

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand Prof. Dr. Dr. Michael von Bergwelt - Baildon

**Kombination von Immuncheckpoint-Blockade
und therapeutischen Antikörpern als Therapieansätze
in der Behandlung der Akuten Myeloischen Leukämie und des Weichteilsarkoms**

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

vorgelegt von
Sonja Boßmann
aus
München
2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter	Prof. Dr. Marion Subklewe
Mitberichterstatter	Prof. Dr. Michael Albert Prof. Dr. Hans Roland Dürr
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter	Dr. Veit Bücklein
Dekan	Prof. Dr. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung	09.12.2021



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Promotionsbüro
Medizinische Fakultät



Eidesstattliche Versicherung

Boßmann, Sonja

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Kombination von Immuncheckpoint-Blockade und therapeutischen Antikörpern als Therapieansätze in der Behandlung der Akuten Myeloischen Leukämie und des Weichteilsarkoms

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

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

München, 10.12.2021

Ort, Datum

Sonja Boßmann

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	11
1.1. Akute myeloische Leukämie.....	12
1.1.1. Grundlagen.....	12
1.1.2. Therapie und Krankheitsverlauf.....	12
1.1.3. Immuntherapie bei akuter myeloischer Leukämie.....	13
1.2. Weichteilsarkome.....	14
1.2.1. Grundlagen.....	14
1.2.2. Therapie und Krankheitsverlauf.....	15
1.2.3. Immuntherapie bei Weichteilsarkomen.....	16
1.3. Natürliche Killerzellen.....	17
1.3.1. Grundlagen.....	17
1.3.2. NK-Zell-Aktivierung und Effektorfunktionen.....	18
1.3.3. Stimulation von NK-Zellen.....	20
1.3.4. NK-Zellen in der Immunosurveillance.....	21
1.3.5. NK-Zellen in der Immuntherapie.....	22
1.4. Immuncheckpoints und Liganden.....	24
1.4.1. Grundlagen.....	24
1.4.2. PD-1 und PD-L1.....	25
1.4.3. TIGIT.....	26
1.4.4. CD96.....	27
1.4.5. PVR.....	28
1.4.6. SLAMF-7.....	28
1.4.7. CD137.....	29
1.5. Therapeutische Antikörper.....	30
1.5.1. Grundlagen.....	30
1.5.2. Anti-CD157 Antikörper.....	31
1.5.3. Anti-CD33 Antikörper.....	31
1.5.4. Anti-GD2 Antikörper.....	32
2. Zielsetzung.....	33
2.1. Identifikation von Zielstrukturen für eine Immuncheckpoint-Blockade.....	33
3. Material und Methoden.....	35
3.1. Material.....	35
3.1.1. Geräte und Softwares.....	35

3.1.2. Verbrauchsmaterial.....	36
3.1.3. Material für Zellkulturen und verwendete Zelllinien	37
3.1.4. Material für Zellisolation, Durchflusszytometrie und Zytotoxizitätsassays	40
3.1.5. Therapeutische und Checkpoint-blockierende Antikörper	42
3.2. Methoden.....	43
3.2.1. Patienten- und Spenderproben.....	43
3.2.1.1. Blutproben von Patienten und gesunden Spendern.....	43
3.2.1.2. Ethische Grundlagen und Datenschutz	43
3.2.2. Gewinnung von Zellen aus Blut	44
3.2.2.1. Isolation peripherer mononukleärer Zellen	44
3.2.2.2. Isolation Natürlicher Killerzellen	45
3.2.3. Durchflusszytometrie	45
3.2.3.1. Grundlagen	45
3.2.3.2. Messungen im Labor für Leukämiediagnostik	46
3.2.3.3. Auswertung durchflusszytometrischer Daten.....	47
3.2.4. Zellkulturen	49
3.2.4.1. Kultur und Passagierung der Zelllinien.....	49
3.2.4.2. Kokulturen aus Tumorzelllinien mit NK-Zellen gesunder Spender	50
3.2.5. ⁵¹ Chrom-Freisetzungs-Versuche.....	51
3.2.5.1. Grundlagen.....	51
3.2.5.2. Zytotoxizitätsassays.....	52
3.2.6. Cytometric Bead Array	53
3.2.6.1. Grundlagen.....	53
3.2.6.2. Messung der Überstände aus den Kokulturen.....	53
3.3. Statistische Auswertung.....	54
4. Ergebnisse.....	55
4.1. Expression von Immuncheckpoints und Liganden	55
4.1.1. NK-Zellen von Patienten und gesunden Spendern	55
4.1.1.1. AML-Patienten.....	55
4.1.1.2. STS-Patienten	57
4.1.2. Liganden-Expression.....	58
4.1.2.1. Primäre AML-Zellen.....	58
4.1.2.2. AML-Zelllinien.....	59
4.1.2.3. GD2-exprimierende Zelllinien	60

4.2. Veränderung der Expressionsstärke von Immuncheckpoints auf NK-Zellen	62
4.2.1. NK-Zell-aktivierende Agentien	62
4.2.1.1. Phytohämagglutinin	63
4.2.1.2. Resiquimod.....	63
4.2.1.3. IL-2 plus IL-15.....	64
4.2.2. Kokulturen mit Tumorzelllinien und therapeutischen Antikörpern.....	65
4.2.2.1. AML-Zelllinien.....	65
4.2.2.2. GD2-exprimierende Zelllinien	66
4.2.2.3. Expressionsunterschiede auf NK-Zell-Subpopulationen	67
4.2.2.3.1. AML-Zelllinien.....	67
4.2.2.3.2. GD2-exprimierende Zelllinien	68
4.3. Zytokinsekretion in Kokulturen	69
4.4. Zytotoxizitätsassays.....	71
4.4.1. Effekt therapeutischer Antikörper ohne Checkpoint-Blockade	72
4.3.2. Therapeutische Antikörper in Kombination mit Immuncheckpoint-Blockade.....	73
4.4.2.1. AML-Zelllinien.....	74
4.4.2.1.1. Vorstimulierte NK-Zellen	74
4.4.2.1.2. NK-Zellen von AML-Patienten	75
4.4.2.2. GD2-exprimierende Zelllinien	75
4.4.2.2.1. Unstimulierte NK-Zellen	75
4.4.2.2.2. Vorstimulierte NK-Zellen	76
4.4.2.2.3. NK-Zellen von STS-Patienten	77
4.4.2.3. Unterschiedliche Zielkonzentrationen der Checkpoint-blockierenden Antikörper	78
5. Diskussion.....	79
5.1. Identifikation von Zielstrukturen für Immuncheckpoint-Blockade.....	79
5.1.1. Expression von Immuncheckpoints auf NK-Zellen	80
5.1.1.1. Inhomogene Datenlage zur Expression von PD-1 auf NK-Zellen.....	81
5.1.1.2. TIGIT als vielversprechender Checkpoint auf NK-Zellen	82
5.1.2. Induzierbarkeit der Checkpoint-Expression	83
5.1.2.1. Stimulierende Agentien führen zu einer Hochregulation von TIGIT auf NK-Zellen	83
5.1.2.2. Therapeutische Antikörper verstärken die Expression von TIGIT auf NK-Zellen	84
5.1.2.3. Einfluss therapeutischer Antikörper auf Zytokin-Sekretion von NK-Zellen	85
5.1.3. Liganden und Zielantigene auf Tumorzellen	86
5.1.3.1. PVR als geeigneter Ligand für die Checkpoint-Blockade.....	86

5.1.3.2. Starke Expression der Zielantigene therapeutischer Antikörper auf eingesetzten Zelllinien..	87
5.1.3.3. Methodische Aspekte bei der Untersuchung der Liganden-Expression	88
5.1.4. TIGIT und PVR als geeignete Zielstrukturen für eine Checkpoint-Blockade.....	88
5.2. Immuncheckpoint-Blockade in Kombination mit therapeutischen Antikörpern	89
5.2.1. Beeinflussung der zytotoxischen Wirkung von NK-Zellen durch therapeutische Antikörper oder Checkpoint-Blockade.....	89
5.2.1.1. Therapeutische Antikörper steigern die lytische Aktivität von NK-Zellen	90
5.2.1.2. Immuncheckpoint-Blockade hat keinen signifikanten Einfluss auf die lytische Aktivität von NK-Zellen	91
5.2.2. Methoden zur Quantifizierung der zytotoxischen Wirkung von NK-Zellen	93
5.2.3. Implikationen für den Einsatz von Immuncheckpoint-Blockade bei NK-Zellen	93
5.3. Ausblick.....	94
6. Zusammenfassung.....	96
7. Literaturverzeichnis.....	99
8. Anhang.....	113
8.1. Abkürzungsverzeichnis	113
8.2. Abbildungsverzeichnis	114
8.3. Tabellenverzeichnis	115
8.4. Patientenaufklärung.....	116
8.5. Danksagung	123
8.6. Lebenslauf	124

1. Einleitung

Krebserkrankungen zählen zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland. Bisher hauptsächlich zur Anwendung gekommene Behandlungen wie Chemo- und Radiotherapie unterliegen zwar weiterhin einer stetigen Weiterentwicklung, können die Prognose vieler Patienten jedoch oft nur geringfügig verbessern. Auf der Suche nach innovativen Therapiemöglichkeiten hat sich das wissenschaftliche Interesse in den letzten Jahren verstärkt der Immuntherapie zugewandt. Dabei handelt es sich um Therapiekonzepte, die eine Aktivierung des patienteneigenen Immunsystems anstreben und die Induktion einer Immunantwort gegen die Krebszellen zum Ziel haben.³⁴ Dies ist bei Krebspatienten zielführend, da maligne Zellen sich durch Escape-Strategien der Elimination durch das Immunsystem entziehen können.¹⁶⁰ Dies ist Ansatzpunkt therapeutischer Strategien.

Zur Vielzahl an immuntherapeutischen Konzepten zählen therapeutische Antikörper, die durch Opsonierung maligne Zellen für das Immunsystem erkennbar machen und so zu einer Aktivierung von Immunzellen führen.¹⁰⁰ Eine der Immunzellpopulationen, die durch die Opsonierung von Zielzellen aktiviert werden, sind die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Dabei handelt es sich um Zellen der angeborenen Immunabwehr, die einen wichtigen Beitrag zur Kontrolle von Infektionen und zur Elimination von malignen Zellen leisten.¹⁰³ Das Ziel der Immunzellaktivierung verfolgt auch die Blockade von Immuncheckpoints, jedoch durch einen abweichenden Mechanismus. Unter Immuncheckpoints versteht man Rezeptoren auf der Oberfläche von Immunzellen, denen normalerweise die Aufgabe zufällt, Immunreaktionen rechtzeitig zu stoppen, um beispielsweise Autoimmunreaktionen vorzubeugen.¹³⁶ Die Aufhebung dieser Inhibition durch eine Immuncheckpoint-Blockade soll die Aktivität von Immunzellen steigern.¹⁰⁴ Therapeutische Antikörper machen Krebszellen also im Idealfall für Immunzellen erkennbar, während die Immuncheckpoint-Blockade die Aktivität dieser Zellen verstärkt.

In der vorliegenden Arbeit soll evaluiert werden, ob eine Kombination von therapeutischen Antikörpern und einer Blockade von Immuncheckpoints additiv oder synergistisch auf die Zytotoxizität von Natürlichen Killerzellen wirkt. Als Modellerkrankungen werden die akute myeloische Leukämie als maligne Neoplasie des blutbildenden Systems sowie Weichteilsarkome als solide Tumoren untersucht.

1.1. Akute myeloische Leukämie

1.1.1. Grundlagen

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine Erkrankung des hämatopoetischen Systems, bei der es zu einer unkontrollierten Proliferation einer oder mehrerer myeloischer Zellreihen kommt. Die jährliche Inzidenz liegt bei 3,7 von 100.000 Erwachsenen und steigt mit zunehmendem Alter auf bis zu 100 auf 100.000 an.⁶² Damit stellt die AML die häufigste akute Leukämie im Erwachsenenalter dar.¹³²

Ursächlich ist eine Proliferation klonaler Zellen im Knochenmark, die als Leukämie-initiiierende Zellen (LIC) bezeichnet werden. Aufgrund ihrer Resistenz gegen Chemotherapeutika und ihrer Fähigkeit zur Selbsterneuerung sind sie an der hohen Rezidivrate der AML maßgeblich beteiligt.⁴⁰ Durch Hemmung der gesunden Blutbildung kommt es zur Trias aus Anämie, Granulozytopenie und Thrombozytopenie.⁴¹ Symptomatisch zeigen sich diese in Müdigkeit und Leistungsminderung, Infektanfälligkeit und erhöhter Blutungsneigung. Der Erkrankungsgipfel liegt im siebten Lebensjahrzehnt.¹³² Risikofaktoren für die Entwicklung einer AML sind neben Rauchen und der Exposition gegenüber radioaktiver Strahlung unter anderem eine zytostatische Therapie in der Anamnese.⁴¹

Die Diagnose AML wird bei Nachweis eines Anteils von über 20% myeloischer Blasten im Knochenmark gestellt.¹ Nachdem die Einteilung der AML jahrelang nach der French-American-British (FAB) Klassifikation nach Peroxidase- und Esterase-Verhalten in acht Untergruppen erfolgte,¹⁴ wird die AML heute nach der WHO-Klassifikation anhand morphologischer, zytogenetischer und molekulargenetischer Faktoren eingeteilt. Das European LeukemiaNet (ELN) teilt zytogenetische und molekulare Faktoren weiter in die Risikogruppen günstig, intermediär und ungünstig ein.⁴¹

1.1.2. Therapie und Krankheitsverlauf

Die Wahl der Therapie wird in Abhängigkeit von Alter und Komorbiditäten des Patienten getroffen. Bei unter 60 bis 65-Jährigen (bzw. auch bei älteren, klinisch fitten Patienten) erfolgt so schnell als möglich eine intensive Induktionschemotherapie, die standardmäßig Anthrazykline und Cytarabin beinhaltet.¹³² Im Anschluss daran folgt zur Prävention eines frühen Rezidivs die Konsolidierungstherapie.¹⁰⁶ Unter Berücksichtigung des Zustands des Patienten und des Risikoprofils der AML muss hier zwischen allogener Blutstammzelltransplantation (allo-HSCT) und hochdosierter Chemotherapie entschieden werden.¹³² Dabei stellt die allo-HSCT bei Patienten mit zytogenetischem

Hochrisikoprofil die langfristig einzig wirksame Therapie dar, die Rezidive dauerhaft verhindern kann,¹⁰⁶ sie ist aber auch mit einem hohen Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko assoziiert.

Die Prognose verschlechtert sich mit zunehmendem Alter des Patienten. So sinkt die 5-Jahre-Überlebensrate von 60% bei unter 30-Jährigen auf bis zu 23% bei 55- bis 64-Jährigen und noch weiter im höheren Alter ab.⁶³ Darüber hinaus ist sie abhängig von zytogenetischen Anomalien, die in über der Hälfte der Patienten zu finden sind,⁴⁴ sowie dem Vorliegen molekularer Marker wie FLT3- oder NPM1-Mutationen.¹⁰⁶ Entscheidend für die Lebenserwartung ist jedoch vor allem die Therapie: Ein großer Anteil der Patienten ist alters- und komorbiditätsbedingt nicht fit genug für eine intensive Induktionstherapie oder eine allo-HSCT. Doch auch bei Ausschöpfung aller Therapieoptionen erleiden viele Patienten aufgrund therapieresistenter Leukämiezellen einen Rückfall.⁸⁵

1.1.3. Immuntherapie bei akuter myeloischer Leukämie

Trotz aller Fortschritte im Krankheits- und Komplikationsmanagement in den vergangenen Jahrzehnten ist die Prognose bei AML somit nach wie vor schlecht. Insbesondere für die große Gruppe der älteren Patienten werden neue therapeutische Konzepte daher dringend benötigt. In den letzten Jahren ist eine Hinwendung des wissenschaftlichen Interesses insbesondere auf die Immuntherapie zu beobachten. Vielversprechend sind hierbei monoklonale Antikörper, T-Zell-rekrutierende Antikörperkonstrukte, adoptiver Zelltransfer mit CAR-T-Zellen, die Vakzinierung mit Dendritischen Zellen (DC) sowie die Blockade von Immuncheckpoints.⁸⁴

Monoklonale Antikörper zielen auf eine Aktivierung von Immunzellen zur Induktion einer Immunantwort gegen die AML-Zellen. Bei der AML sind sie meist gegen das auf AML-Zellen stark exprimierte Zielantigen CD33 gerichtet.⁷⁶ Zudem ist eine Konjugation an zytotoxische Substanzen möglich, die nach Internalisierung die Apoptose der Zielzelle induzieren. Als Beispiel ist Gemtuzumab Ozogamicin (GO) zu nennen, auf das in Kapitel 1.5.3. genauer eingegangen wird.⁸⁶

Eine ähnliche Funktionsweise haben T-Zell-aktivierende Antikörperkonstrukte wie z.B. bispezifische T-Zell-rekrutierende Antikörper (bispecific T cell engagers, BiTEs), die gleichzeitig das Targetantigen auf der Zielzelle und den T-Zell-Rezeptor binden.⁸ Die Effektivität solcher Konstrukte wurde mit dem BiTE Blinatumomab bei akuten Leukämien der lymphatischen B-Zell-Reihe bereits gezeigt.⁸⁵ Der für AML entwickelte, gegen CD33 gerichtete BiTE® AMG330 führte ex vivo zu einer T-Zell-Rekrutierung und starker Antikörper-vermittelter Zytotoxizität und befindet sich, neben anderen Antikörper-basierten Therapieansätzen, derzeit in klinischer Erprobung.⁷⁶

Die Eigenschaften monoklonaler Antikörper werden durch Chimeric antigen receptors (CAR) mit denen zytotoxischer T-Zellen verbunden. Bei CARs handelt es sich um rekombinante Rezeptoren, die tumorspezifische Oberflächenmoleküle binden und mit intrazellulären Signaldomänen die Effektorzelle, meistens T-Zellen, aktivieren.¹⁴¹ Ihr antigenbindender Teil erkennt Zielepitope unabhängig von deren Präsentation auf MHC-Molekülen. Damit können sie einen wichtigen Mechanismus des Immunescape umgehen: Einige maligne Zellen regulieren die Expression von MHC-I auf ihrer Oberfläche herunter, um der Erkennung und Elimination durch das Immunsystem zu entgehen.³⁷ Anti-CD33 CAR T-Zellen werden ebenfalls bereits in klinischen Studien getestet.⁹⁶

Eine Aktivierung von Immunzellen bzw. Verstärkung bereits bestehender Immunantworten haben auch Vakzinierungen zum Ziel.⁸⁴ DC sind dafür als professionelle Antigen-präsentierende Zellen gut geeignet. Durch Kontakt mit Tumorzellen werden patienteneigene DC spezifisch mit Malignom-typischen Antigenen beladen. Die derartig spezialisierten DC werden dem Patienten als Impfung verabreicht und sind im Körper aufgrund ihrer Fähigkeit zur Prozeption und Präsentation der Malignom-typischen Antigene in der Lage, andere Immunzellen zu aktivieren. Ergebnisse früher klinischer Studien mit DC-Vakzinen bei AML wurden bereits veröffentlicht und zeigen, dass die Induktion einer AML-spezifischen Immunantwort so möglich ist. Ergebnisse über die klinische Wirksamkeit (z.B. im Sinne einer Prognoseverbesserung) stehen jedoch noch aus.⁸⁴

Auch das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Konzept der Immuncheckpoint-Blockade zielt auf eine Aktivitätssteigerung von Immunzellen ab und wird bereits für AML untersucht. Blockierende Antikörper, vor allem gegen die Checkpoints PD-1 und CTLA-4, werden sowohl in Monotherapie als auch in Kombination mit zytostatischen Substanzen getestet.⁸⁴ Die Blockade von Checkpoints könnte die Wirkung therapeutischer Antikörper verstärken und somit zu einer signifikanten Aktivitätssteigerung von Immunzellen führen. Dieses Konzept wird in Kapitel 1.4.1. genauer erläutert.

1.2. Weichteilsarkome

1.2.1. Grundlagen

Weichteilsarkome (soft tissue sarcoma, STS) sind seltene maligne Tumoren. Pro Jahr erkranken in Europa circa vier bis fünf von 100.000 Erwachsenen an einer Form von STS.¹⁴⁸ Damit repräsentieren diese Erkrankungen etwa 1% aller malignen Neoplasien im Erwachsenenalter und 15% bei Kindern und treten wesentlich seltener auf als benigne Neoplasien des Weichgewebes.¹³³

STS entwickeln sich aus Strukturen des Bindegewebes, also extraskelettalem Gewebe, das vom embryonalen Meso- und Neuroektoderm abstammt.⁵⁵ Mit einer Inzidenz von 60% ist eine Lokalisation im Bereich der Extremitäten am häufigsten, gefolgt von retroperitonealen Tumoren. Der Erkrankungsgipfel liegt im sechsten Lebensjahrzent, doch bestimmte Unterformen, wie das Rhabdomyosarkom und das Synovialsarkom, treten überwiegend bei Kindern bzw. jungen Erwachsenen auf.¹ Die Ätiologie bleibt im Regelfall unklar, es besteht jedoch ein Zusammenhang beispielsweise mit Noxen wie Dioxin⁴³ oder radioaktiver Strahlung¹⁶ sowie gewissen prädisponierenden Vorerkrankungen wie dem Li-Fraumeni-Syndrom⁹⁴ oder der Neurofibromatose⁵⁵.

Die Diagnose eines STS wird durch die weitgehend stumme klinische Symptomatik erschwert. Oftmals ist die Erkrankung bei Diagnosestellung daher schon relativ weit fortgeschritten.¹ Während Patienten mit Extremitätensarkomen durch eine progrediente Schwellung auffällig werden können, äußern sich retroperitoneale Tumore erst durch infolge ihres Größenzuwachses hervorgerufene Symptome der Verdrängung und Kompression. Gestellt wird die Diagnose mittels radiologischer und nuklearmedizinischer bildgebender Verfahren sowie einer Biopsie.²

Die histologische Klassifikation erfolgt nach der Federation Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer (FNCLCC) in drei Malignitätsgrade, basierend auf Differenzierungsgrad, Ausmaß der vorliegenden Nekrosen und Mitoserate.³² Rund 50 Subentitäten von STS können unterschieden werden.¹ Am häufigsten treten Leiomyosarkome, Liposarkome und pleomorphe Sarkome auf. Maligne Nervenscheidentumore, gastrointestinale Stromatumore und Angiosarkome machen jeweils nur einen geringen Anteil aus.⁴²

1.2.2. Therapie und Krankheitsverlauf

Etablierter Therapiestandard ist die operative R0-Resektion des Primärtumors, also die Exzision der gesamten Tumormasse inklusive tumorfreier Ränder.² Gegebenenfalls wird zudem eine Radiotherapie durchgeführt. Chemotherapie kann adjuvant oder neoadjuvant bei fortgeschrittenen Erkrankungen eingesetzt werden, hat jedoch nur minimalen Einfluss auf das Gesamtüberleben in der Therapie nicht-metastasierter Erkrankungen. Obwohl sie die Therapie der Wahl bei Vorhandensein von Metastasen ist, hat die alleinige Gabe einer Chemotherapie keinen großen Einfluss auf das Gesamtüberleben.¹¹⁶ Bei Hochrisiko-STs oder Infiltration von Lymphknoten kommt die regionale Hyperthermie in Kombination mit einer chemotherapeutischen Behandlung zur Anwendung.²

Abhängig von Faktoren wie Stadium der Erkrankung, histologischer Einteilung, Lokalisation sowie Tumorfreiheit der Resektionsränder, Alter des Patienten und Staging kann die Prognose abgeschätzt werden.³² Gemittelt über alle STS liegt die Fünf-Jahres-Überlebensrate bei etwa 50%.¹⁴² Mit Auftreten einer Fernmetastasierung, typischerweise als pulmonale Metastasierung, verschlechtert sich die Prognose mit einer mittleren Überlebensdauer von ca. 15 Monaten deutlich.⁶⁶

Die Prognose von Patienten mit STS ist somit trotz der aktuell zur Verfügung stehenden Behandlungsoptionen nach wie vor schlecht. Daher müssen neue Therapien entwickelt werden, die wirksamer und besser verträglich sind.

1.2.3. Immuntherapie bei Weichteilsarkomen

Immuntherapeutische Konzepte könnten zukünftig die Grundlage für eine signifikante Verbesserung der Prognose von STS-Patienten bilden. Historisch stellen diese eine der ersten Krankheitsentitäten dar, an denen immuntherapeutische Konzepte getestet und in ihrer Wirksamkeit auch nachgewiesen wurden. Der „Begründer“ der Immuntherapie, William B. Coley, setzte bereits Ende des 19. Jahrhunderts Bakterien oder Extrakte bakterieller Kulturen ein, um eine antitumorale Immunantwort zu induzieren. Durch die Verabreichung von Streptokokken wurde eine fieberhafte Reaktion ausgelöst, in deren Folge es bei vielen Patienten zu einer Verkleinerung der Tumore kam. Besonders erfolgreich war er mit dieser Methode bei Patienten mit STS.⁹⁸ Dem gleichen Wirkprinzip, der Aktivierung des Immunsystems durch artifizielle Infektion, folgt der Einsatz onkolytischer Viren. Mausmodelle undifferenzierter Sarkome wie SARC-28 und SARC-45 sind empfindlich für die Infektion und Elimination durch einen onkolytischen Herpes simplex Virus 1. Talimogene laherparepvec stammt ebenfalls von HSV-1 ab und wurde als erster onkolytischer Virus für die Therapie des malignen Melanoms zugelassen.¹²⁷ Für STS wird seine Anwendung in Kombination mit Radiotherapie bereits in einer klinischen Studie getestet.⁵³

Eine Kombination mit dem gegen PD-1 gerichteten Antikörper Pembrolizumab wird derzeit bei Patienten mit fortgeschrittenen STS getestet.¹²¹ Neben klinischen Studien zu Pembrolizumab in Kombinations- und Monotherapie wurde auch der ebenfalls gegen PD-1 gerichtete Antikörper Nivolumab bereits für STS untersucht. Bei 50% retrospektiv analysierter Patienten mit fortgeschrittenen STS oder Knochensarkomen, die Nivolumab mit oder ohne zusätzliche Gabe von Pazopanib, einem Tyrosinkinase-Inhibitor, zeigte sich eine Krankheitsstabilisierung unter Therapie mit der PD-1 Blockade.¹¹⁵ Der Einsatz des gegen den Checkpoint CTLA4 gerichteten Antikörpers Ipilimumab zeigte bei Patienten mit Synovialsarkomen jedoch keinen positiven Effekt.⁹³

Ansatzpunkt für therapeutische Antikörper stellt das auf vielen Unterformen von STS stark exprimierte Disialogangliosid GD2 dar.²⁷ Bislang wird dieses tumorspezifische Antigen beispielsweise bereits bei Neuroblastomen mittels therapeutischer Antikörper adressiert.¹¹ Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten bereits die Wirksamkeit von anti-GD2-Antikörpern auf die NK-Zell-vermittelte Lyse von GD-exprimierenden STS-Zelllinien feststellen.²³ Andere immuntherapeutische Methoden wie CARs gegen GD2 werden bereits klinisch getestet.¹²¹ Die Vakzinierung gegen GD2 zeigte bislang keine signifikante Verbesserung der Prognose.²⁸

Es existieren bisher also keine zugelassenen immuntherapeutische Ansätze bei STS, und trotz vielversprechender präklinischer Konzepte besteht weiterhin ein dringender Bedarf an innovativen Therapien zur signifikanten Verbesserung der schlechten Prognose von STS-Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung. Die Kombination aus therapeutischen Antikörpern und der Blockade relevanter Immuncheckpoints könnte durch eine additive Steigerung der Aktivität von Immunzellen eine interessante neue Therapieoption darstellen. Ansätze, dafür NK-Zellen einzusetzen, sollen in den folgenden Kapiteln genauer erläutert werden.

1.3. Natürliche Killerzellen

1.3.1. Grundlagen

Wenngleich das Hauptaugenmerk eines Großteils aktueller immuntherapeutischer Konzepte auf den T-Lymphozyten liegt, gibt es im Immunsystem darüber hinaus auch andere Akteure mit immuntherapeutischem Potential. Dazu zählen die NK-Zellen, die als Teil der angeborenen Immunabwehr einen wichtigen Beitrag zur Kontrolle von insbesondere viralen Infektionen und zur Elimination von malignen Zellen leisten.¹⁰³ Die vorliegende Arbeit untersucht, inwieweit die im Folgenden vorgestellten immuntherapeutischen Konzepte die Effektivität dieser Zellen in der Zerstörung von malignen Zellen verbessern können, da bei Patienten mit malignen Erkrankungen die Funktion der NK-Zellen häufig eingeschränkt ist.

NK-Zellen stellen neben T- und B- Zellen die dritte große Gruppe von Lymphozyten dar. Zahlenmäßig sind sie diesen mit nur etwa zehn bis fünfzehn Prozent Anteil an den Lymphozyten im peripheren Blut aber deutlich unterlegen.^{169,173} Daneben finden sich NK-Zellen auch in sekundärem lymphatischem Gewebe sowie in Leber, Uterus und Milz.¹⁶⁹ Im Blutausstrich erscheinen NK-Zellen als Lymphozyten mit großen Granula, immunophänotypisch lassen sie sich durch die für sie charakteristische Expression von CD56 und CD16 bei gleichzeitigem Fehlen von CD3 auf ihrer Oberfläche identifizieren.¹⁰⁴ Im

Regelfall werden zwei Subgruppen unterschieden: Mit ca. 90% Anteil im peripheren Blut machen die zytotoxisch wirksamen CD16^{bright}CD56^{dim} Zellen die größere der beiden aus. Die CD16^{dim}CD56^{bright} Gruppe hingegen ist stärker in sekundär lymphatischem Gewebe vertreten und für die Sekretion von Zytokinen verantwortlich, womit ihr eine vorwiegend immunregulative Aufgabe zufällt. Es wird vermutet, dass letztere eine Vorstufe in der Entwicklung zu zytotoxischen Zellen darstellt.¹⁰¹

Die Entwicklung von NK-Zellen findet hauptsächlich im Knochenmark statt,¹⁵⁰ in der Schwangerschaft entwickeln sich aber auch in Leber und Milz fetale NK-Zellen mit geringer Aktivität.⁹⁵ Ausgehend von hämatopoetischen Stammzellen differenzieren sie unter dem Einfluss diverser Transkriptions- und löslicher Membranfaktoren.¹⁶⁹ Essentiell für die funktionelle Reifung ist unter anderem das Zytokin IL-15.⁵¹

Anders als T- und B-Lymphozyten zählt man die NK-Zellen zum angeborenen Immunsystem, da sie ohne eine vorangehende antigen-spezifische Sensibilisierung aktiviert werden können.¹⁵⁰ Zudem besitzen sie keinen für die Aktivierung hauptverantwortlichen Rezeptor wie den T- bzw. B-Zell-Rezeptor bei Zellen der adaptiven Immunabwehr, sondern mehrere Rezeptoren, die bei der Steuerung der Zelle zusammenwirken, wie in Kapitel 1.3.2. genauer erläutert wird. Dennoch teilen sie einige Eigenschaften mit den Zellen der adaptiven Immunantwort: So durchlaufen sie während ihrer Entwicklung einen Selektions- und Edukationsprozess.¹³⁹ Zudem sind sie in der Lage, Gedächtniszellen zu generieren,¹¹³ die langlebiger als normale NK-Zellen mit einer durchschnittlichen Lebensdauer von zwei Wochen sind.¹⁷³

1.3.2. NK-Zell-Aktivierung und Effektorfunktionen

Die Aktivierung einer NK-Zelle ist ein komplexer Mechanismus. Sie exprimieren eine Vielzahl von aktivierenden und inhibitorischen Rezeptoren,¹⁰³ deren Zusammenspiel entscheidet, ob die Zelle aktiviert oder gehemmt wird – je nachdem, welches Signal überwiegt.¹¹⁷

Eine Vielzahl aktivierender Rezeptoren funktionieren durch sogenannte ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs), deren Phosphorylierung zur Aktivierung führt. Inhibitorische Rezeptoren weisen als Korrelat ITIMs (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs) auf, die, durch Phosphorylierung aktiviert, ihrerseits die ITAMs dephosphorylieren und so die Aktivierung der NK-Zelle blockieren.¹¹⁷

Die prominentesten inhibitorischen Rezeptoren auf NK-Zellen sind die killer immunoglobulin-like receptors (KIRs).¹⁵³ Daneben spielt vor allem das Heterodimer aus CD94 und NKG2A eine wichtige

inhibitorische Rolle.¹¹⁷ Gemeinsam ist ihnen die Erkennung von Major Histocompatibility Complex I (MHC I) auf der Zelloberfläche.¹⁵³

Zu den aktivierenden Rezeptoren zählen die Natural Cytotoxicity Receptors (NCR) mit ihren Vertretern NKp30, NKp44 und NKp46.¹¹⁷ Nach aktuellem Wissensstand spielen NCRs eine prominente Rolle in der Erkennung von (maligne entarteten) Targetzellen durch NK-Zellen. Neben dieser Rezeptor-Gruppe existiert als weiterer aktivierender Rezeptor NKG2D, der sich beispielsweise auch auf zytotoxischen T-Zellen findet.⁷⁹ Zu den wichtigsten Liganden dieses Rezeptors zählen MICA oder MICB.¹²⁵ Dabei handelt es sich um MHC I Polypeptid-verwandte Sequenzen A und B, die auf einigen Tumoren, wie dem Leberkarzinom, epithelialen Tumoren und Melanomen stark exprimiert werden.²⁹

Auf die Rezeptoren, auf denen im Rahmen der vorliegenden Arbeit das Augenmerk liegt, soll im Kapitel 1.4. eingegangen werden.

Um die Zerstörung gesunder Zellen zu verhindern, wird die zytotoxische Funktion der NK-Zelle gehemmt, wenn sie körpereigenes MHC-I auf der Zelle detektiert. Die Bindung daran sendet ein inhibitorisches Signal, das eventuelle andere aktivierende überwiegen kann. Ist dies der Fall, wird die körpereigene Zelle nicht eliminiert. Starke aktivierende Signale können die inhibitorische Wirkung der MHC-I-Expression jedoch unwirksam machen. Sobald eine entartete oder fremde Zelle, die kein MHC-I exprimiert, erkannt wird, fällt dieser Schutzmechanismus aus – die Zelle wird lysiert. Dieses Prinzip wird als „Missing self“ bezeichnet. Wird MHC-I exprimiert, gleichzeitig jedoch auch durch zellulären Stress induzierte aktivierende Liganden, kommt es ebenfalls zu einer Aktivierung der NK-Zelle. Das können beispielsweise MICA oder MICB sein, die als Liganden an den aktivierenden Rezeptor NKG2D binden¹⁶¹. Die Mechanismen der Tumorzellerkennung durch NK-Zellen sind in Abbildung 1-1 dargestellt.

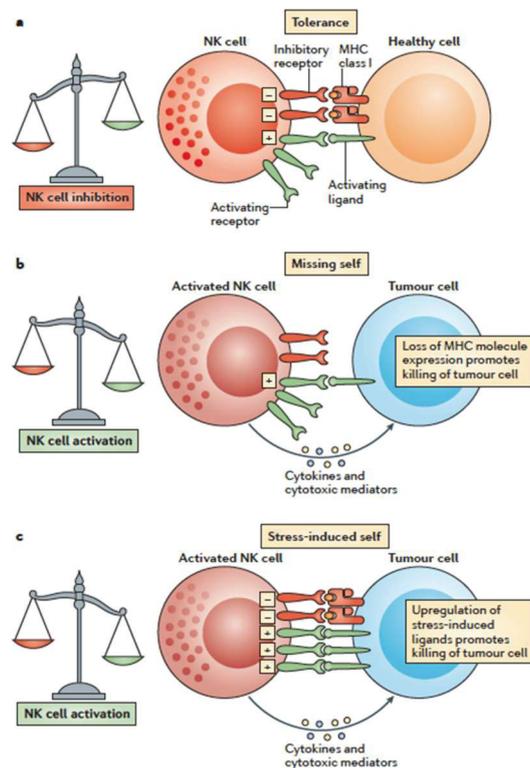


Abbildung 1-1: Erkennung von Tumorzellen durch NK-Zellen. (a): Toleranz gesunder Zellen, die körpereigenes MHC-I exprimieren. (b): Fehlen von MHC-I auf Tumorzellen führt zur NK-Zell-Aktivierung. (c): Stressinduzierte Liganden auf der Tumorzelle aktivieren die NK-Zelle (aus Vivier et al. 2012¹⁶¹).

Die NK-Zelle lysiert die Zielzelle, indem sie Perforine und Granzyme aus ihren Granula freisetzt, die die Zellmembran zerstören und so zum Zelltod führen.¹⁶¹ Eine weitere Option besteht in der Expression von Apoptose-induzierenden Liganden wie dem Fas- oder TRAIL-Liganden auf ihrer Oberfläche. Die Bindung daran setzt in der Zielzelle die Apoptose, den programmierten Zelltod, in Gang.⁹⁵

1.3.3. Stimulation von NK-Zellen

Die konstitutive Aktivität von NK-Zellen kann durch verschiedene Agentien stimuliert werden. Dies ist insbesondere beim Einsatz in der Tumorthherapie von großer Bedeutung, da unstimulierte NK-Zellen nur eine begrenzte Wirksamkeit gegen Zielzellen zeigen. Eine herausragende Rolle als Stimulans spielt das Zytokin Interleukin-2 (IL-2), das in vivo vorwiegend von T-Helferzellen sezerniert wird und unter anderem zur Aktivierung von NK-Zellen beiträgt.⁸³ Das zeigt sich einerseits in einer Proliferation nach Stimulation,¹²⁶ andererseits in einer erhöhten zytotoxischen Wirkung der einzelnen Zellen.⁸⁰ Infolge der Aktivierung kommt es auch zur phänotypischen Veränderung der NK-Zellen: NKG2D wird

hochreguliert,⁷⁵ und der NCR NKp44, der auf ruhenden NK-Zellen nicht nachweisbar ist, wird exprimiert.^{102,117,126}

Durch Stimulation mit IL-2 wird die Fähigkeit von NK-Zellen, solide Tumoren zu infiltrieren und effektiv Zellen zu lysieren, verbessert.⁸⁰ Dieser Effekt kann immuntherapeutisch genutzt werden. IL-2-basierte Therapien können die Prognose von Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom und Melanom verbessern. Dies gilt allerdings nur für etwa fünf bis zehn Prozent dieser Patienten. Zudem ist der Einsatz von IL-2 aufgrund starker Nebenwirkungen wie dem Capillary Leak Syndrom begrenzt.⁸³ IL-2 kann daher zwar zur Steigerung der NK-Zell-Aktivität eingesetzt werden, stellt aber keine eigenständige Therapieoption dar. Neben IL-2 können auch andere Stimulantien eingesetzt werden, um die Aktivität von NK-Zellen zu steigern, wie beispielsweise das Zytokin IL-15¹³ oder Resiquimod, einen Agonisten an Toll-like-Rezeptoren¹⁴³. Eine systemische Applikation dieser Substanzen ist durch die signifikante Toxizität jedoch nicht möglich.

