, CD244 und CD48 korreliert. Innerhalb der Patientenkohorte wurde bei 40 (24%) Patienten eine ITD im Bereich des FLT3-Gens, und bei 49 (32%) Patienten Mutationen im Bereich des NPM1-Gens gefunden. Diese Ergebnisse entsprechen der Häufigkeit der in der Literatur angegebenen Mutationen.¹⁵⁶ Bei Patienten mit der Kombination einer NPM1 Mutation und einem FLT3-Wildtyp – wurde eine signifikant höhere ILT3-Proteinexpression - und bei Patienten mit einer ITD im FLT3-Gen und NPM1-Wildtyp eine hohe CD48-Proteinexpression auf den CD33+AML-Zellen gefunden. Die Assoziation zwischen ILT3-Proteinexpression und NPM1-Mutation waren überraschend, da die Konstellation einer NPM1-Mutation in Kombination mit einem FLT3-Wildtyp und normalem Karyotyp aktuell gemäß der ELN-Klassifikation als günstig eingestuft wird. Im Vergleich der einzelnen ELN-Risikogruppen miteinander zeigte sich jedoch eine signifikant hohe ILT3-Expression für Patienten mit einem ungünstigen Risiko. Die Assoziation mit ungünstigen Veränderungen konnten wir auch bei zytogenetischen Untersuchungen und unseren Überlebenszeitanalysen feststellen.

Die ITDs gelten prognostisch als ungünstig, für CD48 wurde bei AML-Patienten mit einem ungünstigen Risiko gemäß des MRCs ebenfalls eine signifikant hohe Proteinexpression gefunden und ein schlechteres Rezidivfreies Überleben.

V. 3.5. Die ILT3- und CD48-Expression ist assoziiert mit einem ungünstigen Verlauf der AML

Bei Betrachtung der Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass aufgrund der unterschiedlichen Zeitpunkte der AML-Erstdiagnosen die Beobachtungszeit der einzelnen Patienten große Unterschiede aufwies. Die mittlere Beobachtungszeit lag bei 354 Tagen. Aus diesem Grund sind die Überlebenszeitanalysen nur eingeschränkt valide. Es kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, ob weitere Faktoren, die in unserer Arbeit nicht berücksichtigt wurden, das RFÜs und das GÜs beeinflusst haben. In der Arbeit wurden die Überlebenszeitanalysen auf Patienten mit erreichter CR beschränkt. Dies führte zu einer Präselektion der ausgewerteten Patientenkohorte und zu kleineren Subgruppen.

Wie bereits beschrieben konnten wir eine Assoziation der ILT3- und CD48-Proteinexpression mit ungünstigen Faktoren (komplex aberranter Karyotyp, Mutationen im NPM1- und FLT3-Gen, ungünstiges Risiko gemäß MRC) feststellen, welche sich auch in den Überlebensanalysen zeigte. Ein besonders schlechtes RFÜ wurde bei Patienten mit SFI-

Werten > des Median-Werts gefunden. Wir hatten bei Patienten mit einer AML mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen eine hohe CD244-Expression auf CD33+AML-Zellen festgestellt, jedoch keinen Einfluss auf das RFÜ finden.

Im Hinblick auf das GÜ der Patienten bestätigte sich der negative Einfluss für die positive ILT3-Expression. Im Unterschied zu der negativen Korrelation zwischen ILT3-Expressionshöhe und RFÜ konnte aber kein Einfluss der Expressionshöhe auf das GÜ festgestellt werden. De Goje et al. (2015) konnten für die ILT3-Proteinexpression auf malignen Zellen von NSCLC-Patienten ebenfalls eine Assoziation zwischen der Proteinexpression und dem GÜ zeigen. Im Vergleich von Patienten mit einer ILT3^{high} - vs. ILT3^{low} - Expression beobachteten de Goje et al. (2015) ein signifikant schlechteres GÜ ($p=0.023$).¹⁵⁰

V. 3.6. Die Zusätzliche Blockade von ILT3 und HVEM hat keinen Einfluss auf die CD33/CD3 BiTE® Antikörper vermittelte Blastenlyse und T-Zell-Proliferation

Die zusätzliche Blockade von PD-1/PDL-1 zu AMG 330 hatte in der präklinisch eine verbesserte BiTE-vermittelte Zytotoxizität gezeigt.⁶⁰ Auf der Suche nach weiteren geeigneten Target-Strukturen wurden in dieser Arbeit der Effekt der zusätzlichen Blockade von ILT3 und HVEM auf die CD33/CD3 BiTE® -vermittelte Zytotoxizität untersucht. Für ILT3 entschieden wir uns aufgrund seiner bekannten inhibitorischen Funktion und der prognostischen Relevanz, die unsere Expressionsanalysen ergeben hatten (s.Kapitel I. 1.6. Immun-Kontrollpunkte der AML). HVEM wurde aufgrund der von Lichtenegger et al. (2015) gefundenen prognostischen Relevanz und der in dieser Arbeit festgestellten Zytokin-abhängigen Expression ausgewählt.

80

Für die zusätzliche Blockade von ILT3, ebenso für die zusätzliche Blockade von HVEM konnte in unseren Untersuchungen kein Vorteil gefunden werden. Es wurde kein Unterschied in der CD33/CD3 BiTE® - vermittelten Blastenlyse oder in der T-Zellproliferation festgestellt. Diese Ergebnisse zeigten sich *in vitro* sowohl auf AML-Zelllinien als auch auf primären CD33+AML-Zellen. Für die zusätzliche Blockade von ILT3 zeigte sich bei primären leukämischen Zellen an d5 eine verbesserte Zytotoxizität ($p=0,0358$). Aufgrund der geringen Fallzahl ($n=3$) kann es sich hierbei jedoch um ein zufälliges Ereignis handeln, da wir an d7 keinen Unterschied mehr feststellen konnten. Unsere Titrierungsversuche ergaben, dass eine Konzentration des Anti-ILT3-Antikörpers von $0,125 \mu\text{G}/1 \times 10^2/\text{ml}$ Zellen nötig ist, um ILT3 vollständig zu blockieren. Diese Konzentration lag unterhalb der vom Hersteller angegebenen Konzentration $1\text{mg}/\text{ml}$. Die ILT3-Expression lag für die verwendeten AML-Zelllinien zwischen SFI (ILT3)-