1.3.4. NK-Zellen in der Immunosurveillance

NK-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Immunosurveillance maligner Erkrankungen: Sie leisten einen entscheidenden Beitrag einerseits in der Kontrolle entarteter Zellen eines primären Tumors, andererseits auch in der Elimination von im Körper zirkulierenden malignen Zellen und verhindern dadurch eine Metastasierung.¹⁴⁴ Eine verminderte Aktivität der NK-Zellen geht mit einem erhöhten Risiko einher, eine Neoplasie zu entwickeln.⁵⁹ Durch Inaktivierung von NK-Zellen im immuninkompetenten Rattenmodell konnte eine ungehinderte Tumorpheriferation nach Injektion von Tumorzellen beobachtet werden, während die Gabe von NK-Zellen vor der Tumordinjektion zu einer verbesserten Tumorkontrolle führte und eine Metastasierung verhinderte.¹⁰ Eine hohe Anzahl tumorinfiltrierender NK-Zellen geht bei kolorektalem Karzinom, squamösem Lungenkarzinom und Magenkarzinom mit einer günstigen Prognose einher.²⁹

Diese Erkenntnisse korrelieren mit der Tatsache, dass bei einer Vielzahl von Erkrankungen sowohl eine verringerte Anzahl als auch eine eingeschränkte Funktion der NK-Zellen nachweisbar ist. Bestes Beispiel hierfür ist die primäre NK-Zell-Defizienz, die sich in eine klassische und eine funktionelle Form untergliedern lässt. Bei ersterer liegt ein quantitativer, bei letzterer ein qualitativer Mangel von NK-Zellen zu Grunde. Gemein ist beiden Typen eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber viralen Erregern und der Entwicklung von Malignomen, insbesondere virusassoziierter Tumoren.¹¹¹ Rauchen⁴⁸ und Übergewicht¹¹² vermindern die NK-Zell-Aktivität. Auch bei Autoimmunerkrankungen wie Diabetes Typ I und Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis lassen sich Einschränkungen der NK-Zellen

beobachten.⁹⁵ Psychosoziale Faktoren scheinen ebenfalls einen Einfluss auf die Zytotoxizität von NK-Zellen zu haben.⁹⁰ Darüber hinaus lässt sich eine Aktivitätseinschränkung von NK-Zellen bei Krebserkrankungen wie Mamma-¹⁴⁹ und Ovarialkarzinomen⁹⁰, Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphomen⁷⁴, Magenkarzinomen¹⁵¹, malignen Melanomen⁵⁶ und einer Reihe hämatologischer Malignome nachweisen⁶⁷. Bei einigen Krankheitsentitäten korreliert die NK-Zellfunktion mit der Aggressivität des Malignoms.⁷⁴

Die beiden in der vorliegenden Arbeit untersuchten Krankheiten reihen sich in diese Aufzählung ein. Bei AML ist die Zytotoxizität von NK-Zellen durch die mangelhafte Expression von NCR vermindert.^{33,46} Dass sich diese Downregulation bei Patienten in kompletter Remission nicht mehr findet, spricht für eine Beteiligung von Leukämiezellen an ihrer Entstehung.⁴⁶ Die schwache Expression von NCR kann zudem mit der Prognose der Patienten korreliert werden. Auch bei Patienten mit STS kann eine verminderte lytische Aktivität festgestellt werden, die durch Stimulation mit IL-2 wiederhergestellt werden kann.²²

1.3.5. NK-Zellen in der Immuntherapie

In Anbetracht der Einschränkungen bezüglich Funktion und Anzahl stellen NK-Zellen einen guten Ansatzpunkt für immuntherapeutische Interventionen dar. Eine Möglichkeit ist die Aktivierung autologer, also patienteneigener, NK-Zellen mit Zytokinen oder Interferonen. Durch diese Stimulation entstehen sogenannte lymphokine-activated killer cells (LAK), wobei diese Bezeichnung aktivierte T-Zellen einschließt, die eine erhöhte Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen aufweisen. Grund dafür sind eine Hochregulation von Effektormolekülen sowie eine Steigerung der Zytokinproduktion und Proliferation.²⁹ Entweder erfolgt die Aktivierung in vivo oder ex vivo mit anschließendem adoptivem Zelltransfer. Bislang konnte allerdings keine signifikante Wirksamkeit gezeigt werden, die Gabe von LAK zeigte bei Patienten mit Melanom und metastasiertem Nierenzellkarzinom keinen Vorteil gegenüber der alleinigen Infusion von IL-2.³⁹ Zudem geht die Gabe von IL-2 in höheren Dosen mit Nebenwirkungen wie der Auslösung eines capillary leak Syndroms einher und trägt außerdem über die Aktivierung von regulatorischen T-Zellen indirekt zu einer Dämpfung der Immunantwort bei.²⁹

In der Behandlung vor allem hämatologischer Neoplasien kommen allogene NK-Zellen, also die eines Spenders zum Einsatz. Nach Transplantation haploidentischer Stammzellen sind sie in der Lage, den Patienten vor unerwünschten Infektionen zu schützen, die aufgrund der T-Zell-Depletion ein gefürchtetes Risiko darstellen.¹⁵⁸ Zudem können durch die Alloreaktivität der NK-Zellen maligne Zellen eliminiert werden, was als Graft-versus-Disease-Reaktion (GvD) bezeichnet wird, während gleichzeitig

keine unerwünschten Graft-versus-Host-Reaktionen (GvH), d.h. Unverträglichkeitsreaktionen zwischen Spender-NK-Zellen und Körperzellen des Empfängers, auftreten.^{128,135} Der Einsatz solcher allogener NK-Zellen nach haploidentischer Stammzelltransplantation wird bereits mit guten Ergebnissen erprobt.⁸⁸ Beispielsweise erhielten in einer 2016 abgeschlossenen Phase II Studie acht Patienten mit AML oder Myelodysplastischem Syndrom (MDS) nach allogener Stammzelltransplantation und Gabe des Zytostatikums Cyclophosphamid Infusionen mit haploidentischen Spender-NK-Zellen sowie zusätzlich sechsmalig IL-2. Trotz HLA-Mismatch der NK-Zellen trat bei keinem Patienten eine GvH-Reaktion auf, womit diese Studie die Annahme stützt, dass die Infusion haploidentischer NK-Zellen nach allogener Stammzelltransplantation aufgrund des Ausbleibens von GvH-Reaktionen sicher ist.¹³⁵ Die Wirksamkeit der so verabreichten NK-Zellen ist unter anderem auch abhängig davon, ob eine neue oder reaktivierte Infektion mit Zytomegalivirus (CMV) vorliegt, die im Rahmen einer Stammzelltransplantation häufig auftritt. Infolge der Infektion zeigt sich eine ausgeprägte Aktivierung und beschleunigte Reifung der NK-Zellen. Die Exposition der NK-Zellen gegenüber dem Virus kann demnach evtl. deren antileukämischen Effekt verstärken.⁸⁸ Auch der Einsatz autologer, also patienteneigener, NK-Zellen stellt eine Option in der Behandlung maligner Neoplasien dar, bislang konnte jedoch keine therapeutische Wirksamkeit gezeigt werden. Beispielsweise konnten bei Patienten mit Tumoren des Gastrointestinaltrakts zwar autologe NK-Zellen expandiert werden und zeigten in vitro eine gute zytotoxische Aktivität. Nach Verabreichung war jedoch kein klinisches Ansprechen der Patienten zu beobachten.¹²⁹ Zusammenfassend ist der Einsatz insbesondere haploidentischer NK-Zellen bei Malignomen also ein interessanter Ansatz, den es weiter zu verfolgen gilt.

Vielversprechend scheint auch der Einsatz von NK-Zelllinien. Diese stammen von malignen Erkrankungen mit Proliferation von NK-Zellen ab, proliferieren jedoch nicht innerhalb des Empfängers. Nach Expansion in vitro zeigen die Zelllinien eine hohe Aktivität bezüglich Zytotoxizität und Zytokinproduktion in vivo.²⁹ Als Beispiel ist die zytotoxische Zelllinie NK-92 zu nennen, deren Einsatz bereits in klinischen Studien evaluiert wird.¹⁵⁵ Vorteil der Zelllinien ist deren einfache Handhabung und Qualitätskontrolle im Vergleich zu autologen oder Spender-NK-Zell-Präparaten.^{29,137}

Als letztes Beispiel für die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten von NK-Zellen in der Immuntherapie sollen CAR-NK-Zellen genannt werden. Das Konzept wurde zwar zuerst für T-Zellen entwickelt, NK-Zellen sind jedoch möglicherweise sogar besser geeignet als diese: Im Gegensatz zu T-Zellen können sie zusätzlich zum CAR-spezifischen Mechanismus auch auf ihre spontane, CAR-unabhängige Zytotoxizität zur Elimination von Zielzellen zurückgreifen, beispielsweise mittels NCR.⁷¹

Die beiden Therapiekonzepte, die in der vorliegenden Arbeit an NK-Zellen untersucht wurden, sollen in den folgenden Kapiteln ausführlich vorgestellt werden.

1.4. Immuncheckpoints und Liganden

1.4.1. Grundlagen

Als Immuncheckpoints bezeichnet man Rezeptoren auf der Oberfläche von Immunzellen, die eine Immunantwort dämpfen oder verstärken können. Inhibitorische Checkpoints sollen die Immunreaktion kontrollieren, so dass im Rahmen der Abwehr von Erregern oder malignen Zellen keine Schäden am körpereigenen Gewebe entstehen. Somit kommt Immuncheckpoints eine Schlüsselposition bei der Verhinderung von Autoimmunerkrankungen zu.¹³⁶ Aktivierende Checkpoints sind in der Lage, die Effektorfunktionen von Immunzellen zu verstärken, um eine effektive Abwehr zu gewährleisten.

Bereits mit der Entdeckung des inhibitorischen Checkpoints CTLA-4 und der Entwicklung des Antikörpers Ipilimumab, der CTLA-4 blockiert und mittlerweile erfolgreich beim malignen Melanom eingesetzt wird, begann man vor einigen Jahren, sich das immuntherapeutische Potential der Checkpoints zu Nutze zu machen.³⁴ Um die starke potentielle Wirkung von NK-Zellen gegen Tumore zu verstärken, stellt die Checkpoint-Blockade einen guten Ansatzpunkt dar. Durch die Blockade eines inhibitorischen Checkpoints wird dessen Wirkung auf die NK-Zelle aufgehoben, so dass Effektorfunktionen wieder ausgeführt werden können. Ein aktivierender Rezeptor kann mit einem agonistischen Antikörper in seiner Wirkung unterstützt werden.¹⁰⁴ Abbildung 1-2 stellt die Checkpoint-Blockade schematisch dar. Bis jetzt existieren nur wenige Daten zum Nutzen einer Checkpoint-Blockade bei NK-Zellen, erste Ergebnisse zu den auch im Rahmen dieser Arbeit untersuchten inhibitorischen Checkpoints TIGIT und PD-1 sind jedoch vielversprechend.^{57,172} So führte die Blockade von PD-1 nicht nur zur Reduktion der Tumorzellvolumina im Mausmodell, sondern es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass dieser Effekt nur in Anwesenheit von NK-Zellen auftrat.⁵⁷

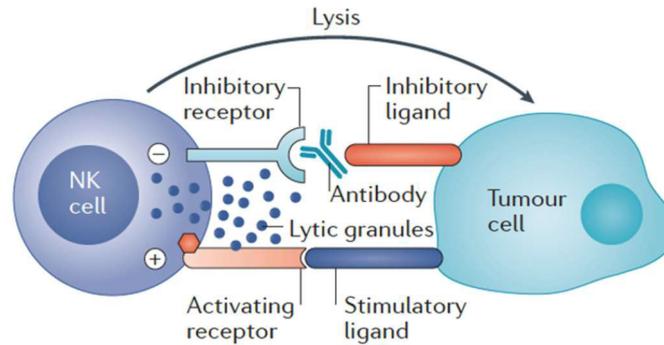


Abbildung 1-2: Funktionsweise der Immuncheckpoint-Blockade (aus Morvan und Lanier 2016¹⁰⁴).

Im Folgenden sollen die Immuncheckpoints und Liganden, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, genauer bezüglich Funktion, Lokalisation, Bindungspartnern und immuntherapeutischem Potential charakterisiert werden.

1.4.2. PD-1 und PD-L1

Bei Programmed cell death protein 1 (PD-1) handelt es sich um einen der bislang am besten untersuchten Immuncheckpoints. Er wird auf T-Zellen und Monozyten, nicht aber auf frisch isolierten NK-Zellen gesunder Spender exprimiert.¹³⁶ Durch exogenes IL-2 ist die Expression auf letzteren aber induzierbar.¹⁵ PD-1 besitzt unter anderem eine ITIM-Domäne⁶⁸ und trägt als inhibitorischer Rezeptor direkt zur Funktionseinschränkung von T-Zellen bei.¹³⁶ Zudem spielt es eine Rolle bei der Dysfunktion von NK-Zellen. So konnte gezeigt werden, dass PD-1 positive NK-Zellen beim Kaposi-Sarkom weder IFN- γ sezernieren noch degranulieren können, was durch die Gabe von IL-2 oder IL-15 rückgängig gemacht werden kann.¹³ Die zu PD-1 korrespondierenden Liganden Programmed Death Ligand 1 und 2 (PD-L1 und PD-L2) unterscheiden sich bezüglich ihrer Expression: Während PD-L1 sich auf vielen lymphoiden und nicht lymphoiden Zellen und Tumoren findet, ist die Expression von PD-L2 auf antigenpräsentierende Zellen beschränkt.⁸¹

Die Achse aus PD-1 und PD-L1 wird von einigen Viren und Tumoren genutzt, um sich vor Immunreaktionen zu schützen.^{61,136} PD-L1 wird auf primären AML-Zellen nicht in relevantem Maße exprimiert, kann jedoch zytokininduziert hochreguliert werden, was ein potenter Mechanismus des Immunescapes zu sein scheint.⁷⁷ Kongruent mit diesen Erkenntnissen ist die Tatsache, dass PD-1-

Polymorphismen mit einigen Autoimmun-Erkrankungen assoziiert sind und der PD-1-Signalweg somit wohl eine Schlüsselrolle in der Entstehung von Autoimmunerkrankungen innehat.¹³⁶

Da PD-1 auf tumorinfiltrierenden Lymphozyten, beispielsweise beim malignen Melanom³ exprimiert wird und PD-L1 auf vielen Tumorarten hochreguliert wird, eignet sich der Signalweg für eine immuntherapeutische Intervention.¹⁵⁶ Klinische Studien konnten die Wirksamkeit monoklonaler Antikörper gegen PD-1 und PD-L1 bereits beim Nierenzellkarzinom, Melanom, nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) und Blasenkarzinom zeigen.¹⁰⁹ Vor allem beim Melanom ist der Einsatz von anti-PD-1 Antikörpern erfolgreich.⁹² Dabei ist nicht letztlich gesichert, ob das Ansprechen auf die Therapie von der Expressionsintensität von PD-L1 im Tumor abhängt. Insbesondere beim Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom existieren widersprüchliche Daten dazu.²¹ Zwei Antikörper gegen PD-1, Pembrolizumab und Nivolumab, sind in Europa bereits für die Behandlung von Melanomen, klassischen Hodgkin-Lymphomen, Nierenzell- und Urothelkarzinomen, NSCLC sowie Plattenepithelkarzinomen der Kopf- und Halsregion zugelassen.^{20,105}

1.4.3. TIGIT

Der T-cell immunoglobulin and ITIM-domain Rezeptor (TIGIT), ist ein inhibitorischer Immuncheckpoint. Der 2009 von Yu et al. erstmals beschriebene Rezeptor besitzt unter anderem eine ITIM-Domäne. Er wird auf NK- und T-Zellen exprimiert und kann auf beiden Zelltypen durch Aktivierung hochreguliert werden.¹⁷⁰ Die Expressionsintensität korreliert mit der Funktionalität: je schwächer, desto stärker ist die IFN- γ - und Zytokin-Sekretion, die Degranulation, und damit das zytotoxische Potential.^{162,171} Bei Gesunden lässt sich eine große Bandbreite der Expressionsstärke beobachten. Eventuell korreliert dies mit der individuell unterschiedlichen Anfälligkeit gegenüber Infektionen, Autoimmunerkrankungen und Krebs.¹⁶²

Der zu TIGIT korrespondierende Hauptligand ist der humane Poliovirusrezeptor (PVR).¹⁷⁰ Weiterhin kann TIGIT auch an PVRL2 (CD112) binden.¹⁴⁷ Um die Bindung an PVR konkurriert TIGIT mit CD96 und dem aktivierenden Rezeptor CD226. Da TIGIT jedoch die höchste Affinität zum Liganden aufweist, kann er dessen Interaktion mit den Konkurrenten erfolgreich blockieren.¹⁷⁰

Durch die Bindung von TIGIT und PVR wird die Sekretion von IL-10 durch DC gesteigert, welches seinerseits immunsuppressiv auf T-Zellen wirkt.¹⁷⁰ Zugleich unterdrückt die Interaktion die Produktion von IFN- γ durch NK-Zellen.⁸² Die Zytotoxizität von NK-Zellen wird durch TIGIT direkt mittels seiner ITIM-Domäne inhibiert.¹⁴⁷

Die Blockade dieses Immuncheckpoints verspricht daher eine Steigerung der zytotoxischen Aktivität. Nachgewiesen wurde dies bereits am Beispiel von cytokine-induced killer cells (CIK), die CD56 und CD3 exprimieren und somit Eigenschaften sowohl mit NK- als auch T-Zellen teilen. Die Blockade von TIGIT führt bei ihnen zu einer gesteigerten Zytotoxizität, Proliferation und Produktion von IFN- γ , IL-6 und TNF- α der CIK-Zellen gegenüber Tumorzelllinien.¹⁷¹ Zudem konnten Zhang et al. im Mausmodell zeigen, dass eine Blockade von TIGIT die Funktionalität tumorinfiltrierender, nicht vorbehandelter, NK-Zellen wiederherstellen kann. Die Gabe von gegen TIGIT gerichteten monoklonalen Antikörpern resultierte in der Reduktion der Tumervolumina in Mäusen mit Kolonkarzinom und einer verlängerten Überlebenszeit. Darüber hinaus waren die NK-Zellen in Folge der Blockade bis zu 270 Tage im Besitz eines antitumoralen Gedächtnisses.¹⁷²

1.4.4. CD96

Das Oberflächenmolekül CD96 ist strukturverwandt mit TIGIT und besitzt ebenso wie dieses eine ITIM-Domäne.¹⁷ CD96 wird auf T- und NK-Zellen exprimiert und infolge von Stimulation hochreguliert, wobei es eine langsame Kinetik zeigt,¹⁶³ woher sich sein alternativer Name T cell activation, increased late expression (TACTILE) ableitet. Funktionell ist CD96 an der Adhäsion von T- und NK-Zellen beteiligt.⁴⁹

Zu seinem Liganden PVR weist CD96 eine niedrigere Affinität als TIGIT, aber eine höhere als CD226 auf,¹⁷ mit denen er um die Bindung konkurriert.¹⁷⁰ Dabei wirken CD96 und CD226 in der NK-Zellregulation entgegengesetzt.²⁶ Während CD226 die Zytotoxizität steigert,¹³⁸ wirkt CD96 als negativer Regulator der NK-Zellfunktion.²⁶ Die Expressionsstärke beider Rezeptoren korreliert mit der des bereits vorgestellten Checkpoints TIGIT. Auf NK-Zellen, die TIGIT exprimieren, findet sich CD226 nur in geringem, CD96 dagegen in höherem Maße und umgekehrt.¹⁷²

Aus diesem Grund kann eine Blockade von CD96 unter Umständen eine Verstärkung der Zytotoxizität nach sich ziehen. So konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass ein gegen CD96 gerichteter Antikörper in Kombination mit der Blockade von PD-1 oder CTLA-4 bzw. unter Zugabe des Zytostatikums Doxorubicin erfolgreich Metastasen reduzieren kann. Der Effekt ist von NK-Zellen abhängig – durch die Blockade wird die Produktion von IFN- γ gesteigert und die Infiltration der NK-Zellen gefördert.¹⁸

1.4.5. PVR

Der humane Poliovirus Rezeptor (PVR) zählt zur Familie der Nectine. Andere Bezeichnungen für ihn sind Nectin-like molecule 5 (necl-5) oder CD155. Neben PVR existieren die PVR-ähnlichen Proteine (PVRL) 1 bis 4. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll das Augenmerk aber lediglich auf PVR liegen.

Physiologisch wird PVR auf DC, Fibroblasten und Endothelzellen,¹⁷⁰ zudem auf einer Reihe von malignen Zellen verstärkt exprimiert.⁵⁸ So zum Beispiel beim Melanom,⁶⁰ Kolonkarzinom,⁹⁷ Neuroblastom²⁵ und auf nahezu allen AML.¹¹⁸

Funktional handelt es sich um ein Zelladhäsions-Molekül. Als solches spielt es eine Rolle bei Proliferation, Differenzierung und Zellmigration.¹³⁰ Es ist an der Tumorpheriferation beteiligt und seine Expressionsstärke korreliert mit der von VEGF und der intratumoralen Gefäßdichte. Eine Herunterregulation führt zu einer Hemmung der Proliferation.⁵⁰ Maligne Zellen oder Viren wie beispielweise das Cytomegalievirus nutzen diesen Mechanismus, um sich vor einer Elimination durch das Immunsystem zu verbergen.¹⁵⁴

Eine Blockade von PVR mit dem spezifischen Antikörper D171 verhindert die Bindung von TIGIT und CD226 an PVR.¹⁷⁰ Die kombinierte Blockade von TIGIT und PVR resultiert beim Melanom in stark verbesserter Effektorfunktion zytotoxischer T-Zellen.⁹¹

1.4.6. SLAMF-7

Zur Familie der Signaling lymphocyte activation molecules (SLAM Familie) zählt SLAMF-7.¹⁹ Alternativ wird er als CS1, CD319 oder CD2-like receptor activating cytotoxic cells (CRACC) bezeichnet.⁴ Neben SLAMF-7 existieren sechs weitere SLAM Rezeptoren, denen bis auf eine Ausnahme – 2B4 – ihre Eigenschaft als homotype Rezeptoren gemein ist, das heißt, sie binden an ein Molekül des gleichen Rezeptors auf einer anderen (trans-Interaktion) oder derselben Zelle (cis-Interaktion).⁵⁴ Sie werden auf Zellen hämatopoetischen Ursprungs exprimiert.²⁴

Die Rezeptoren der SLAM-Familie können sowohl aktivierende als auch inhibitorische Effekte auf NK-Zellen haben, abhängig davon, ob die Zellen zusätzlich ein sogenanntes Adaptorprotein, im Fall von SLAMF-7 das Ewing's sarcoma associated transcript 2 (EAT-2), exprimieren. In dessen Anwesenheit aktiviert SLAMF-7 die NK-Zelle, fehlt es, wird deren Funktion inhibiert.³⁶ Im Regelfall ist SLAMF-7 daher ein positiver Regulator, da EAT-2 auf NK-Zellen exprimiert wird.¹⁵²

Da SLAMF-7 stark auf Plasmazellen exprimiert wird, dient es als Marker des multiplen Myeloms und wird als Zielantigen des therapeutischen Antikörpers Elotuzumab bereits immuntherapeutisch genutzt. Dieser monoklonale IgG1-Antikörper aktiviert NK-Zellen unter anderem durch Auslösung der antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC).⁹ Im Rahmen dieser Arbeit steht jedoch vorrangig die Rolle von SLAMF-7 als Immunregulator im Fokus.

1.4.7. CD137

Das Oberflächenmolekül CD137 gehört zur Familie der Tumor Nekrose Faktor (TNF)-Rezeptoren.⁶⁹ Es handelt sich um ein Oberflächenmolekül, das sowohl auf Zellen des nativen als auch des adaptiven Immunsystems exprimiert wird,¹⁶⁴ so auch auf aktivierten NK-Zellen.⁶ Durch Bindung an CD137 wird die Proliferation und Zytokinsekretion von NK-Zellen gesteigert.¹⁶⁵ Der Einsatz von agonistischen Antikörpern gegen CD137 führt bei NK-Zellen zu einer verbesserten Degranulation und Zytotoxizität.⁷² Damit unterscheidet CD137 sich deutlich von den anderen bereits vorgestellten Checkpoints: Aufgrund seiner aktivierenden Natur ist nicht eine Antagonisierung, sondern ein Agonismus an diesem Checkpoint Ziel einer möglichen therapeutischen Intervention.

Korrespondierender Ligand ist CD137L, der neben Zellen hämatopoetischen Ursprungs auch auf einigen soliden Tumoren¹³¹ und Lymphomen¹¹⁴ exprimiert wird. Es konnte gezeigt werden, dass solide Tumoren durch agonistische Antikörper gegen CD137 eliminiert werden können.⁹⁹ Zwei solche Antikörper, Urelumab und Utomilumab, werden bereits in klinischen Studien getestet, meist in Kombination mit anderen Antikörpern wie Nivolumab, Ipilimumab oder Rituximab.¹⁶⁸ Die bislang vorliegenden Ergebnisse weisen auf ein Ansprechen auf die CD137-Agonisten hin, wengleich aufgrund der Kombination mit anderen Antikörpern nicht zweifelsfrei zu bestimmen ist, welchen Anteil sie am therapeutischen Erfolg haben. Eingeschränkt wird der Einsatz des potenteren der beiden Agonisten, Urelumab, insbesondere durch dessen ausgeprägte toxische Wirkung auf die Leber. Da aus diesem Grund nur geringe Dosen des Wirkstoffs eingesetzt werden können, sind die Ergebnisse in klinischen Studien aktuell noch nicht zufriedenstellend. Jedoch besteht eine deutliche Diskrepanz zu präklinischen Daten, was darauf hinweist, dass die Effektivität des Antikörpers durch die Dosierungsrestriktion eingeschränkt wird.³¹

1.5. Therapeutische Antikörper

1.5.1. Grundlagen

Therapeutische Antikörper sind physiologischerweise nicht vorhandene Antikörper, die durch ihre spezifische Bindung an ein einziges Epitop eine effektive und wirkungsvolle Therapieoption bei vielen malignen Erkrankungen darstellen.¹⁰⁰ Ihre Wirkung beruht einerseits auf der Antagonisierung onkogener Signalwege und andererseits auf einer direkten Opsonierung von Tumorzellen gegenüber Immunzellen. Nomenklatorisch lassen sich monoklonale, unprozessierte z.B. murine Antikörper von chimären Konstrukten unterscheiden. Beide Formen stammen von einem einzigen (üblicherweise nicht-humanen) B-Zellklon ab, letztere werden aus nicht-humanen und humanen Immunglobulin-Genen zusammengesetzt.

An der Lyse von Tumorzellen sind therapeutische Antikörper über mehrere Mechanismen beteiligt. Dazu zählen neben der unmittelbaren zytotoxischen Wirkung, beispielsweise einer Rezeptorblockade oder Apoptoseinduktion, immunvermittelte Mechanismen. Darunter zusammengefasst werden die complement-dependent cytotoxicity (CDC) und die antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC).¹³⁴ Im Rahmen der vorliegenden Arbeit liegt das Augenmerk auf der ADCC, die daher im Folgenden genauer erläutert werden soll.

Mit ihrem variablen Fab-Teil binden therapeutische Antikörper an das tumorspezifische Antigen und mit der konstanten Domäne (Fc-Teil) an Oberflächenrezeptoren auf Immunzellen.³⁸ Im Falle von NK-Zellen handelt es sich dabei um CD16,¹² einen niedrig-affinen, aktivierenden Rezeptor (FcγRIIIa), der konstitutiv exprimiert wird.⁴⁷ Die Affinität zum Fc-Teil wird zudem von einem Polymorphismus im humanen CD16 beeinflusst: Handelt es sich bei der Aminosäure an Stelle 158 um Valin, ist sie erhöht, ist es Phenylalanin, ist sie erniedrigt.¹⁰⁴ Durch die Bindung wird einerseits ein direkter Kontakt zwischen Ziel- und Effektorzellen hergestellt, andererseits die NK-Zelle aktiviert. Der Wirkmechanismus der ADCC ist in Abbildung 1-3 dargestellt.

Im Folgenden sollen die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten therapeutischen Antikörper sowie ihre Zielantigene genauer charakterisiert werden.

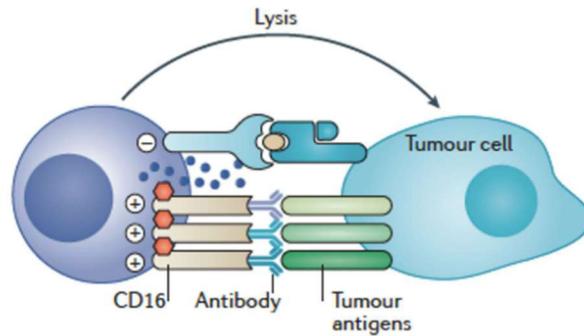


Abbildung 1-3: Wirkmechanismus der ADCC. Im oberen Teil der Abbildung sind zusätzlich ein inhibitorischer NK-Zell-Rezeptor und ein von MHC-I gebundenes Antigen dargestellt (aus Morvan und Lanier¹⁰⁴).

1.5.2. Anti-CD157 Antikörper

Für die Versuche zur AML wurde als therapeutischer Antikörper zunächst OBT357NF eingesetzt. Dabei handelt es sich um einen Antikörper gegen das Oberflächenmolekül CD157. CD157 oder Bone marrow stromal antigen 1 (BST-1) spielt eine Rolle beim Wachstum von Vorläufern der B-Zellen.⁶⁵ Es wird auf bis zu 97% primärer AML-Patientenproben sowie in geringerem Ausmaß auf Leukämie-initiiierenden Zellen exprimiert.⁷⁸ Zudem findet es sich auf einer Vielzahl weiterer Zelltypen, wie dermalen Fibroblasten und Mastzellen in mehreren Geweben.¹²³

Der eingesetzte Antikörper OBT357NF, ebenfalls bekannt unter dem Namen MEN1112, ist ein monoklonaler, humanisierter Antikörper.⁷⁸ Die Defucosylierung seines Fc-Teiles führt zu einer vielfach verstärkten Affinität an die Effektorzelle und somit zu einer verbesserten ADCC.¹⁰⁸

1.5.3. Anti-CD33 Antikörper

Das Zielantigen des anderen bei den Versuchen zur AML eingesetzten Antikörpers LP-47 ist CD33. Dieses Oberflächenmolekül wird stark auf myeloischen Vorläuferzellen exprimiert. Vermutlich trägt es zu deren Proliferation und Differenzierung bei.³⁵ Da es sich auf bis zu 85-90% der Zellen von AML-Patienten findet, spielt es eine wichtige Rolle bei der Diagnosestellung. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Expressionsstärke mit den prognostischen Subgruppen bei AML korreliert.⁷⁶

Aufgrund der hohen Expressionsrate eignet sich CD33 zudem als Zielantigen therapeutischer Antikörper. Beim anti-CD33 Antikörper Gemtuzumab Ozogamicin (GO) handelt es sich um einen humanisierten, monoklonalen Antikörper, der mit dem potenten Zellgift Calicheamicin konjugiert ist.

Infolge der Bindung an CD33 wird das Konstrukt internalisiert und das Toxin kann im Zellinneren seine Wirkung entfalten.⁸⁶ Seit 2018 ist GO (Handelsname Mylotarg®, Wyeth, TX, USA) in Deutschland für die Behandlung von Erwachsenen mit Erstdiagnose AML wieder zugelassen.

Bei dem für diese Arbeit verwendeten anti-CD33 Antikörper LP-47 handelt es sich mit P67.7 um den gleichen Immunglobulinklon wie bei GO.¹²²

1.5.4. Anti-GD2 Antikörper

Für die Versuche zu Weichteilsarkomen wurde ch14.18 verwendet. Dieser Antikörper ist gegen das Disialogangliosid GD2 (GD2) gerichtet. GD2 ist ein Glycosphingolipid, bestehend aus einer Lipidkomponente und einem Kohlenhydratrest an der Zelloberfläche.²⁷ Normalerweise befindet es sich auf Zellen des Zentralen Nervensystems, peripherer Nerven und Melanozyten und spielt dort vermutlich eine Rolle beim Zustandekommen extrazellulärer Bindungen.^{30,119} Verstärkt exprimiert wird es auf maligne entarteten Zellen z.B. bei Neuroblastomen, Kleinzelligen Lungenkarzinomen, Melanomen und Weichteilsarkomen.^{27,107} Daher eignet es sich gut als Target für eine gezielte Antikörpertherapie.

Da ch14.18 einen murinen Fab- und einen humanen Fc-Teil besitzt, handelt es sich um einen chimären Antikörper.¹⁴⁵ Ziel dieser Kombination ist eine Verringerung von Immunantworten gegen den Antikörper. So zeigt die chimäre Form eine geringere Immunogenität und längere Halbwertszeit als monoklonale murine Konstrukte bei gleichzeitig vergleichbarer Affinität zu GD2.¹¹⁹ In der Klinik findet ch14.18 unter dem Namen Dinutuximab bereits erfolgreiche Anwendung: 2015 wurde es in Kombination mit GM-CSF, IL-2 und Isotretinoin von der FDA zur Behandlung von pädiatrischen Hochrisiko-Neuroblastomen zugelassen.¹¹

2. Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit Fragestellungen zur NK-Zell-basierten Immuntherapie bei AML und STS:

- *Durch Charakterisierung des Expressionsmusters von Immuncheckpoints auf NK-Zellen von Patienten und gesunden Kontrollen werden mögliche Ziele für eine Immuncheckpoint-Blockade identifiziert.*
- *Die Auswirkungen einer Blockade von Immuncheckpoints auf die zytotoxische Funktion von NK-Zellen werden untersucht und in der Kombination mit therapeutischen Antikörpern evaluiert.*

Im Folgenden soll detaillierter auf die bearbeiteten Fragestellungen eingegangen werden.

2.1. Identifikation von Zielstrukturen für eine Immuncheckpoint-Blockade

Die Hauptfragestellung lautet:

Lässt sich anhand von Unterschieden in der Expression von Immuncheckpoints auf NK-Zellen des peripheren Bluts von Patienten mit Erstdiagnose AML oder STS im Vergleich zu gesunden Individuen ein mögliches Ziel für eine Immuncheckpoint-Blockade identifizieren?

Diese Frage soll durch immunphänotypische Untersuchung von PBMC von Patienten und gesunden Spendern beantwortet werden. Dabei wird die Expression ausgewählter Immuncheckpoints untersucht.

Darüber hinaus sollen weitere Fragestellungen untersucht werden:

- *Führt die Stimulation von NK-Zellen zu einer verstärkten Expression von Immuncheckpoints auf den aktivierten Zellen, und lassen sich durch diese Hochregulation weitere Zielstrukturen zur Blockade identifizieren?*
- *Expriemieren AML- und Sarkom-Zelllinien Liganden der ausgewählten Immuncheckpoints?*
- *Welche Immuncheckpoint-Liganden werden auf primären AML-Zellen von Patienten expriemiert?*

- *Welche Liganden werden auf Tumormaterial von Patienten mit STS exprimiert?*
- *Kommt es in Kokultur von Tumorzelllinien und therapeutischen Antikörpern zu einer Hochregulation von Immuncheckpoints auf NK-Zellen?*

2.2.Immuncheckpoint-Blockade in Kombination mit therapeutischen Antikörpern

Die Hauptfragestellung lautet:

Nimmt die Zytotoxizität von NK-Zellen durch die antikörperbasierte Blockade ausgewählter Immuncheckpoints und bzw. oder ihrer Liganden in Kombination mit dem Einsatz tumorspezifischer therapeutischer Antikörper zu?

Zur Beantwortung dieser Frage wird die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen nach Blockade verschiedener Immuncheckpoints und Gabe des entsprechenden therapeutischen Antikörpers gemessen.

Des Weiteren werden auch die folgenden weiterführenden Fragen bearbeitet:

- *Ist eine Immuncheckpoint-Blockade bei durch Koinkubation mit Zytokinen vorstimulierten NK-Zellen effektiver als bei konstitutionell aktiven?*
- *Kommt es durch die Blockade zu einer erhöhten Sekretion von Zytokinen durch NK-Zellen?*
- *Zeigt eine Blockade bei NK-Zellen von Patienten mit AML oder STS ähnliche Effekte wie bei NK-Zellen von Gesunden?*

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte und Softwares

BD FACSDIVA™ Software	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
BD™ Cytometric Bead Array (CBA)	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
CO ₂ Inkubator (C170)	Binder GmbH, Tuttlingen, DE
Mr. Frosty Einfrierhilfe	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
FCAP Array Software 3.0	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Flow Jo (Version 10)	FlowJo LLC, Ashland, OR, USA
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr, Bulle, CH
Gefrierschrank (-80°C)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Gefriertruhe (-150°C)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
Kolbenhubpipetten (Research plus)	Eppendorf, Hamburg, DE
Kühlschrank (2-8°C)	Liebherr, Bulle, CH
Laminar Flow Werkbank (Safe 2020/HeraSafe)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
MACS MultiStand (Magnetständer)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, DE
Mikroskop (DMIL)	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE
PipettBoy acu	Integra Biosciences, Ferndwald, DE
Stickstofftank (-196°C)	Messer Industriegase GmbH, Bad Soden, DE

TopCount NXT Microplate Scintillation and Luminescence Counter	Packard Instrument Company, Meriden, Connecticut, USA
Vortex Mischer (Reax top)	Heidolph Instruments GmbH&Co.KG, Schwabach, DE
Wasserbad (VWB 12)	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Zellzählgerät (Countess™)	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zentrifuge (Centrifuge 5920R)	Eppendorf, Hamburg, DE
Zentrifuge (Megafuge 2.0)	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Zentrifuge (Rotina 420R)	Hettich Lab Technology, Tuttlingen, DE

Tabelle 3-1: Geräte und Softwares.

3.1.2. Verbrauchsmaterial

Butterfly (Safety-Multifly-Kanüle)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Countess™ cell counting chamber side	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Cryogenic vials (1,0ml, 1,8ml)	Starlab GmbH, Hamburg, DE
Dreiwegehahn	Uno Plast As, Hundested, DK
Feindosierungsspritze, Infekt®F, 1ml	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Handschuhe	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Kanülen (Perfusion 50ml Syringe)	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Microlance™ 3	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Pasteurpipetten	VWR, Radnor, PA, USA
Pipettenspitzen 0,5-20/2-200/50-1000µl	Eppendorf, Hamburg, DE

Polypropylen-Zentrifugenröhrchen 15ml	Falcon™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Polypropylen-Zentrifugenröhrchen 50ml (CentriStar™)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Polystyrene-round-bottom-tube 5ml	Falcon™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Serologische Pipetten 5/10/25ml	Corning, New York City, NY, USA
Tissue Culture Plate, 12/24 Well, Flat Bottom (Flachbodenplatte)	Falcon™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Tissue Culture Plate, 96 Well, U Bottom (Rundbodenplatte)	Falcon™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
LumaPlate-96, 96 Well	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
Zellkulturflaschen (75cm ² , 125cm ²)	Falcon™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Tabelle 3-2: Verbrauchsmaterial.

3.1.3. Material für Zellkulturen und verwendete Zelllinien

0,05% Trypsin-EDTA	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Serva Electrophoresis, Heidelberg, DE
DPBS (Dulbecco's Phosphat)	PAN-Biotech, Aidenbach, DE
EDTA 0,5M pH 8.0 (Ethylendiamintetraacetat)	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
FBS (Fetal Bovine Serum)	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Ficoll-Separationslösung (Biocoll)	Biochrom, Berlin, DE
Heparin (Heparin-Natrium-25000-ratiopharm)	Ratiopharm GmbH, Ulm, DE
HEPES Buffer Solution (1M) (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Rekombinantes humanes IL-15	PeptoTech, Rocky Hill, NJ, USA
Rekombinantes humanes IL-2	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium)	PAN-Biotech, Aidenbach, DE
MACS BSA Stock Solution (Bovine Serum Albumin)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, DE
Pen Strep Glutamine (100X) (Penicillin, Streptomycin, Glutamine)	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Phytohämagglutinin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Resiquimod	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
RPMI 1640	PAN-Biotech, Aidenbach, DE
Trypanblau	Life technologies, New York City, NY, USA
Wasser, steril	Gene Center, München, DE

Tabelle 3-3: Verwendetes Material für Zellkulturen.

Zelllinie	Ursprung
HL-60 DSMZ-Nr.: ACC 3	<u>Humane akute myeloische Leukämie</u> , generiert aus peripherem Blut einer 35-jährigen Frau (Diagnose: AML FAB M2); DSMZ

KG-1 α DSMZ-Nr.: ACC 421	<u>Humane akute myeloische Leukämie</u> , generiert aus peripherem Blut eines 59-jährigen Mannes (Entwicklung aus einer erythroleukämischen Leukämie); DSMZ
LAN-1 DSMZ-Nr.: ACC 655	<u>Humanes Neuroblastom</u> , generiert aus einer Knochenmetastase eines 2-jährigen Jungen (Diagnose: Neuroblastom Grad IV); DSMZ
MOLM-13 DSMZ-Nr.: ACC 554	<u>Humane akute myeloische Leukämie</u> , generiert aus peripherem Blut eines 20-jährigen Mannes (Diagnose: AML FAB M5a im Rezidiv nach vorangegangenem myelodysplastischem Syndrom); DSMZ
MV4-11 DSMZ-Nr.: ACC 102	<u>Humane akute monozytäre Leukämie</u> , generiert aus peripherem Blut eines 10-jährigen Jungen (Diagnose: AML FAB M5); DSMZ
OCI-AML3 DSMZ-Nr.: ACC 582	<u>Humane akute myeloische Leukämie</u> , generiert aus peripherem Blut eines 57-jährigen Mannes (Diagnose: AML FAB M4); DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), Braunschweig DE
PL-21 DSMZ-Nr.: ACC 536	<u>Humane akute myeloische Leukämie</u> , generiert aus peripherem Blut eines 24-jährigen Mannes (nach refraktärer akuter promyelozytischer Leukämie nach einem mediastinalen Chlorom); DSMZ
SK-UT-1 ATCC-Nr.: HTB-114	<u>Humanes Leiomyosarkom</u> , generiert aus dem Tumor einer 75-jährigen Frau (Diagnose: Leiomyosarkom Grad III); ATCC

SW-872 ATCC-Nr.: HTB-92	<u>Humanes Liposarkom</u> , generiert aus dem Tumor eines 36-jährigen Mannes; ATCC (American Type Culture Collection), Manassas, VA, USA
TC-71 DSMZ-Nr.: ACC 516	<u>Humanes Ewing's Sarkom</u> , generiert aus dem Lokalrezidiv eines 22-jährigen Mannes; DSMZ

Tabelle 3-4: Verwendete Zelllinien.

Medienzusammensetzung	Zelllinien
RPMI 1640 + 10% FBS + 1% HEPES + 1% Penicillin/ Streptomycin	HL-60, KG-1 α , MOLM-13, MV4-11, OCI-AML3, PL-21
DMEM + 10% FBS + 1% HEPES + 1% Penicillin/Streptomycin	LAN-1, SW-872
IMDM + 10% FBS + 1% HEPES + 1% Penicillin/Streptomycin	SK-UT-1, TC-71

Tabelle 3-5: Zusammensetzung der Medien für die unterschiedlichen Zelllinien.

3.1.4. Material für Zellisolation, Durchflusszytometrie und Zytotoxizitätsassays

MACS-Säulen (LS)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, DE
MACS-Filter	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, DE
NK Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, DE
Cytometric Bead Array (CBA) - Wash buffer	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
CBA- Human IFN Flex Set	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
CBA- Human TNF Flex Set	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Formaldehyd Lösung, 37%	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, DE
Human FcR Blocking Reagent	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, DE

LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit	Invitrogen™ , Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
⁵¹ Chrom-Isotop (185MBq)	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, Deutschland

Tabelle 3-6: Material für Zellisolation, Durchflusszytometrie und Zytotoxizitätsassays.

Antikörper	Konjugierter Fluoreszenzfarbstoff	Klon	Firma
CD16	APC	3G8	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD33	PE/Cy7	WM-53	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
CD279	BV421	EH12.2H7	BioLegend, San Diego, CA, USA
TIGIT	APC	MBSA43	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
TIGIT	FITC	MBSA43	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
CD96	PE/Cy7	NK92.39	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD137	BV421	4B4-1	BioLegend, San Diego, CA, USA
GD2	PE	14.G2a	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
CD56	PE/Cy5	HCD56	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD56	FITC	HCD56	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD56	PE	HCD56	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD226	APC	11A8	BioLegend, San Diego, CA, USA
Isotype IgG1 κ	BV421	MOPC-21	BioLegend, San Diego, CA, USA

Isotype IgG1 κ	FITC	P 3.6.2.8.1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Isotype IgG1 κ	APC	P 3.6.2.8.1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Isotype IgG1 κ	PE/Cy7	MOPC-21	BioLegend, San Diego, CA, USA

Tabelle 3-7: Antikörper für die Durchflusszytometrie.

3.1.5. Therapeutische und Checkpoint-blockierende Antikörper

Antikörper	Klon	Firma/Herkunft
Anti-CD155/PVR Ab-1	D171	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Anti-CD157	OBT357NF	Menarini Group in Kooperation mit Oxford Bio Therapeutics, Abingdon, UK
Anti-CD33	LP47	Laboratory for Structural Molecular Biology, Gene Center der LMU München, DE
Anti-GD2	ch14.18	Universitätsklinikum Tübingen, DE
TIGIT Functional Grade Monoclonal Antibody	MBSA43	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Tabelle 3-8: Therapeutische und Checkpoint-blockierende Antikörper.

3.2. Methoden

3.2.1. Patienten- und Spenderproben

3.2.1.1. Blutproben von Patienten und gesunden Spendern

Für die vorliegende Arbeit wurde Blut von AML- und STS-Patienten sowie von gesunden Spendern gewonnen. Patienten, die am Klinikum Großhadern wegen eines neu diagnostizierten Weichteilsarkoms antineoplastisch behandelt werden sollten, wurde vor der ersten Gabe Chemotherapie peripheres venöses Blut entnommen. Im Regelfall wurden bei Sarkompatienten circa 50ml in EDTA- und Serumröhrchen abgenommen, bei Patienten mit AML häufig nur geringere Mengen (10-20ml) aufgrund der vorbestehenden Anämie. Ein Teil des EDTA-Bluts wurde dem Labor für Leukämiediagnostik (LfL) für die durchflusszytometrische Untersuchung übergeben, aus dem Rest wurden PBMC isoliert und für die spätere Verwendung eingefroren.

Das Blut von AML-Patienten wurde im Rahmen der Routinediagnostik gewonnen. Patienten mit STS wurden gesondert aufgeklärt. Ein Teil des Materials wurde dem LfL zur Untersuchung übergeben, der Rest wurde im Labor für Tumorimmunologie verarbeitet und die isolierten Zellen für die spätere Verwendung eingefroren.

Des Weiteren wurde Blut gesunder Spender gewonnen. Die Blutentnahme und Isolation der Blutzellen wurde im Labor für Tumorimmunologie durchgeführt. Die Spender rekrutierten sich aus Medizinstudenten, Medizinisch-Technischen Angestellten des Klinikums Großhadern und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe des Labors für Tumorimmunologie am Genzentrum.

3.2.1.2. Ethische Grundlagen und Datenschutz

Für alle Probenentnahmen von Patienten und Probanden liegen zustimmende Voten der Ethikkommission vor: Für die Gewinnung von Blutzellen von Patienten mit AML (Projekt-Nr. 216-08) und mit Weichteilsarkom (Projekt-Nr. 408-12), ebenso wie für die Blutentnahme bei gesunden Spendern (Projekt-Nr. 216-08).

Alle Patienten willigten schriftlich auf der im Anhang beigefügten Aufklärung in die Analyse und Verarbeitung der von ihnen gewonnenen Proben ein.

Zusätzlich zu Diagnose, histologischer Subentität, Alter und Geschlecht wurden keine weiteren patientenbezogenen Informationen akquiriert oder gespeichert. Die erhobenen Daten wurden anonymisiert erfasst.

3.2.2. Gewinnung von Zellen aus Blut

3.2.2.1. Isolation peripherer mononukleärer Zellen

Für die Isolation von NK-Zellen müssen zunächst die peripheren mononukleären Zellen (PBMC) aus Vollblut gewonnen werden. Die Abtrennung von den restlichen Blutbestandteilen erfolgt durch Dichtegradzentrifugation. Dabei wird das Blut auf Biocoll, eine Trennlösung, die Polysucrose enthält und mit 1,077g/l eine etwas geringere Dichte als Blut aufweist, aufgeschichtet. Durch Zentrifugation kommt es zur Auftrennung in Erythrozyten, Biocoll und Serum, sowie einen dünnen Film PBMC zwischen den beiden letztgenannten Schichten.

Gesunden Spendern wurden bis zu 300ml heparinisertes Vollblut aus einer peripheren Vene entnommen. Patientenproben wurden im Regelfall in EDTA-Monovetten gewonnen. Das Vollblut wurde im Verhältnis 1:1 mit DPBS gemischt und in 50ml Falcons auf je 15ml Biocoll geschichtet. Es wurde 30 Minuten bei 2000rpm zentrifugiert, wobei die Zentrifuge besonders langsam be- und entschleunigte, um die einzelnen Schichten nicht zu vermischen. Die PBMC enthaltende Schicht wurde vorsichtig mit einer Pasteur-Pipette abgesaugt, gesammelt und mit DPBS zehn Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen erneut in DPBS resuspendiert und weitere fünf Minuten zentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Dazwischen wurde die Gesamtzellzahl mithilfe eines automatischen Zellzählgerätes (Countess™) ermittelt.

Nach dem letzten Zentrifugationsschritt konnten die Zellen entweder direkt eingesetzt werden oder wurden für die spätere Verwendung eingefroren. Als Einfriermedium wurde FKS mit 10% DMSO benutzt. Nach zehn Tagen bei -80°C in einer Einfrierhilfe wurden die Zellen für die längerfristige Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert.

3.2.2.2. Isolation Natürlicher Killerzellen

NK-Zellen wurden durch Magnetic Activated Cell Sorting (MACS®) aus PBMC isoliert. Bei dieser Methode werden die verschiedenen Zelltypen mittels magnetischer Markierung und einem Gegenpol voneinander getrennt. Die in PBMC neben den NK-Zellen enthaltenen Zellen, wie beispielsweise T-Zellen, werden mit für diesen Zelltyp spezifischen Antikörpern (für T-Zellen z.B. gegen CD3 gerichtet, für B-Zellen gegen CD19 etc.) markiert. An diese Antikörper sind magnetische Beads gebunden. Nach Inkubation der Zellen mit diesen Antikörpern bleiben lediglich die NK-Zellen ungebunden und somit ohne magnetische Markierung – es handelt sich um eine Negativ-Isolation. Derart vorbereitet wird die Probe auf eine in einem Magneten befestigte Säule gegeben. Die an die magnetischen Beads gebundenen Zellen verbleiben in der Säule, nur die gewünschten NK-Zellen treten wieder aus.

Für die Isolation wurden zunächst PBMC des Spenders bzw. Patienten in Zellmedium gewaschen und gezählt. Pro 1×10^7 Zellen wurden sie in $40 \mu\text{l}$ FACS-Puffer aufgenommen und mit $10 \mu\text{l}$ NK Cell Biotin Antibody Cocktail für fünf Minuten bei $2-5^\circ\text{C}$ im Dunklen inkubiert. Nach Zugabe von $30 \mu\text{l}$ FACS-Puffer und $20 \mu\text{l}$ NK Cell Microbead Cocktail wurde erneut für zehn Minuten bei $2-5^\circ\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurde die Mischung mit FACS-Puffer auf $500 \mu\text{l}$ Gesamtmenge aufgefüllt. Die MACS Column LS mit Preseparation Filter wurde vor und nach Zugabe der Probe mit 3ml FACS-Puffer gespült. Die isolierten Zellen wurden abzentrifugiert, in 1ml Medium aufgenommen und ihrer weiteren Verwendung zugeführt. Die Säule wurde anschließend mit FACS-Puffer gespült und die aus der Probe entfernten Zellen verworfen.

3.2.3. Durchflusszytometrie

3.2.3.1. Grundlagen

Zur Analyse der Zellen und der zu untersuchenden Oberflächenmoleküle wurden durchflusszytometrische Untersuchungen durchgeführt. Dabei werden die zu untersuchenden Zellantigene mit Antikörpern markiert, an die Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind. Es werden unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe, die jeweils durch Verwendung eines monoklonalen Antikörpers spezifisch für das zu untersuchende Antigen sind, miteinander kombiniert. Somit können für jede gemessene Zelle Informationen zur Expression mehrerer Antigene bei einer Messung erhoben werden. In Einzelsuspension werden die Zellen an einem Laser vorbeigeführt und das Streulicht bzw. Fluoreszenzsignal detektiert. Mittels dieser Messwerte kann auf Eigenschaften der Zellen geschlossen werden: mit dem Vorwärts-Scatter (FSC) auf die Größe, mit dem Seitwärts-Scatter (SSC) auf die

Granularität, sowie mit der Fluoreszenzintensität auf die Menge der an die Zelle bindenden spezifischen Antikörper, die somit ein Maß für die Expressionsstärke ist. Durch die Färbung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen können verschiedene Zellpopulationen anhand ihrer charakteristischen Expression von Oberflächenmolekülen differenziert werden.

Die zu färbenden Zellen wurden zunächst in FACS-Puffer gewaschen, anschließend in 50µl FACS-Puffer aufgenommen und 10µl FcR-Blocking Reagent hinzugegeben. So wurde die Bildung unspezifischer Bindungen zwischen den F_c-Teilen der Antikörper und Rezeptoren auf der Zelle verhindert, indem die F_c-Bindungsstellen auf der Zelloberfläche mit Antikörper-C-Fragmenten gesättigt wurden. Nach zehnmütiger Inkubation bei 4°C wurden die Zellen erneut gewaschen, in 200µl FACS-Puffer aufgenommen und auf je zwei Messröhrchen aufgeteilt. Um den Anteil unspezifischer Bindungen zu bestimmen, wurde zu jeder Probe ein Röhrchen mit Antikörperisotypen von gleichem Typ und gleicher Spezies gefärbt.

Allen Röhrchen wurde LIVE/DEAD-Marker zugegeben. Den unterschiedlichen Röhrchen für Isotypen und Proben wurden jeweils die Antikörper-konjugierten Farbstoffen bzw. ihre Isotypen zum Färben zugegeben. Nach zwanzig Minuten Inkubation bei 4°C wurde mit 1ml FACS-Puffer gewaschen, danach die Zellen in 100µl FACS-Fixationspuffer aufgenommen und bis zur Messung im Kühlschrank aufbewahrt.

Die Messungen wurden am LSR II Durchflusszytometer durchgeführt, die Auswertung erfolgte mit der FlowJo9® Software.

3.2.3.2. Messungen im Labor für Leukämiediagnostik

Blut von Patienten mit AML und STS wurde durchflusszytometrisch hinsichtlich der Expression von Immuncheckpoints auf NK-Zellen und deren Liganden auf den malignen Zellen im Labor für Leukämiediagnostik (LfL) untersucht.

Die im LfL verwendeten Panel für die Messung sind in Tabelle 3-9 dargestellt. Nach etwa der Hälfte des Projekts wurden SLAMF7 und PD-1 durch CD96 und CD137 ersetzt, um somit weitere interessante Immuncheckpoints berücksichtigen zu können. Die eingesetzte Menge der Antikörper wurde im LfL vor Verwendung anhand von Positiv- und Negativkontrollen titriert.

	Fluorochrom	FITC	PE	ECD	PC7	APC	APCA 750	PACIFIC BLUE	KROME ORANGE
1. Panel	Antigen	CD33	PVR	CD16/56	SLAMF7	TIGIT	CD3	PD-1	CD45
2. Panel	Antigen	CD33	PVR	CD16/56	CD96	TIGIT	CD3	CD137	CD45

Tabelle 3-9: Im LfL verwendete Panel zur Untersuchung von Checkpoints und Liganden auf NK-Zellen. Parallel zu den Proben wurden in einem zweiten Röhrchen die Isotypen angefärbt. Unterschiede zwischen den beiden verwendeten Panels sind hervorgehoben.

Für die Untersuchungen am Blut von AML-Patienten wurden die im Rahmen der Routinediagnostik im LfL generierten Daten verwendet. Dabei wurden alle durchflusszytometrischen Daten von Patienten mit Erstdiagnose AML oder einem Rezidiv im Zeitraum von August 2016 bis Januar 2018 eingeschlossen.

Zum Vergleich der Checkpoint-Expression auf gesunden NK-Zellen wurde zusätzlich Blut gesunder Spender untersucht. Um eine direkte Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten, wurden diese Untersuchungen mit identischen Geräten und Einstellungen ebenfalls im LfL durchgeführt.

Im peripheren Blut von STS-Patienten sind aufgrund der Solidität der Tumore keine malignen Zellen in ausreichend hoher Zahl enthalten, um eine Bestimmung des Antigenprofils zu ermöglichen. Anders als bei AML-Patienten konnte die Expression der Liganden auf den Tumorzellen daher nicht mithilfe einer Blutprobe identifiziert werden. Stattdessen wurden GD2-exprimierende Zelllinien hinsichtlich der Expression im LfL untersucht. Gleiches wurde auch mit AML-Zelllinien durchgeführt.

3.2.3.3. Auswertung durchflusszytometrischer Daten

Die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten erfolgte mit der FlowJo⁹® Software. Um die verschiedenen Zellpopulationen einzeln zu beschreiben, können sie anhand der Expression Zelltypspezifischer Antigene voneinander getrennt werden. Dieses Verfahren wird als Gating bezeichnet. Im Anschluss können die Zellpopulationen bezüglich ihrer Expression von Checkpoints oder Liganden charakterisiert werden. Mit Histogrammen wird die Expression des untersuchten Oberflächenmoleküls im direkten Vergleich zum jeweiligen Isotypen dargestellt. Zur Quantifizierung wird die median

fluorescence intensity (MFI)-Ratio errechnet, also das Verhältnis der MFI des untersuchten Antigens zur MFI des Isotypen. Eine signifikante Expression des Antigens auf der Zelle kann angenommen werden, wenn die MFI Ratio über 1,5 liegt.

Zur Unterscheidung von NK- und AML-Zellen in Blutproben von AML-Patienten wurden zunächst im Isotypenröhrchen die Populationen von AML-Zellen und Lymphozyten anhand des Leukozytenmarkers CD45 und der Granularität, gemessen am SSC, voneinander abgegrenzt. Die so gesetzten Gates wurden für die Probenröhrchen übernommen. Aus der Lymphozytenpopulation wurden die NK-Zellen als die CD16/CD56-positiven- und CD33-negativen Zellen ausgewählt. Das Prozedere ist in Abbildung 3-1 dargestellt. Die so identifizierten NK- und AML-Zellen wurden anschließend hinsichtlich der Expression von Checkpoints bzw. Liganden untersucht.

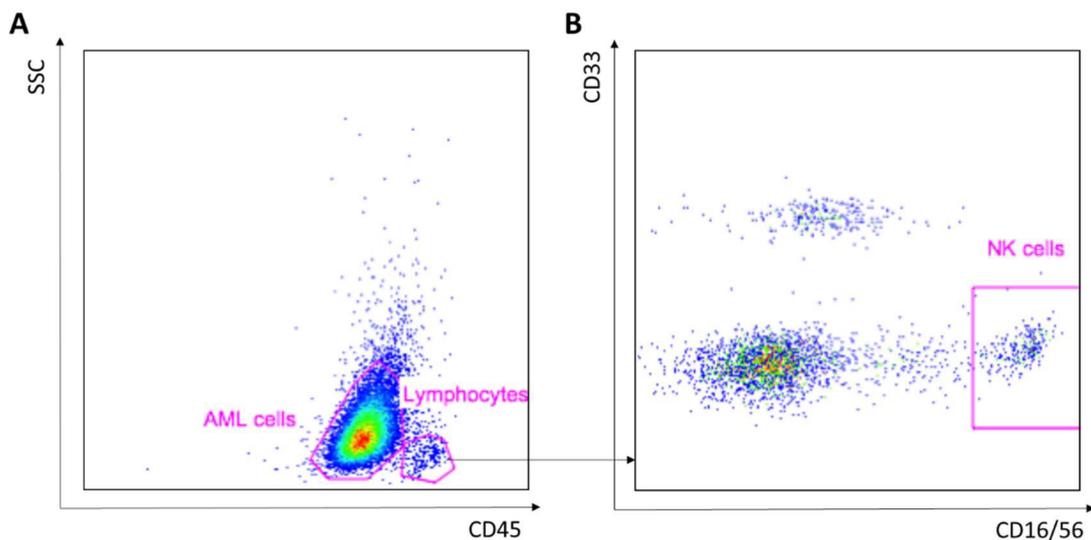


Abbildung 3-1: (A) Differenzierung von AML-Zellen und Lymphozyten in der Blutprobe eines AML-Patienten; (B) Identifizierung von NK-Zellen aus der Lymphozytenpopulation.

Bei den Proben von gesunden Spendern und STS-Patienten kam die gleiche Gatingstrategie zur Identifizierung der NK-Zellen zur Anwendung.

Bei der Auswertung der im Folgenden in Kapitel 3.2.4.2. erläuterten Kokulturen aus NK-Zellen und Zelllinien erfolgte die Trennung der beiden Populationen nach Abtrennung von toten Zellen im SSC gegen FSC sowie mittels des LIVE/DEAD-Markers. Im Anschluss wurden die NK-Zellen durch Expression von CD16 von den Tumorzellen abgegrenzt (vgl. Tabelle 3-9, Panel 1 und 2). Letztere wurden, im Fall von AML-Zelllinien durch die Expression von CD33, im Fall von GD2-exprimierende Zelllinien durch die

Expression von GD2 identifiziert. Für die weitere Unterscheidung von NK-Zell-Subpopulationen wurde zusätzlich zu CD16 auch CD56 angefärbt. So konnten die beiden Populationen CD56^{dim}CD16^{bright} und CD56^{bright}CD16^{dim} voneinander abgegrenzt werden.

3.2.4. Zellkulturen

3.2.4.1. Kultur und Passagierung der Zelllinien

Für die durchzuführenden Versuche wurden verschiedene Zelllinien in Kultur genommen. Als AML-Linien wurden OCI-AML-3, PL-21, HL-60 und MV4-11, als STS-Linien LAN-1, SW-872, SK-UT-1 und TC-71 verwendet. Die AML-Linien sind nicht-adhärenz und wurden daher in Suspensionskultur gehalten, bei den übrigen handelt es sich um adhärenz Zellen.

Die Zellen wurden zwei Mal in der Woche, in der Regel im Verhältnis 1:20 gesplittet. Bei den adhärenz Linien war eine Behandlung mit 0,05% Trypsin notwendig. Durch drei- bis fünfminütige Inkubation bei 37°C mit diesem proteolytischen Enzym lösten sich die Zellen vom Boden des Kulturgefäßes und konnten in das entsprechende Medium aufgenommen werden. Durch fünf Minuten Zentrifugation wurden die Zellen gewaschen und anschließend in frischem Kulturmedium resuspendiert. Der gewünschte Anteil davon wurde in eine neue Flasche überführt und mit Medium auf 20ml aufgefüllt. Der Rest wurde entweder verworfen oder unmittelbar im Anschluss für Versuche genutzt.

Für die Untersuchung der Expression von Oberflächenmolekülen wurden die Zelllinien mit Accutase[®] statt mit Trypsin behandelt. Dabei handelt es sich um ein Gemisch aus kollageno- und proteolytischen Enzymen, das weniger aggressiv als Trypsin wirkt. Die Anwendung erfolgte analog zur Trypsinierung mit dem Unterschied, dass Accutase[®] über den längeren Zeitraum von zehn Minuten zugesetzt wurde und keine Inkubation bei 37°C nötig war.

Für die Bestimmung der Anzahl an viablen Zellen wurde ein automatisches Zellzählgerät eingesetzt. 20µl der auszuzählenden Zellen wurden im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau vermischt und in die Zählkammer gegeben. Viable Zellen unterscheiden sich von toten durch die fehlende Aufnahme des Trypanblaus aufgrund ihrer intakten Zellmembranen. Die so ermittelte Zellzahl wird pro ml angegeben und kann im mikroskopischen Bild am Gerät auf Plausibilität geprüft werden.

3.2.4.2. Kokulturen aus Tumorzelllinien mit NK-Zellen gesunder Spender

Zelllinien der beiden Krankheitsentitäten wurden mit NK-Zellen gesunder Spender kokubiert, um die Expression bzw. Hochregulation bestimmter Immuncheckpoints unter unterschiedlichen Bedingungen sowie eine potentielle Verbesserung in der Lyse der Zielzellen zu untersuchen. Dafür wurden NK-Zellen aus tagesaktuell von gesunden Spendern gewonnenem und verarbeitetem Vollblut sowie verschiedene Tumorzelllinien verwendet. Im Regelfall wurden die Effektor-Target-Ratios (E:T) von 1:1, 1:2 und 1:4 eingesetzt, mit jeweils 1×10^5 NK-Zellen pro Well einer Rundboden-96-Well-Platte (siehe Kapitel 3.1.2.). Die verschiedenen Konditionen, siehe Abbildung 3-2, wurden jeweils mit Kontrollen ohne Zugabe von Antikörpern verglichen. Für die Untersuchung der Lyseraten unter Zugabe von Checkpoint-blockierenden Antikörpern wurden NK-Zellen aus kryokonservierten PBMC mit IL-2 vorstimuliert und die E:T variiert.

Nach Inkubation für 24 oder 48 Stunden wurde eine FACS-Färbung durchgeführt. Die Überstände der Kokulturen wurden zuvor abgenommen und bei -20°C eingefroren, um sie später weiter zu untersuchen, wie in Kapitel 3.2.6. dargestellt.

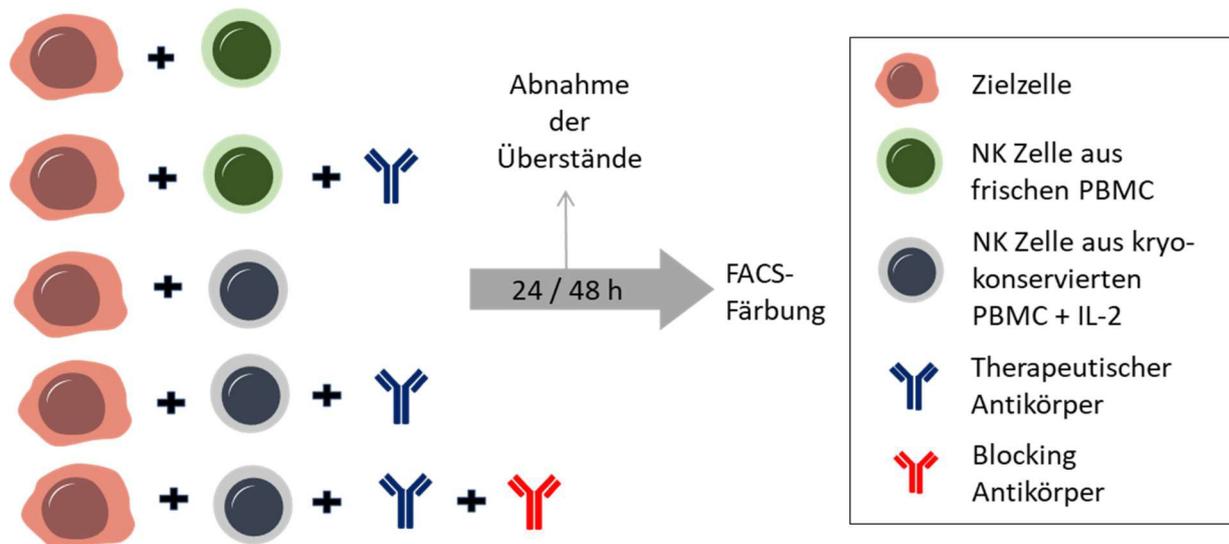


Abbildung 3-2: Konditionen der Kokulturen aus Tumorzelllinien und NK-Zellen gesunder Spender.

3.2.5. ^{51}Cr -Freisetzungs-Versuche

3.2.5.1. Grundlagen

Für die Quantifizierung der zytotoxischen Wirkung der NK-Zellen auf die untersuchten Zielzellen wurden ^{51}Cr -Freisetzungs-Versuche durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine Methode, bei der mittels des radioaktiven Isotops ^{51}Cr der Anteil an lysierten Zielzellen gemessen werden kann. ^{51}Cr ist ein Gammastrahler mit einer Halbwertszeit von 27,7 Tagen. Es wird von intakten Zellen in die Zellmembran internalisiert und im Rahmen des Zelltodes daraus freigesetzt, wie in Abbildung 3-3 gezeigt. Die emittierte Strahlung mit einer Energie von 0,32MeV lässt sich mittels eines γ -Counters hervorragend detektieren. Die gemessene Strahlungsintensität des Überstands (also nicht der Zellen) ist direkt proportional zur Menge an freiem ^{51}Cr im Überstand und somit ein Surrogatparameter für die Menge der lysierten Targetzellen. Je stärker also die γ -Aktivität, desto höher die zytotoxische Wirksamkeit der Effektorzellen.

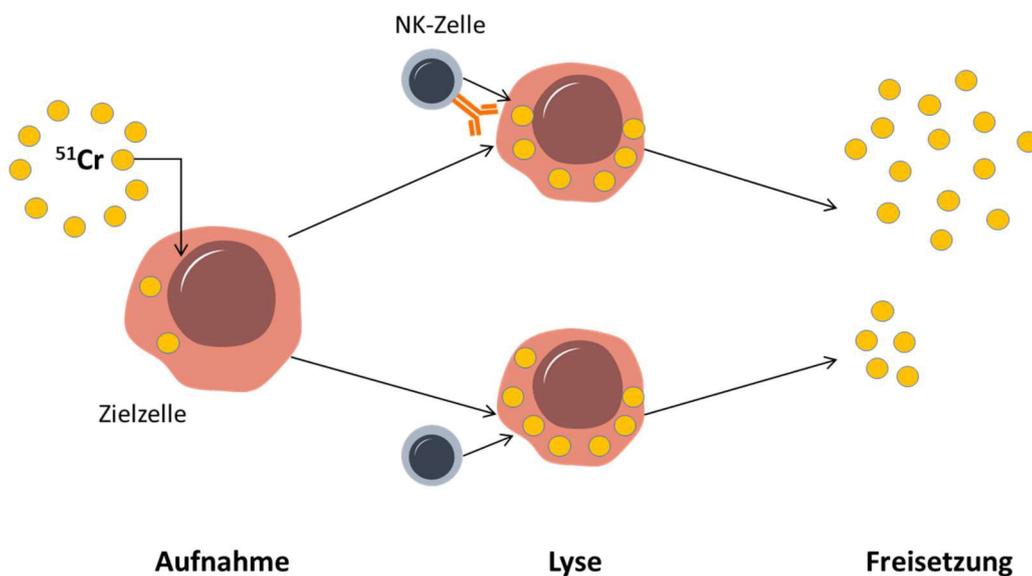


Abbildung 3-3: Funktionsprinzip des ^{51}Cr -Freisetzungs-Versuchs. Zielzellen werden mit radioaktivem ^{51}Cr markiert. NK-Zellen lysieren Zielzellen entweder ohne oder mit Zugabe von therapeutischen oder Checkpoint-blockierenden Antikörpern. Infolge der Lyse wird eine zur Menge der lysierten Zellen proportionale Menge ^{51}Cr freigesetzt.

Die Targetzellen wurden aus der Zellkultur entnommen, mit der im Verhältnis 1:3 mit sterilem RPMI 1640 vorverdünnten radioaktiven ⁵¹Chromlösung markiert und eineinhalb Stunden bei 37°C inkubiert. Da die Aktivität des ⁵¹Chroms im Laufe der Zeit entsprechend seiner Halbwertszeit abnimmt, wurde für jeden Versuchstag die einzusetzende Menge so errechnet, dass immer eine Aktivität von 1,85 MBq verwendet wurde.

Nach Ablauf der Inkubation wurde in zwei Waschschrritten das nicht in die Targetzellen aufgenommene ⁵¹Chrom entfernt. Die Zellen wurden anschließend in Medium aufgenommen und mittels einer Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt.

Effektor- und radioaktiv markierte Targetzellen wurden in absteigender E:T-Ratio, im Regelfall 50:1, 25:1, 12,5:1 und 6,25:1 bei 2x10³ Zielzellen pro Well, in einer Rundboden-96-Well-Platte koinkubiert und je nach Versuchsaufbau therapeutische oder blockierende Antikörper zugegeben. Zur Kontrolle wurde jede Bedingung in Triplikaten gemessen. Als Referenzmessungen zur Errechnung der Hintergrundlyse wurden zusätzlich Spontan- und Maximallyse bestimmt, wobei die Spontanlyse der minimalen Lyse entspricht. Für die Messung der Spontanlyse wurden die radioaktiv markierten Targetzellen nur mit Medium inkubiert, für die Maximallyse wurden sie direkt und ohne weitere Verdünnung auf die Messplatte gegeben.

Nach vier Stunden Inkubation bei 37°C wurden je 50µl der Überstände abgenommen und auf die Messplatte übertragen. Die Messung der über Nacht getrockneten Platten erfolgte am nächsten Tag mit dem γ-Counter. Aus den Werten wurde pro Bedingung der Mittelwert ermittelt und die spezifische lytische Aktivität (in Prozent) mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\gamma\text{-Aktivität im untersuchten Well} - \text{Spontanaktivität}}{\text{Maximalaktivität} - \text{Spontanaktivität}} \times 100 = \text{Spezifische Lyse (\%)}$$

3.2.5.2. Zytotoxizitätsassays

Für die Untersuchungen zur Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber Tumorzelllinien wurden ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Versuche unter unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt. Verglichen wurden jeweils Kontrollen ohne jeglichen Antikörper mit der Zugabe von entweder therapeutischen oder blockierenden Antikörpern. In einigen Versuchsreihen wurde zudem eine Kombination der beiden Antikörper getestet. Zudem wurden die als Zielzellen genutzten Zelllinien variiert und die Antikörper in verschiedenen Zielkonzentrationen eingesetzt. Verwendet wurden NK-Zellen von gesunden

Spendern und Patienten mit AML bzw. STS. Die unterschiedlichen Versuchsbedingungen sind in Abbildung 3-4 schematisch dargestellt.

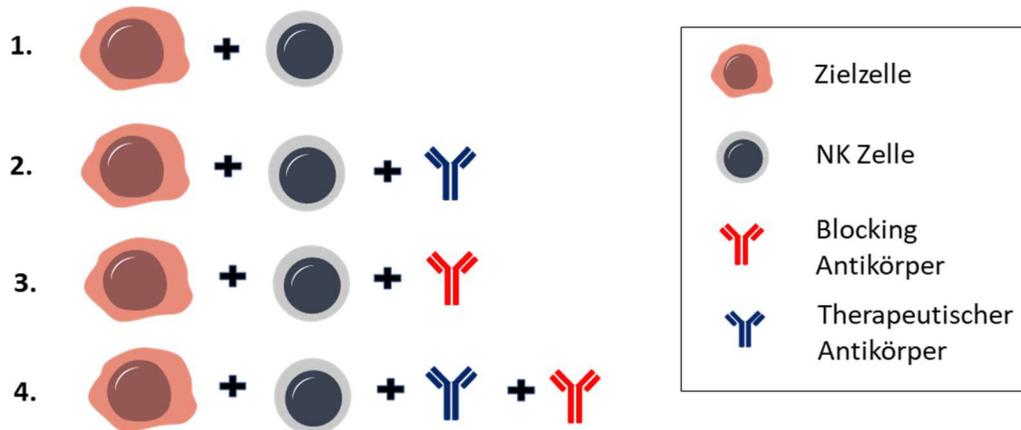


Abbildung 3-4: Konditionen des ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Versuchs.

3.2.6. Cytometric Bead Array

3.2.6.1. Grundlagen

Der Cytometric Bead Array (CBA) wird zur Messung von Zytokinkonzentrationen in Lösungen eingesetzt. Er ist dabei in der Lage, bereits sehr niedrige Konzentrationen von 10-2500pg/ml zu detektieren. Die zu untersuchenden löslichen Zytokine werden von Capture Beads mit direkter Fluoreszenzaktivität gebunden. Daran wiederum binden mit dem Farbstoff PE konjugierte Antikörper, die Detection Beads. Das durch die so entstehenden Komplexe erzeugte Fluoreszenzsignal ist proportional zum Zytokingehalt in der Lösung und kann im Durchflusszytometer detektiert werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Konzentrationen von Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor (TNF) untersucht.

3.2.6.2. Messung der Überstände aus den Kokulturen

Der CBA wurde genutzt, um die Überstände der Kokulturen aus NK-Zellen gesunder Spender mit Tumorzelllinien auf Veränderungen des Zytokinmilieus in Abhängigkeit von den durchgeführten

Versuchskonditionen zu untersuchen. Je 25µl der aufgetauten Überstände wurden mit je 0,5µl Zytokin-Capture-Beads und 24µl CBA Waschpuffer gemischt und im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer Stunde wurde das Prozedere mit den Detection Beads wiederholt und weitere zwei Stunden inkubiert. Nach einem Waschschrift mit Puffer wurden die Proben unverzüglich und ohne Fixierung am Durchflusszytometer gemessen.

3.3. Statistische Auswertung

Die statistischen Analysen aller Versuche wurden mit der Software Graphpad PRISM® 6 durchgeführt.

Daten zu Unterschieden in der Expression von Checkpoints auf NK-Zellen von Patienten und gesunden Spendern sowie von Liganden auf AML-Zellen von Patienten wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test, einem nicht-parametrischen, ungepaarten t-Test, verglichen. Der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test wurde angewandt, um Unterschiede zwischen allen fünf untersuchten Checkpoints zu detektieren.