Werten von 119 und 175 für primäre AML-Zellen lagen die SFI (ILT3)-Werte zwischen 19,50 und 42,54. Interessanterweise zeigten die Proben der drei Patienten jedoch eine negative Korrelation zwischen ILT3-Expression und der Zellzahl der AML-Zellen (SFI (ILT3) 19,5 - 35,37 - 42,54 vs. Blasten-Anteil in % 92,2 - 87,4 - 81,7; Spearman Korrelationskoeffizient (rs) 0,33). Aufgrund unserer statistischen Analysen konnten wir für die Spender der hier verwendeten Proben überprüfen, ob diese zu der Gruppe mit positiver ILT3-Expression und ungünstigem Verlauf gehörten. Für keinen der drei Patienten konnten wir diese Korrelationen finden. Insofern kann es sich bei diesen Ergebnissen bei den drei Patienten auch um „Ausreißer“ handeln. Im Unterschied zu unseren Ergebnissen hatten Suci-Foca et al. (2007) gezeigt, dass durch die Blockade von ILT3 *in vitro* der inhibitorische Einfluss von ILT3 auf T-Zellen aufgehoben werden kann. In einer Kokultur mit T-Zellen führte die Blockade des ILT3-Rezeptors (1µg/well) auf APZ zu einer verbesserten T-Zellproliferation und zu einer verbesserten T-Zellaktivierung. Die gesteigerte T-Zellaktivität wurde ebenfalls in einem Mausmodell für maligne Zellen von Melanom, Kolonrektumkarzinom, und Pankreaskarzinomen festgestellt. Bei dem blockierten ILT3-Protein handelte es sich jedoch um die lösliche Form des Proteins.¹⁵¹

Für die zusätzliche HVEM-Blockade konnte ebenfalls kein Einfluss auf die BiTE-vermittelte Zytotoxizität gefunden werden. Dieses Ergebnis zeigte sich unabhängig von der HVEM-Expression auf den AML-Zellen. Alle drei AML-Proben exprimierten HVEM auf ihrer Zelloberfläche (SFI (HVEM) 1,72 vs. 2,2 vs. 3,4). Man könnte den fehlenden Erfolg der HVEM-Blockade im Hinblick auf die von Lichtenberger et al. (2015) beschriebene Funktion von HVEM als weiteren Beleg dafür sehen, dass die Blockade eines Aktivierungsmarkers nicht zu einer verbesserten T-Zellaktivierung und T-Zellproliferation führt. Del Rio et al. (2016) konnten eine Abnahme der T-Zellproliferation und der T-Zelldifferenzierung durch die Blockade von LIGHT, einem Liganden von HVEM, zeigen.¹⁵² Weitere Untersuchungen mit höheren Fallzahlen müssten durchgeführt werden, damit die Ergebnisse unserer Arbeit überprüft werden können.

VI. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung von Cytarabin und Hydroxyurea auf T-Zellen untersucht. Ziel war die Identifizierung einer geeigneten Substanz, die zytoreduktiv auf AML-Zellen wirkt, ohne die T-Zellfunktion zu beeinträchtigen. Hydroxyurea zeigte unabhängig von der gewählten Konzentration keinen negativen Einfluss auf CD3+ HD-T-Zellen *in vitro* (T-Zellproliferation: UT 76.2% vs. 10 μ M 74% vs. 100 μ M 73.83% vs. 1000 μ M 70.5%, AMG330 vermittelte Lyse der HL60-Blasten: UT 99.4% vs. 10 μ M 93.21% vs. 100 μ M 95.789% vs. 1000 μ M 99.78%). Die Ergebnisse trugen zu der Aufnahme von Hydroxyurea in das Studienprotokoll der klinische Phase-I-Studie von AMG 330 (NCT02520427) bei. Im Hinblick auf weitere Immun-Kontrollpunkte wurden auf CD33+AML-Zellen die Proteinexpression von ILT3, CD244 und CD48 untersucht, welche konstitutiv exprimiert werden. Eine positive Expression von ILT3 wurde bei 63% (medianer SFI(ILT3) 3,139; n=153), für CD244 bei 97,4 % (medianer SFI(CD244) 19,2; n=162) und von CD48 bei 59,3 % (medianer SFI(CD48)1,8; n=145) der AML-Patienten mit einer Erstdiagnose festgestellt. Die Proteine zeigten sich im Verlauf der Erkrankung konstitutiv exprimiert, es wurden keine signifikanten Unterschiede in der Expression zum Zeitpunkt des Rezidivs festgestellt. Zytokin-vermittelt induzierbar auf CD33+AML-Zellen zeigten sich *in vitro* die Proteine LAG3 und HVEM ($p=0.0313$ und $p=0.0313$). Erstmals wurde gezeigt, dass die Proteinexpression von ILT3, CD244 und CD48 mit zytomorphologischen, zyto- und molekulargenetischen Veränderungen auf CD33+AML-Zellen assoziiert ist. Für Patienten mit einer Monoblastenleukämie wurde eine signifikant hohe ILT3 - Proteinexpresison ($p=0,01$) und für Patienten der WHO-Subgruppe AML mit Myelodysplasie-assoziierten Eigenschaften eine hohe CD244-Proteinexpression ($p=0,026$) auf den CD33+AML-Zellen festgestellt. Unsere Untersuchungen ergaben, dass die zytogenetisch ungünstige Veränderung eines komplex aberranten Karyotyps assoziiert ist mit einer hohen ILT3- und CD48-Proteinexpression ($p=0,0027$ und $p=0,02$). Die Korrelation molekular-genetischer Veränderungen mit der Proteinexpression zeigte für die ITD im FLT3-Gen eine hohe CD48-Proteinexpresison ($p=0,007$). Im Vergleich der einzelnen Risikogruppen gemäß des MRCs konnte die Assoziation der ILT3- und CD48-Proteinexpression mit einem ungünstigen Risiko ($p=0,05$ und $p=0,011$) ebenfalls festgestellt werden. Der ungünstige Einfluss der ILT3 und CD48-Proteinexpression bestätigte sich auch in unseren Analysen des RFÜ ($p=0,028$ und $p=0,035$) und des GÜs ($p=0,028$).

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Koregulatorische Interaktionen zwischen T-Zellen und Antigenpräsentierenden Zellen (APC). Chen L, 2013 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3786574/figure/F1/ (Stand 06. 06. 2016)11
Abb. 2 Prinzip der CD33/CD3 BiTE® - vermittelten Lyse von AML Zellen. (Krupka C, 2015, http://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/news/aml/bite/ ; Stand 24. 05. 2016)29
Abb. 3 Einfluss von Cytarabin (10-40 µM) auf die CD33/CD3 BiTE® - vermittelte Lyse von AML-Zellen und T-Zellproliferation (A - D)30
Abb. 4 Die T-Zellproliferation <i>ex vivo</i> reversibel nach drei Chemotherapie-freien Tagen (A und B) und nach sechs Chemotherapie-freien Tagen (C-D)32
Abb. 5 Einfluss von Hydroxyurea (10µM;100µM und 1000 µM) auf die CD33/CD3 BiTE® -vermittelte Lyse von AML-Zellen (A und C) und T-Zellproliferation (B)33
Abb. 6 Einfluss von Hydroxyurea (A und C) und Cytarabin (B und D) auf die CD33-Proteinexpression auf primären AML- Zellen <i>ex vivo</i> . SFI (CD33) Werte (A und B) und CD33 Fold change (C und D)34
Abb. 7 Proteinexpression von ILT3 (A), CD244 (B) und CD48 (C) <i>ex vivo</i> auf CD33+AML-Zellen von AML-Patienten mit einer Erstdiagnose37
Abb. 8 Einfluss von TNFα und INFγ auf die LAG3-Proteinexpression auf AML-Zelllinien (A) und primären AML-Zellen (B)38
Abb. 9 Einfluss der von TNFα und IFNγ auf die HVEM-Proteinexpression auf (A) AML-Zelllinien und (B) primären AML-Zellen39

Abb. 10 Vergleich der ILT3, CD48 und CD244-Expression von AML-Zellen bei Erstdiagnose und Rezidiv. Ungepaarter AML-Patienten Subgruppen-Vergleich (A, C und E) und bei 8 Patienten Vergleich der Proteinexpression im Verlauf der Erkrankung (B, D und F)40
Abb. 11 Korrelation der Proteinexpression von ILT3 und CD244 mit morphologischen (A und B), zytogenetischen, (C und D) Veränderungen42
Abb.12 Proteinexpression von ILT3 (A und C) und CD48 auf (B) auf AML-Zellen unterschiedlicher zytogenetischer Risikogruppen (MRC)43
Abb. 13 Rezidivfreies Überleben (RFÜ) von AML-Patienten mit ILT3-Proteinexpression (A, B, und C)46
Abb. 14 Rezidivfreies Überleben (RFÜ) von AML-Patienten mit CD48-Proteinexpression (A, B, und C)46
Abb. 15 Gesamtüberleben (RFÜ) von AML-Patienten mit ILT3-Proteinexpression (A und B). Vergleich des Gesamtüberlebens von Patienten mit einem ungünstigen Risiko (gemäß MRC) und ILT3 ^{high} -Expression vs. ILT3 ^{low} -Expression (B und C)49
Abb. 16 Effekt der Blockade des ILT3-Proteins auf die CD33/CD3 BiTE® vermittelte Lyse von AML-Zellen Blasten (A-E)51

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. WHO-Klassifikation 2008 (Döhner H, et al. 2010. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults)5
Tabelle 2. FAB Klassifikation5
Tabelle 3. ELN-Klassifikation (Döhner H, et al., 2010, Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults)5
Tabelle 4. MRC-Klassifikation (Döhner H, et al., 2010, Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults)5
Tabelle 4. Charakteristika der Patienten für ILT3 die – Proteinanalyse36
Tabelle 5. Charakteristika der Patienten für die CD244 – Proteinanalyse36
Tabelle 6. Charakteristika der Patienten für die CD48 – Proteinanalyse36

Abstracts und Poster-Präsentationen

- 2015 **DGHO - Jahrestagung, Basel**
“CD33 - BiTE® antibody construct mediated lysis of AML cells in vitro is influenced by the choice of pretherapeutic cytoreductive agent”
 F. Brauneck, C. Krupka, FS. Lichtenegger, P. Kufer, R. Kischel, G. Zugmaier, T. Köhnke, T. Altmann, S. Schneider, M. Fiegl, K. Spiekermann, W. Hiddemann, M. Subklewe .
- 2014 **56th ASH Annual Meeting, San Francisco**
„Hydroxyurea is most suitable for cytoreduction of AML prior to CD33/CD3 bispecific antibody therapy in AML: uncompromised T cell proliferation ex-vivo and CD33 upregulation on AML cells“
 C. Krupka, F. Brauneck, P. Kufer, R. Kischel, G. Zugmaier, F. Lichtenegger, T. Köhnke, T. Altmann, S. Schneider, M. Fiegl, K. Spiekermann, A. Sinclair, K. Newhall, PA. Baeuerle, W. Hiddemann, G. Riethmüller, M. Subklewe.
- 2014 **DGHO - Jahrestagung, Hamburg**
„Potential relevance of coinhibitory molecules for immunotherapy of AML“
 F. Brauneck, FS. Lichtenegger, C. Krupka, I. Kondla, K. Spiekermann, W. Hiddemann und M. Subklewe.
- 2014 **16. Wissenschaftliches Symposium der Medizinischen Klinik III
 Klinikum der Ludwig - Maximilians - Universität, München**
„Coinhibitory expression profiling of AML blasts at primary diagnosis and in relapse“
 F. Brauneck, I. Kondla, M. Krempasky, A.-L. Weber, S. Schneider, K. Spiekermann, W. Hiddemann, F.S. Lichtenegger und M. Subklewe.

Quellenverzeichnis

- ¹ Lichtenegger FS, et al. Immunotherapy for Acute Myeloid Leukemia. *Semin Hematol.* 2015. 52: 207-14.
- ² Spiekermann K, Akute myeloische Leukämie. In: Spiekermann K, et al. *Leukämien, myelodysplastische und myeloproliferative Syndrome - Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge.* 4. Auflage. Zuckschwerdt Verlag. 2015. S. 19.
- ³ Kroschinsky F, Wandte H, Definition der akuten myeloischen Leukämie. In: Ehninger G (Ed). *Akute myeloische Leukämie - Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie, Prognose.* Köln: Deutscher Ärzte-Verlag. 2008. <http://www.onkodin.de/e2/e51675/e53188/e53739/>.
- ⁴ Schaich M, Epidemiologie. In: Ehninger G (Ed). *Akute myeloische Leukämie - Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie, Prognose.* Köln: Deutscher Ärzte-Verlag. 2008. <http://www.onkodin.de/e2/e51675/e53188/e53739/>.
- ⁵ Giagounidis AAN, Sekundäre akute myeloische Leukämie. In: Ehninger G (Ed). *Akute myeloische Leukämie - Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie, Prognose.* Köln: Deutscher Ärzte-Verlag. 2008. <http://www.onkodin.de/e2/e51675/e52389/e52390/>.
- ⁶ Baldur CD, Thiele E, Immunphänotypisierung. In: Ehninger G (Ed). *Akute myeloische Leukämie - Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie, Prognose.* Köln: Deutscher Ärzte-Verlag. 2008. <http://www.onkodin.de/e2/e51675/e52556/e52757/>.
- ⁷ Rummelt C, et al. Akute myeloische Leukämie. In: Berger DP, Bertelsmann R., *Das Rote Buch Hämatologie und internistische Onkologie.* 6. Auflage. Zuckschwerdt Verlag. 2015. S. 699-712.
- ⁸ Robert Koch Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten - Stand 2015.
- ⁹ Hehn (Informationszentrum) Kompetenznetz Leukämien. Akute myeloische Leukämie (AML). Stand 07/2014. <https://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/aerzte/aml/epidemiologie/> - Stand 2015.