Alle Versuche, bei denen jeweils NK-Zellen eines Individuums zu unterschiedlichen Zeitpunkten oder unter verschiedenen Bedingungen miteinander verglichen wurden, wurden mit dem Wilcoxon Test ausgewertet. Dabei handelt es sich um einen nicht-parametrischen, gepaarten t-Test. Als signifikant, in Abbildungen gekennzeichnet mit *, wird ein p-Wert unter 0,05 gewertet. Stark signifikant, gekennzeichnet mit **, sind p-Werte unter 0,01 und sehr stark signifikant, ***, solche unter 0,001. Angegeben werden die p-Werte lediglich bei Signifikanz. Ab einer Anzahl von drei Versuchen wurde die Standardabweichung berechnet und in den Abbildungen graphisch dargestellt.

4. Ergebnisse

4.1. Expression von Immuncheckpoints und Liganden

Die Expression von Immuncheckpoints auf der Oberfläche von NK-Zellen und von Liganden auf Tumorzellen wurde durchflusszytometrisch am Blut von Patienten und gesunden Spendern sowie Zelllinien untersucht. Eine signifikante Expression wurde bei einer MFI Ratio von über 1,5 angenommen. Dieser Grenzwert wird daher im Folgenden in allen Abbildungen als rote Linie dargestellt.

4.1.1. NK-Zellen von Patienten und gesunden Spendern

4.1.1.1. AML-Patienten

Die Daten zur Expression von PD-1 und SLAMF-7 wurden an 109 Patienten mit AML erhoben, zur Expression von CD137 und CD96 an weiteren 69 Patienten. TIGIT und PVR wurde bei allen 178 Patienten untersucht. Die Expression der Immuncheckpoints auf NK-Zellen zeigte überwiegend keine signifikanten Unterschiede zwischen Gesunden und AML-Patienten. CD96 bildete hier die einzige Ausnahme. Der Unterschied in der Expression bei Gesunden und AML-Patienten zeigte sich bei diesem Checkpoint signifikant ($p=0,007$). PD-1 und CD137 wurden am schwächsten exprimiert, wobei der Mittelwert von CD137 leicht über dem von PD-1 lag. TIGIT wies den nächsthöheren Mittelwert auf. Bei diesem Checkpoint streuten die Expressionswerte von AML-Patienten stärker als die von Gesunden. So zeigten einige Patienten eine schwache und sehr wenige keine Expression. SLAMF-7 war insgesamt am stärksten exprimiert und wies die größte Streuung von Expressionswerten auf. Gleiches galt bei gesunden Spendern. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-1 dargestellt.

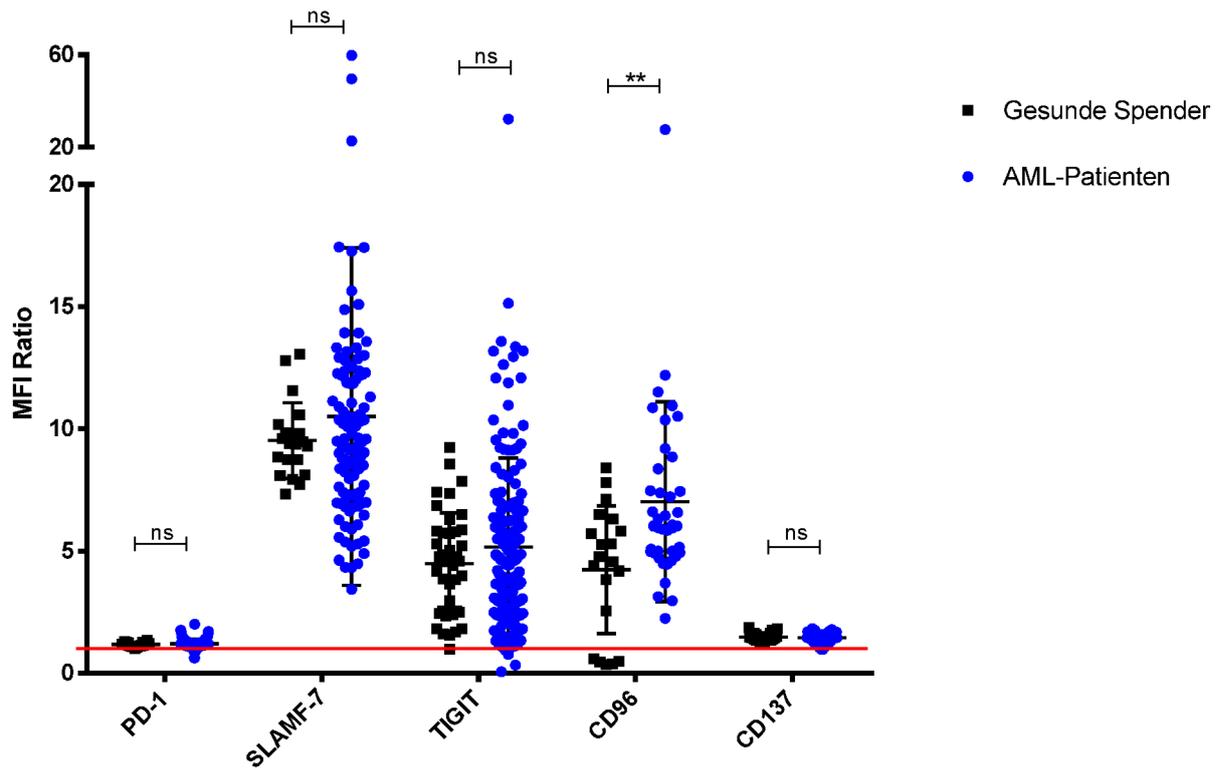


Abbildung 4-1: Expression von Immuncheckpoints auf NK-Zellen von AML-Patienten (blau) im Vergleich zu NK-Zellen von gesunden Spendern (schwarz); Mann-Whitney U-Test.

	PD-1	SLAMF-7	TIGIT	CD96	CD137
Median AML-Patienten	1,21	9,39	4,58	5,94	1,51
Median Gesunde Spender	1,17	9,39	4,65	4,66	1,43
p-Wert (Mann-Whitney U)	0,45	0,98	0,88	0,007	0,55

Tabelle 4-1: Expression von Immuncheckpoints auf NK-Zellen von AML-Patienten im Vergleich zu NK-Zellen von gesunden Spendern.

4.1.1.2. STS-Patienten

Die Daten zur Expression von PD-1 und SLAMF-7 wurden an 18 Patienten mit Erstdiagnose STS erhoben, zur Expression von CD137 und CD96 an weiteren 14. TIGIT wurde bei allen 32 Patienten untersucht. Die Ergebnisse sind weitgehend analog zu den unter 4.1.1.1. zu AML-Patienten beschriebenen. Ein Unterschied in der Expression von CD96 konnte zwischen STS-Patienten und Gesunden jedoch nicht nachgewiesen werden. Ganz im Gegenteil war sowohl bei einigen STS-Patienten als auch bei einigen Gesunden keinerlei Expression von CD96 nachweisbar. Des Weiteren zeigte sich kein nennenswerter Unterschied zwischen der Expression von Immuncheckpoints auf NK-Zellen von STS- und AML-Patienten. Die Expression der Immuncheckpoints auf NK-Zellen zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Gesunden und STS-Patienten. PD-1 und CD137 wurden am schwächsten exprimiert, wobei der Mittelwert von CD137 leicht über dem von PD-1 lag. TIGIT wies den nächsthöheren Mittelwert auf, wobei sich lediglich ein geringer Unterschied zwischen Patienten und Gesunden zeigte. SLAMF-7 war insgesamt am stärksten exprimiert und wies eine größere Streuung von Expressionswerten bei STS-Patienten als bei Gesunden auf. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-2 dargestellt.

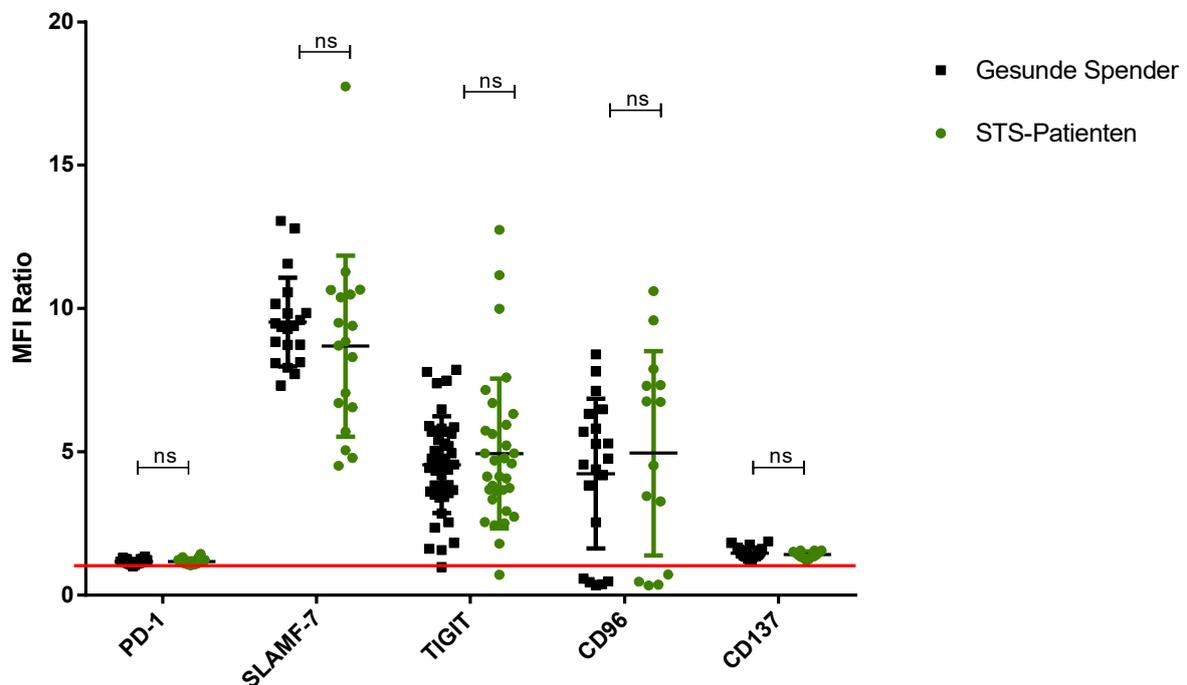


Abbildung 4-2: Expression von Immuncheckpoints auf NK-Zellen von STS-Patienten (grün) im Vergleich zu NK-Zellen von gesunden Spendern (schwarz); Mann-Whitney U-Test.

	PD-1	SLAMF-7	TIGIT	CD96	CD137
Median STS-Patienten	1,14	8,78	4,37	5,64	1,41
Median Gesunde Spender	1,17	9,39	4,65	4,66	1,43
Mann-Whitney U-Test	0,57	0,39	0,99	0,52	0,54

Tabelle 4-2: Expression von Immuncheckpoints auf NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu NK-Zellen von gesunden Spendern.

4.1.2. Liganden-Expression

Zur Identifizierung von Liganden, die für eine Checkpoint-Blockade von Interesse sein könnten, wurden AML-Zellen von Patienten sowie AML- und GD2-exprimierende Zelllinien untersucht. Zusätzlich wurden Zelllinien beider Krankheitsentitäten auf die Expression der Zielantigene für die eingesetzten therapeutischen Antikörper getestet. So konnten für die im Anschluss durchgeführten Versuche jeweils passende Zelllinien ausgewählt werden. Die Untersuchung der Liganden-Expression auf AML-Zellen von Patienten sowie ein Teil der Untersuchungen von AML- und GD2-exprimierende Zelllinien wurden im LfL durchgeführt. Die restlichen Messungen erfolgten im Labor für Tumorimmunologie an einem anderen Zytometer, wodurch sich die teilweise voneinander abweichenden Werte der MFI Ratios bei zwei Versuchen zum gleichen Liganden erklären.

4.1.2.1. Primäre AML-Zellen

Die AML-Zellen von Patienten wurden auf PVR und SLAMF-7 untersucht. Der Großteil der Patientenzellen exprimierte kein SLAMF-7, nur einige wenige zeigten eine schwache Expression. PVR hingegen war bei den meisten Patienten stark exprimiert. Bei einigen Patienten war aber lediglich eine schwache oder gar keine Expression nachweisbar. Somit zeigten die Werte der Expression eine relativ starke Streuung. Der Expressionsunterschied zwischen den beiden Liganden war stark signifikant ($p < 0,0001$). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-3 dargestellt.

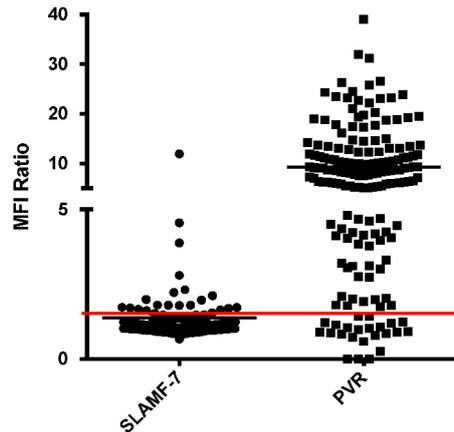


Abbildung 4-3: Expression von SLAMF-7 und PVR auf AML-Zellen von Patienten, gemessen im LfL.

4.1.2.2. AML-Zelllinien

AML-Zelllinien wurden auf die Expression von PVR und Zielantigenen hin untersucht. Zunächst wurden fünf Zelllinien einmalig im LfL auf PVR und CD157 getestet, wie Abbildung 4-4 zu entnehmen. PVR war mit Ausnahme von PL-21 auf allen Zelllinien exprimiert, schwach auf KG-1 α und stark auf MOLM-13 und OCI-AML3. Die stärkste Expression zeigte MV4-11. CD157 dagegen war auf KG-1 α , nicht und auf MOLM-13 und MV4-11 nur schwach exprimiert, die stärkste Expression zeigte OCI-AML3, gefolgt von PL-21. Es zeigte sich, dass OCI-AML3 die einzige Zelllinie ist, die sowohl den Liganden PVR als auch das Zielantigen CD157 in signifikanter Stärke exprimiert. HL-60 wurde nicht getestet, da zu diesem Liganden bereits Daten unserer Arbeitsgruppe vorliegen, die eine mäßig ausgeprägte Expression von CD157 zeigen.⁷⁸ Die Expression von PVR auf dieser Zelllinie wird in Abbildung 4-4 dargestellt.

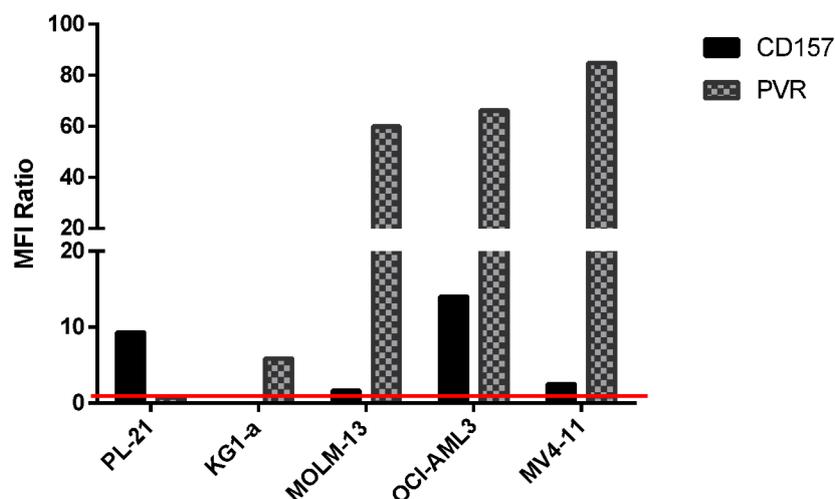


Abbildung 4-4: Expression des Zielantigens CD157 und des Liganden PVR auf AML-Zelllinien, gemessen im LfL.

Die Untersuchung auf PVR und CD33 wurde im Labor für Tumorummunologie durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-5 dargestellt. PVR war auch hier am stärksten auf MV4-11 exprimiert, gefolgt von OCI-AML3 und MOLM-13. Die schwächste Expression zeigte HL-60. Das Zielantigen CD33 war am stärksten auf MOLM-13 exprimiert, während HL-60 und MV4-11 eine vergleichbar schwächere Expression aufwiesen. Lediglich bei OCI-AML3 war CD33 nur schwach ausgeprägt. Demnach sind MOLM-13 und MV4-11 die beiden Zelllinien mit starker Expression sowohl des Liganden PVR als auch des Zielantigens CD33.

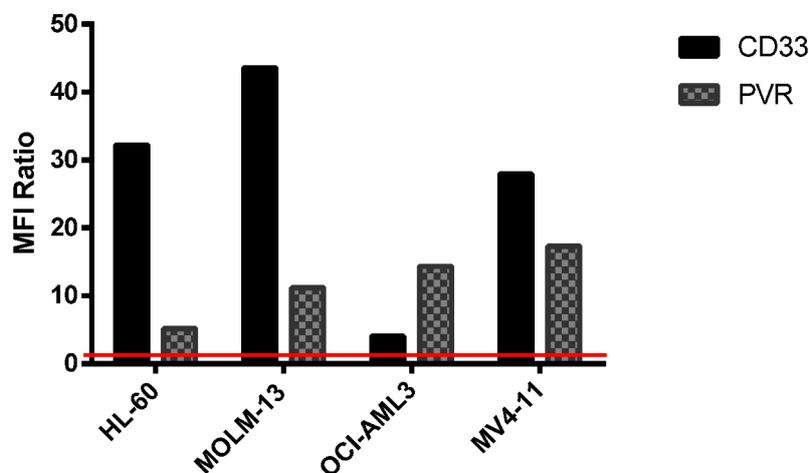


Abbildung 4-5: Expression des Zielantigens CD33 und des Liganden PVR auf AML-Zelllinien, gemessen im Labor für Tumorummunologie.

4.1.2.3. GD2-exprimierende Zelllinien

GD2-exprimierende Zelllinien wurden im LfL einmalig auf die Expression von Liganden getestet. Zusätzlich zu PVR und SLAMF-7 wurde auch PD-L1 mit in die Untersuchung aufgenommen.

Alle analysierten Zelllinien zeigten eine starke Expression von PVR. Am stärksten war PVR auf SK-UT-1 und vergleichbar stark auf SW-872 exprimiert, gefolgt von LAN-1. TC-71 zeigte die schwächste Expression. PD-L1 wurde weder auf SK-UT-1 noch auf TC-71 exprimiert. Das Expressionsniveau von PD-L1 bei LAN-1 und SW-872 war vergleichbar schwach ausgeprägt. SLAMF-7 wurde lediglich auf SW-872 schwach exprimiert.

Zusätzlich wurde untersucht, ob die Passagierung mit Trypsin oder Accutase einen Einfluss auf die Expressionsstärke hat. Bei keiner Zelllinie konnte ein Unterschied festgestellt werden, alle Liganden wurden bei beiden Bedingungen äquivalent exprimiert, wie Abbildung 4-6 zeigt.

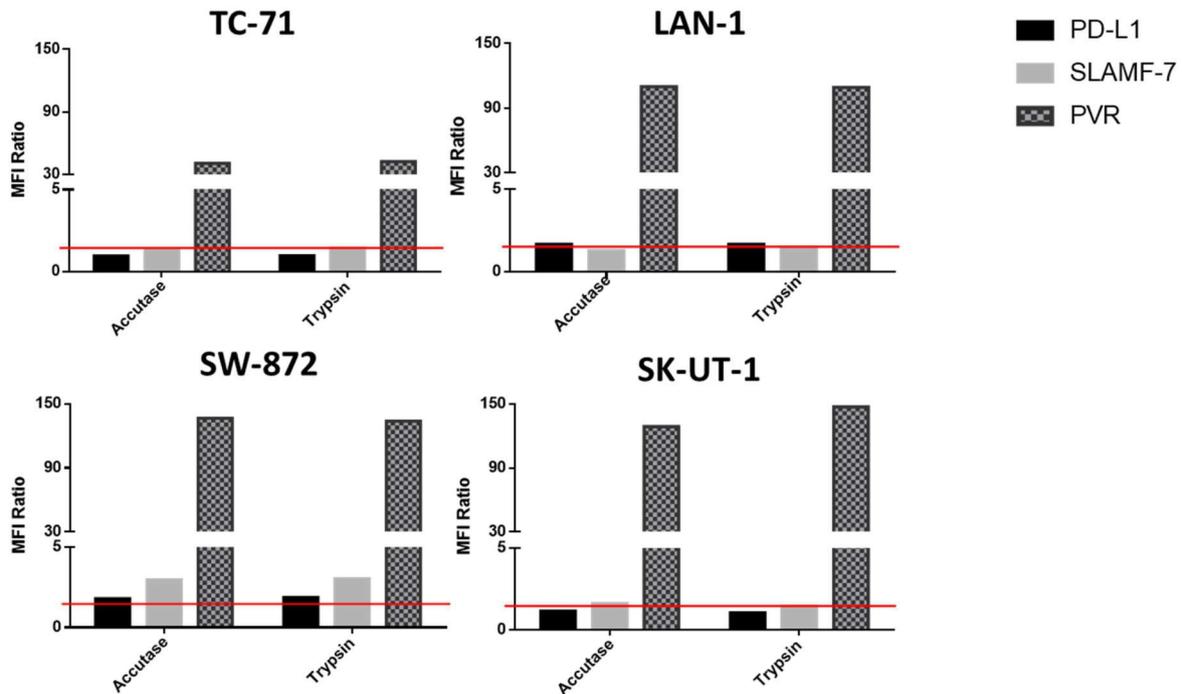


Abbildung 4-6: Expression der Liganden PD-L1, SLAMF-7 und PVR auf den GD2-exprimierenden Zelllinien TC-71, LAN-1, SW-872 und SK-UT-1 im Vergleich zwischen Passagierung mit Accutase und Trypsin, gemessen im LfL.

Für die Versuche zur Kombination von therapeutischen Antikörpern mit Checkpoint-Blockade bei STS wurden GD2-exprimierende Zelllinien ausgewählt, die sowohl den Liganden PVR als auch das Zielantigen GD2 exprimieren. Diese einmalige Messung wurde im Labor für Tumorimmunologie durchgeführt. TC-71 zeigte die stärkste Expression von GD2, während SW-872 nur schwach positiv und SK-UT-1 negativ für das Zielantigen waren. PVR hingegen wurde auf allen Zelllinien exprimiert, am stärksten auf SW-872, am schwächsten auf TC-71. TC-71 war die einzige Zelllinie, bei der die GD2-Expression stärker als die von PVR war. Die Ergebnisse sind Abbildung 4-7 zu entnehmen.

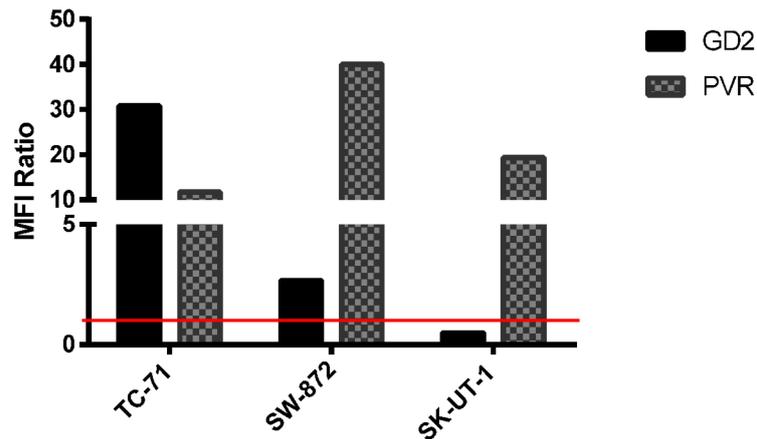


Abbildung 4-7: Expression des Zielantigens GD2 und des Liganden PVR auf GD2-exprimierenden Zelllinien, gemessen im Labor für Tumormimmunologie.

4.2. Veränderung der Expressionsstärke von Immuncheckpoints auf NK-Zellen

Zur Untersuchung, ob eine Stimulation oder die Zugabe therapeutischer Antikörper zu einer Hochregulation von konstitutiv auf NK-Zellen exprimierten Immuncheckpoints führt, wurden NK-Zellen gesunder Spender mit NK-Zell-aktivierenden Agentien bzw. in Kokulturen mit Tumorzelllinien und therapeutischen Antikörpern inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch hinsichtlich der Checkpoint-Expression untersucht.

4.2.1. NK-Zell-aktivierende Agentien

NK-Zellen von sechs gesunden Spendern wurden mit unterschiedlichen NK-Zell-aktivierenden Agentien inkubiert. Dabei handelte es sich um Resiquimod, Phytohämagglutinin und eine Kombination aus IL-2 und IL-15. Alle wurden jeweils in einer Zielkonzentration von 2µg/ml eingesetzt. Die Expression von PD-1 und TIGIT wurde auf unstimulierten Zellen am Tag des Versuchsansatzes sowie nach 24 und 48 Stunden durchflusszytometrisch bestimmt. Bei allen Probanden waren beide Checkpoints bei der Basismessung an Tag null bereits exprimiert (MFI Ratio Mittelwert: PD-1: 1,50; TIGIT: 3,37). Veränderungen der Expression zu den Messzeitpunkten im Vergleich zu unstimulierten NK-Zellen wurden in den folgenden Abbildungen mittels Fold change dargestellt. Die unterschiedlich starke Entwicklung der Expression von TIGIT und PD-1 verlangte verschiedene Achsenskalierungen.

4.2.1.1. Phytohämagglutinin

Phytohämagglutinin (PHA) ist ein pflanzliches Lektin, das die Zellteilung anregt. PD-1 wurde weder 24 noch 48 Stunden nach der Stimulation mit PHA hochreguliert. Dabei zeigte sich keine Veränderung der Veränderungen im Vergleich von Tag eins zu Tag zwei. TIGIT wurde sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden im Vergleich zur Expression an Tag 0 signifikant hochreguliert. Zwischen der Messung an Tag eins und Tag zwei war aber ein signifikanter Abfall in der Expression festzustellen ($p=0,03$). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-8 dargestellt.

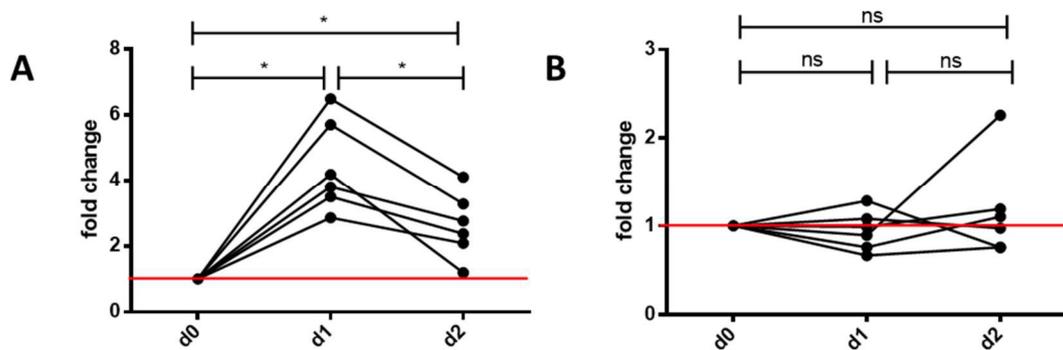


Abbildung 4-8: Expression von (A) TIGIT und (B) PD-1 24 (d1) und 48 (d2) Stunden nach Stimulation mit PHA im Vergleich zu unstimulierten NK-Zellen an Tag 0 (d0); n=6; Wilcoxon-Test.

4.2.1.2. Resiquimod

Bei Resiquimod (R848) handelt es sich um einen Immunmodulator, der durch Bindung an Toll-like-Rezeptoren wirkt. PD-1 zeigte auch hier keine Hochregulation nach 24 oder 48 Stunden. Die Expression von TIGIT war an beiden Messzeitpunkten signifikant gegenüber den unstimulierten Zellen erhöht. Zwischen Tag eins und Tag zwei fand bei den meisten Probanden eine leichte, jedoch nicht signifikante Hochregulation statt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-9 dargestellt.

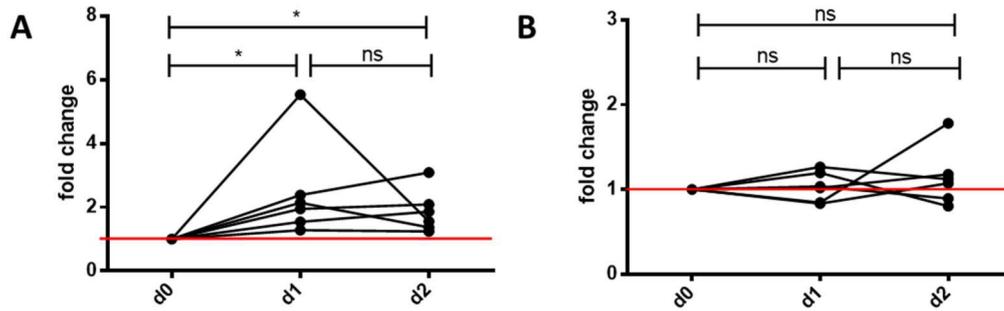


Abbildung 4-9: Expression von TIGIT (A) und PD-1 (B) 24 (d1) und 48 (d2) Stunden nach Stimulation mit R848 im Vergleich zu unstimulierten NK-Zellen an Tag 0 (d0); n=6; Wilcoxon-Test.

4.2.1.3. IL-2 plus IL-15

Die Kombination der beiden Zytokine IL-2 und IL-15 zeigte eine Hochregulation von PD-1 bei einzelnen Probanden, im Durchschnitt war dies aber weder nach 24 noch nach 48 Stunden signifikant. TIGIT wurde nach 24 und nach 48 Stunden signifikant exprimiert. Zwischen Tag eins und Tag zwei nahm die Expression bei den meisten Probanden leicht, jedoch nicht signifikant, zu. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-10 dargestellt.

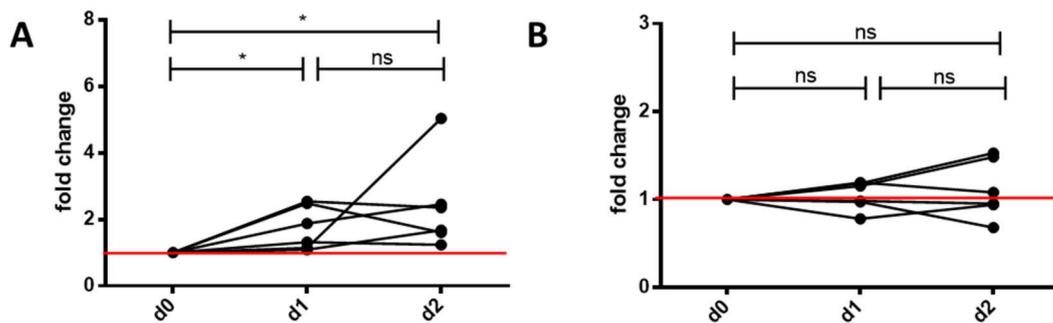


Abbildung 4-10: Expression von TIGIT (A) und PD-1 (B) 24 (d1) und 48 (d2) Stunden nach Stimulation mit IL-2 und IL-15 im Vergleich zu unstimulierten NK-Zellen an Tag 0 (d0); n=6; Wilcoxon-Test.

4.2.2. Kokulturen mit Tumorzelllinien und therapeutischen Antikörpern

Um zu untersuchen, ob die Expression der Immuncheckpoints TIGIT und PD-1 auf NK-Zellen durch ADCC hochreguliert werden, wurden aus frischem Vollblut isolierte NK-Zellen von gesunden Spendern mit Tumorzelllinien in E:T Ratios von 1:1, 1:2 und 1:4 in Kokultur genommen. Therapeutische Antikörper wurden in einer Zielkonzentration von 5µg/ml zugegeben und mit Kontrollen ohne Antikörper verglichen. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte nach 48 Stunden. Bei den hier vorgestellten Versuchen stand einzig die Expression von Checkpoints und nicht die Auswertung der Lyse der Zielzellen durch NK-Zellen im Fokus. Die hier erwähnten Ergebnisse zur Lyse von Zielzellen durch NK-Zellen sind daher lediglich Beobachtungen und auch aufgrund methodischer Einschränkungen nicht als richtungsweisend zu verstehen. Zur Quantifizierung der Zytotoxizität wurden im Anschluss ⁵¹Chrom-basierte Versuche durchgeführt.

4.2.2.1. AML-Zelllinien

Als AML-Zelllinien für diesen Versuch wurden OCI-AML3 und HL-60 ausgewählt. Getestet wurden NK-Zellen von jeweils drei gesunden Spendern. Als therapeutischer Antikörper wurde der anti-CD157 Antikörper eingesetzt. Die Ergebnisse zur Checkpoint-Expression sind in Abbildung 4-11 dargestellt. In den meisten Fällen konnte keine signifikante Lyse der Zielzellen erreicht werden, lediglich bei einer E:T von 1:1 konnten NK-Zellen einen Teil der Zielzellen lysieren. Die Expression von TIGIT war immer stärker als die von PD-1 (Mittelwert MFI Ratio TIGIT: 3,02; PD-1: 1,35). TIGIT war bei den Versuchen mit beiden Zelllinien auf NK-Zellen mit Antikörper im Vergleich zu den Kontrollen stärker exprimiert. Auf eine statistische Auswertung wurde verzichtet, da aufgrund der niedrigen Versuchszahl kein aussagekräftiges Ergebnis zu erwarten war. Die Expression von TIGIT auf NK-Zellen mit Antikörper war bei den Versuchen mit beiden Zelllinien vergleichbar stark, bei OCI-AML3 war der Unterschied zur Kontrolle größer als bei HL-60. PD-1 hingegen wurde auf keiner der beiden Zelllinien exprimiert. Einzige Ausnahme bildeten NK-Zellen in Kokultur mit HL60 in einer E:T Ratio von 1:1 ohne Zugabe des therapeutischen Antikörpers.

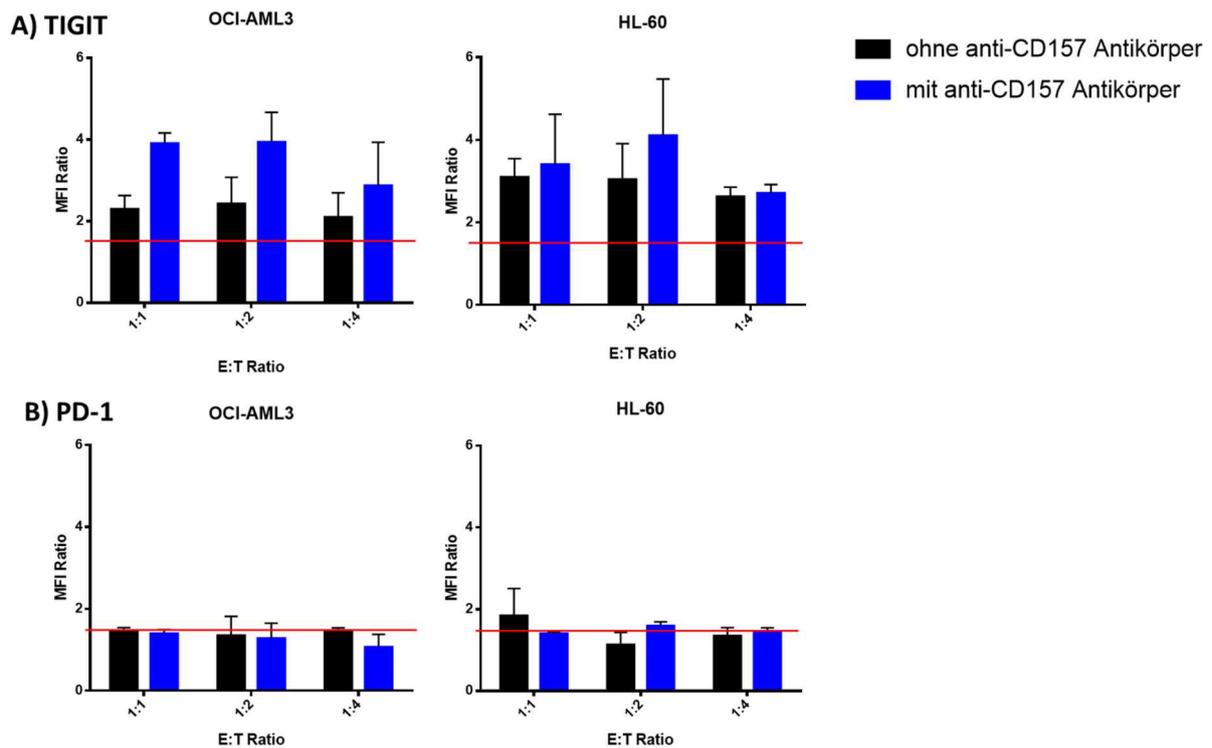


Abbildung 4-11: Expression von TIGIT und PD-1 auf NK-Zellen in Kokultur mit AML-Zelllinien mit (blau) und ohne (schwarz) anti-CD157 Antikörper (A) TIGIT auf NK in Kokultur mit OCI-AML3 und HL-60 (B) PD-1 auf NK in Kokultur mit OCI-AML3 und HL-60; n=3.

4.2.2.2. GD2-exprimierende Zelllinien

Als GD2-exprimierende Zelllinien für diesen Versuch wurden TC-71 und LAN-1 ausgewählt. Getestet wurden NK-Zellen von jeweils drei gesunden Spendern. Als therapeutischer Antikörper wurde der anti-GD2 Antikörper eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-12 dargestellt. Die Expression von TIGIT war immer stärker als die von PD-1. TIGIT war bei den Versuchen mit LAN-1 auf NK-Zellen mit Antikörper im Vergleich zu den Kontrollen stärker exprimiert, auf eine statistische Auswertung wurde aus dem unter 4.2.2.1. genannten Grund verzichtet. Bei TC-71 wurde TIGIT nur in den E:T 1:2 und 1:4 verstärkt auf NK-Zellen mit Antikörper exprimiert, während die Expression bei 1:1 äquivalent zur Kontrolle war. Die Expression von TIGIT auf NK-Zellen mit Antikörper war bei den Versuchen mit beiden Zelllinien vergleichbar stark, bei LAN-1 war der Unterschied zur Kontrolle jedoch größer als bei TC-71. PD-1 hingegen war auf NK-Zellen in Kokultur mit beiden Zelllinien nicht exprimiert. Eine Hochregulation durch Zugabe des anti-GD2 Antikörpers war nicht zu beobachten.

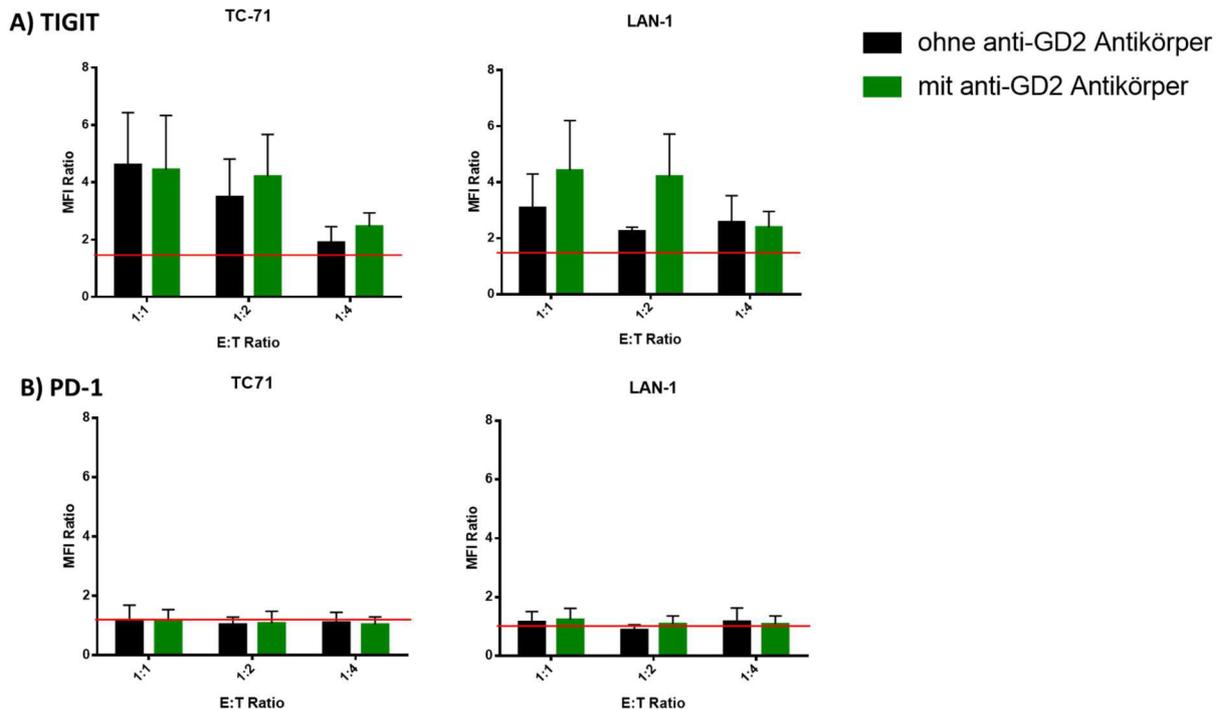


Abbildung 4-12: Expression von TIGIT und PD-1 auf NK-Zellen in Kokultur mit GD2-exprimierenden Zelllinien mit (grün) und ohne (schwarz) anti-GD2 Antikörper **(A)** TIGIT auf NK in Kokultur mit TC-71 und LAN-1 **(B)** PD-1 auf NK in Kokultur mit TC-71 und LAN-1; n=3.

4.2.2.3. Expressionsunterschiede auf NK-Zell-Subpopulationen

Zusätzlich sollte die Expression von PD-1 und TIGIT auf Subpopulationen von NK-Zellen charakterisiert werden. Unterschieden wurde zwischen $CD56^{bright}CD16^{dim-}$ und $CD56^{dim}CD16^{bright-}$ NK-Zellen. Getestet wurden NK-Zellen von jeweils drei gesunden Spendern. Einzige Ausnahme bildeten die Versuche mit LAN-1, die mit fünf Spendern durchgeführt wurden. Die hier dargestellte Versuchsreihe wurde unabhängig von den unter 4.2.2.1. und 4.2.2.2. erläuterten Untersuchungen zur Expression auf NK-Zellen ohne Unterscheidung der Subpopulationen durchgeführt.

4.2.2.3.1. AML-Zelllinien

Verwendet wurden die AML-Zelllinien OCI-AML3 und HL-60 sowie der anti-CD33 Antikörper. Die Umstellung vom anti-CD157 auf den anti-CD33 Antikörper war infolge von Lieferproblemen des ersteren notwendig. In keiner der untersuchten Kokulturen konnte eine signifikante Lyse der Zielzellen nachgewiesen werden, analog zu den unter 4.2.2.1. beschriebenen Versuchen. PD-1 war auf NK-Zellen

in Kokultur mit AML-Zelllinien nicht nachweisbar. Die Versuche mit OCI-AML3 zeigten eine nur schwache Expression von TIGIT auf der CD56^{dim}CD16^{bright}-Population und keinen Unterschied im Vergleich zwischen Zugabe des anti-CD33 Antikörpers und der Kontrolle. Bei der CD56^{bright}CD16^{dim}-Population war TIGIT dagegen nicht exprimiert und es konnte keine Veränderung bei Zugabe des Antikörpers beobachtet werden.

Das Expressionsniveau von TIGIT auf CD56^{dim}CD16^{bright} Zellen war bei den Versuchen mit HL-60 generell höher als bei denen mit OCI-AML3. In den Versuchen mit HL-60 wurde TIGIT auf dieser Zellpopulation sowohl mit als auch ohne therapeutischen Antikörper stark exprimiert. Dabei zeigte sich mit abnehmendem Anteil an Effektorzellen auch eine schwächere Expression des Checkpoints. Bei Zugabe des Antikörpers fand eine Herunterregulation von TIGIT statt, die jedoch nicht signifikant war. CD56^{bright}CD16^{dim}-Zellen wiesen auch in den Versuchen mit HL-60 keine Expression von TIGIT auf. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-13 dargestellt.

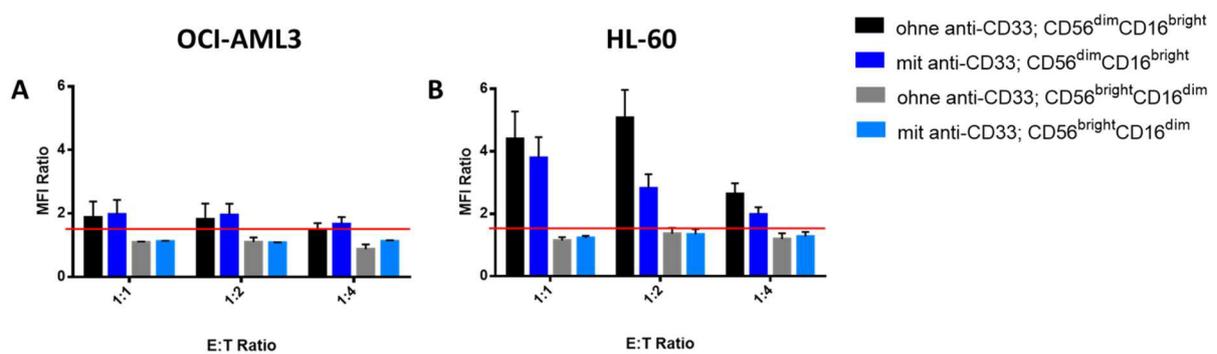


Abbildung 4-13: Expression von TIGIT auf NK-Zell-Subpopulationen in Kokultur mit AML-Zelllinien. CD56^{dim}CD16^{bright} NK ohne (schwarz) und mit (dunkelblau) anti-CD33 Antikörper. CD56^{bright}CD16^{dim} NK ohne (grau) und mit (hellblau) anti-CD33 Antikörper. (A) TIGIT auf NK in Kokultur mit OCI-AML3 (B) TIGIT auf NK in Kokultur mit HL-60; n=3.

4.2.2.3.2. GD2-exprimierende Zelllinien

Verwendet wurden die GD2-exprimierende Zelllinien TC-71 und LAN-1 sowie der anti-GD2 Antikörper. Auch hier konnte keine relevante Lyse der Zielzellen beobachtet werden. PD-1 war auf NK-Zellen in Kokultur mit GD2-exprimierende Zelllinien nicht exprimiert. Bei den Versuchen mit der Zelllinie TC-71 war die stärkste Expression von TIGIT auf der CD56^{dim}CD16^{bright}-Population unter Zugabe des anti-GD2 Antikörpers erkennbar. Der Unterschied zur Kontrolle war jedoch nicht signifikant. Die CD56^{bright}CD16^{dim}-Population zeigte dagegen keine Expression und keine Veränderung im Expressionsprofil bei Zugabe des Antikörpers. Der Vergleich zwischen den beiden Populationen war nicht signifikant.

Das Expressionsniveau war bei den Versuchen mit TC-71 generell höher als mit LAN-1. NK-Zellen in den Versuchen mit LAN-1 wiesen keine Hochregulation auf CD56^{dim}CD16^{bright} Zellen auf, jedoch eine leichte Verstärkung der Expression. Auf der CD56^{bright}CD16^{dim} Population wurde TIGIT jedoch bei den E:T Ratios 1:1 und 1:2 nach Zugabe des Antikörpers exprimiert, während es bei den Kontrollen nicht nachweisbar war. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-14 dargestellt.

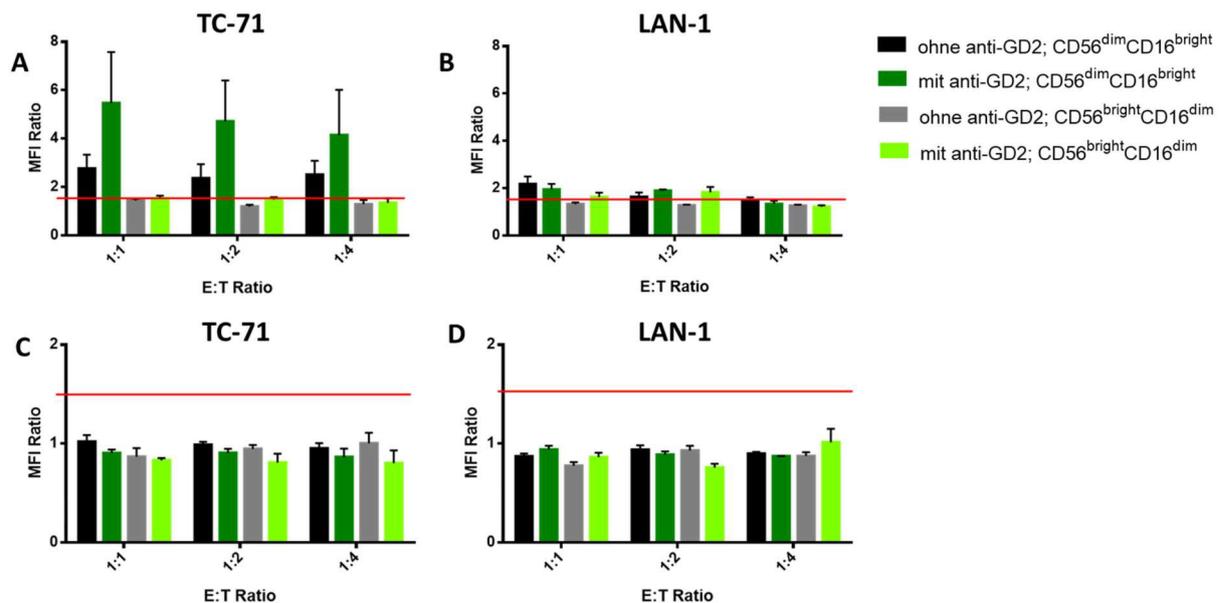


Abbildung 4-14: Expression von TIGIT und PD-1 auf NK-Zell-Subpopulationen in Kokultur mit GD2-exprimierenden Zelllinien. CD56^{dim}CD16^{bright} NK ohne (schwarz) und mit (dunkelgrün) anti-GD2 Antikörper. CD56^{bright}CD16^{dim} NK ohne (grau) und mit (hellgrün) anti-GD2 Antikörper. **(A)** TIGIT auf NK in Kokultur mit TC-71, n=3 **(B)** TIGIT auf NK in Kokultur mit LAN-1, n=5 **(C)** PD-1 auf NK in Kokultur mit TC-71, n=3 **(D)** PD-1 auf NK in Kokultur mit LAN-1, n=5.

4.3. Zytokinsekretion in Kokulturen

In den Überständen der in Kapitel 4.2.2. behandelten Kokulturen wurden die Konzentrationen der Zytokine IFN- γ und TNF bestimmt. Zu diesem Zweck wurden kryokonservierte Überstände von Kokulturen mit allen drei therapeutischen Antikörpern mittels CBA untersucht. Wie in den Kapiteln 4.2.2.1. und 4.2.2.2. erläutert, konnten bei keiner der durchgeführten Kokulturen signifikante Lyseraten erzielt werden. TNF konnte bei keinem der durchgeführten CBAs detektiert werden. In Abbildung 4-15 sind die Ergebnisse aller Versuche zusammengefasst, bei denen IFN- γ nachweisbar war. Da sich die maximal sezernierten Konzentrationen zwischen den verschiedenen Zelllinien und Antikörpern in hohem Maße unterschieden, wurde für jeden Teil der Graphik eine eigene

Achsenkalierung gewählt. Aufgrund der niedrigen Versuchszahlen wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet.

Bei den Überständen einer Kokultur mit OCI-AML3 mit NK-Zellen eines gesunden Spenders zeigte sich eine generell verhältnismäßig schwache Sekretion von IFN- γ . Durch Zugabe des anti-CD157 Antikörpers wurde diese stark gesteigert. Dabei lag kein Unterschied zwischen den eingesetzten E:T Ratios vor.

Ebenfalls mit OCI-AML3 wurden Kokulturen mit NK-Zellen dreier gesunder Spender untersucht, diesmal mit dem anti-CD33 Antikörper. Ohne Antikörper konnte kein IFN- γ detektiert werden. Durch dessen Zugabe stieg die Sekretion vor allem bei den E:T Ratios 1:1 und 1:2 auf hohe Werte an. Dabei zeigte sich besonders bei 1:2 eine große Streuung der Werte.

Auch Überstände aus drei Kokulturen mit HL-60 und anti-CD33 Antikörper wurden getestet. Bei generell schwacher Sekretion zeigte sich hier eine tendenziell verringerte Sekretion von IFN- γ bei Zugabe des Antikörpers. Ausgeprägter war dieser Effekt bei einer E:T von 1:1. Bei einer E:T von 1:4 waren sowohl bei den Ansätzen mit Antikörper als auch bei der Kontrolle ohne nur sehr geringe Konzentrationen nachweisbar.

Von den Ansätzen mit GD2-exprimierende Zelllinien und anti-GD2 Antikörper wurden drei Kokulturen mit LAN-1 untersucht, ebenfalls in Abbildung 4-15 dargestellt. Hier zeigte sich besonders in einer E:T Ratio von 1:2 ein starker Anstieg der IFN- γ Konzentration durch Zugabe des Antikörpers. Bei einer E:T Ratio 1:4 war eine relevante Sekretion von IFN- γ lediglich bei Zugabe des Antikörpers detektierbar. Kein Unterschied zur Kontrolle zeigte sich bei einer E:T Ratio von 1:1.

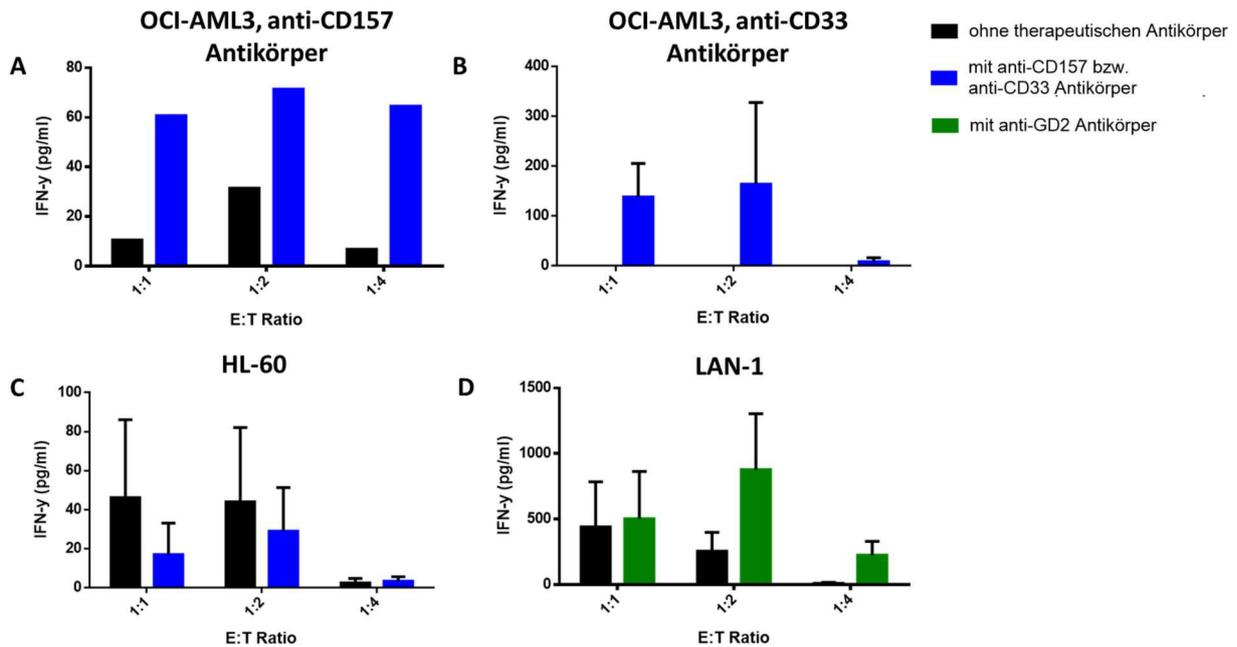


Abbildung 4-15: Sekretion von IFN- γ durch NK-Zellen in Kokultur mit Tumorzelllinien, mit (farbig) und ohne (schwarz) therapeutische Antikörper. **(A)** OCI-AML3 und anti-CD157 Antikörper, n=1 **(B)** OCI-AML3 und anti-CD33 Antikörper, n=2 **(C)** HL-60 und anti-CD33 Antikörper, n=3 **(D)** LAN-1 und anti-GD2 Antikörper, n=3.

4.4. Zytotoxizitätsassays

Der Effekt von therapeutischen Antikörpern und Immuncheckpoint-Blockade auf die zytotoxische Wirksamkeit von NK-Zellen wurde in $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungs-Versuchen getestet. Untersucht wurde zunächst der Einfluss der drei therapeutischen Antikörper ohne Zugabe von Checkpoint-blockierendem Antikörper. Im Anschluss wurden Kombinationen aus therapeutischen mit blockierenden Antikörpern gegen PVR, TIGIT und einer Kombination aus beiden getestet. Die zytotoxische Wirkung unstimulierter NK-Zellen wurde an GD2-exprimierende Zelllinien, die vorstimulierter an AML- und GD2-exprimierende Zelllinien getestet. Für die Vorstimulation wurden NK-Zellen mit 50 U/ml IL-2 über Nacht inkubiert. Zum Abschluss wurden unstimulierte NK-Zellen von STS- und AML-Patienten untersucht.

In der Regel wurden die E:T Ratios 50:1, 25:1, 12,5:1 und 6,25:1 verwendet, mit Ausnahme eines in Kapitel 4.3.1. behandelten Ansatzes. Sowohl therapeutische als auch blockierende Antikörper wurden in der Zielkonzentration 1 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt. Einzige Ausnahme bildete der unter Kapitel 4.3.2.3. dargestellte Versuch, bei dem zusätzlich die zehnfache Konzentration des anti-PVR-Antikörpers

getestet wurde. Allen Versuchen war die große Streuung der Lyseraten zwischen den einzelnen NK-Zell-Spendern gemein.

Zusätzlich zu ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Versuchen wurde die Kombination aus therapeutischen und Checkpoint-blockierenden Antikörpern in Kokulturen von NK-Zellen gesunder Spender mit Zelllinien untersucht. So konnte getestet werden, ob sich nach der, im Vergleich zu vier Stunden bei den ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Versuchen längeren, Inkubationszeit von 48 Stunden Effekte zeigten.

4.4.1. Effekt therapeutischer Antikörper ohne Checkpoint-Blockade

Bei allen drei therapeutischen Antikörpern konnte eine Verbesserung der Lyse beobachtet werden. Zudem nahmen bei allen Antikörpern und getesteten Zelllinien die Lyseraten sowohl bei Zugabe des Antikörpers als auch bei den Kontrollen mit abnehmender E:T Ratio gleichmäßig ab. Alle Versuche sind in Abbildung 4-16 zusammengefasst. Aufgrund der niedrigen Versuchszahlen wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet.

Für die Versuche mit dem anti-CD157 Antikörper wurden die E:T Ratios 40:1, 20:1, 10:1 und 5:1 eingesetzt. Als Zielzellen wurde die AML-Zelllinie OCI-AML3 ausgewählt, da sie die stärkste Expression von CD157 unter den getesteten Zelllinien aufwies (vgl. Abbildung 4-4). Getestet wurde mit NK-Zellen von vier gesunden Spendern. Der Unterschied in der Lyse zwischen Zugabe des Antikörpers und Kontrolle war bei allen E:T Ratios stark ausgeprägt.

Der anti-CD33 Antikörper wurde an drei gesunden Spendern mit der AML-Zelllinie MV4-11 getestet. Der Unterschied zwischen Antikörper-Zugabe und Kontrolle war hier bei allen E:T Ratios stark ausgeprägt.

Der anti-GD2 Antikörper wurde in Versuchen mit zwei gesunden Spendern und den Zelllinien TC-71 und LAN-1 getestet. Bei beiden Zelllinien zeigte sich eine starke Zunahme der Lyse durch Zugabe des Antikörpers im Vergleich zur Kontrolle ohne Antikörper. Diese war bei allen eingesetzten E:T Ratios der Fall. Die Werte waren bei TC-71 etwas niedriger als bei LAN-1.

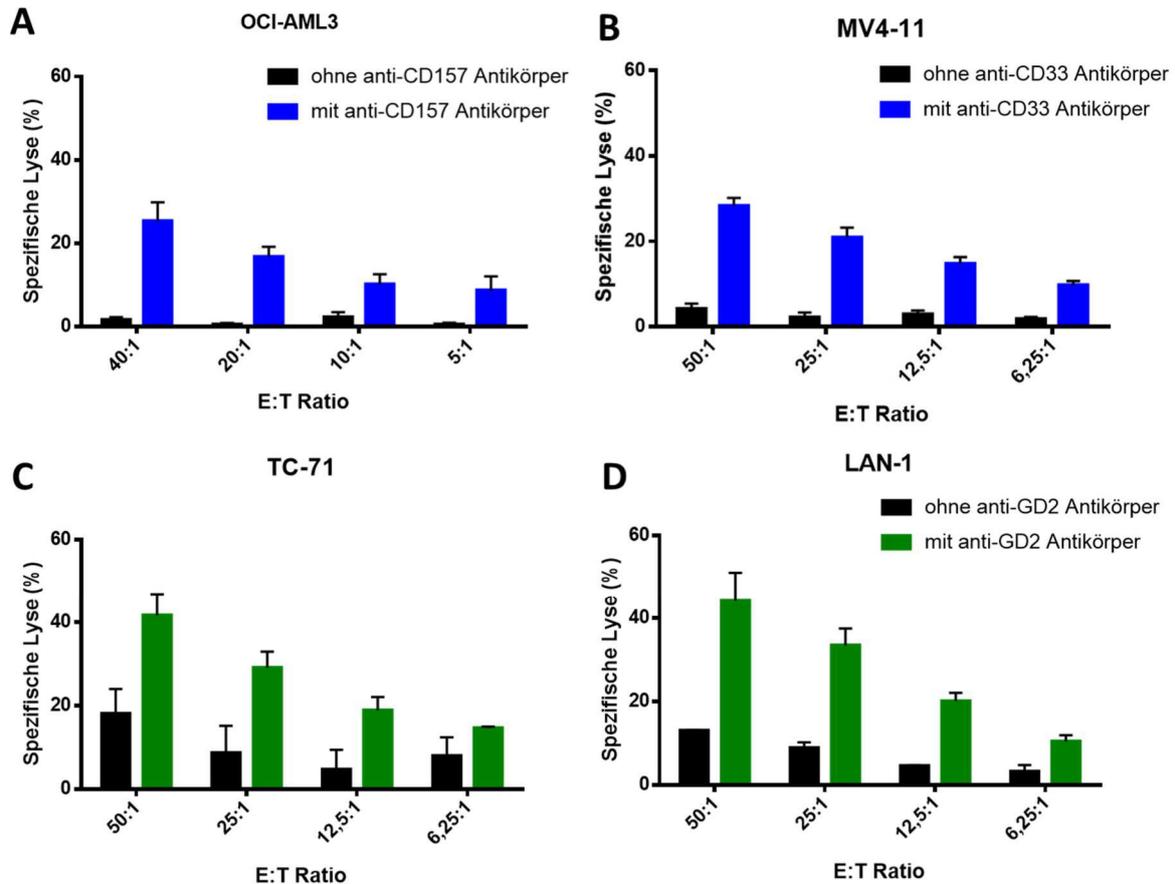


Abbildung 4-16: Effekt therapeutischer Antikörper auf die Lyse von STS- und AML-Zelllinien durch NK-Zellen gesunder Spender. **(A)** OCI-AML3 mit anti-CD157 Antikörper, n=4; **(B)** MV4-11 mit anti-CD33 Antikörper, n=3; **(C)** TC-71 mit anti-GD2 Antikörper, n=2; **(D)** LAN-1 mit anti-GD2 Antikörper, n=2.

4.3.2. Therapeutische Antikörper in Kombination mit Immuncheckpoint-Blockade

Im Folgenden werden die Ergebnisse der ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Versuche zum Effekt der Immuncheckpoint-Blockade dargestellt. Dabei werden lediglich die Ergebnisse der E:T Ratio 50:1 erörtert, die verglichen mit den restlichen durchgeführten E:T Ratios aufgrund der generell höheren Lyseraten die größte Aussagekraft besitzen.

4.4.2.1. AML-Zelllinien

4.4.2.1.1. Vorstimulierte NK-Zellen

Die ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Versuche zur Checkpoint-Blockade bei AML wurden mit vorstimulierten NK-Zellen von neun bis 14 gesunden Spendern durchgeführt. Getestet wurde an der AML-Zelllinie MV4-11, da diese die stärkste Expression von PVR bei gleichzeitig starker Expression von CD33 aufwies. Als therapeutischer Antikörper wurde der anti-CD33 Antikörper eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-17 dargestellt.

Unterschiede waren lediglich zwischen Zugabe des therapeutischen Antikörpers und den Kontrollen ohne erkennbar. Bei den Konditionen ohne blockierende Antikörper war dieser Vergleich sehr stark signifikant (n=14, p=0,0002), bei Zugabe von PVR oder TIGIT zeigte sich ein stark signifikanter Unterschied (PVR: n=11, p=0,002; TIGIT: n=10, p=0,002). Die kombinierte Blockade von PVR und TIGIT wies ebenfalls einen signifikanten Unterschied zwischen Zugabe und Fehlen des anti-CD33 Antikörpers auf (n=9, p=0,01). Ein Unterschied zwischen den verschiedenen Blocking-Konditionen konnte nicht festgestellt werden.

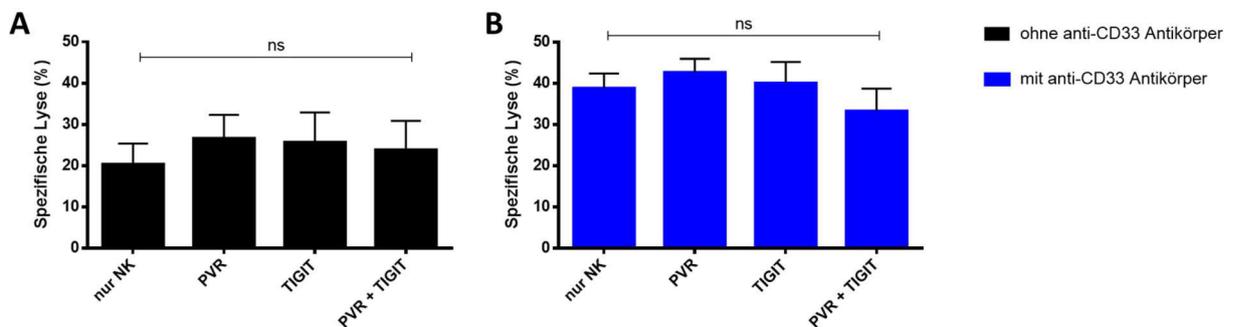


Abbildung 4-17: Lyse der AML-Zelllinie MV4-11 durch vorstimulierte NK-Zellen von gesunden Spendern in einer E:T Ratio von 50:1, mit und ohne therapeutische und blockierende Antikörper. Die Immuncheckpoint-Blockade von PVR (n=11), TIGIT (n=10) bzw. beider in Kombination (n=9) wurde jeweils ohne (A) und mit (B) dem anti-CD33 Antikörper durchgeführt, ebenso wie eine Kontrolle ohne blockierende Antikörper (n=14); Wilcoxon-Test.

4.4.2.1.2. NK-Zellen von AML-Patienten

Anschließend wurden ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Versuche mit NK-Zellen von AML-Patienten durchgeführt. Als Zielzellen wurde die Zelllinie MV4-11, als therapeutischer Antikörper der anti-CD33 Antikörper eingesetzt. Getestet wurden sechs Patienten. Aufgrund der geringen Ausbeute an NK-Zellen aus den PBMC der Patienten wurden nicht alle Konditionen gleich häufig untersucht: Bei drei Patienten wurden alle Blocking-Konditionen durchgeführt, bei der anderen Hälfte lediglich die Versuche ohne blockierende Antikörper und PVR-Blockade.

Da alle Lysewerte unter 5% lagen, kann keine Aussage über mögliche Effekte des therapeutischen oder der blockierenden Antikörper getroffen werden. Die Daten sind daher nicht dargestellt. Möglicherweise waren die aus kryokonservierten PBMC von AML-Patienten gewonnenen NK-Zellen nicht optimal als Ausgangsmaterial geeignet, da bereits die Isolation der Effektorzellen eine geringere Viabilität als bei STS-Patienten und gesunden Spendern zeigte.

4.4.2.2. GD2-exprimierende Zelllinien

4.4.2.2.1. Unstimulierte NK-Zellen

Für die Untersuchung des Effekts der Immuncheckpoint-Blockade auf die zytotoxische Wirksamkeit unbehandelter NK-Zellen wurden ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Versuche mit NK-Zellen von zehn gesunden Spendern und der GD2-exprimierende Zelllinie TC-71 durchgeführt, wie in Abbildung 4-18 dargestellt. Dabei zeigte sich die höchste Lyse bei alleiniger Zugabe des anti-GD2 Antikörpers. Der Unterschied zur Kontrolle ohne jeglichen Zusatz von Antikörpern war stark signifikant (n=10, p=0,002). Die Zugabe von Checkpoint-blockierenden Antikörpern zusätzlich zum anti-GD2 Antikörper resultierte nicht in einer Verstärkung der Lyse, sondern vielmehr in einer – nicht signifikanten - Abnahme. Dabei zeigte sich kein Unterschied zwischen der Blockade von PVR, TIGIT und der Kombination aus beiden. Die Kontrollen der einzelnen Konditionen, also jeweils ohne anti-GD2 Antikörper, zeigten vergleichbare Lyseraten. Der Vergleich zwischen den Checkpoint-Blockaden mit und ohne anti-GD2 Antikörper war lediglich bei TIGIT signifikant (n=10, p=0,04). Zwischen den drei unterschiedlichen Blocking-Konditionen konnte kein Unterschied festgestellt werden.

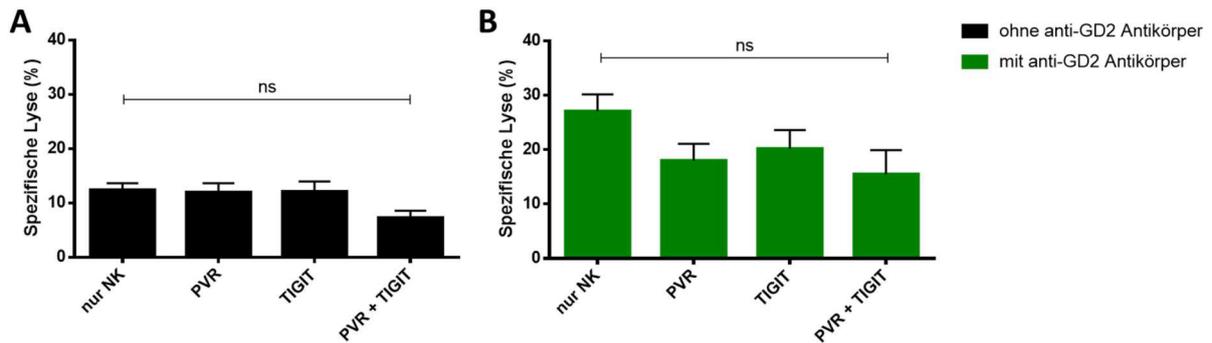


Abbildung 4-18: Lyse der GD2-exprimierenden Zelllinie TC-71 durch unstimulierte NK-Zellen von gesunden Spendern in einer E:T Ratio von 50:1, mit und ohne therapeutische und blockierende Antikörper. Die Immuncheckpoint-Blockade von PVR, TIGIT bzw. beider in Kombination wurde jeweils ohne **(A)** und mit **(B)** dem anti-GD2 Antikörper durchgeführt, ebenso wie eine Kontrolle ohne blockierende Antikörper; n=10; Wilcoxon-Test.

4.4.2.2. Vorstimulierte NK-Zellen

Um potentielle Effekte der Immuncheckpoint-Blockade auf die zytotoxische Wirksamkeit von NK-Zellen besser sichtbar zu machen, wurden $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungs-Versuche mit vorstimulierten NK-Zellen von zehn bzw. neun gesunden Spendern und den GD2-exprimierenden Zelllinien SW-872 und TC-71 durchgeführt, wie in Abbildung 4-19 dargestellt.

Unterschiede in der Lyse zwischen Zugabe des therapeutischen Antikörpers und der Kontrolle ohne diesen konnten vor allem bei den Versuchen mit SW-872 beobachtet werden. Sowohl der Vergleich zwischen alleiniger Zugabe des anti-GD2 Antikörper und der zugehörigen Kontrolle als auch der Vergleich zwischen der kombinierten Blockade von PVR und TIGIT mit therapeutischem Antikörper und entsprechender Kontrolle war signifikant (nur NK ohne blockierende Antikörper: n=10, p=0,01; gleichzeitige Blockade von PVR und TIGIT: n=9, p=0,01). Bei TIGIT war der Unterschied nicht, bei PVR dagegen stark signifikant (n=10, p=0,002). Da wir den Effekt des therapeutischen Antikörpers bereits unter 4.4.1. (s. auch Abbildung 4-16) untersucht haben, ist der direkte Vergleich zwischen den Konditionen mit und ohne therapeutischen Antikörper in Abbildung 4-19 nicht dargestellt.

Die Lyse von TC-71 war generell niedriger als die von SW-872. Zudem waren die Unterschiede zwischen Zugabe des anti-GD2 Antikörpers und den zugehörigen Kontrollen geringer ausgeprägt. Lediglich bei PVR und TIGIT war der Unterschied signifikant (PVR: n=10, p=0,02; TIGIT: n=10, p=0,04).

Versuche mit beiden Zelllinien zeigten keine Zunahme der Lyse durch Zugabe der blockierenden Antikörper zusätzlich zum anti-GD2 Antikörper. Ebenfalls konnte kein Unterschied zwischen den drei unterschiedlichen Blocking-Konditionen festgestellt werden.

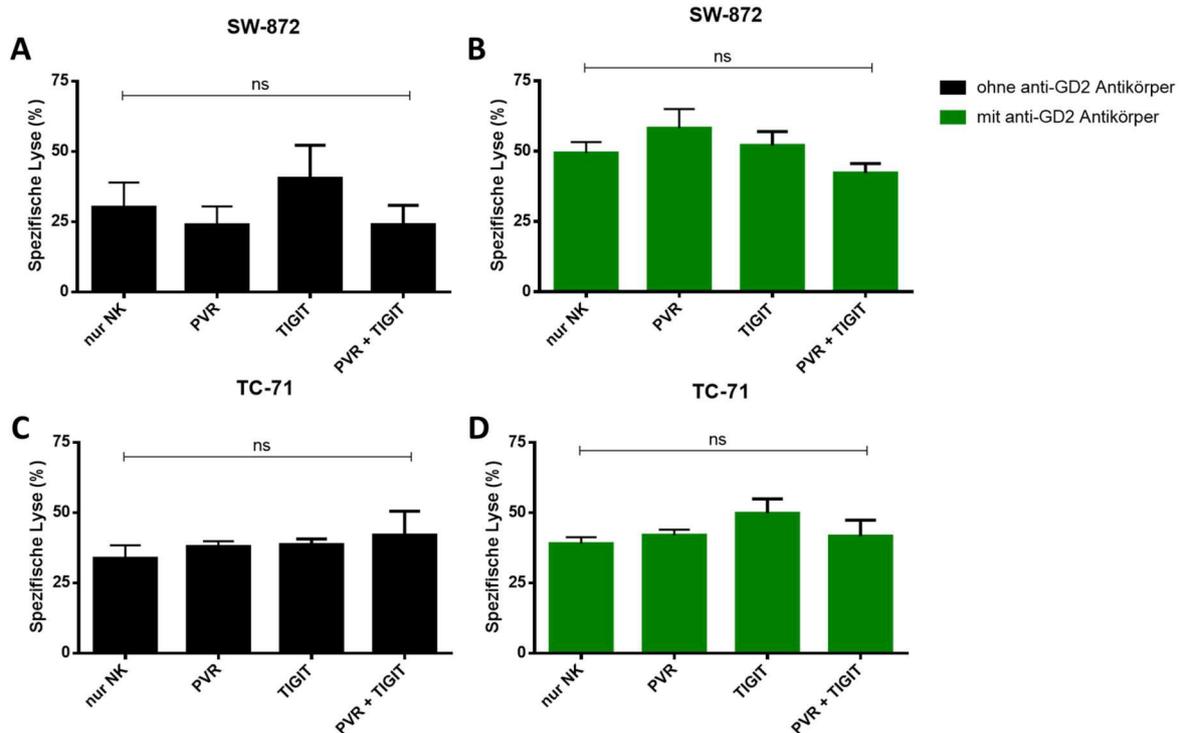


Abbildung 4-19: Lyse der GD2-exprimierenden Zelllinien SW-872 und TC-71 durch vorstimulierte NK-Zellen von gesunden Spendern in einer E:T Ratio von 50:1, mit und ohne therapeutische und blockierende Antikörper. Alle Konditionen wurden jeweils ohne (A), (C) und mit (B), (D) dem anti-GD2 Antikörper durchgeführt; n=10; Wilcoxon-Test.

4.4.2.2.3. NK-Zellen von STS-Patienten

Anschließend wurden unstimulierte NK-Zellen von STS-Patienten in ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Versuchen mit SW-872 getestet. Die Konditionen ohne blockierende Antikörper und die mit PVR-Blockade wurden an zehn, die Blockade von TIGIT an vier Patienten untersucht. Die Zunahme der Lyse durch Zugabe des anti-GD2 Antikörpers war bei den Versuchen ohne blockierende Antikörper und denen mit PVR- bzw. TIGIT-Blockade stark signifikant (beide n=10, p=0,002). Zwischen den verschiedenen Konditionen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-20 dargestellt.