- ¹⁰ Wetzler M, et al. Akute und chronische myeloische Leukämie. In: Dietel M, Suttrop N, Zeitz M, in Zusammenarbeit mit der Charité. Harrisons Innere Medizin. 18. Auflage. ABW-Verlag. 2012. S. 972-986.
- ¹¹ Döhner K, Döhner H. et al. Molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2008. 93: 976-982.
- ¹² Takahashi S, et al. Current findings for recurring mutations in acute myeloid leukemia. *Journal of Hematology & Oncology*. 2011. 14: 4-36.
- ¹³ Rölling C, et al. Akute Myeloische Leukämie (AML). Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO). Stand 2015.
<https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/akute-myeloische-leukaemie-aml/@@view/html/index.html>.
- ¹⁴ Hinrichsen T, et al. Akute Myeloische Leukämie (AML) [C92.00]. In: Molekulare Onkologie. Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsdiagnostik. Stand 2017.
<https://medizinische-genetik.de/index.php?id=labor-mvz-martinsried>.
- ¹⁵ Small D. FLT3 mutations: biology and treatment. *Hematology. Am Soc Hematol Educ Program*. 2006. 178-84.
- ¹⁶ Gallogly MM, Lazarus HM, Midostaurin: an emerging treatment for acute myeloid leukemia. *Journal of Blood Medicine*. 2016. 7: 73-83.
- ¹⁷ Smith L, et al. PU.1 (Spi-1) and CEBP alpha regulate the granulocyte colony-stimulating factor receptor promoter in myeloid cells. *Blood*. 1996. 88: 1234-47.
- ¹⁸ Döhner H, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017. 129: 424-447.
- ¹⁹ Box et al. Nucleophosmin: from structure and function to disease development. *BMC Molecular Biol*. 2016. 17-19.
- ²⁰ Neame PB, et al. Classifying acute leukemia by immunophenotyping: a combined FAB-immunologic classification of AML. *Blood*. 1986. 68:1355-1362.

- ²¹ Leukämiediagnostik am Klinikum der Universität München. Immunphänotypisierung. Stand 2016. <http://www.klinikum.uni-muenchen.de/Medizinische-Klinik-und-Poliklinik-III/de/leukaemiediagnostik/immunphaenotypisierung/index.html>.
- ²² Shook D, et al. Minimal residual disease quantitation in acute myeloid leukemia. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*. 2009. 3: 281-5.
- ²³ Haferlach C, Zytogenetik In: Ehninger G (Ed). *Akute myeloische Leukämie - Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie, Prognose*. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag, 2008. <http://www.onkodin.de/e2/e51675/e52556/e52810/>.
- ²⁴ Thiede C, Müller-Tidow C, Molekulargenetische Diagnostik. In: Ehninger G (Ed). *Akute myeloische Leukämie - Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie, Prognose*. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag. 2008. <http://www.onkodin.de/e2/e51675/e52556/e52881/>.
- ²⁵ Mrozek K, et al. Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2012. 36: 4515-23.
- ²⁶ Schnittger S, et al. Minimal residual disease levels assessed by NPM1 mutation-specific RQ-PCR provide important prognostic information in AML. *Blood*. 2009.114: 2220-2231.
- ²⁷ Bennett JM, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*. 1976. 33: 451-458.
- ²⁸ Vardiman JW, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009.114: 937-951.
- ²⁹ Walter R, et al. Significance of FAB subclassification of “acute myeloid leukemia, NOS” in the 2008 WHO classification: analysis of 5848 newly diagnosed patients. *Blood*. 2013. 121: 2424-2431.
- ³⁰ Grimwade D, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among

5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*. 2010. 116: 354-65.

³¹ Illmer T, Klinische und apparative Diagnostik. In: Ehninger G (Ed). *Akute myeloische Leukämie - Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie, Prognose*. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag. 2008. <http://www.onkodin.de/e2/e51675/e53188/e53739/>.

³² Fonatsch C, et al. Akute myeloische Leukämien. In: Ruckpaul K, Ganten D, *Molekularmedizinische Grundlagen von hämatologischen Neoplasien*. Springer Verlag. 2003. 1. Auflage. S. 317.

³³ Subklewe M, Immunphänotypisierung. In: Stark M, *Allgemeine Diagnostik*. In: Spiekermann K, et al. *Leukämien, myelodysplastische und myeloproliferative Syndrome - Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. 4. Auflage. Zuckschwerdt Verlag. 2015. S. 6.

³⁴ Hitzler JK, et al. GATA1 mutations in transient leukemia and acute megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Blood*. 2003. 101: 4301-4.

³⁵ Stelljes M, et al. Allogeneic transplantation versus chemotherapy as postremission therapy for acute myeloid leukemia: a prospective matched pairs analysis. *J Clin Oncol*. 2014. 32: 288-296.

³⁶ Döhner H, et al. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2015. 373: 1136-1152.

³⁷ Weinberg OK, et al. Clinical characterization of acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes as defined by the 2008 WHO classification system. *Blood* 2009. 113: 1906-08.

³⁸ Burnett A, Wetzler M, Lowenberg B. Therapeutic advances in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2011. 29: 487-494.

³⁹ Lown RN, et al. Beating the odds: factors implicated in the speed and availability of unrelated haematopoietic cell donor provision. *Bone Marrow Transplant*. 2013. 48: 210-219.