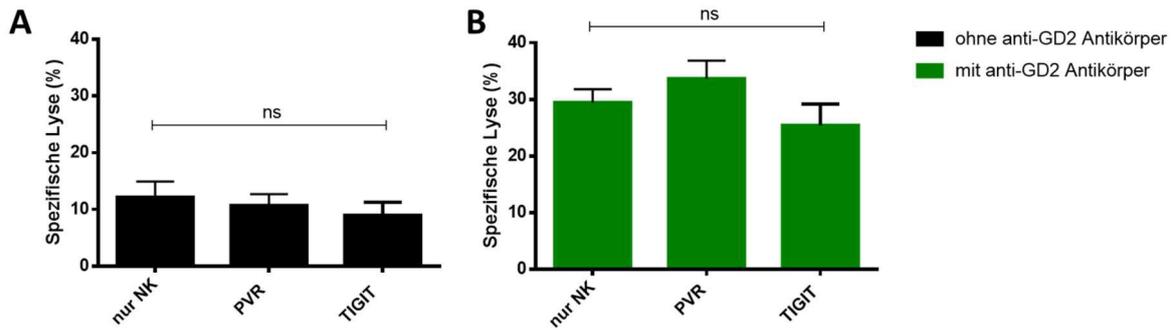


Abbildung 4-20: Lyse der GD2-exprimierende Zelllinie SW-872 durch NK-Zellen von STS-Patienten in einer E:T Ratio von 50:1, mit und ohne therapeutische und blockierende Antikörper. Die Immuncheckpoint-Blockade von PVR (n=10) und TIGIT (n=4) wurde jeweils ohne (A) und mit (B) dem anti-GD2 Antikörper durchgeführt, ebenso wie eine Kontrolle ohne blockierende Antikörper; n=10; Wilcoxon-Test.

4.4.2.3. Unterschiedliche Zielkonzentrationen der Checkpoint-blockierenden Antikörper

Um zu untersuchen, ob sich bei höheren Konzentrationen der blockierenden Antikörper Effekte der Checkpoint-Blockade zeigen, wurde der anti-PVR-Antikörper parallel in den Zielkonzentrationen 1µg/ml und 10µg/ml eingesetzt. Getestet wurde dies in ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Versuchen mit der GD2-exprimierende Zelllinie SW-872 und NK-Zellen von fünf STS-Patienten. Analog zu den vorigen Versuchen war die Lyse bei Zugabe des anti-GD2 Antikörpers im Vergleich zur Kontrolle stark erhöht. Eine leichte Steigerung der Lyse fand ebenfalls mit zunehmender Konzentration von PVR statt. Dieser Effekt war jedoch statistisch nicht signifikant. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-21 dargestellt.

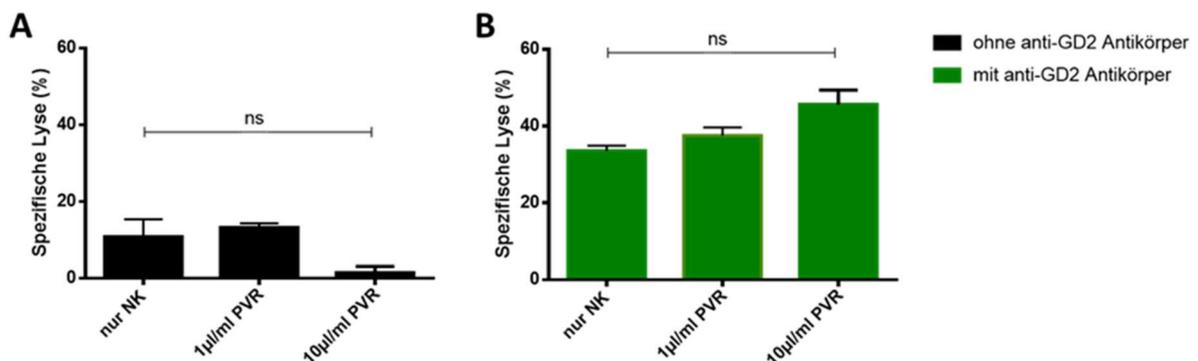


Abbildung 4-21: Einfluss unterschiedlicher Zielkonzentrationen des anti-PVR Antikörpers auf die Lyse der GD2-exprimierenden Zelllinie SW-872 durch NK-Zellen von STS-Patienten. Die Immuncheckpoint-Blockade von PVR wurde jeweils ohne (A) und mit (B) dem anti-GD2 Antikörper durchgeführt; n=5; Wilcoxon-Test.

5. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Kombination von Immuncheckpoint-Blockade und Einsatz therapeutischer Antikörper bei den Erkrankungen AML und STS untersucht. Dies begründet sich in der nach wie vor schlechten Prognose bei beiden Erkrankungen. Die in dieser Arbeit vorgestellten immuntherapeutischen Konzepte könnten ein Ansatzpunkt für eine zukünftig effektivere Behandlung sowohl bei AML- als auch bei STS-Patienten sein.

Die Identifikation für eine Immuncheckpoint-Blockade relevanter Zielstrukturen war einerseits eigenständiges Ziel der vorliegenden Arbeit und diente andererseits als Grundlage für die im Anschluss durchgeführten Untersuchungen. In Kombination mit therapeutischen Antikörpern wurde die Blockade der ausgewählten Checkpoints und Liganden evaluiert.

5.1. Identifikation von Zielstrukturen für Immuncheckpoint-Blockade

Für keine der beiden Krankheitsentitäten AML und STS ist bislang ein charakteristischer Checkpoint auf NK-Zellen identifiziert worden, auch insgesamt ist die Datenlage zu Checkpoints bei NK-Zellen aktuell dünn. Zu einzelnen Checkpoints liegen bereits Daten vor, wie in Kapitel 1.4. detaillierter ausgeführt. So wurde für TIGIT¹⁷⁰, SLAMF-7⁹, CD96¹⁶³ und CD137⁷² eine Expression auf NK-Zellen gezeigt. Für PD-1 konnte bereits gezeigt werden, dass es die Aktivierung und zytotoxische Aktivität von NK-Zellen gegenüber Zellen des Multiplen Myeloms beeinflusst^{15,52}. Zusätzlich zur Charakterisierung der Checkpoint-Expression auf NK-Zellen wurde untersucht, ob diese durch Stimulation induzierbar ist und ob Subpopulationen von NK-Zellen sich hinsichtlich des Expressionsprofils von Checkpoints unterscheiden.

Die Expressionsstärke von Immuncheckpoints und Liganden wurde auf Basis durchflusszytometrischer Daten bestimmt. Üblicherweise wird zur Interpretation der untersuchten Zellpopulationen der prozentuale Anteil an Zellen angegeben, die positiv für das zu untersuchende Oberflächenmerkmal sind. Um Aussagen zum individuellen Expressionsniveau zu treffen, ist die in dieser Arbeit angewandte Methode, als Maß für die Expressionsintensität die MFI Ratio zu errechnen, gut geeignet, da bei jeder einzelnen Probe die Hintergrundfluoreszenz berücksichtigt wird. Im Gegensatz zur ebenfalls gängigen Methode, lediglich den prozentualen Anteil an Zellen, die für das untersuchte Antigen positiv sind, zu beurteilen,⁸⁷ ermöglicht die MFI-Ratio den Vergleich zwischen einzelnen Individuen.⁷⁶

5.1.1. Expression von Immuncheckpoints auf NK-Zellen

Ideal geeignet für eine spezifische Blockade wäre ein Checkpoint, dessen Expression auf NK-Zellen von AML- und STS- Patienten sich von der auf NK-Zellen gesunder Spender unterscheidet. Von den fünf in die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit aufgenommenen Checkpoints soll hier lediglich auf zwei genauer eingegangen werden. Wenngleich PD-1 und CD137 ähnlich geringe Expressionsniveaus aufwiesen, soll im Folgenden lediglich PD-1 ausführlicher diskutiert werden. Da dieser Checkpoint bei anderen Erkrankungen bereits immuntherapeutisch adressiert wird, wurde er von uns trotz seiner niedrigen Expression in weiteren Versuchen untersucht. SLAMF-7 zeigte zwar die durchschnittlich stärkste Expression, wurde jedoch aufgrund der niedrigen Expression seines Liganden auf Tumorzellen nicht weiter evaluiert. Die beiden strukturverwandten, gegen den Liganden PVR gerichteten, Checkpoints TIGIT und CD96 ähnelten sich hinsichtlich der Expressionsstärke auf NK-Zellen von Gesunden und STS-Patienten, während es sich auf NK-Zellen von AML-Patienten signifikant stärker exprimiert zeigte. Die Rolle von TIGIT soll im Folgenden ebenfalls genauer beleuchtet werden. Da CD96 erst im zweiten der im LfL angewendeten FACS-Panels gemessen wurde, konnte dieser Checkpoint im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr genauer untersucht werden, sollte jedoch als vielversprechender Ansatzpunkt für eine Immuncheckpoint-Blockade in Folgearbeiten genauer untersucht werden.

Die beiden Checkpoints PD-1 und TIGIT sollen in den folgenden Abschnitten ausführlich diskutiert werden. Dabei werden die Daten von gesunden Spendern und Patienten beider Krankheitsentitäten zusammengefasst dargestellt. Unsere Daten basieren auf der unter 3.2.3.3. vorgestellten Gatingstrategie zur Identifikation von NK-Zellen. So definierten wir CD16/CD56-positive Lymphozyten, die keine relevante Expression von CD33 zeigten, als NK-Zellen. Neben NK-Zellen können jedoch auch T-Zellen in einem geringen Maße CD16/56 exprimieren¹⁵⁹ und mittels des Gatings gegen CD33 nicht sicher aus der gewählten Population eliminiert werden, was zu Beginn der Arbeit nicht in diesem Ausmaß bekannt war. Daher ist es möglich, dass wir in unsere Untersuchungen einen geringen Prozentsatz T-Zellen miteinschlossen. Für die genauere Differenzierung könnte in Zukunft ein Gating gegen CD3, das auf T-Zellen stark exprimiert wird, gewählt werden. Eine relevante Beeinflussung der Ergebnisse infolge der von uns angewandten Gatingstrategie ist aber nicht anzunehmen.

Zusätzlich zur Expression von Checkpoints auf NK-Zellen von Gesunden und Patienten wollten wir die Expression von Immuncheckpoints auf der Oberfläche auf einen Zusammenhang mit dem NK-Zell-Phänotyp untersuchen. Wie bereits erläutert, besteht zwischen den NK-Zell-Subpopulationen CD56^{bright}CD16^{dim} und CD56^{dim}CD16^{bright} ein funktionaler Unterschied. Während erstere durch Sekretion von Zytokinen indirekt zur Immunreaktion beitragen, sind letztere zytotoxisch wirksam.

5.1.1.1. Inhomogene Datenlage zur Expression von PD-1 auf NK-Zellen

Die Expression von PD-1 ist bereits vielfach untersucht worden. In mehreren klinischen Settings wird der Rezeptor auf NK-Zellen exprimiert. Dabei sind die Ergebnisse jedoch nicht konsistent. Vergleichbar mit den von uns erhobenen Daten zeigte sich auch bei Liu et al. eine niedrige Expression von PD-1 bei gesunden Spendern. Die Ergebnisse unserer Arbeit können aufgrund der Anwendung der MFI Ratio als Parameter für die Expression gegenüber der Angabe des prozentualen Anteils an PD-1-positiven Zellen bei Liu et al. jedoch nicht direkt miteinander verglichen werden. Das Fehlen einer relevanten Expression könnte darin begründet liegen, dass PD-1 bevorzugt auf stimulierten NK-Zellen exprimiert wird. Diese Stimulation kann beispielsweise durch Kontakt mit Tumoren, viralen Erregern oder nach einer Transplantation erfolgen.⁸⁷ So ließ sich in der Arbeit von Pesce et al. bei einem Viertel der untersuchten gesunden Spender eine PD-1-Expression auf NK-Zellen nachweisen; angegeben wurde hier der prozentuale Anteil PD-1-positiver Zellen. Alle Spender mit PD-1-positiven NK-Zellen waren seropositiv für das Cytomegalievirus.¹²⁰

Auch in unseren Versuchen zur Expression von PD-1 auf NK-Zell-Subpopulationen konnte PD-1 entweder gar nicht nachgewiesen werden oder wurde mit einer MFI Ratio unter 1,5 als nicht exprimiert gewertet. Dieses Ergebnis widerspricht jedoch der Arbeit von Pesce et al., die eine Expression auf CD56^{dim}CD16^{bright}-Zellen gegenüber fehlender Expression auf der CD56^{bright}CD16^{dim}-Population bei Gesunden beschreibt. Diese Diskrepanz könnte möglicherweise ebenfalls in der bereits erwähnten CMV-Seropositivität aller PD-1 positiven gesunden Spender begründet liegen.¹²⁰ Die im Rahmen unserer Arbeit untersuchten Spender unterzogen wir keiner Untersuchung auf den CMV-Status, bei der geringen Probandenzahl wäre es daher denkbar, dass sie seronegativ waren. Zusammenfassend sprechen all diese Ergebnisse dafür, dass PD-1 nicht auf ruhenden, sondern lediglich auf aktivierten NK-Zellen exprimiert wird.

Bei Patienten mit AML oder STS konnten wir keine relevante PD-1-Expression auf NK-Zellen feststellen. Bislang sind zudem keine Ergebnisse über die Expression auf NK-Zellen von Patienten mit diesen beiden Krankheiten publiziert. Bei einigen anderen Erkrankungen lässt sich jedoch eine Erhöhung des Expressionsniveaus feststellen. Liu et al. konnten zeigen, dass PD-1 auf NK-Zellen von Patienten mit Malignomen des Verdauungstraktes im Vergleich zu gesunden Spendern verstärkt exprimiert wird. Dies geht mit einer schlechteren Prognose einher.⁸⁷ Bei Pesce et al. zeigten sich PD-1-positive NK-Zellen vermehrt in der Aszitesflüssigkeit von Patientinnen mit Ovarialkarzinom. Funktionell waren diese Zellen hinsichtlich ihrer Proliferation, Degranulation und Zytokin-Produktion eingeschränkt.¹²⁰ PD-1 scheint demnach durchaus Einfluss auf die Aktivität von NK-Zellen zu nehmen, wenngleich wir keine relevante Expression dieses Checkpoints feststellen konnten.

PD-1 stellt auf der Grundlage unserer Ergebnisse keinen geeigneten Checkpoint für eine Blockade bei NK-Zellen dar und wurde in unsere dahingehenden Versuche daher nicht integriert. Bei einer insgesamt inhomogenen Datenlage in der Literatur und trotz der Tatsache, dass PD-1 im klinischen Alltag bereits erfolgreich als Zielstruktur für eine therapeutische Intervention mittels Checkpoint-Blockade adressiert wird, können wir aufbauend auf unseren Ergebnissen keine Hinweise auf einen Einfluss einer PD-1-Blockade auf die NK-Zell-Aktivität bei AML und STS finden.

5.1.1.2. TIGIT als vielversprechender Checkpoint auf NK-Zellen

Im Gegensatz zu PD-1 wurde TIGIT auf NK-Zellen sowohl bei Patienten beider Krankheitsentitäten als auch bei gesunden Spendern stark exprimiert. Dabei zeigte sich bei allen untersuchten Gruppen eine starke Streuung der Expressionswerte. Dies korreliert mit den Daten von Wang et al., die zeigen, dass NK-Zellen gesunder Spender bezüglich der TIGIT-Expression starke Schwankungen zwischen einzelnen Individuen aufweisen. Des Weiteren beschreiben Wang et al., dass NK-Zellen TIGIT im Durchschnitt stärker exprimieren als T-Zellen ¹⁶².

Für TIGIT zeigten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit keine Expression auf der CD56^{bright}CD16^{dim}-Population im Gegensatz zu einer, abhängig von Zelllinie und Einsatz von therapeutischen Antikörpern unterschiedlich stark ausgeprägten, Expression auf der zytotoxischen NK-Zell-Population. Die fehlende Expression auf der Zytokin-produzierenden Population war bei allen durchgeführten Versuchen konsistent. Unsere Daten reihen sich in bereits publizierte Ergebnisse ein. Sowohl Xu et al. als auch Wang et al. konnten zeigen, dass TIGIT präferentiell auf CD56^{dim}CD16^{bright} exprimiert wird.^{162,166} Die zitierten Arbeiten unterstreichen unsere Ergebnisse, die eindeutig auf eine Korrelation zwischen der Expression von TIGIT und der zytotoxischen NK-Zell-Subpopulation hinweisen.

Obwohl auch für TIGIT bislang keine Expressionsdaten zu NK-Zellen von Patienten mit AML oder STS existieren, konnten Kong et al. die Rolle von TIGIT auf CD8⁺-T-Zellen von AML-Patienten genauer charakterisieren. Das hohe Expressionsniveau auf diesen Zellen korreliert mit primär refraktären Krankheitsverläufen und Rückfällen nach allogener Stammzelltransplantation.⁷³

In Zusammenschau unserer Ergebnisse und den Daten aus der Literatur erscheint TIGIT als vielversprechender Immuncheckpoint für eine Blockade auf NK-Zellen. Daher wurde er in alle folgenden Versuche miteingeschlossen.

5.1.2. Induzierbarkeit der Checkpoint-Expression

Anhand der durch Analyse des Expressionsprofils ausgewählten Checkpoints PD-1 und TIGIT wurde die Nebenfragestellung bearbeitet, ob die Expression von Checkpoints auf der Oberfläche von NK-Zellen induzierbar ist. Zusätzlich wurden NK-Zell-Subpopulationen auf Unterschiede hinsichtlich der Expression untersucht.

Die Auswirkung einer Stimulation auf die Aktivität von NK-Zellen wurde am Beispiel dreier stimulierender Agentien sowie der verwendeten therapeutischen Antikörper untersucht. Eine verstärkte Expression inhibitorischer Immuncheckpoints auf der Oberfläche von NK-Zellen könnte im Sinne einer Aktivierung der NK-Zelle verstanden werden: Mit der erhöhten lytischen Kapazität der Zelle geht der Aufbau von Schutzmechanismen einher, die die Immunreaktion nach Angriff der Zielzelle wieder beenden können. Aus therapeutischer Sicht hat die verstärkte Expression eines Checkpoints den Vorteil, dass eine Checkpoint-Blockade effektiver wirken kann.

Die bei einzelnen Spendern nachweisbare leichte Erhöhung der PD-1 Expression bei Einsatz stimulierender Agentien ist aufgrund fehlender Signifikanz zu vernachlässigen. Dieses Ergebnis korreliert mit den bereits vorgestellten Daten zur niedrigen bzw. fehlenden Expression von PD-1 auf NK-Zellen gesunder Spender. Literatur zur Induktion von PD-1 auf NK-Zellen unter Stimulation existiert aktuell nicht. Unabhängig von der Art der Stimulation konnte in unseren Versuchen keine relevante Expression oder Induktion von PD-1 festgestellt werden.

5.1.2.1. Stimulierende Agentien führen zu einer Hochregulation von TIGIT auf NK-Zellen

Alle zur Stimulation der NK-Zell-Aktivität ausgewählten Agentien verstärkten die Expression von TIGIT. PHA induzierte die vergleichsweise stärkste Hochregulation des Checkpoints, zudem war es das einzige Stimulans, das bei allen getesteten Spendern eine Verstärkung der Expression auslöste. Die Kombination aus IL-2 und IL-15 zeigte nur bei einigen Spendern eine relevante Hochregulation. Gleiches galt für R848, wobei die Stärke der Hochregulation im Mittelfeld zwischen den anderen beiden Konditionen lag. Damit reihen sich unsere Ergebnisse in bereits publizierte Daten ein. So zeigten Xu et al. eine Hochregulation von TIGIT auf NK-Zellen infolge von Stimulation mit IL-2 und IL-12.¹⁶⁶ Über den Einfluss von R848 auf die Expression von TIGIT ist nichts beschrieben. PHA induzierten in Kombination mit IL-2 die Stimulation von TIGIT. Die Ergebnisse von Boles et al. korrelieren zudem bezüglich der Dynamik der Werte. Bereits einen Tag nach Stimulation war eine Expression in schwachem Maße nachweisbar, erst nach vier bis fünf Tagen jedoch konnte eine relevante Expression

detektiert werden.¹⁹ Bei den Versuchen mit PHA zeigte sich auch bei uns eine Erhöhung an Tag zwei gegenüber Tag eins. Die Verringerung der Expression in diesem Zeitraum bei den anderen beiden Stimulationskonditionen, IL-2 plus IL-15 und R848, könnte damit erklärt werden, dass die Expression zu diesen Zeitpunkten generell noch schwach ist und Schwankungen daher nicht aussagekräftig sind. Unabhängig vom Ausmaß der durch die verschiedenen Agentien ausgelösten Hochregulation war für uns die Tatsache, dass alle in der Lage waren, TIGIT auf NK-Zellen hochzuregulieren, mit ausschlaggebend, im weiteren Verlauf der Arbeit diesen Checkpoint genauer zu untersuchen.

5.1.2.2. Therapeutische Antikörper verstärken die Expression von TIGIT auf NK-Zellen

Zusätzlich zu den bereits vorgestellten Agentien zur Steigerung der NK-Zell-Aktivität, die hier aus Gründen der Übersichtlichkeit von therapeutischen Antikörpern abgegrenzt wurden, sollte auch eine Aussage zur Induzierbarkeit von Checkpoints auf NK-Zellen durch ADCC getroffen werden. Die Ergebnisse der zu diesem Zweck untersuchten Kokulturen aus NK-Zellen und AML- und STS-Zelllinien zeigten, unabhängig von Zelllinie und eingesetztem therapeutischem Antikörper, keine Expression oder Induzierbarkeit von PD-1.

TIGIT wurde auf NK-Zellen in allen Kokulturen exprimiert. Die Zugabe therapeutischer Antikörper induzierte in den meisten Fällen eine verstärkte Expression des Checkpoints. Aufgrund niedriger Versuchszahlen konnte dies nicht auf Signifikanz untersucht werden, graphisch zeigte sich der Effekt der therapeutischen Antikörper jedoch relevant (s. Abbildungen 4-11 und 4-12). Am stärksten war dieser Effekt bei den Kokulturen mit der AML-Zelllinie OCI-AML3 und dem anti-CD157 Antikörper ausgeprägt. Versuche mit der STS-Zelllinie TC-71 zeigten hingegen bei der E:T Ratio 50:1 keine Veränderung der Expressionsstärke im Rahmen der ADCC-Induktion. Da dies aber eine einmalige Ausnahme darstellt, liegt die Vermutung nahe, dass der Effekt durch den verhältnismäßig großen Standardfehler verursacht ist. Die Streuung der Werte ist durch die individuell unterschiedliche Expression bei den einzelnen Spendern zu erklären. Bislang ist nichts über den Einfluss der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten therapeutischen Antikörper auf die Expression von Checkpoints auf NK-Zellen publiziert. Xu et al. konnten jedoch zeigen, dass TIGIT auf aktivierten NK-Zellen durch den anti-Her2-Antikörper Trastuzumab hochreguliert wird.¹⁶⁶

Zusammenfassend lässt sich eine Induzierbarkeit von TIGIT auf NK-Zellen feststellen, die in unterschiedlichem Maße sowohl durch stimulierende Agentien als auch therapeutische Antikörper ausgelöst wird und war für uns neben der starken Expression auf NK-Zellen von Patienten und Gesunden ein weiterer Grund, diesen Checkpoint weiter zu untersuchen.

5.1.2.3. Einfluss therapeutischer Antikörper auf Zytokin-Sekretion von NK-Zellen

Die im vorangegangenen Abschnitt diskutierten Kokulturen wurden zusätzlich zur Analyse der Checkpoint-Expression auch bezüglich der Sekretion von IFN- γ durch NK-Zellen untersucht. In der Literatur ist eine Korrelation zwischen erhöhter IFN- γ -Sekretion und Aktivierung von NK-Zellen beschrieben. So konnten Ohs et al. zeigen, dass eine Stimulation mit IL-12 die IFN- γ -Produktion von aus Mäusen isolierten NK-Zellen erhöht und deren zytotoxische Funktionalität wiederherstellt.¹¹⁰ Wang et al. beschreiben eine inverse Korrelation zwischen der Intensität der TIGIT-Expression mit der IFN- γ -Sekretionskapazität von NK-Zellen. Diese Ergebnisse stützen damit die Annahme weiter, dass die Expression von TIGIT Einfluss auf die Funktionalität von NK-Zellen hat. Dabei wurden NK-Zellen, die auf gleiche Weise wie in vorliegender Arbeit gewonnen und isoliert wurden, für 24 Stunden mit IL-12 inkubiert und anschließend IFN- γ mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen, wobei sich ein starker Anstieg der IFN- γ -Konzentrationen zeigte. Dies war insbesondere bei TIGIT-negativen NK-Zellen der Fall, während TIGIT-positive NK-Zellen IFN- γ nur in geringem Maße sezernierten.¹⁶²

Unsere Ergebnisse zeigen überwiegend einen Anstieg der IFN- γ -Konzentration durch therapeutische Antikörper. Die gesteigerte Sekretion infolge von Stimulation mit therapeutischen Antikörpern steht damit in Korrelation zur Arbeit von Ohs et al.¹¹⁰ Bei den Kokulturen mit der AML-Zelllinie HL-60 konnten wir hingegen eine Abnahme der IFN- γ -Konzentration durch Zugabe des anti-CD33 Antikörpers beobachten. Dieses Ergebnis kann analog zur Arbeit von Wang et al. gesehen werden, da die Induktion der TIGIT-Expression durch Zugabe des therapeutischen Antikörpers mit einer verringerten IFN- γ -Sekretion einherging.¹⁶² Die bezüglich des Ausmaßes der Sekretion von IFN- γ schwankenden Ergebnisse unserer Arbeit im Vergleich zu den Ergebnissen von Wang et al. könnten darauf zurückzuführen sein, dass wir keine zusätzliche Stimulation der NK-Zellen vornahmen.

Somit ergibt sich der Widerspruch, dass eine Stimulation der NK-Zellen einerseits zur Hochregulation von TIGIT führt, was, wie beschrieben, meist mit einer geringeren IFN- γ -Sekretion einhergeht. Andererseits wird die Sekretionsfähigkeit aber durch Stimulation gesteigert. In Zusammenschau unserer und der zitierten Arbeiten lassen sich die Ergebnisse dahingehend interpretieren, dass der Einfluss einer Stimulation der NK-Zellen möglicherweise den Einfluss einer hohen TIGIT-Expression auf die Sekretion von IFN- γ überwiegt. Eine solche Stimulation kann unter anderem durch aktivierende Zytokine oder therapeutische Antikörper ausgelöst werden. Der Einsatz solcher Stimulantien ist demnach ein vielversprechender Ansatz, um die zytotoxische Wirkung von NK-Zellen zu verbessern und ist möglicherweise in der Lage, dem negativen Einfluss inhibitorischer Checkpoints auf die Funktionalität entgegenzuwirken.

5.1.3. Liganden und Zielantigene auf Tumorzellen

Die untersuchten Liganden für Immuncheckpoints und die Zielantigene für therapeutische Antikörper werden getrennt voneinander betrachtet, wobei keine strukturelle Trennung der beiden Krankheitsentitäten voneinander erfolgt.

5.1.3.1. PVR als geeigneter Ligand für die Checkpoint-Blockade

Die Rolle von SLAMF-7 als Ligand wurde in dieser Arbeit auf AML-Zellen von Patienten und STS-Zelllinien untersucht. Weder für AML noch für STS sind bislang Daten über diesen Liganden veröffentlicht. In unseren Versuchen fand sich eine allenfalls sehr schwach vorhandene Expression von SLAMF-7 auf AML-Zellen von Patienten. Auf STS-Zelllinien war SLAMF-7 gar nicht bzw. nur auf SW-872 schwach exprimiert. Da diese Ergebnisse den Schluss zulassen, dass dieser Ligand bei keiner der beiden Erkrankungen von großer Bedeutung ist, wurden weder er noch sein Eigenrezeptor SLAMF-7 auf NK-Zellen weiter untersucht.

PD-L1 wurde nur bei STS-Zelllinien in die Untersuchungen aufgenommen, nicht jedoch bei AML-Patienten und -Zelllinien. Dies liegt darin begründet, dass eine Expression von PD-L1 auf AML-Zellen zwar bereits gezeigt wurde,¹⁶⁷ diese jedoch zum Zeitpunkt der Diagnose nicht relevant ist, sondern erst durch stimulierende Antikörper hochreguliert und dann auch inhibitorisch für T-Zellen relevant wird.⁷⁷ Bei keiner der getesteten STS-Zelllinien konnten wir eine relevante Expression von PD-L1 feststellen. Dies steht im Gegensatz zu Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die bei STS PD-L1 auf Tumorzellen von Patienten nachweisen konnten.¹²⁴ Dies war jedoch in einer Arbeit von Que et al. lediglich bei elf Prozent der untersuchten STS-Patienten der Fall. Als positiv für PD-L1 wurden Tumoren gewertet, bei denen bei mindestens einem Prozent der Tumorzellen eine Expression mittels immunhistochemischer Methoden nachweisbar war. Für eine Positivität für PD-L1 zeigte sich eine Korrelation mit hohem Tumorgrad und Alter des Patienten. Subentitäten von STS unterschieden sich zwar bezüglich der Häufigkeit PD-L1-positiver Tumoren, aufgrund der geringen Anzahl untersuchter Patienten pro Subentität ist dies jedoch nicht aussagekräftig.¹²⁴ PD-L1 ist also zwar auf STS exprimiert, jedoch lediglich bei einem Bruchteil der Patienten. In Zusammenschau mit den von uns erhobenen Daten zur mangelnden Expression von PD-1 auf NK-Zellen beschlossen wir daher, die PD-1/PD-L1-Achse nicht in unsere Versuche zur Checkpoint-Blockade zu integrieren.

Die Expression des Liganden PVR wurde sowohl auf Tumorzellen von AML-Patienten als auch auf Zelllinien beider Krankheitsentitäten untersucht. Zur Rolle von PVR bei AML sind bislang keine Daten

publiziert. Wir konnten auf AML-Zellen von Patienten eine starke Expression von PVR nachweisen. Die Streuung der Expressionswerte könnte dadurch erklärt werden, dass Patienten mit unterschiedlichen Subtypen von AML untersucht wurden. Diese Erklärung liegt nahe, da die getesteten AML-Zelllinien sich ebenfalls stark bezüglich ihrer Expressionsniveaus unterschieden und die AML als sehr heterogene Erkrankung gilt. Daten zu dieser Vermutung liegen bislang nicht vor, für das für die AML charakteristischen Oberflächenmolekül CD33 konnten Krupka et al. jedoch eine solche Korrelation nachweisen, während keine Korrelation mit dem Alter der Patienten bestand.⁷⁶

Auf allen untersuchten STS-Zelllinien konnten wir eine starke Expression von PVR feststellen. Atsumi et al. zeigten eine erhöhte Expression von PVR bei STS, die einen unabhängigen, ungünstigen Risikofaktor für ein lokales Rezidiv des Tumors darstellt. Während die Expressionsstärke mit dem Alter des Patienten korreliert, lässt sich keine Korrelation zu Patienten- oder Tumorcharakteristika herstellen.⁵

5.1.3.2. Starke Expression der Zielantigene therapeutischer Antikörper auf eingesetzten Zelllinien

Die Untersuchung von Zelllinien auf Zielantigene erfolgte nur einmalig. Daher können keine verallgemeinernden Aussagen getroffen werden. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten können jedoch in Analogie zu Ergebnissen anderer Arbeiten gesehen werden.

Unsere Daten zeigen eine Expression des Zielantigens CD157 auf den AML-Zelllinien PL-21 und OCI-AML3. Dies korreliert mit Daten von Krupka et al., in deren Arbeit die Expression von CD157 sowohl auf AML-Zellen als auch AML-Zelllinien untersucht wurde. Analog zu unseren Ergebnissen zeigen auch sie eine Positivität der Zelllinie OCI-AML3 sowie eine starke Expression auf PL-21.⁷⁸

Zum Vergleich der Expression des Zielantigens für den anti-CD33 Antikörper kann die Arbeit von Krupka et al. zur Evaluation von CD33 als Zielantigen bei AML herangezogen werden. Darin wird die AML-Zelllinie OCI-AML3 aufgrund mangelnder Expression von CD33 als Negativkontrolle eingesetzt, während MV4-11 als Zelllinie mit stark ausgeprägter Expression charakterisiert wurde.⁷⁶ Die gleiche Tendenz findet sich in unseren Daten.

Die Expression von GD2 ist vielen STS gemein, hängt jedoch stark vom histologischen Subtyp ab.²⁷ Die starke Expression auf der Ewing-Sarkom-Zelllinie TC-71 in unserer Untersuchung wurde bereits von Kailayangiri et al. beschrieben.⁶⁴ Über die Expression auf den anderen beiden getesteten Zelllinien SW-872 und SK-UT-1 liegt keine Literatur vor. Auf SK-UT-1 konnten wir keinerlei Expression des Zielantigens nachweisen. SW-872 exprimierte GD2 nur in geringem Maße, was sich dadurch erklären

lässt, dass diese Zelllinie sowohl eine GD2-positive als auch eine -negative Zellpopulation beinhaltet. Durchschnittlich ist das Expressionsniveau daher niedrig.

Die erhobenen Daten dienten zur Auswahl passender Zelllinien für den Einsatz therapeutischer Antikörper. Gewählt wurde demzufolge jeweils die Zelllinie mit starker Expression des entsprechenden Zielantigens. Somit eignen sich die jeweils gewählten Zelllinien gut zur Prüfung des Effekts therapeutischer Antikörper, der in weiteren Versuchen durch eine Checkpoint-Inhibition verstärkt werden sollte.

5.1.3.3. Methodische Aspekte bei der Untersuchung der Liganden-Expression

Da Daten zur Beeinflussung der Liganden-Expression durch Passagierung von adhärennten Zelllinien mit Trypsin existieren,¹⁵⁷ führten wir die Untersuchungen der STS-Zelllinien parallel mit Trypsin und Accutase durch. Unsere Daten zeigen keinerlei Unterschied bezüglich der Expressionsstärke von Liganden zwischen den beiden Vorgehensweisen. Zum Vergleich kann die Arbeit von Tsuji et al. herangezogen werden. Diese untersuchten ebenfalls das Expressionsprofil von Oberflächenmolekülen auf adhärennten Zellen nach Behandlung mit Trypsin. Dazu inkubierten sie die Zellen, obwohl auch sie bereits nach fünf Minuten eine ausreichende Loslösung erzielten, für dreißig Minuten. Zu diesem Zeitpunkt beobachteten sie eine signifikante Verringerung der Expression von Oberflächenantigenen.¹⁵⁷ Dies kann als Erklärung für den Unterschied zu unseren Ergebnissen gelten.

Zusammenfassend lässt sich aus unseren Ergebnissen kein Vorteil von Trypsin oder Accutase bezüglich des Expressionsprofils von Oberflächenmolekülen feststellen. Aufgrund der untergeordneten Bedeutung von SLAMF-7 bei den untersuchten Erkrankungen wurde dieser Ligand nicht weiter untersucht, ebenso wie PD-L1, dessen Rolle für AML und STS nicht eindeutig ist. Infolgedessen und insbesondere wegen seiner starken Expression wurde für alle weiteren Versuche der Ligand PVR ausgewählt.

5.1.4. TIGIT und PVR als geeignete Zielstrukturen für eine Checkpoint-Blockade

In Zusammenschau aller vorgestellten Ergebnisse wurden der inhibitorische Checkpoint TIGIT sowie sein Ligand PVR für die nachfolgenden Versuche zur Checkpoint-Blockade ausgewählt. TIGIT stellt als auf NK-Zellen von sowohl AML- und STS-Patienten als auch von Gesunden stark exprimierter Checkpoint ein geeignetes Ziel dar. Die verstärkte Expression auf der zytotoxischen CD56^{dim}CD16^{bright}

NK-Zell-Subpopulation verdeutlicht die physiologische Funktion dieses inhibitorischen Checkpoints in der Regulation der Immunantwort. Der zu TIGIT korrespondierende Ligand PVR ist aufgrund seiner starken Expression sowohl auf primären Zellen von AML-Patienten als auch auf der Mehrzahl der getesteten AML- und allen STS-Zelllinien ebenfalls gut geeignet für eine Blockade.

5.2. Immuncheckpoint-Blockade in Kombination mit therapeutischen Antikörpern

Die Blockade einzelner Immuncheckpoints bzw. derer Liganden wird bereits wirksam zur Steigerung der Lyse von Zielzellen eingesetzt. Als Beispiel ist vor allem die Blockade der PD-1/PD-L1-Achse anzuführen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Blockade von TIGIT auf NK-Zellen, dem Liganden PVR auf Zielzellen und der Kombination aus beiden evaluiert.

5.2.1. Beeinflussung der zytotoxischen Wirkung von NK-Zellen durch therapeutische Antikörper oder Checkpoint-Blockade

Die beiden im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Konzepte, der Einsatz therapeutischer Antikörper und die Blockade von Immuncheckpoints, wurden einzeln und in Kombination auf ihren Einfluss auf die NK-Zell-vermittelte Lyse getestet.

Unabhängig von den untersuchten Krankheitsentitäten und eingesetzten Antikörpern fielen in allen Versuchsreihen teilweise große Unterschiede der spezifischen Lyse zwischen den einzelnen gesunden Spendern auf. Auch in Versuchen, bei denen NK-Zellen des gleichen Spenders, jedoch aus Blutabnahmen an verschiedenen Tagen, eingesetzt wurden, zeigten sich Unterschiede, wenn auch in geringerem Maße. Bei über alle Versuche konstanter Anzahl der eingesetzten Effektorzellen und identischem Isolationsverfahren ist dies Ausdruck sowohl der individuellen NK-Zell-Aktivität als auch einer Schwankung bei ein und demselben Spender. Letzteres könnten leichte Infekte zum Zeitpunkt der Blutabnahme erklären. Wenngleich allen Spendern nur in subjektiv gesundem Zustand Blut entnommen wurde, könnte ein subakut verlaufender Infekt neben der Induktion einer gesteigerten Proliferation auch Einfluss auf funktionelle Eigenschaften der NK-Zellen haben.¹⁷³ Die unterschiedliche Aktivität bei verschiedenen Spendern lässt sich nicht durch Faktoren wie Alter begründen, da alle gesunden Spender zwischen 20 und 30 Jahre alt waren. Eine Rolle spielen könnten dagegen das Geschlecht und der allgemeine Gesundheitszustand der Spender. Dies könnte als Anreiz dienen, die Probandengruppe in weiterführenden Versuchen nach dementsprechenden Kriterien auszuwählen, um signifikantere Ergebnisse zu erzielen.

5.2.1.1. Therapeutische Antikörper steigern die lytische Aktivität von NK-Zellen

Zu Beginn der Versuche zur Steigerung der NK-Zell-Zytotoxizität sollte festgestellt werden, ob die verwendeten therapeutischen Antikörper, ohne zusätzliche Checkpoint-Blockade, die lytische Kapazität verbessern können.