- ⁴⁰ Smits EL, et al. Clinical evaluation of cellular immunotherapy in acute myeloid leukemia. *Cancer immunol. Immunoth.* 2011. 60:757-69.
- ⁴¹ Barrett AJ, et al. Immunotherapy prospects for acute myeloid leukemia. *Clinical and Experimental Immunology.* 2010. 161: 223-232.
- ⁴² Van Tendeloo VF, et al. Induction of complete and molecular remissions in acute myeloid leukemia by wilms` tumor 1 antigen-targeted dendritic cell vaccination. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010: 30: 2506.
- ⁴³ Berneman ZW, et al. Vaccination with WT1 mRNA-Electroporated Dendritic Cells: Report of Clinical Outcome in 66 Cancer Patients. *Blood.* 2014. 124. Meeting Abstract.
- ⁴⁴ Berneman ZN, et al. WT1-targeted dendritic cell vaccination as a postremission treatment to prevent or delay relapse in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol (ASO Annual meeting Proceedings).* 2012. 30: 2506.
- ⁴⁵ Anguille S, et al. Dendritic cell vaccine therapy for acute myeloid leukemia: Questions and answers. *Human Vaccines.* 2011. 75: 579-584.
- ⁴⁶ Altrash G, et al. Vaccines as consolidation therapy for myeloid leukemia. *Expert Rev Hematol.* 2011. 4: 47-50.
- ⁴⁷ Smits EL, et al. Clinical evaluation of cellular immunotherapy in acute myeloid leukemia. *Cancer immunol. Immunoth.* 2011. 60: 757-69.
- ⁴⁸ Deiser K et al. Next-Generation Dendritic Cell Vaccination in Postremission Therapy of AML: Results of a Clinical Phase I Trial. *Blood.* 2015. 126: 3805.
- ⁴⁹ Kung Sutherland et al. SGN-CD33A: a novel CD33-targeting antibody-drug conjugate using a pyrrolobenzodiazepine dimer is active in models of drug-resistant AML. *Blood.* 2013. 1455-63.
- ⁵⁰ Krupka C, et al. CD33 target validation and sustained depletion of AML blasts in long-term cultures by the bispecific T-cell-engaging antibody AMG 330. *Blood.* 2014.123: 356-65.

- ⁵¹ Zugmaier G, et al. Clinical overview of anti-CD19 BiTE and ex vivo data from anti-CD33 BiTE as examples for retargeting T cells in hematologic malignancies. *Molecular immunology*. 2015. 67: 58-66.
- ⁵² (<https://de.wikipedia.org/wiki/BiTE-Antikörper>) - Stand 2018.
- ⁵³ Baeuerle PA, et al. Bispecific T-cell engaging antibodies for cancer therapy. *Cancer Research*. 2009.69: 4941–4944.
- ⁵⁴ Laszlo GS, et al. Cellular determinants for preclinical activity of a novel CD33/CD3 bispecific T-cell engager (BiTE) antibody, AMG 330, against human AML. *Blood*. 2013. 123: 554-61.
- ⁵⁵ Aigner M, et al. T lymphocytes can be effectively recruited for ex vivo and in vivo lysis of AML blasts by a novel CD33/CD3-bispecific BiTE antibody construct. *Leukemia*. 2013. 5: 1107-15.
- ⁵⁶ Harrington KH, et al. The Broad Anti-AML Activity of the CD33/CD3 BiTE Antibody Construct, AMG 330, Is Impacted by Disease Stage and Risk. *PLoS ONE*. 2015. 10(8): e0135945. doi:10.1371/journal.pone.0135945.
- ⁵⁷ Laszlo GS, et al. T-cell ligands modulate the cytolytic activity of the CD33/CD3 BiTE antibody construct, AMG 330. *Blood Cancer Journal*. 2015). 5, e340; doi:10.1038/bcj.2015.68.
- ⁵⁸ Laszlo GS, et al. Cellular determinants for preclinical activity of a novel CD33/CD3 bispecific T-cell engager (BiTE) antibody, AMG 330, against human AML. *Blood*. 2014. 123: 554-61.
- ⁵⁹ Stamm H, et al. Immune checkpoints PVR and PVRL2 are prognostic markers in AML and their blockade represents a new therapeutic option. *oncogene*. 2018 <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0288-y>.
- ⁶⁰ Krupka C, et al. Blockade of the PD-1/PD-L1 axis augments lysis of AML cells by the CD33/CD3 BiTE antibody construct AMG 330: reversing a T-cell-induced immune escape mechanism. *Leukemia*. 2016. 30: 484-91.

- ⁶¹ Topp MS, et al. Phase II trial of the anti-CD19 bispecific T cell-engager blinatumomab shows hematologic and molecular remissions in patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2014. 32: 4134-40.
- ⁶² Topp MS, et al. Safety and activity of blinatumomab for adult patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukaemia: a multicentre, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2015. 16: 57-66.
- ⁶³ European Commission Approves Amgen's BLINCYTO® (blinatumomab) for the Treatment of Adults with Philadelphia Chromosome-Negative Relapsed or Refractory B-precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. Stand 2018.
- ⁶⁴ Walter RB. Biting back: BiTE antibodies as a promising therapy for acute myeloid leukemia. *Expert Rev Hematol*. 2014. 3: 317-9.
- ⁶⁵ Chen L, et al. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol*. 2013. 13: 227-242.
- ⁶⁶ Wherry EJ, et al. T cell exhaustion. *Nat Immunol*. 2011. 13: 492-499.
- ⁶⁷ Lichtenegger FS, et al. Costimulatory Expression Profiling of AML Blasts Identifies Surface Markers with High Correlation to Isolated NPM1 Mutation. *Blood*. 2011. 118: 1075-1075. Meeting Abstract.
- ⁶⁸ Wherry EJ, et al. T cell exhaustion. *Nat Immunol*. 2011. 13: 492-499.
- ⁶⁹ Tonks A, et al. CD200 as a prognostic factor in acute myeloid leukaemia. *Leukemia*. 2007. 3: 566-568.
- ⁷⁰ Lichtenegger, FS, et al. Coinhibitory Expression Profiling of AML Blasts Identifies HVEM as Prognostic Marker in AML. *Blood*. 2013. 122: 1359. Meeting Abstract.

- ⁷¹ Zhou Q, et al. Coexpression of Tim-3 and PD-1 identifies a CD8+ T-cell exhaustion phenotype in mice with disseminated acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2011. 117: 4501-4510.
- ⁷² Lichtenegger FS, et. al. Pseudo-Exhaustion Of CD8+ T Cells in AML. *Blood*. 2013. 122: 2615. Meeting Abstract.
- ⁷³ Schnorfeil FM, et al. T cells are functionally not impaired in AML: increased PD-1 expression is only seen at time of relapse. *J Hematol Oncol*. 2015. 30: 8-93.
- ⁷⁴ Baer MR, et al. High frequency of immunophenotype changes in acute myeloid leukemia at relapse: implications for residual disease detection (Cancer and Leukemia Group B Study 8361). *Blood*. 2001. 11: 3574-80.
- ⁷⁵ Sucio-Foca N, et al. Diagnosis and Treatment of Cancer Expressing ILT3 or ILT3 Ligand US 20150110714 A1. Patentanmeldung. 2015.
- ⁷⁶ De Goje PL, et al. Immunoglobulin-like transcript 3 is expressed by myeloid-derived suppressor cells and correlates with survival in patients with non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology*. 2015. 19; 4(7).
- ⁷⁷ Cella M, et al. A novel inhibitory receptor (ILT3) expressed on monocytes, macrophages, and dendritic cells involved in antigen processing. *J Exp Med*. 1997. 19: 1743-51.
- ⁷⁸ Vlad G, et al. Membrane and soluble ILT3 are critical to the genera. *Int Rev Immunol*. 2010. 29:119-32.
- ⁷⁹ Vlad G, et al. Induction of antigen-specific human T suppressor cells by membrane and soluble ILT3. *Exp Mol Pathol*. 2012. 93: 294-301.
- ⁸⁰ Lichtenegger FS, et al. RNA and protein expression of herpesvirus entry mediator (HVEM) is associated with molecular markers, immunity-related pathways and relapse-free survival of patients with AML. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2015. 64: 1505-1515.
- ⁸¹ Sheng, Y. et al. Advances in targeting cell surface signalling molecules for immune modulation. *Nat Rev Drug Discov*. 2013. 2: 130–146.

- ⁸² Workman CJ, et al. Lymphocyte activation gene-3 (CD223) regulates the size of the expanding T cell population following antigen activation in vivo. *J Immunol.* 2004. 9: 5450-5.
- ⁸³ Huang CT, et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity.* 2004. 4: 503-13.
- ⁸⁴ Lal N, et al. An immunogenomic stratification of colorectal cancer: Implications for development of targeted immunotherapy. *Oncoimmunology.* 2015 .3: e976052.
- ⁸⁵ Gassner FJ, et al. Chronic lymphocytic leukaemia induces an exhausted T cell phenotype in the TCL1 transgenic mouse model. *Br J Haematol.* 2015. 170: 515-22.
- ⁸⁶ Anderson AC, et al. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. *Immunity.* 2016. 5: 989-1004.
- ⁸⁷ Nguyen LG, et al. Clinical blockade of PD1 and LAG3--potential mechanisms of action. *Nat Rev Immunol.* 2015. 15: 45-56.
- ⁸⁸ Georgoudak AM, et al. CD244 is expressed on dendritic cells and regulates their functions. *Immunol Cell Biol.* 2015. 6: 581-90.
- ⁸⁹ Mc Ardel SL, et al. Roles of CD48 in regulating immunity and tolerance. *Clin Immunol.* 2016. 164: 10-20.
- ⁹⁰ Yang X, et al. Expression of CD48 as a live marker to distinguish division of hematopoietic stem cells. 2014. 22: 573-9.
- ⁹¹ Alari-Pahissa E, et al. Activation by SLAM Family Receptors Contributes to NK Cell Mediated "Missing-Self" Recognition. *PLoS One.* 2016. 11:e0153236.
- ⁹² Elishmereni, M., et al. CD48: A co-stimulatory receptor of immunity. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011 43: 25-8.
- ⁹³ Kis-Toth K, et al. Engagement of SLAMF2/CD48 prolongs the time frame of effective T cell activation by supporting mature dendritic cell survival. *J Immunol.* 2014. 9: 4436-42.

- ⁹⁴ Mattdorf A, Baumhäkel M. Gesinnungsstörungen und Thrombosen. In: Supportive Therapie. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag, 2012. <https://www.onkodin.de/e6/e95709/e95710/>.
- ⁹⁵ Mrozek K. Acute Myeloid Leukemia with a Complex Karyotype. *Semi Oncology*. 2008;35(4): 365-377.
- ⁹⁶ Stiegelmaier et al. Utilizing the BiTE (bispecific T-cell engager) platform for immunotherapy of cancer. 2015. *Expert Opinion on Biological Therapy*. Volume 15. Issue 8.
- ⁹⁷ Peipp M, et al. Bispecific antibodies targeting cancer cells. In: *Biochem Soc Trans*. 2002. 30: 507–511.
- ⁹⁸ Weiner LM, et al. Binding and cytotoxicity characteristics of the bispecific murine monoclonal antibody 2B1. In: *J Immunol* 1993. 151: 2877–2886.
- ⁹⁹ Link BK, et al. Anti-CD3-based bispecific antibody designed for therapy of human B-cell malignancy can induce T-cell activation by antigen-dependent and antigen-independent mechanisms. *Int J Cancer*. 1998. 77: 251–256.
- ¹⁰⁰ Moore A, et al. Application of dual affinity retargeting molecules to achieve optimal redirected T-cell killing of B-cell lymphoma. *Blood*. 2011.17: 4542-51.
- ¹⁰¹ Topp MS, et al. 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. *J Clin Oncol*. 2011. 18: 2493-8.
- ¹⁰² Duell J, et al. Crucial Role of Regulatory T Cells in Predicting the Outcome of the T Cell Engaging Antibody Blinatumomab in Relapsed and Refractory B Precursor ALL Patients. *Blood*. 2014. 124: 2291-91.
- ¹⁰³ Friedrich M, et al. Preclinical characterization of AMG 330, a CD3/CD33-bispecific T – cell engaging antibody with potential for treatment of acute myelogenous leukemia. *Mol Cancer Ther*. 2014. 13: 1549-57.