Alle eingesetzten therapeutischen Antikörper induzierten einen starken Anstieg in der spezifischen Lyse der Zielzellen. Bei der E:T Ratio 50:1 war ein Anstieg der Lyseraten auf das zwei- bis sechsfache zu beobachten. Während bislang keine Ergebnisse über den Einfluss des von uns verwendeten anti-CD33 Antikörpers auf die NK-Zell-vermittelte Lyse veröffentlicht sind, wurde der Einfluss des anti-CD157 Antikörpers auf NK-Zellen bereits von Krupka et al. untersucht. Mittels der gleichen Methode konnten auch sie einen starken Effekt des Antikörpers auf die Lyse der, ebenfalls von uns verwendeten, AML-Zelllinie OCI-AML3 nachweisen.⁷⁸

Der eingesetzte anti-GD2-Antikörper findet unter dem Namen Dinotuximab bereits erfolgreich Verwendung bei der Behandlung pädiatrischer Neuroblastome.¹¹ Bei allen Versuchen mit Zugabe des Antikörpers nahm die Lyse mit sinkender Anzahl der eingesetzten Effektorzellen stetig ab, nicht jedoch bei den Kontrollen (s. Abbildung 4-16). Während die Lyse in den Versuchen mit STS-Zelllinien und anti-GD2 Antikörper auch in den Kontrollen eine gewisse Dynamik bei den verschiedenen E:T Ratios zeigte, war dies bei den Versuchen mit AML-Zelllinien und anti-CD157- bzw. anti-CD33-Antikörper nicht der Fall. Letzteres deutet darauf hin, dass die Wirkung des Antikörpers von der Anzahl der Effektorzellen abhängig ist. Eine mögliche Erklärung ist, dass die NK-Zell-Aktivierung mittels des an CD16 bindenden Antikörpers durch das mit einer höheren Zahl an NK-Zellen einhergehende größere Angebot an CD16 auf der Zelloberfläche vereinfacht wird. Möglich wäre auch, dass die Lyse ohne Zugabe des Antikörpers zu gering war, um valide Messergebnisse zu erzielen.

Obwohl alle drei getesteten Antikörper eine Verbesserung der NK-Zell-vermittelten Lyse induzierten, wurden lediglich der anti-GD2- sowie der anti-CD33 Antikörper für die weiteren Versuche eingesetzt, da der anti-CD157 Antikörper im Verlauf des Projekts nicht weiter verfügbar war.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der Einsatz therapeutischer Antikörper die lytische Aktivität von NK-Zellen positiv beeinflusst, wobei dieser Effekt dosisabhängig zu sein scheint.

5.2.1.2. Immuncheckpoint-Blockade hat keinen signifikanten Einfluss auf die lytische Aktivität von NK-Zellen

Die Evaluation der Blockade von PVR, TIGIT und der Kombination aus beiden erfolgte anhand unbehandelter und vorstimulierter NK-Zellen gesunder Spender sowie von Patienten-NK-Zellen.

In Zusammenschau aller Versuche zeigte sich kein Effekt der Checkpoint-Blockade. Die Applikation lediglich blockierender Antikörper wies vergleichbar hohe Lyseraten auf wie die Kontrollen ohne jegliche Zugabe von Antikörpern. Auch die Kombination aus therapeutischen und blockierenden Antikörpern zeigte keinen Vorteil gegenüber der alleinigen Gabe von therapeutischen Antikörpern. Die Vorstimulation der NK-Zellen mit IL-2 beeinflusste zwar die Lyseraten insgesamt positiv, führte jedoch ebenfalls nicht zu einem Effekt der Checkpoint-Blockade. Eine Abhängigkeit des Effekts blockierender Antikörper von ihrer Konzentration konnten wir durch parallele Testung der zehnfachen Konzentration des anti-PVR Antikörpers ebenfalls ausschließen.

Zur Blockade von PVR war zum Zeitpunkt unserer Versuche nichts publiziert. Mittlerweile konnten Stamm et al. jedoch eine Verbesserung der lytischen Kapazität von CIK gegenüber Mammakarzinom-Zelllinien durch Blockade von PVR zeigen. Methodisch unterschied sich der von dieser Gruppe verwendete Ansatz deutlich von unserem, insbesondere, da anstelle unbehandelter bzw. mit IL-2 einfach vorstimulierter NK-Zellen hier CIK eingesetzt wurden und Target- und Effektorzellen für eine Dauer von 24 Stunden mit dem blockierendem Antikörper koinkubiert wurden. Der Effekt der Checkpoint-Blockade wurde mittels Durchflusszytometrie evaluiert.¹⁴⁶ Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Blockade von PVR ein Ansatzpunkt in der Therapie maligner Erkrankungen sein könnte, lassen jedoch keine Rückschlüsse über die Effektivität bei NK-Zellen zu.

Die Blockade von TIGIT auf NK-Zellen wurde bereits von Xu et al. getestet, die in ihrer Arbeit zeigen konnten, dass der ebenfalls von uns verwendete anti-TIGIT Antikörper die ADCC-vermittelte antineoplastische Aktivität von NK-Zellen verstärken kann. Als therapeutischer Antikörper zur Auslösung der ADCC wurde in dieser Arbeit Trastuzumab eingesetzt und zur Quantifizierung der zytotoxischen Wirkung der NK-Zellen CD107a-Degranulations-Versuche durchgeführt. NK- und Tumorzellen wurden 16 Stunden mit Trastuzumab und anti-TIGIT Antikörper koinkubiert.¹⁶⁶ Aufgrund dieser methodischen Unterschiede können die Ergebnisse von Xu et al. nicht direkt mit den von uns in ⁵¹Chrom-Freisetzung-Versuchen erhobenen Daten verglichen werden. Auch Zhang et al. konnten eine Verbesserung der zytotoxischen Wirkung von NK-Zellen durch TIGIT-Blockade am Beispiel von Kolonkarzinomen im Mausmodell feststellen. Zur Anwendung kam ein anderer blockierender Antikörper als in unserer Versuchsreihe. Als Marker der Wirksamkeit des Antikörpers wurden die

Expressionslevel von CD107a, IFN- γ und TNF gemessen sowie zusätzlich in vivo die Größe pulmonaler Metastasen bestimmt.¹⁷²

Die Diskrepanz der Ergebnisse weist darauf hin, dass sich ein möglicher Effekt der Checkpoint-Blockade eventuell nur in Abhängigkeit von der angewandten Nachweismethode zeigt. Insbesondere die längere Inkubationszeit im Vergleich zu den bei uns angewendeten vier Stunden beeinflusst möglicherweise die Wirksamkeit der Checkpoint-Blockade. Zudem bildet der CD107a-Degranulations-Versuch die zytotoxische Kapazität von NK-Zellen ab, ohne die tatsächlich stattgefunden Lyse von Zielzellen zu berücksichtigen. Im von uns verwendeten ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Versuch hingegen wird nur letztere analysiert. Es ist daher denkbar, dass NK-Zellen zwar im Degranulations-Versuch positiv sind, in der kürzeren Zeit des ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Versuchs jedoch keine Lyse von Zielzellen induzieren können. Da eine Stimulation ebenfalls erst nach ausreichender Inkubationszeit zu einer signifikanten Hochregulation von Checkpoints führt, kann eine längere Inkubation mit therapeutischem Antikörper zudem zur verstärkten Expression von TIGIT und somit möglicherweise zur besseren Wirksamkeit des anti-TIGIT Antikörpers führen.

Auch zur Kombination der von uns verwendeten therapeutischen Antikörper mit der Blockade von TIGIT oder PVR existiert bislang keine Literatur. Die Arbeit von Siebert et al. beschreibt jedoch die Kombination des anti-GD2 Antikörpers mit Nivolumab. Durch den therapeutischen Antikörper kam es zu einer starken Hochregulation von PD-L1 auf der Neuroblastom-Zelllinie LAN-1. Diese führte zu einer Aufhebung der durch den Antikörper vermittelten ADCC. Das gegen die PD-1/PD-L1-Achse gerichtete Nivolumab konnte diese Einschränkung rückgängig machen. Im Mausmodell resultierte die Kombination aus therapeutischem und blockierendem Antikörper in längerer Überlebenszeit, höchstmöglicher Zytotoxizität gegen die Zielzellen und Rückgang des Tumorwachstums. Die Autoren interpretierten diese Ergebnisse dahingehend, dass die Blockade von Checkpoints und der Einsatz therapeutischer Antikörper synergistisch wirken.¹⁴⁰ Neben der Tatsache, dass ein anderes Checkpoint-Liganden-System als bei uns blockiert wurde, unterscheidet sich die Arbeit von Siebert et al. auch bezüglich der eingesetzten Effektorzellen. Statt isolierter NK-Zellen wurden Leukozyten ohne Differenzierung in die unterschiedlichen Zellarten untersucht. Der direkte Einfluss einer Kombination der beiden therapeutischen Konzepte auf NK-Zellen lässt sich aus dieser Arbeit daher nicht rekonstruieren.

Auf Basis der Datenlage und unseren Ergebnissen lässt sich demnach bislang keine eindeutige Aussage zur Effektivität einer Kombinationstherapie aus therapeutischen und blockierenden Antikörpern bei NK-Zellen treffen.

5.2.2. Methoden zur Quantifizierung der zytotoxischen Wirkung von NK-Zellen

Zur Beurteilung der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen führten wir ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Versuche durch. Diese Methode stellt den Goldstandard für die Beurteilung der Zytotoxizität von NK-Zellen dar. Dies begründet sich in ihrer hohen Sensibilität im Vergleich zu anderen Methoden, bei denen z.B. beim Zelltod freigesetzte Enzyme quantifiziert werden ⁴⁵. Solche Methoden sind nicht in der Lage, Ziel- und Effektorzellen voneinander zu unterscheiden. Seine hohe Sensibilität verdankt der ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Versuch dem Vergleich zwischen der Lyse durch Effektorzellen und der Hintergrundlyse. Dennoch gibt es Limitationen der Methode. Neben dem potentiell gesundheitsschädlichen Einsatz eines radioaktiven Isotops zählt dazu die kurze Inkubationszeit von vier Stunden. Somit kann die Zytotoxizität lediglich nach einem kurzen Zeitraum beurteilt werden, längerfristige Effekte können nicht erfasst werden. Zudem ist eine hohe Variabilität zwischen zwei Versuchen beschrieben.⁷⁰ Trotz dieser überschaubaren Nachteile nutzten wir die ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Versuche als aussagekräftige und etablierte Methode für den Großteil der durchgeführten Versuche.

Neben dieser hauptsächlich verwendeten Methode wurden Kokulturen hinsichtlich der NK-Zell-induzierten Lyse von Zielzellen untersucht. Gegenüber dem ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Versuch wiesen diese Methode den Vorteil einer mit 48 Stunden wesentlich längeren Inkubationszeit auf. Allerdings war die Abgrenzung der beiden Zellpopulationen in der Durchflusszytometrie in vielen Fällen nicht eindeutig möglich. Vor allem bei Kokulturen mit therapeutischem Antikörper war das der Fall. Die durch den Antikörper ausgelöste Aktivierung von NK-Zellen führte zu einer Herunterregulation von CD16.¹² Dieses Oberflächenmolekül wird jedoch zur Abgrenzung der NK-Zell-Population in der Auswertung benötigt. Die alleinige Interpretation der zur Identifizierung der Zielzellen angefärbten Zielantigene CD33 für AML- bzw. GD2 für STS-Zellen war nicht ausreichend, um eine Trennung der Populationen zu gewährleisten. Aus diesen Gründen war die Auswertung stark eingeschränkt und es werden im Folgenden vor allem die Ergebnisse der vorwiegend durchgeführten ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Versuche diskutiert.

5.2.3. Implikationen für den Einsatz von Immuncheckpoint-Blockade bei NK-Zellen

In Zusammenschau aller von uns erarbeiteten Ergebnisse zeigt sich keine Verbesserung der NK-Zell-vermittelten Lyse durch Blockade des Immuncheckpoints TIGIT auf NK-Zellen oder seines Liganden PVR auf AML- und STS-Zelllinien. Dies ist gleichermaßen bei NK-Zellen von gesunden Spendern und STS-Patienten der Fall. Weder Stimulation der Effektorzellen mit IL-2 noch Konzentrationserhöhung des anti-PVR Antikörpers beeinflussen die Effektivität der Blockade.

Möglicher Grund für den ausbleibenden Effekt der Checkpoint-blockierenden Antikörper in unseren Versuchen ist zum einen die angewandte Methode, die möglicherweise Effekte aufgrund ihrer kurzen Inkubationszeit nicht abbilden konnte. Eine andere Ursache könnten Beeinträchtigungen in der Funktionalität der verwendeten blockierenden Antikörper sein. Da jedoch zumindest für den anti-TIGIT-Antikörper bereits Daten zu seiner Fähigkeit, die Zytotoxizität von NK-Zellen zu steigern, publiziert sind, ist diese Möglichkeit eher zu vernachlässigen. Des Weiteren könnten inhibitorische Signale stärker auf die NK-Zelle einwirken als aktivierende. Da die Aktivierung von NK-Zellen erst durch eine Dominanz aktivierender über hemmende Einflüsse zustande kommt, kann ein stark inhibitorisches Signal möglicherweise die Wirkung der Checkpoint-Blockade zunichtemachen. Quelle solcher hemmenden Signale könnte eine starke Expression von MHC-I auf Zielzellen sein. Eine Dominanz inhibitorischer über durch Rezeptor-Liganden-Interaktion ausgelöste aktivierende Signale ist beschrieben.⁸⁹ Die Tatsache, dass die Expression von MHC-I auf der von uns für die Versuche zur Checkpoint-Blockade verwendeten AML-Zelllinie MV4-11 nachgewiesen wurde, stützt diese Theorie.⁷ Auch auf den eingesetzten STS-Zelllinien wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits die Expression von MHC-I bestätigt.

Auf Basis unserer Ergebnisse können wir demnach keinen signifikanten positiven Einfluss von Checkpoint-inhibierenden Antikörpern auf die zytotoxische Wirksamkeit von NK-Zellen nachweisen. Weitere Versuche sollten die Ursachen für den ausbleibenden Effekt klären, um in der Folge therapeutische Konzepte für die Umgehung oder Elimination möglicher hemmender Einflüsse zu entwickeln.

5.3. Ausblick

Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Arbeit sollten für ein besseres Verständnis und eine konkrete klinische Anwendung von Immuncheckpoint-Blockade auf NK-Zellen bei AML und STS in weiterführenden Arbeiten die im Folgenden umrissenen Aspekte näher experimentell untersucht und analysiert werden.

Um auszuschließen, dass ein Effekt der Checkpoint-Blockade nur in Abhängigkeit von der angewandten Methode erkennbar ist, wäre es wünschenswert, dies mittels unterschiedlicher Methoden zu evaluieren. Die Wahl eines längeren Versuchszeitraums sowie die zusätzliche Betrachtung sowohl der Lyse von Zielzellen als auch der Aktivierung von Effektorzellen würden mögliche Effekte besser sichtbar machen. So könnte beispielsweise ein xCELLigence® Assay die Lyse von Zielzellen über einen längeren

Zeitraum dynamisch abbilden. STS-Zelllinien wären gut für diesen Versuch geeignet, da dieser nur mit adhärennten Zellen durchgeführt werden kann.

Durch eine parallele Durchführung der Checkpoint-Blockade mit NK- und T-Zellen könnte beurteilt werden, ob das Ausbleiben eines Effekts der Checkpoint-Blockade auf den jeweiligen blockierenden Antikörper oder die als Effektoren verwendeten NK-Zellen zurückzuführen ist. Um eine Dominanz inhibitorischer Signale als mögliche Ursache für die ausbleibende Wirkung der Checkpoint-Blockade zu eliminieren, könnte eine Blockade von MHC-I auf Zielzellen erfolgen.

Darüber hinaus ist es wünschenswert, weitere Checkpoint-Liganden-Systeme, die für AML und STS relevant sind, zu identifizieren. Der von uns im Rahmen dieser Arbeit bereits bezüglich seiner Expression charakterisierte Checkpoint CD96 sollte eingehender untersucht werden. Einerseits sollte sein Einfluss auf die zytotoxische Wirkung von NK-Zellen evaluiert werden, andererseits die Wechselwirkungen mit den ebenfalls an PVR bindenden Checkpoints TIGIT und DNAM-1. Letzterer stellt möglicherweise ebenfalls einen interessanten Ansatzpunkt für eine immuntherapeutische Intervention dar. Im Gegensatz zu TIGIT und CD96 handelt es sich hierbei um einen kostimulatorisches Adhäsionsmolekül.¹³⁸ Die gleichzeitige Adressierung eines inhibitorischen Checkpoints wie TIGIT oder CD96 durch Blockade und eines aktivierenden wie DNAM-1 durch Stimulation könnte eine Verbesserung der zytotoxischen Wirkung induzieren.

6. Zusammenfassung

Immuntherapeutische Konzepte stellen eine vielversprechende Möglichkeit dar, die Prognose von Patienten mit AML und STS signifikant zu verbessern.

In unserer Arbeit untersuchten wir das Expressionsprofil von Immuncheckpoints auf NK-Zellen bzw. Liganden auf der Oberfläche maligner Zellen und evaluierten die Kombination aus therapeutischen Antikörpern und der Blockade von Immuncheckpoints. Tumorspezifische therapeutische Antikörper unterstützen das Immunsystem bei der Erkennung und Elimination von Tumorzellen mittels Induktion von ADCC. Die physiologische Funktion inhibitorischer Immuncheckpoints besteht in der Prävention überschießender Immunantworten. Ihre Blockade durch Antikörper kann die zytotoxische Aktivität von Immunzellen verbessern. In dieser Arbeit testeten wir diese beiden Konzepte an NK-Zellen. Diese sind trotz ihrer geringen Anzahl im peripheren Blut wichtige Akteure im Immunsystem, da sie Zielzellen schnell und unabhängig von vorheriger Erkennung von Antigenen durch einen T-Zell-Rezeptor eliminieren können.

Wir konnten zeigen, dass der inhibitorische Checkpoint TIGIT auf NK-Zellen von gesunden Spendern und Patienten mit AML und STS vergleichbar stark exprimiert wird. Der zu TIGIT korrespondierende Ligand PVR war auf primären AML-Zellen von Patienten sowie auf AML- und STS-Zelllinien stark exprimiert. PD-1 und sein Ligand PD-L1 waren nicht oder nur sehr schwach auf NK-Zellen bzw. AML-Zellen oder STS-Zelllinien nachweisbar.

Eine Stimulation mit PHA, R848 oder einer Kombination aus IL-2 und IL-15 führte zur verstärkten Expression von TIGIT, nicht aber von PD-1, auf NK-Zellen gesunder Spender. Der Einsatz therapeutischer Antikörper gegen CD157, CD33 oder GD2 auf Tumorzellen in Kokultur mit NK-Zellen löste ebenfalls eine Hochregulation von TIGIT aus. Dies war nur bei der zytotoxisch wirksamen CD56^{dim}CD16^{bright}-Subpopulation der Fall, während die CD56^{bright}CD16^{dim}-Population kein TIGIT auf ihrer Oberfläche aufwies. Zudem induzierten die eingesetzten therapeutischen Antikörper eine verstärkte Sekretion von IFN- γ durch NK-Zellen.

Aufbauend auf den Ergebnissen zu Expression und Induzierbarkeit wurden TIGIT und PVR als Ziele für eine Checkpoint-Blockade ausgewählt. Der Einsatz therapeutischer Antikörper löste eine Steigerung der Zytotoxizität von NK-Zellen aus. Die Blockade von TIGIT, PVR bzw. der Kombination aus beiden erhöhte die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen hingegen weder bei alleiniger Gabe, noch kombiniert mit therapeutischen Antikörpern. Auch nach Vorstimulation der NK-Zellen mit IL-2 vor Durchführung der eigentlichen Blockade-Versuche zeigte sich kein Effekt der Checkpoint-Blockade.

Da sich in unserer Arbeit keine Wirkung der Blockade von TIGIT oder PVR auf die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen zeigte, ist eine Evaluation der Checkpoint-Blockade mittels anderer Methoden wünschenswert. Unter Berücksichtigung möglicherweise limitierender Faktoren wie einer inhibierenden MHC-I-Expression auf Zielzellen kann Klarheit darüber geschaffen werden, ob eine Checkpoint-Blockade dennoch erfolgreich bei NK-Zellen angewandt werden kann.

7. Literaturverzeichnis

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-2405. *Blood*. 2016;128(3):462–463. eng. doi:10.1182/blood-2016-06-721662.
2. Soft tissue and visceral sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2014;25 Suppl 3:iii102-12. eng. doi:10.1093/annonc/mdu254.
3. Ahmadzadeh M, Johnson LA, Heemskerk B, Wunderlich JR, Dudley ME, White DE, Rosenberg SA. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood*. 2009;114(8):1537–1544. eng. doi:10.1182/blood-2008-12-195792.
4. Alari-Pahissa E, Grandclément C, Jeevan-Raj B, Leclercq G, Veillette A, Held W. Activation by SLAM Family Receptors Contributes to NK Cell Mediated "Missing-Self" Recognition. *PLoS ONE*. 2016;11(4):e0153236. eng. doi:10.1371/journal.pone.0153236.
5. Atsumi S, Matsumine A, Toyoda H, Niimi R, Iino T, Sudo A. Prognostic significance of CD155 mRNA expression in soft tissue sarcomas. *Oncol Lett*. 2013;5(6):1771–1776. eng. doi:10.3892/ol.2013.1280.
6. Baessler T, Charton JE, Schmiedel BJ, Grünebach F, Krusch M, Wacker A, Rammensee H-G, Salih HR. CD137 ligand mediates opposite effects in human and mouse NK cells and impairs NK-cell reactivity against human acute myeloid leukemia cells. *Blood*. 2010;115(15):3058–3069. eng. doi:10.1182/blood-2009-06-227934.
7. Baessler T, Krusch M, Schmiedel BJ, Kloss M, Baltz KM, Wacker A, Schmetzer HM, Salih HR. Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related protein ligand subverts immunosurveillance of acute myeloid leukemia in humans. *Cancer Res*. 2009;69(3):1037–1045. eng. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2650.
8. Baeuerle PA, Reinhardt C. Bispecific T-cell engaging antibodies for cancer therapy. *Cancer Res*. 2009;69(12):4941–4944. eng. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-0547.
9. Balasa B, Yun R, Belmar NA, Fox M, Chao DT, Robbins MD, Starling GC, Rice AG. Elotuzumab enhances natural killer cell activation and myeloma cell killing through interleukin-2 and TNF- α pathways. *Cancer Immunol Immunother*. 2015;64(1):61–73. eng. doi:10.1007/s00262-014-1610-3.
10. Barlozzari T, Reynolds CW, Herberman RB. In vivo role of natural killer cells: involvement of large granular lymphocytes in the clearance of tumor cells in anti-asialo GM1-treated rats. *J Immunol*. 1983;131(2):1024–1027. eng.
11. Bartholomew J, Washington T, Bergeron S, Nielson D, Saggio J, Quirk L. Dinutuximab: A Novel Immunotherapy in the Treatment of Pediatric Patients With High-Risk Neuroblastoma Formula: see text. *J Pediatr Oncol Nurs*. 2017;34(1):5–12. eng. doi:10.1177/1043454216659448.

12. Battella S, Cox MC, Santoni A, Palmieri G. Natural killer (NK) cells and anti-tumor therapeutic mAb: unexplored interactions. *J Leukoc Biol.* 2016;99(1):87–96. eng. doi:10.1189/jlb.5VMR0415-141R.
13. Beldi-Ferchiou A, Lambert M, Dogniaux S, Vély F, Vivier E, Olive D, Dupuy S, Levasseur F, Zucman D, Lebbé C, et al. PD-1 mediates functional exhaustion of activated NK cells in patients with Kaposi sarcoma. *Oncotarget.* 2016;7(45):72961–72977. eng. doi:10.18632/oncotarget.12150.
14. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med.* 1985;103(4):620–625. eng. doi:10.7326/0003-4819-103-4-620.
15. Benson DM, Bakan CE, Mishra A, Hofmeister CC, Efebera Y, Becknell B, Baiocchi RA, Zhang J, Yu J, Smith MK, et al. The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody. *Blood.* 2010;116(13):2286–2294. eng. doi:10.1182/blood-2010-02-271874.
16. Berwick M, Song Y, Jordan R, Brady MS, Orlov I. Mutagen sensitivity as an indicator of soft tissue sarcoma risk. *Environ Mol Mutagen.* 2001;38(2-3):223–226. eng. doi:10.1002/em.1075.
17. Blake SJ, Dougall WC, Miles JJ, Teng MWL, Smyth MJ. Molecular Pathways: Targeting CD96 and TIGIT for Cancer Immunotherapy. *Clin Cancer Res.* 2016;22(21):5183–5188. eng. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-0933.
18. Blake SJ, Stannard K, Liu J, Allen S, Yong MCR, Mittal D, Aguilera AR, Miles JJ, Lutzky VP, Andrade LF de, et al. Suppression of Metastases Using a New Lymphocyte Checkpoint Target for Cancer Immunotherapy. *Cancer Discov.* 2016;6(4):446–459. eng. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0944.
19. Boles KS, Vermi W, Facchetti F, Fuchs A, Wilson TJ, Diacovo TG, Cella M, Colonna M. A novel molecular interaction for the adhesion of follicular CD4 T cells to follicular DC. *Eur J Immunol.* 2009;39(3):695–703. eng. doi:10.1002/eji.200839116.
20. Bristol-Myers Squibb Pharma EEIG, Dublin, Irland. OPDIVO (Nivolumab), Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung. <https://fi.b-ms.de/Opdivo>. [accessed 2020 May 10].
21. Brody R, Zhang Y, Ballas M, Siddiqui MK, Gupta P, Barker C, Midha A, Walker J. PD-L1 expression in advanced NSCLC: Insights into risk stratification and treatment selection from a systematic literature review. *Lung Cancer.* 2017;112:200–215. eng. doi:10.1016/j.lungcan.2017.08.005.
22. Bücklein V, Adunka T, Mandler AN, Issels R, Subklewe M, Schmollinger JC, Noessner E. Progressive natural killer cell dysfunction associated with alterations in subset proportions and receptor expression in soft-tissue sarcoma patients. *Oncoimmunology.* 2016;5(7):e1178421. eng. doi:10.1080/2162402X.2016.1178421.
23. Bücklein V., Jorg T., Pass D., Krupka C., Schlegel P., Lang P., Hoffmeister sen. H., Lindner L., Hiddemann W., Subklewe M. Immunotherapeutic strategies for soft-tissue sarcoma: Preclinical results of Natural Killer cell augmentation by ex vivo expansion and use of an anti-GD2 antibody. ORT [P493, Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften

für Hämatologie und Medizinische Onkologie Basel, 9.-13. Oktober 2015: Abstracts]. 2015;38(Suppl. 5):149–150. german. <https://www.karger.com/Article/Pdf/439070>. doi:10.1159/000439070.

24. Cannons JL, Tangye SG, Schwartzberg PL. SLAM family receptors and SAP adaptors in immunity. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:665–705. eng. doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101302.
25. Castriconi R, Dondero A, Corrias MV, Lanino E, Pende D, Moretta L, Bottino C, Moretta A. Natural killer cell-mediated killing of freshly isolated neuroblastoma cells: critical role of DNAX accessory molecule-1-poliovirus receptor interaction. *Cancer Res.* 2004;64(24):9180–9184. eng. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2682.
26. Chan CJ, Smyth MJ, Martinet L. Molecular mechanisms of natural killer cell activation in response to cellular stress. *Cell Death Differ.* 2014;21(1):5–14. eng. doi:10.1038/cdd.2013.26.
27. Chang HR, Cordon-Cardo C, Houghton AN, Cheung N-KV, Brennan MF. Expression of disialogangliosides GD2 and GD3 on human soft tissue sarcomas. *Cancer.* 1992;70(3):633–638. doi:10.1002/1097-0142(19920801)70:3<633:AID-CNCR2820700315>3.0.CO;2-F.
28. Chapman PB, Morrissey D, Panageas KS, Williams L, Lewis JJ, Israel RJ, Hamilton WB, Livingston PO. Vaccination with a bivalent G(M2) and G(D2) ganglioside conjugate vaccine: a trial comparing doses of G(D2)-keyhole limpet hemocyanin. *Clin Cancer Res.* 2000;6(12):4658–4662. eng.
29. Cheng M, Chen Y, Xiao W, Sun R, Tian Z. NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cell Mol Immunol.* 2013;10(3):230–252. eng. doi:10.1038/cmi.2013.10.
30. Cheresch DA, Pierschbacher MD, Herzig MA, Mujoo K. Disialogangliosides GD2 and GD3 are involved in the attachment of human melanoma and neuroblastoma cells to extracellular matrix proteins. *J Cell Biol.* 1986;102(3):688–696. eng. doi:10.1083/jcb.102.3.688.
31. Chester C, Sanmamed MF, Wang J, Melero I. Immunotherapy targeting 4-1BB: mechanistic rationale, clinical results, and future strategies. *Blood.* 2018;131(1):49–57. eng. doi:10.1182/blood-2017-06-741041.
32. Coindre J-M. Grading of soft tissue sarcomas: review and update. *Arch Pathol Lab Med.* 2006;130(10):1448–1453. eng. doi:10.1043/1543-2165(2006)130[1448:GOSTSR]2.0.CO;2.
33. Costello RT, Sivori S, Marcenaro E, Lafage-Pochitaloff M, Mozziconacci M-J, Reviron D, Gastaut J-A, Pende D, Olive D, Moretta A. Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2002;99(10):3661–3667. eng. doi:10.1182/blood.v99.10.3661.
34. Couzin-Frankel J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science.* 2013;342(6165):1432–1433. eng. doi:10.1126/science.342.6165.1432.
35. Crocker PR, Paulson JC, Varki A. Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(4):255–266. eng. doi:10.1038/nri2056.

36. Cruz-Munoz M-E, Dong Z, Shi X, Zhang S, Veillette A. Influence of CRACC, a SLAM family receptor coupled to the adaptor EAT-2, on natural killer cell function. *Nat Immunol.* 2009;10(3):297–305. eng. doi:10.1038/ni.1693.
37. Dai H-S, Caligiuri MA. Molecular Basis for the Recognition of Herpes Simplex Virus Type 1 Infection by Human Natural Killer Cells. *Front Immunol.* 2018;9:183. eng. doi:10.3389/fimmu.2018.00183.
38. Dai H-S, Griffin N, Bolyard C, Mao HC, Zhang J, Cripe TP, Suenaga T, Arase H, Nakano I, Chiocca EA, et al. The Fc Domain of Immunoglobulin Is Sufficient to Bridge NK Cells with Virally Infected Cells. *Immunity.* 2017;47(1):159-170.e10. eng. doi:10.1016/j.immuni.2017.06.019.
39. Davies JOJ, Stringaris K, Barrett AJ, Rezvani K. Opportunities and limitations of natural killer cells as adoptive therapy for malignant disease. *Cytotherapy.* 2014;16(11):1453–1466. eng. doi:10.1016/j.jcyt.2014.03.009.
40. Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood.* 2008;112(13):4793–4807. eng. doi:10.1182/blood-2008-08-077941.
41. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, Dombret H, Fenaux P, Grimwade D, Larson RA, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood.* 2010;115(3):453–474. eng. doi:10.1182/blood-2009-07-235358.
42. Ducimetière F, Lurkin A, Ranchère-Vince D, Decouvelaere A-V, Péoc'h M, Istier L, Chalabreysse P, Muller C, Alberti L, Bringuier P-P, et al. Incidence of sarcoma histotypes and molecular subtypes in a prospective epidemiological study with central pathology review and molecular testing. *PLoS ONE.* 2011;6(8):e20294. eng. doi:10.1371/journal.pone.0020294.
43. Eriksson M, Hardell L, Adami HO. Exposure to dioxins as a risk factor for soft tissue sarcoma: a population-based case-control study. *J Natl Cancer Inst.* 1990;82(6):486–490. eng. doi:10.1093/jnci/82.6.486.
44. Estey E. Acute Myeloid Leukemia - Many Diseases, Many Treatments. *N Engl J Med.* 2016;375(21):2094–2095. eng. doi:10.1056/NEJMe1611424.
45. Fassy J, Tsalkitzi K, Goncalves-Maia M, Braud VM. A Real-Time Cytotoxicity Assay as an Alternative to the Standard Chromium-51 Release Assay for Measurement of Human NK and T Cell Cytotoxic Activity. *Curr Protoc Immunol.* 2017;118:7.42.1-7.42.12. eng. doi:10.1002/cpim.28.
46. Fauriat C, Just-Landi S, Mallet F, Arnoulet C, Sainty D, Olive D, Costello RT. Deficient expression of NCR in NK cells from acute myeloid leukemia: Evolution during leukemia treatment and impact of leukemia cells in NCRdull phenotype induction. *Blood.* 2007;109(1):323–330. eng. doi:10.1182/blood-2005-08-027979.
47. Ferris RL, Jaffee EM, Ferrone S. Tumor antigen-targeted, monoclonal antibody-based immunotherapy: clinical response, cellular immunity, and immunoescape. *J Clin Oncol.* 2010;28(28):4390–4399. eng. doi:10.1200/JCO.2009.27.6360.

48. Ferson M, Edwards A, Lind A, Milton GW, Hersey P. Low natural killer-cell activity and immunoglobulin levels associated with smoking in human subjects. *Int J Cancer*. 1979;23(5):603–609. eng. doi:10.1002/ijc.2910230504.
49. Fuchs A, Cella M, Giurisato E, Shaw AS, Colonna M. Cutting edge: CD96 (tactile) promotes NK cell-target cell adhesion by interacting with the poliovirus receptor (CD155). *J Immunol*. 2004;172(7):3994–3998. eng. doi:10.4049/jimmunol.172.7.3994.
50. Gao J, Zheng Q, Xin N, Wang W, Zhao C. CD155, an onco-immunologic molecule in human tumors. *Cancer Sci*. 2017;108(10):1934–1938. eng. doi:10.1111/cas.13324.
51. Geiger TL, Sun JC. Development and maturation of natural killer cells. *Curr Opin Immunol*. 2016;39:82–89. eng. doi:10.1016/j.coi.2016.01.007.
52. Giuliani M, Janji B, Berchem G. Activation of NK cells and disruption of PD-L1/PD-1 axis: two different ways for lenalidomide to block myeloma progression. *Oncotarget*. 2017;8(14):24031–24044. eng. doi:10.18632/oncotarget.15234.
53. Greig SL. Talimogene Laherparepvec: First Global Approval. *Drugs*. 2016;76(1):147–154. eng. doi:10.1007/s40265-015-0522-7.
54. Guo H, Cranert SA, Lu Y, Zhong M-C, Zhang S, Chen J, Li R, Mahl SE, Wu N, Davidson D, et al. Deletion of Slam locus in mice reveals inhibitory role of SLAM family in NK cell responses regulated by cytokines and LFA-1. *J Exp Med*. 2016;213(10):2187–2207. eng. doi:10.1084/jem.20160552.
55. Helman LJ, Meltzer P. Mechanisms of sarcoma development. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(9):685–694. eng. doi:10.1038/nrc1168.
56. Hersey P, Edwards A, Honeyman M, McCarthy WH. Low natural-killer-cell activity in familial melanoma patients and their relatives. *Br J Cancer*. 1979;40(1):113–122. eng. doi:10.1038/bjc.1979.147.
57. Hsu J, Hodgins JJ, Marathe M, Nicolai CJ, Bourgeois-Daigneault M-C, Trevino TN, Azimi CS, Scheer AK, Randolph HE, Thompson TW, et al. Contribution of NK cells to immunotherapy mediated by PD-1/PD-L1 blockade. *J Clin Invest*. 2018;128(10):4654–4668. eng. doi:10.1172/JCI99317.
58. Iguchi-Manaka A, Okumura G, Kojima H, Cho Y, Hirochika R, Bando H, Sato T, Yoshikawa H, Hara H, Shibuya A, et al. Increased Soluble CD155 in the Serum of Cancer Patients. *PLoS ONE*. 2016;11(4):e0152982. eng. doi:10.1371/journal.pone.0152982.
59. Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet*. 2000;356(9244):1795–1799. eng. doi:10.1016/S0140-6736(00)03231-1.
60. Inozume T, Yaguchi T, Furuta J, Harada K, Kawakami Y, Shimada S. Melanoma Cells Control Antimelanoma CTL Responses via Interaction between TIGIT and CD155 in the Effector Phase. *J Invest Dermatol*. 2016;136(1):255–263. eng. doi:10.1038/JID.2015.404.

61. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(19):12293–12297. eng. doi:10.1073/pnas.192461099.
62. Juliusson G, Antunovic P, Derolf A, Lehmann S, Möllgård L, Stockelberg D, Tidefelt U, Wahlin A, Höglund M. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood*. 2009;113(18):4179–4187. eng. doi:10.1182/blood-2008-07-172007.
63. Juliusson G, Lazarevic V, Hörstedt A-S, Hagberg O, Höglund M. Acute myeloid leukemia in the real world: why population-based registries are needed. *Blood*. 2012;119(17):3890–3899. eng. doi:10.1182/blood-2011-12-379008.
64. Kailayangiri S, Altvater B, Meltzer J, Pscherer S, Luecke A, Dierkes C, Titze U, Leuchte K, Landmeier S, Hotfilder M, et al. The ganglioside antigen G(D2) is surface-expressed in Ewing sarcoma and allows for MHC-independent immune targeting. *Br J Cancer*. 2012;106(6):1123–1133. eng. doi:10.1038/bjc.2012.57.
65. Kaisho T, Ishikawa J, Oritani K, Inazawa J, Tomizawa H, Muraoka O, Ochi T, Hirano T. BST-1, a surface molecule of bone marrow stromal cell lines that facilitates pre-B-cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(12):5325–5329. eng. doi:10.1073/pnas.91.12.5325.
66. Kane JM, Finley JW, Driscoll D, Kraybill WG, Gibbs JF. The treatment and outcome of patients with soft tissue sarcomas and synchronous metastases. *Sarcoma*. 2002;6(2):69–73. eng. doi:10.1080/1357714021000022168.
67. Katrinakis G, Kyriakou D, Papadaki H, Kalokyri I, Markidou F, Eliopoulos GD. Defective natural killer cell activity in B-cell chronic lymphocytic leukaemia is associated with impaired release of natural killer cytotoxic factor(s) but not of tumour necrosis factor-alpha. *Acta Haematol*. 1996;96(1):16–23. eng. doi:10.1159/000203709.
68. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:677–704. eng. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331.
69. Kienzle G, Kempis J von. CD137 (ILA/4-1BB), expressed by primary human monocytes, induces monocyte activation and apoptosis of B lymphocytes. *Int Immunol*. 2000;12(1):73–82. eng. doi:10.1093/intimm/12.1.73.
70. Kim GG, Donnenberg VS, Donnenberg AD, Gooding W, Whiteside TL. A novel multiparametric flow cytometry-based cytotoxicity assay simultaneously immunophenotypes effector cells: comparisons to a 4 h ⁵¹Cr-release assay. *J Immunol Methods*. 2007;325(1-2):51–66. eng. doi:10.1016/j.jim.2007.05.013.
71. Klingemann H. Challenges of cancer therapy with natural killer cells. *Cytotherapy*. 2015;17(3):245–249. eng. doi:10.1016/j.jcyt.2014.09.007.
72. Kohrt HE, Colevas AD, Houot R, Weiskopf K, Goldstein MJ, Lund P, Mueller A, Sagiv-Barfi I, Marabelle A, Lira R, et al. Targeting CD137 enhances the efficacy of cetuximab. *J Clin Invest*. 2014;124(6):2668–2682. eng. doi:10.1172/JCI73014.