- ¹⁰⁴ Held G, Baldur C, Balabanow S. Akute Leukämien. In: Interdisziplinäre Empfehlungen zur Therapie 2018/2019. Taschenbuch Onkologie. 2018. 19. Auflage. S. 7-9.
- ¹⁰⁵ Zühlsdorf M, et al. Primary resistance to Ara-C in AML progenitor Cells and its Modulation by Cytokines. 1998 Akute Leukemias VII. experimental Approaches and Novel Therapy. 651-654.
- ¹⁰⁶ Löwenberg B, et al. Cytarabine Dose for Acute Myeloid. N Engl J Med. 2011. 364:1027-36.
- ¹⁰⁷ Löwenberg B, et al. Sense and nonsense of high-dose cytarabine for acute myeloid leukemia. Blood. 2013. Blood. 121: 26-8.
- ¹⁰⁸ Funato T, et al. In vitro leukemia cell models of Ara-C resistance. Leuk Res. 2000. 24: 535-41.
- ¹⁰⁹ Kvestad H, et al. In Vitro Characterization of Valproic Acid, ATRA, and Cytarabine Used for Disease-Stabilization in Human Acute Myeloid Leukemia: Antiproliferative Effects of Drugs on Endothelial and Osteoblastic Cells and Altered Release of Angioregulatory Mediators by Endothelial Cells. Leuk Res Treatment. 2014. 2014:143479.
- ¹¹⁰ Gati WP, et al. Sensitivity of Acute Leukemia Cells to Cytarabine Is a Correlate of Cellular es Nucleoside Transporter Site Content Measured by Flow Cytometry With SAENTA-Fluorescein. Blood. 1997. 1: 346-353.
- ¹¹¹ Yang M, et al. The influence of Ara-C on anti-CD3/anti-Pgp mediating T-lymphocytes activities against multi-drug resistant leukemia cells. Chin. J. Hematol. 2009. 30: 812-5.
- ¹¹² Li W, et al. Cytosine Arabinoside Promotes Cytotoxic Effect of T Cells on Leukemia Cells Mediated by Bispecific Antibody. HUMAN GENE THERAPY. 2013. 24: 751–760.
- ¹¹³ Ersvaer E, et al. Effects of cytarabine on activation of human T cells – cytarabine has concentration-dependent effects that are modulated both by valproic acid and all-trans retinoic acid. BMC Pharmacology and Toxicology.2015. 16:12.

- ¹¹⁴ Gibbins JD, et al. An autologous leukemia cell vaccine prevents murine acute leukemia relapse after cytarabine treatment. *Blood*. 2014. 124: 2953-2963.
- ¹¹⁵ Sarah M, et al. Sequential Treatment with Cytarabine and Decitabine Has an Increased Anti-Leukemia Effect Compared to Cytarabine Alone in Xenograft Models of Childhood Acute Myeloid Leukemia *Blood*. PLoS ONE. 2014. 91: e87475.
- ¹¹⁶ Hiddemann W, et al. Primary Resistance to Ara-C in AML Progenitor Cells and its Modulation by Cytokines. *Acute Leukemias VII. Haematology and Blood Transfusion / Hämatologie und Bluttransfusion*, vol 39. *Acute Leukemias VII*: 651-654.
- ¹¹⁷ Kadia TM, et al. Final results of a phase 2 trial of clofarabine and low-dose cytarabine alternating with decitabine in older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Cancer*. 2015. 121: 2375-82.
- ¹¹⁸ <https://de.wikipedia.org/wiki/Cytarabin> - Stand 2018.
- ¹¹⁹ <https://www.der-arzneimittelbrief.de/Jahrgang2000/Ausgabe07Seite54b.htm> - Stand 2018.
- ¹²⁰ De Lima P, et al. Evaluation of the mutagenic activity of hydroxyurea on the G1-S-G2 phases of the cell cycle: an in vitro study. *Genet Mol Res*. 2003. 2: 328-33.
- ¹²¹ Achille N, et al. Association between early promoter-specific DNA methylation changes and outcome in older acute myeloid leukemia patients. *Leuk Res*. 2016. 42: 68-74.
- ¹²² Geyer H, et al. Therapy for myeloproliferative neoplasms: when, which agent, and how? *Blood*. 2014. 124: 3529-37.
- ¹²³ <http://www.cochrane.org/de/CD002202/hydroxyurea-auch-bekannt-als-hydroxycarbamid-fur-personen-mit-sichelzellerkrankung>. - Stand 2018.
- ¹²⁴ Baccaraini M, et al. Treatment recommendations for chronic myeloid leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2014. 6: e2014005.

- ¹²⁵ Pourfarzad F, et al. Hydroxyurea responsiveness in β -thalassemic patients is determined by the stress response adaptation of erythroid progenitors and their differentiation propensity. *Haematologica*. 2013. 98: 696–704.
- ¹²⁶ Lopes FCM, et al. Key endothelial cell angiogenic mechanisms are stimulated by the circulating milieu in sickle cell disease and attenuated by hydroxyurea *Haematologica*. 2015. 100: 730–739.
- ¹²⁷ Preis J, Honecker F. Medikamente. In: *Interdisziplinäre Empfehlungen zur Therapie 2018/2019. Taschenbuch Onkologie*. 2018. 19. Auflage. S. 339.
- ¹²⁸ Ware RE, et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and pharmacogenetics of hydroxyurea treatment for children with sickle cell anemia. *Blood journal*. 2011. 118: 4985-4991.
- ¹²⁹ Orendi JM, et al. Hydroxyurea interferes with antigen-dependent T-cell activation in vitro. *Eur J Clin Invest*. 2000. 30: 162-6.
- ¹³⁰ Petti MC, et al. Complete remission through blast cell differentiation in PLZF/RARalpha-positive acute promyelocytic leukemia: in vitro and in vivo studies. *Blood*. 2002. 100: 1065-7.
- ¹³¹ Watanapokasin YI, et al. In vivo and in vitro studies of fetal hemoglobin induction by hydroxyurea in beta-thalassemia/hemoglobin E patients. *Exp Hematol*. 2005. 12:1486-92.
- ¹³² Mamez AC, et al. Pre-treatment with oral hydroxyurea prior to intensive chemotherapy improves early survival of patients with high hyperleukocytosis in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2016. 5: 1-8.
- ¹³³ Orendi JM, et al. Hydroxyurea interferes with antigen-dependent T-cell activation in vitro. *Eur J Clin Invest*. 2000. 2:162-6.
- ¹³⁴ Benito JM, et al. Hydroxyurea exerts an anti-proliferative effect on T cells but has no direct impact on cellular activation. *Clin Exp Immunol*. 2007. 149: 171–177.
- ¹³⁵ Weinberg A, et al. In Vitro Hydroxyurea Decreases Th1 Cell-Mediated Immunity. *Clin Vaccine Immunol*. 2001. 4: 702-705.

- ¹³⁶ Rothe G. Technische und Methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie. In: Sack U, Tárnok A, Rothe G (Eds). Zelluläre Diagnostik - Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie. Basel: Karger.2007. S. 27-70.
- ¹³⁷ Klinger M, et al. Immunopharmacologic response of patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia to continuous infusion of T cell–engaging CD19/CD3-bispecific BiTE antibody blinatumomab. *Blood*. 2012. 119: 6226-6233.
- ¹³⁸ http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_Summary_for_the_public/human/003731/WC500198229.pdf). - Stand 2018.
- ¹³⁹ Combination of epigenetic factors and bispecific compounds targeting CD33 and CD3 in the treatment of myeloid leukemia WO 2015036583 A2.
- ¹⁴⁰ Lova L, et al. Hydroxyurea exerts a cytostatic but not immunosuppressive effect on T lymphocytes. *AIDS*. 2005. 19:137-44.
- ¹⁴¹ Dobrowolska H, et al. Expression of immune inhibitory receptor ILT3 in acute myeloid leukemia with monocytic differentiation. *Cytometry B Clin Cytom*. 2013. 84: 21-9.
- ¹⁴² Kiel M, et al. SLAM Family Receptors Distinguish Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Reveal Endothelial Niches for Stem Cells. 2005. 121: 1109–1121.
- ¹⁴³ Oguro H, et al. SLAM family markers resolve functionally distinct subpopulations of hematopoietic stem cells and multipotent progenitors. *Cell Stem Cell*. 2013. 13: 102–116.
- ¹⁴⁴ Lewis TS, et al. SGN-CD48A: a Novel Humanized Anti-CD48 Antibody-Drug Conjugate for the Treatment of Multiple Myeloma. *Blood*. 2016. 128: 4470.
- ¹⁴⁴ Elias S, et al. Immune evasion by oncogenic proteins of acute myeloid leukemia. *Blood*. 2014. 123: 1535-1543.
- ¹⁴⁵ Nguyen LT, et al. Clinical blockade of PD1 and LAG3 — potential mechanisms of action. *Nature Reviews Immunology* .2015. 15: 45–56.

- ¹⁴⁶ Bankey PE, et al. Cytokine induced expression of programmed death ligands in human neutrophils. *Immunol Lett.* 2010. 129: 100-7.
- ¹⁴⁷ Huang RY, et al. LAG3 and PD1 co-inhibitory molecules collaborate to limit CD8+ T cell signaling and dampen antitumor immunity in a murine ovarian cancer model. *Oncotarget.* 2015. 6:27359-77.
- ¹⁴⁸ Brenk M, et al. Tryptophan deprivation induces inhibitory receptors ILT3 and ILT4 on dendritic cells favoring the induction of human CD4+CD25+ Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol.* 2009. 183: 145-54.
- ¹⁴⁹ Stallone G, et al. Rapamycin induces ILT3(high)ILT4(high) dendritic cells promoting a new immunoregulatory pathway. *Kidney Int.* 2014. 4: 888-97.
- ¹⁵⁰ de Goeje PL, et al. Immunoglobulin-like transcript 3 is expressed by myeloid-derived suppressor cells and correlates with survival in patients with non-small cell lung cancer. *Oncol Immunology.* 2015. 19;4(7):e1014242. eCollection.
- ¹⁵¹ Suci-Foca N, et al. Soluble Ig-like transcript 3 inhibits tumor allograft rejection in humanized SCID mice and T cell responses in cancer patients. *J Immunol.* 2007.178: 7432-41.
- ¹⁵² Del Rio ML, et al. Immunotherapeutic targeting of LIGHT/LT β R/HVEM pathway fully recapitulates the reduced cytotoxic phenotype of LIGHT-deficient T cells. *MAbs.* 2016 3: 478-90.
- ¹⁵³ Singh A, et al. The Cell Killing Mechanisms of Hydroxyurea. *Genes (Basel).* 2016. 7: 99.
- ¹⁵⁴ https://www.helmholtzmuenchen.de/fileadmin/_migrated/content_uploads/DOREMI2015-Cell_cycle_01.pdf - Stand 2018.
- ¹⁵⁵ Bischoff JR, et al. An Adenovirus Mutant That Replicates Selectively in p53- Deficient Human Tumor Cells. *Science.* 1996. 5286: 373-376.

¹⁵⁶ Naoe T, et al. Gene mutations of acute myeloid leukemia in the genome era. *Int J Hematol.* 2013. 97: 165-74.

¹⁵⁷ Aldoss I, et al. Correlates of resistance and relapse during blinatumab therapy for relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. *AJH.* 2017. <https://doi.org/10.1002/ajh.24783>.

¹⁵⁸ Spiekermann K, Akute myeloische Leukämie. In: Spiekermann K, et al. *Leukämien, myelodysplastische und myeloproliferative Syndrome - Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge.* 4. Auflage. Zuckschwerdt Verlag. 2015. S. 29.

Danksagung

Mein größter Dank gilt Frau Professor Subklewe und meinen Betreuern Frau Dr. Krupka und Herrn Dr. Lichtenegger für das interessante Projekt und die gute Unterstützung meiner Arbeit. Besonders bei Frau Dr. Krupka möchte ich mich bedanken für ihre Geduld, ihre Hilfsbereitschaft und für ihre sachkundige Betreuung. Sie war für mich eine stets bereite Ansprechpartnerin für alle anstehenden theoretischen und praktischen Fragen, die im Zusammenhang meiner Arbeit aufkamen. Darüber hinaus hat mich der wissenschaftliche Austausch in der Forschungsgruppe von Frau Professor Subklewe für die Forschung in der Tumorummunologie fasziniert.

Der José Carreras Leukämie-Stiftung danke ich für das großzügige Promotionsstipendium, aufgrund dessen ich mich ein Jahr lang - frei von anderen universitären Verpflichtungen - dieser Arbeit widmen konnte.

Ich möchte mich auch bei Frau Lämmermann für ihre große Unterstützung in allen Phasen meiner Doktorarbeit und vieles andere herzlich bedanken.

Allen Mitarbeitern der Forschungsgruppe von Professor Subklewe danke ich für die überaus gute Zusammenarbeit und Hilfe, die dazu beigetragen hat, dass ich die Arbeit durchführen und zum Abschluss bringen konnte.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinem Großvater Professor Dr. Manfred Brauneck, bedanken für die stetige Motivation besonders in der letzten Phase der Doktorarbeit. Desgleichen seine unermüdliche Bereitschaft sich der Texte anzunehmen und Korrektur zu lesen.

Eidesstatliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, Franziska Brauneck, an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Antikörper-basierte Immuntherapie in der AML:
Einfluss zytoreduktiver Substanzen auf die CD33/CD3 BiTE® -
vermittelte Zytotoxizität Und Analyse der Expression von ILT3,
CD244 und CD48
auf CD33 positiven AML-Zellen**

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient habe und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorliegende Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Hamburg, den 19.10.2018

.....

Franziska Brauneck