73. Kong Y, Zhu L, Schell TD, Zhang J, Claxton DF, Ehmann WC, Rybka WB, George MR, Zeng H, Zheng H. T-Cell Immunoglobulin and ITIM Domain (TIGIT) Associates with CD8+ T-Cell Exhaustion and Poor Clinical Outcome in AML Patients. *Clin Cancer Res.* 2016;22(12):3057–3066. eng. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2626.
74. Konjević G, Jurisić V, Banićević B, Spuzić I. The difference in NK-cell activity between patients with non-Hodgkin's lymphomas and Hodgkin's disease. *Br J Haematol.* 1999;104(1):144–151. eng. doi:10.1046/j.1365-2141.1999.01129.x.
75. Konjević G, Mirjacić Martinović K, Vuletić A, Jović V, Jurisić V, Babović N, Spuzić I. Low expression of CD161 and NKG2D activating NK receptor is associated with impaired NK cell cytotoxicity in metastatic melanoma patients. *Clin Exp Metastasis.* 2007;24(1):1–11. eng. doi:10.1007/s10585-006-9043-9.
76. Krupka C, Kufer P, Kischel R, Zugmaier G, Bögeholz J, Köhnke T, Lichtenegger FS, Schneider S, Metzeler KH, Fiegl M, 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(3):356–365. eng. doi:10.1182/blood-2013-08-523548.
77. Krupka C, Kufer P, Kischel R, Zugmaier G, Lichtenegger FS, Köhnke T, Vick B, Jeremias I, Metzeler KH, Altmann T, 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(2):484–491. eng. doi:10.1038/leu.2015.214.
78. Krupka C, Lichtenegger FS, Köhnke T, Bögeholz J, Bücklein V, Roiss M, Altmann T, Do TU, Dusek R, Wilson K, et al. Targeting CD157 in AML using a novel, Fc-engineered antibody construct. *Oncotarget.* 2017;8(22):35707–35717. eng. doi:10.18632/oncotarget.16060.
79. Lanier LL. NKG2D Receptor and Its Ligands in Host Defense. *Cancer Immunol Res.* 2015;3(6):575–582. eng. doi:10.1158/2326-6066.CIR-15-0098.
80. Larsen SK, Gao Y, Basse PH. NK Cells in the Tumor Microenvironment. *Crit Rev Oncog.* 2014;19(0):91–105. eng.
81. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, Iwai Y, Long AJ, Brown JA, Nunes R, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol.* 2001;2(3):261–268. eng. doi:10.1038/85330.
82. Li M, Xia P, Du Y, Liu S, Huang G, Chen J, Zhang H, Hou N, Cheng X, Zhou L, et al. T-cell immunoglobulin and ITIM domain (TIGIT) receptor/poliovirus receptor (PVR) ligand engagement suppresses interferon- γ production of natural killer cells via β -arrestin 2-mediated negative signaling. *J Biol Chem.* 2014;289(25):17647–17657. eng. doi:10.1074/jbc.M114.572420.
83. Liao W, Lin J-X, Leonard WJ. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity.* 2013;38(1):13–25. eng. doi:10.1016/j.immuni.2013.01.004.
84. Lichtenegger FS, Krupka C, Haubner S, Köhnke T, Subklewe M. Recent developments in immunotherapy of acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol.* 2017;10(1):142. eng. doi:10.1186/s13045-017-0505-0.

85. Lichtenegger FS, Krupka C, Köhnke T, Subklewe M. Immunotherapy for Acute Myeloid Leukemia. *Semin Hematol.* 2015;52(3):207–214. eng. doi:10.1053/j.seminhematol.2015.03.006.
86. Linenberger ML. CD33-directed therapy with gemtuzumab ozogamicin in acute myeloid leukemia: progress in understanding cytotoxicity and potential mechanisms of drug resistance. *Leukemia.* 2005;19(2):176–182. eng. doi:10.1038/sj.leu.2403598.
87. Liu Y, Cheng Y, Xu Y, Wang Z, Du X, Li C, Peng J, Gao L, Liang X, Ma C. Increased expression of programmed cell death protein 1 on NK cells inhibits NK-cell-mediated anti-tumor function and indicates poor prognosis in digestive cancers. *Oncogene.* 2017;36(44):6143–6153. eng. doi:10.1038/onc.2017.209.
88. Locatelli F, Pende D, Falco M, Della Chiesa M, Moretta A, Moretta L. NK Cells Mediate a Crucial Graft-versus-Leukemia Effect in Haploidentical-HSCT to Cure High-Risk Acute Leukemia. *Trends Immunol.* 2018;39(7):577–590. eng. doi:10.1016/j.it.2018.04.009.
89. Long EO, Kim HS, Liu D, Peterson ME, Rajagopalan S. Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:227–258. eng. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-075005.
90. Lutgendorf SK, Sood AK, Anderson B, McGinn S, Maseri H, Dao M, Sorosky JI, Geest K de, Ritchie J, Lubaroff DM. Social support, psychological distress, and natural killer cell activity in ovarian cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23(28):7105–7113. eng. doi:10.1200/JCO.2005.10.015.
91. Mahnke K, Enk AH. TIGIT-CD155 Interactions in Melanoma: A Novel Co-Inhibitory Pathway with Potential for Clinical Intervention. *J Invest Dermatol.* 2016;136(1):9–11. eng. doi:10.1016/j.jid.2015.10.048.
92. Mahoney KM, Freeman GJ, McDermott DF. The Next Immune-Checkpoint Inhibitors: PD-1/PD-L1 Blockade in Melanoma. *Clin Ther.* 2015;37(4):764–782. eng. doi:10.1016/j.clinthera.2015.02.018.
93. Maki RG, Jungbluth AA, Gnjatic S, Schwartz GK, D'Adamo DR, Keohan ML, Wagner MJ, Scheu K, Chiu R, Ritter E, et al. A Pilot Study of Anti-CTLA4 Antibody Ipilimumab in Patients with Synovial Sarcoma. *Sarcoma.* 2013;2013:168145. eng. doi:10.1155/2013/168145.
94. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science.* 1990;250(4985):1233–1238. eng. doi:10.1126/science.1978757.
95. Mandal A, Viswanathan C. Natural killer cells: In health and disease. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* 2015;8(2):47–55. eng. doi:10.1016/j.hemonc.2014.11.006.
96. Marin V, Pizzitola I, Agostoni V, Attianese GMPG, Finney H, Lawson A, Pule M, Rousseau R, Biondi A, Biagi E. Cytokine-induced killer cells for cell therapy of acute myeloid leukemia: improvement of their immune activity by expression of CD33-specific chimeric receptors. *Haematologica.* 2010;95(12):2144–2152. eng. doi:10.3324/haematol.2010.026310.
97. Masson D, Jarry A, Bauray B, Blanchardie P, Laboisie C, Lustenberger P, Denis MG. Overexpression of the CD155 gene in human colorectal carcinoma. *Gut.* 2001;49(2):236–240. eng. doi:10.1136/gut.49.2.236.

98. McCarthy EF. The Toxins of William B. Coley and the Treatment of Bone and Soft-Tissue Sarcomas. *Iowa Orthop J.* 2006;26:154–158. eng.
99. Melero I, Shuford WW, Newby SA, Aruffo A, Ledbetter JA, Hellström KE, Mittler RS, Chen L. Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors. *Nat Med.* 1997;3(6):682–685. eng. doi:10.1038/nm0697-682.
100. Michaud H-A, Eliaou J-F, Lafont V, Bonnefoy N, Gros L. Tumor antigen-targeting monoclonal antibody-based immunotherapy: Orchestrating combined strategies for the development of long-term antitumor immunity. *Oncoimmunology.* 2014;3(9):e955684. eng. doi:10.4161/21624011.2014.955684.
101. Michel T, Poli A, Cuapio A, Briquemont B, Iserentant G, Ollert M, Zimmer J. Human CD56bright NK Cells: An Update. *J Immunol.* 2016;196(7):2923–2931. eng. doi:10.4049/jimmunol.1502570.
102. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:197–223. eng. doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.197.
103. Moretta L, Montaldo E, Vacca P, Del Zotto G, Moretta F, Merli P, Locatelli F, Mingari MC. Human natural killer cells: origin, receptors, function, and clinical applications. *Int Arch Allergy Immunol.* 2014;164(4):253–264. eng. doi:10.1159/000365632.
104. Morvan MG, Lanier LL. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(1):7–19. eng. doi:10.1038/nrc.2015.5.
105. MSD Sharp & Dohme GmbH, Haar, Deutschland. KEYTRUDA (Pembrolizumab), Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung. https://www.msd.de/fileadmin/files/arzneimittel-impfstoffe/gebrauchsinformationen/keytruda_25_mg_ml_konzentrat_zur_herstellung_einer_infusionsloesung.pdf. [accessed 2020 May 10].
106. Müller LP, Müller-Tidow C. The indications for allogeneic stem cell transplantation in myeloid malignancies. *Dtsch Arztebl Int.* 2015;112(15):262–270. eng. doi:10.3238/arztebl.2015.0262.
107. Navid F, Santana VM, Barfield RC. Anti-GD2 antibody therapy for GD2-expressing tumors. *Curr Cancer Drug Targets.* 2010;10(2):200–209. eng. doi:10.2174/156800910791054167.
108. Niwa R, Sakurada M, Kobayashi Y, Uehara A, Matsushima K, Ueda R, Nakamura K, Shitara K. Enhanced natural killer cell binding and activation by low-fucose IgG1 antibody results in potent antibody-dependent cellular cytotoxicity induction at lower antigen density. *Clin Cancer Res.* 2005;11(6):2327–2336. eng. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-2263.
109. Ohaegbulam KC, Assal A, Lazar-Molnar E, Yao Y, Zang X. Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway. *Trends Mol Med.* 2015;21(1):24–33. eng. doi:10.1016/j.molmed.2014.10.009.
110. Ohs I, Ducimetière L, Marinho J, Kulig P, Becher B, Tugues S. Restoration of Natural Killer Cell Antimetastatic Activity by IL12 and Checkpoint Blockade. *Cancer Res.* 2017;77(24):7059–7071. eng. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-1032.

111. Orange JS. Natural killer cell deficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(3):515–525. eng. doi:10.1016/j.jaci.2013.07.020.
112. O'Shea D, Cawood TJ, O'Farrelly C, Lynch L. Natural killer cells in obesity: impaired function and increased susceptibility to the effects of cigarette smoke. *PLoS ONE*. 2010;5(1):e8660. eng. doi:10.1371/journal.pone.0008660.
113. O'Sullivan TE, Sun JC, Lanier LL. Natural Killer Cell Memory. *Immunity*. 2015;43(4):634–645. eng. doi:10.1016/j.immuni.2015.09.013.
114. Palma C, Binaschi M, Bigioni M, Maggi CA, Goso C. CD137 and CD137 ligand constitutively coexpressed on human T and B leukemia cells signal proliferation and survival. *Int J Cancer*. 2004;108(3):390–398. eng. doi:10.1002/ijc.11574.
115. Paoluzzi L, Cacavio A, Ghesani M, Karambelkar A, Rapkiewicz A, Weber J, Rosen G. Response to anti-PD1 therapy with nivolumab in metastatic sarcomas. *Clin Sarcoma Res*. 2016;6:24. eng. doi:10.1186/s13569-016-0064-0.
116. Patrikidou A, Domont J, Cioffi A, Le Cesne A. Treating soft tissue sarcomas with adjuvant chemotherapy. *Curr Treat Options Oncol*. 2011;12(1):21–31. eng. doi:10.1007/s11864-011-0145-5.
117. Pegram HJ, Andrews DM, Smyth MJ, Darcy PK, Kershaw MH. Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunol Cell Biol*. 2011;89(2):216–224. eng. doi:10.1038/icb.2010.78.
118. Pende D, Spaggiari GM, Marcenaro S, Martini S, Rivera P, Capobianco A, Falco M, Lanino E, Pierri I, Zambello R, et al. Analysis of the receptor-ligand interactions in the natural killer-mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias: evidence for the involvement of the Poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112). *Blood*. 2005;105(5):2066–2073. eng. doi:10.1182/blood-2004-09-3548.
119. Perez Horta Z, Goldberg JL, Sondel PM. Anti-GD2 mAbs and next-generation mAb-based agents for cancer therapy. *Immunotherapy*. 2016;8(9):1097–1117. eng. doi:10.2217/imt-2016-0021.
120. Pesce S, Greppi M, Tabellini G, Rampinelli F, Parolini S, Olive D, Moretta L, Moretta A, Marcenaro E. Identification of a subset of human natural killer cells expressing high levels of programmed death 1: A phenotypic and functional characterization. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(1):335–346.e3. eng. doi:10.1016/j.jaci.2016.04.025.
121. Pollack SM, Ingham M, Spraker MB, Schwartz GK. Emerging Targeted and Immune-Based Therapies in Sarcoma. *J Clin Oncol*. 2018;36(2):125–135. eng. doi:10.1200/JCO.2017.75.1610.
122. Ponce LP, Fenn NC, Moritz N, Krupka C, Kozik J-H, Lauber K, Subklewe M, Hopfner K-P. SIRP α -antibody fusion proteins stimulate phagocytosis and promote elimination of acute myeloid leukemia cells. *Oncotarget*. 2017;8(7):11284–11301. eng. doi:10.18632/oncotarget.14500.
123. Quarona V, Zaccarello G, Chillemi A, Brunetti E, Singh VK, Ferrero E, Funaro A, Horenstein AL, Malavasi F. CD38 and CD157: a long journey from activation markers to multifunctional molecules. *Cytometry B Clin Cytom*. 2013;84(4):207–217. eng. doi:10.1002/cyto.b.21092.

124. Que Y, Xiao W, Guan Y-X, Liang Y, Yan S-M, Chen H-Y, Li Q-Q, Xu B-S, Zhou Z-W, Zhang X. PD-L1 Expression Is Associated with FOXP3+ Regulatory T-Cell Infiltration of Soft Tissue Sarcoma and Poor Patient Prognosis. *J Cancer*. 2017;8(11):2018–2025. eng. doi:10.7150/jca.18683.
125. Raulet DH, Gasser S, Gowen BG, Deng W, Jung H. Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:413–441. eng. doi:10.1146/annurev-immunol-032712-095951.
126. Rham C de, Ferrari-Lacraz S, Jendly S, Schneider G, Dayer J-M, Villard J. The proinflammatory cytokines IL-2, IL-15 and IL-21 modulate the repertoire of mature human natural killer cell receptors. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(6):R125. eng. doi:10.1186/ar2336.
127. Ring EK, Li R, Moore BP, Nan L, Kelly VM, Han X, Beierle EA, Markert JM, Leavenworth JW, Gillespie GY, et al. Newly Characterized Murine Undifferentiated Sarcoma Models Sensitive to Virotherapy with Oncolytic HSV-1 M002. *Mol Ther Oncolytics*. 2017;7:27–36. eng. doi:10.1016/j.omto.2017.09.003.
128. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, Posati S, Rogaia D, Frassoni F, Aversa F, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*. 2002;295(5562):2097–2100. eng. doi:10.1126/science.1068440.
129. Sakamoto N, Ishikawa T, Kokura S, Okayama T, Oka K, Ideno M, Sakai F, Kato A, Tanabe M, Enoki T, et al. Phase I clinical trial of autologous NK cell therapy using novel expansion method in patients with advanced digestive cancer. *J Transl Med*. 2015;13:277. eng. doi:10.1186/s12967-015-0632-8.
130. Sakisaka T, Takai Y. Biology and pathology of nectins and nectin-like molecules. *Curr Opin Cell Biol*. 2004;16(5):513–521. eng. doi:10.1016/j.ceb.2004.07.007.
131. Salih HR, Kosowski SG, Haluska VF, Starling GC, Loo DT, Lee F, Aruffo AA, Trail PA, Kiener PA. Constitutive expression of functional 4-1BB (CD137) ligand on carcinoma cells. *J Immunol*. 2000;165(5):2903–2910. eng. doi:10.4049/jimmunol.165.5.2903.
132. Schlenk RF, Döhner K, Döhner H. Akute myeloische Leukämie. Genetische Diagnostik und molekulare Therapie [Acute myeloid leukemia. Genetic diagnostics and molecular therapy]. *Internist (Berl)*. 2013;54(2):171–178. ger. doi:10.1007/s00108-012-3154-y.
133. Schöffski P, Cornillie J, Wozniak A, Li H, Hompes D. Soft tissue sarcoma: an update on systemic treatment options for patients with advanced disease. *Oncol Res Treat*. 2014;37(6):355–362. eng. doi:10.1159/000362631.
134. Scott AM, Wolchok JD, Old LJ. Antibody therapy of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):278–287. eng. doi:10.1038/nrc3236.
135. Shaffer BC, Le Luduec J-B, Forlenza C, Jakubowski AA, Perales M-A, Young JW, Hsu KC. Phase II Study of Haploidentical Natural Killer Cell Infusion for Treatment of Relapsed or Persistent Myeloid Malignancies Following Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22(4):705–709. eng. doi:10.1016/j.bbmt.2015.12.028.

136. Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol.* 2007;8(3):239–245. eng. doi:10.1038/ni1443.
137. Shevtsov M, Multhoff G. Immunological and Translational Aspects of NK Cell-Based Antitumor Immunotherapies. *Front Immunol.* 2016;7:492. eng. doi:10.3389/fimmu.2016.00492.
138. Shibuya A, Campbell D, Hannum C, Yssel H, Franz-Bacon K, McClanahan T, Kitamura T, Nicholl J, Sutherland GR, Lanier LL, et al. DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. *Immunity.* 1996;4(6):573–581. eng. doi:10.1016/s1074-7613(00)70060-4.
139. Shifrin N, Raulet DH, Ardolino M. NK cell self tolerance, responsiveness and missing self recognition. *Semin Immunol.* 2014;26(2):138–144. eng. doi:10.1016/j.smim.2014.02.007.
140. Siebert N, Zumpe M, Jüttner M, Troschke-Meurer S, Lode HN. PD-1 blockade augments anti-neuroblastoma immune response induced by anti-GD2 antibody ch14.18/CHO. *Oncoimmunology.* 2017;6(10):e1343775. eng. doi:10.1080/2162402X.2017.1343775.
141. Sinha C, Cunningham LC. An overview of the potential strategies for NK cell-based immunotherapy for acute myeloid leukemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2016;63(12):2078–2085. eng. doi:10.1002/pbc.26171.
142. Sinha S, Peach AHS. Diagnosis and management of soft tissue sarcoma. *BMJ.* 2010;341:c7170. eng. doi:10.1136/bmj.c7170.
143. Smits ELJM, Cools N, Lion E, van Camp K, Ponsaerts P, Berneman ZN, van Tendeloo VFI. The Toll-like receptor 7/8 agonist resiquimod greatly increases the immunostimulatory capacity of human acute myeloid leukemia cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2010;59(1):35–46. eng. doi:10.1007/s00262-009-0721-8.
144. Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(11):850–861. eng. doi:10.1038/nrc928.
145. Soman G, Kallarakal AT, Michiel D, Yang X, Saptharish N, Jiang H, Giardina S, Gilly J, Mitra G. Analytical characterization of ch14.18: a mouse-human chimeric disialoganglioside-specific therapeutic antibody. *MAbs.* 2012;4(1):84–100. eng. doi:10.4161/mabs.4.1.18566.
146. Stamm H, Oliveira-Ferrer L, Grossjohann E-M, Muschhammer J, Thaden V, Brauneck F, Kischel R, Müller V, Bokemeyer C, Fiedler W, et al. Targeting the TIGIT-PVR immune checkpoint axis as novel therapeutic option in breast cancer. *Oncoimmunology.* 2019;8(12):e1674605. eng. doi:10.1080/2162402X.2019.1674605.
147. Stanietsky N, Simic H, Arapovic J, Toporik A, Levy O, Novik A, Levine Z, Beiman M, Dassa L, Achdout H, et al. The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(42):17858–17863. eng. doi:10.1073/pnas.0903474106.

148. Stiller CA, Trama A, Serraino D, Rossi S, Navarro C, Chirilaque MD, Casali PG. Descriptive epidemiology of sarcomas in Europe: report from the RARECARE project. *Eur J Cancer*. 2013;49(3):684–695. eng. doi:10.1016/j.ejca.2012.09.011.
149. Strayer DR, Carter WA, Brodsky I. Familial occurrence of breast cancer is associated with reduced natural killer cytotoxicity. *Breast Cancer Res Treat*. 1986;7(3):187–192. eng. doi:10.1007/bf01806249.
150. Sun JC, Lanier LL. NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8⁺ T cells. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(10):645–657. eng. doi:10.1038/nri3044.
151. Szkaradkiewicz A, Karpiński TM, Drews M, Borejsza-Wysocki M, Majewski P, Andrzejewska E. Natural killer cell cytotoxicity and immunosuppressive cytokines (IL-10, TGF-beta1) in patients with gastric cancer. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:901564. eng. doi:10.1155/2010/901564.
152. Tassi I, Colonna M. The cytotoxicity receptor CRACC (CS-1) recruits EAT-2 and activates the PI3K and phospholipase Cgamma signaling pathways in human NK cells. *J Immunol*. 2005;175(12):7996–8002. eng. doi:10.4049/jimmunol.175.12.7996.
153. Thielens A, Vivier E, Romagné F. NK cell MHC class I specific receptors (KIR): from biology to clinical intervention. *Curr Opin Immunol*. 2012;24(2):239–245. eng. doi:10.1016/j.coi.2012.01.001.
154. Tomasec P, Wang ECY, Davison AJ, Vojtesek B, Armstrong M, Griffin C, McSharry BP, Morris RJ, Llewellyn-Lacey S, Rickards C, et al. Downregulation of natural killer cell-activating ligand CD155 by human cytomegalovirus UL141. *Nat Immunol*. 2005;6(2):181–188. eng. doi:10.1038/ni1156.
155. Tonn T, Becker S, Esser R, Schwabe D, Seifried E. Cellular immunotherapy of malignancies using the clonal natural killer cell line NK-92. *J Hematother Stem Cell Res*. 2001;10(4):535–544. eng. doi:10.1089/15258160152509145.
156. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol*. 2012;24(2):207–212. eng. doi:10.1016/j.coi.2011.12.009.
157. Tsuji K, Ojima M, Otabe K, Horie M, Koga H, Sekiya I, Muneta T. Effects of Different Cell-Detaching Methods on the Viability and Cell Surface Antigen Expression of Synovial Mesenchymal Stem Cells. *Cell Transplant*. 2017;26(6):1089–1102. eng. doi:10.3727/096368917X694831.
158. Vacca P, Montaldo E, Croxatto D, Moretta F, Bertaina A, Vitale C, Locatelli F, Mingari MC, Moretta L. NK Cells and Other Innate Lymphoid Cells in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol*. 2016;7:188. eng. doi:10.3389/fimmu.2016.00188.
159. van Acker HH, Capsomidis A, Smits EL, van Tendeloo VF. CD56 in the Immune System: More Than a Marker for Cytotoxicity? *Front Immunol*. 2017;8. eng. doi:10.3389/fimmu.2017.00892.
160. Vinay DS, Ryan EP, Pawelec G, Talib WH, Stagg J, Elkord E, Lichtor T, Decker WK, Whelan RL, Kumara HMCS, et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol*. 2015;35 Suppl:S185-S198. eng. doi:10.1016/j.semcancer.2015.03.004.

161. Vivier E, Ugolini S, Blaise D, Chabannon C, Brossay L. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(4):239–252. eng. doi:10.1038/nri3174.
162. Wang F, Hou H, Wu S, Tang Q, Liu W, Huang M, Yin B, Huang J, Mao L, Lu Y, et al. TIGIT expression levels on human NK cells correlate with functional heterogeneity among healthy individuals. *Eur J Immunol*. 2015;45(10):2886–2897. eng. doi:10.1002/eji.201545480.
163. Wang PL, O'Farrell S, Clayberger C, Krensky AM. Identification and molecular cloning of tactile. A novel human T cell activation antigen that is a member of the Ig gene superfamily. *J Immunol*. 1992;148(8):2600–2608. eng.
164. Watts TH. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:23–68. eng. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115839.
165. Wilcox RA, Tamada K, Strome SE, Chen L. Signaling through NK cell-associated CD137 promotes both helper function for CD8+ cytolytic T cells and responsiveness to IL-2 but not cytolytic activity. *J Immunol*. 2002;169(8):4230–4236. eng. doi:10.4049/jimmunol.169.8.4230.
166. Xu F, Sunderland A, Zhou Y, Schulick RD, Edil BH, Zhu Y. Blockade of CD112R and TIGIT signaling sensitizes human natural killer cell functions. *Cancer Immunol Immunother*. 2017;66(10):1367–1375. eng. doi:10.1007/s00262-017-2031-x.
167. Yang H, Bueso-Ramos C, DiNardo C, Estecio MR, Davanlou M, Geng Q-R, Fang Z, Nguyen M, Pierce S, Wei Y, et al. Expression of PD-L1, PD-L2, PD-1 and CTLA4 in myelodysplastic syndromes is enhanced by treatment with hypomethylating agents. *Leukemia*. 2014;28(6):1280–1288. eng. doi:10.1038/leu.2013.355.
168. Yonezawa A, Dutt S, Chester C, Kim J, Kohrt HE. Boosting Cancer Immunotherapy with Anti-CD137 Antibody Therapy. *Clin Cancer Res*. 2015;21(14):3113–3120. eng. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-0263.
169. Yu J, Freud AG, Caligiuri MA. Location and cellular stages of natural killer cell development. *Trends Immunol*. 2013;34(12):573–582. eng. doi:10.1016/j.it.2013.07.005.
170. Yu X, Harden K, Gonzalez LC, Francesco M, Chiang E, Irving B, Tom I, Ivelja S, Refino CJ, Clark H, et al. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat Immunol*. 2009;10(1):48–57. eng. doi:10.1038/ni.1674.
171. Zhang B, Zhao W, Li H, Chen Y, Tian H, Li L, Zhang L, Gao C, Zheng J. Immunoreceptor TIGIT inhibits the cytotoxicity of human cytokine-induced killer cells by interacting with CD155. *Cancer Immunol Immunother*. 2016;65(3):305–314. eng. doi:10.1007/s00262-016-1799-4.
172. Zhang Q, Bi J, Zheng X, Chen Y, Wang H, Wu W, Wang Z, Wu Q, Peng H, Wei H, et al. Blockade of the checkpoint receptor TIGIT prevents NK cell exhaustion and elicits potent anti-tumor immunity. *Nat Immunol*. 2018;19(7):723–732. eng. doi:10.1038/s41590-018-0132-0.
173. Zhang Y, Wallace DL, Lara CM de, Ghattas H, Asquith B, Worth A, Griffin GE, Taylor GP, Tough DF, Beverley PCL, et al. In vivo kinetics of human natural killer cells: the effects of ageing and acute and chronic viral infection. *Immunology*. 2007;121(2):258–265. eng. doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02573.x.

8. Anhang

8.1. Abkürzungsverzeichnis

ADCC	Antibody-dependent cellular cytotoxicity
AML	Akute myeloische Leukämie
CD	Cluster of Differentiation
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's Phosphate buffered saline
FCS	Fetales Kälberserum
IFN- γ	Interferon γ
IL	Interleukin
IMDM	Isocove's Modified Dulbecco's Medium
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
KIR	Killer immunoglobulin-like receptor
MHC-I	Major Histocompatibility Complex Typ 1
NCR	Natural Cytotoxicity Receptor
NK Zellen	Natürliche Killerzellen
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PD-1	Programmed Death 1
PD-1	Programmed Death 1
PDL-1	Programmed Death Ligand 1
PD-L1	Programmed Death Ligand 1
PHA	Phytohämagglutinin
PVR	Poliovirus Rezeptor
R848	Resiquimod
Rpm	Rotationen pro Minute

SLT	Secondary lymphatic tissue; Sekundäres lymphatisches Gewebe
STS	Soft Tissue Sarcoma; Weichteilsarkom
TACTILE	T cell activation, increased late expression
TIGIT	T-cell immunoglobulin ITIM domain
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand

8.2. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1-1 Erkennung von Tumorzellen durch NK-Zellen
- Abbildung 1-2 Funktionsweise der Immuncheckpoint-Blockade
- Abbildung 1-3 Wirkmechanismus der ADCC
- Abbildung 3-1 Differenzierung von AML-Zellen und Lymphozyten in der Blutprobe eines AML-Patienten
- Abbildung 3-2 Konditionen der Kokulturen aus Tumorzelllinien und NK-Zellen gesunder Spender
- Abbildung 3-3 Funktionsprinzip des ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Versuchs
- Abbildung 3-4 Konditionen des ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Versuchs
- Abbildung 4-1 Expression von Immuncheckpoints auf NK-Zellen von AML-Patienten im Vergleich zu NK-Zellen von gesunden Spendern
- Abbildung 4-2 Expression von Immuncheckpoints auf NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu NK-Zellen von gesunden Spendern
- Abbildung 4-3 Expression von SLAMF-7 und PVR auf AML-Zellen von Patienten
- Abbildung 4-4 Expression des Zielantigens CD157 und des Liganden PVR auf AML-Zelllinien
- Abbildung 4-5 Expression des Zielantigens CD33 und des Liganden PVR auf AML-Zelllinien
- Abbildung 4-6 Expression der Liganden PD-L1, SLAMF-7 und PVR auf GD2-exprimierenden Zelllinien im Vergleich zwischen Passagierung mit Accutase und Trypsin
- Abbildung 4-7 Expression des Zielantigens GD2 und des Liganden PVR auf GD2-exprimierenden Zelllinien
- Abbildung 4-8 Expression von TIGIT und PD-1 nach Stimulation mit PHA im Vergleich zu unstimulierten NK-Zellen

- Abbildung 4-9 Expression von TIGIT und PD-1 nach Stimulation mit R848 im Vergleich zu unstimulierten NK-Zellen
- Abbildung 4-10 Expression von TIGIT und PD-1 nach Stimulation mit I2 und IL-15 im Vergleich zu unstimulierten NK-Zellen
- Abbildung 4-11 Expression von TIGIT und PD-1 auf NK-Zellen in Kokultur mit AML-Zelllinien mit und ohne anti-CD157 Antikörper
- Abbildung 4-12 Expression von TIGIT und PD-1 auf NK-Zellen in Kokultur mit GD2-exprimierenden Zelllinien mit und ohne anti-GD2 Antikörper
- Abbildung 4-13 Expression von TIGIT auf NK-Zell-Subpopulationen in Kokultur mit AML-Zelllinien
- Abbildung 4-14 Expression von TIGIT und PD-1 auf NK-Zell-Subpopulationen in Kokultur mit GD2-exprimierenden Zelllinien
- Abbildung 4-15 Sekretion von IFN- γ durch NK-Zellen in Kokultur mit Tumorzelllinien mit und ohne therapeutische Antikörper
- Abbildung 4-16 Effekt therapeutischer Antikörper auf die Lyse von STS- und AML-Zelllinien durch NK-Zellen gesunder Spender
- Abbildung 4-17 Lyse der AML-Zelllinie MV4-11 durch vorstimulierte NK-Zellen von gesunden Spendern mit und ohne therapeutische und blockierende Antikörper
- Abbildung 4-18 Lyse der GD2-exprimierenden Zelllinie TC-71 durch unstimulierte NK-Zellen von gesunden Spendern mit und ohne therapeutische und blockierende Antikörper
- Abbildung 4-19 Lyse der GD2-exprimierenden Zelllinien SW-872 und TC-71 durch vorstimulierte NK-Zellen von gesunden Spendern mit und ohne therapeutische und blockierende Antikörper
- Abbildung 4-20 Lyse der GD2-exprimierende Zelllinie SW-872 durch NK-Zellen von STS-Patienten mit und ohne therapeutische und blockierende Antikörper
- Abbildung 4-21 Einfluss unterschiedlicher Zielkonzentrationen des anti-PVR Antikörpers auf die Lyse der GD2-exprimierenden Zelllinie SW-872 durch NK-Zellen von STS-Patienten

8.3. Tabellenverzeichnis

- Tabelle 3-1 Geräte und Softwares
- Tabelle 3-2 Verbrauchsmaterial
- Tabelle 3-3 Verwendetes Material für Zellkulturen
- Tabelle 3-4 Verwendete Zelllinien

Tabelle 3-5	Zusammensetzung der Medien für die unterschiedlichen Zelllinien
Tabelle 3-6	Material für Zellisolation, Durchflusszytometrie und Zytotoxizitätsassays
Tabelle 3-7	Antikörper für die Durchflusszytometrie
Tabelle 3-8	Therapeutische und Checkpoint-blockierende Antikörper
Tabelle 3-9	Panel zur Untersuchung von Checkpoints und Liganden auf NK-Zellen
Tabelle 4-1	Expression von Immuncheckpoints auf NK-Zellen von AML-Patienten im Vergleich zu NK-Zellen von gesunden Spendern
Tabelle 4-2	Expression von Immuncheckpoints auf NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu NK-Zellen von gesunden Spendern

8.4. Patientenaufklärung



Patienten- und Probandeninformation

In-vitro-Studie zur Etablierung neuer Immuntherapien bei Patienten mit Weichteilsarkomen

Bevor Sie Ihre Zustimmung zur Teilnahme an dieser Untersuchung geben, ist es wichtig, dass Sie diese Patienteninformation aufmerksam lesen und verstehen. Wenn Sie etwas nicht verstehen, fragen Sie bitte Ihren behandelnden Arzt.

Sehr geehrte(r) Patient/in, sehr geehrte(r) Blutspender,

wir laden Sie ein, an der oben genannten Untersuchung teilzunehmen. Bevor Sie sich dafür oder dagegen entscheiden, ist es wichtig für Sie zu verstehen, warum diese Untersuchung durchgeführt wird und was sie beinhaltet. Sie werden über den Nutzen und die möglichen Risiken einer Teilnahme an dieser wissenschaftlichen Untersuchung von Ihrem behandelnden Arzt umfassend aufgeklärt. Bitte nehmen Sie sich darüber hinaus die Zeit, die folgenden Informationen sorgfältig durchzulesen, und besprechen Sie sie eventuell mit einer vertrauten Person und Ihrem behandelnden Arzt. Sie können uns jederzeit fragen, wenn Sie etwas nicht verstehen oder gerne weitere Informationen hätten. Entscheiden Sie ganz in Ruhe, ob Sie an der Studie teilnehmen wollen oder nicht.

Die Teilnahme an dieser Untersuchung ist freiwillig und kann jederzeit ohne Angabe von Gründen durch Sie beendet werden, ohne dass Ihnen hierdurch Nachteile entstehen.

Unverzichtbare Voraussetzung für die Durchführung dieser Untersuchung ist, dass Sie Ihr Einverständnis zur Teilnahme schriftlich erklären. Bitte lesen Sie den folgenden Text als Ergänzung zum ärztlichen Informationsgespräch sorgfältig durch und zögern Sie nicht, Fragen zu stellen.

Bitte unterschreiben Sie die Einwilligungserklärung nur

- wenn Sie Art und Ablauf der Untersuchung vollständig verstanden haben,
- wenn Sie bereit sind, der Teilnahme zuzustimmen und
- wenn Sie sich über Ihre Rechte als Teilnehmer an dieser Untersuchung im Klaren sind.

Diese Untersuchung, die Patienteninformation und Einwilligungserklärung wurden von der zuständigen Ethikkommission geprüft und es bestanden dagegen keine Einwände.

Hintergrund zur untersuchten Erkrankung und zur Behandlung

Weichteilsarkome sind seltene bösartige Tumorerkrankungen, die vom Bindegewebe ausgehen und überall im Körper auftreten können. Standardtherapie dieser Tumore ist die vollständige operative Entfernung. Diese ist jedoch nicht bei allen Patienten anwendbar, da der Tumor möglicherweise in lebenswichtige Organe einwächst oder bereits Absiedelungen in anderen Organen (Metastasen) gebildet hat.

Bei diesen Patienten kommt eine Chemotherapie, möglicherweise in Kombination mit regionaler Hyperthermie, also eine Erwärmung des Tumors oder des ehemaligen Tumorgebiets, zum Einsatz. Es gelingt jedoch auch unter Anwendung dieser Therapieverfahren nur in einem Teil der Patienten, eine dauerhafte Heilung der Erkrankung zu erreichen. Das Risiko ist hoch, dass die Erkrankung trotz entsprechender Therapie weiter fortschreitet oder wiederkehrt (rezidiviert). Deshalb wird nach Wegen gesucht, die krankheitsfreie Zeit bei diesen Patienten zu verlängern oder die Rate an Rezidiven zu senken. Ein möglicherweise erfolgversprechender Ansatz ist die Unterstützung des patienteneigenen Immunsystems, da die Immunabwehr eine wichtige Rolle in der Verhinderung und Bekämpfung von Tumorerkrankungen spielt.

2. Ziel der Untersuchung

Im Rahmen dieser Untersuchung werden Ihre weißen Blutkörperchen hinsichtlich Zahl und Funktion untersucht und diese Werte mit den Ergebnissen von Untersuchungen an gesunden Spendern verglichen. Hierzu werden weiße Blutkörperchen, die über eine normale Blutentnahme gewonnen werden, bezüglich des Vorhandenseins bestimmter Eiweißen auf ihrer Zelloberfläche untersucht (sog. Durchflusszytometrie). Mit Hilfe dieser Analyse ist es möglich, die Zellen verschiedenen Untergruppen zuzuordnen und Informationen über ihre Funktion zu erhalten. Durch den Vergleich mit gesunden Spendern kann erkannt werden, ob Zellen bestimmter Untergruppen in erhöhter oder verminderter Zahl im Blut vorliegen. Dies lässt Rückschlüsse auf die Funktionsfähigkeit Ihres Immunsystems zu. Insgesamt sollen diese Untersuchungen an 30 Patienten und zu Vergleichszwecken auch an 10 gesunden Probanden durchgeführt werden.

In einem zweiten Schritt sollen bei 2 - 6 der untersuchten Patienten Analysen der Funktionsfähigkeit von Zellen einer bestimmten Lymphozyten-Untergruppe, den Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), erfolgen sowie eine Vermehrung dieser NK-Zellen im Brutschrank versucht werden. Dabei sollen NK-Zellen aus Ihrem Blut durch Lagerung in einer nährstoffreichen Flüssigkeit und Hinzufügung von Signalstoffen, die eine Teilung der Zellen auslösen, in ihrer Zahl deutlich gesteigert werden. Ziel ist die Erreichung einer Zellzahl, wie sie für die Verwendung für therapeutische Zwecke notwendig ist. Wird diese Zellzahl erreicht, sollen wiederum durchflusszytometrische Analysen erfolgen, um erneut Informationen über ihre Funktion erhalten. Genetische Untersuchungen werden jedoch **nicht** durchgeführt.

3. Möglicher Nutzen der Teilnahme für den Probanden

Die Untersuchung dient vorerst einem wissenschaftlichen Erkenntnisgewinn, der zur Entwicklung neuer Therapieansätze in der Behandlung von Patienten mit Weichteilsarkomen beitragen soll. Damit hat die vorliegende Untersuchung für Sie keinen möglichen Nutzen, Sie tragen jedoch möglicherweise zur Verbesserung der Therapiemöglichkeiten von zukünftigen Patienten mit Weichteilsarkom.

4. Ablauf der Untersuchung

Im Rahmen einer Routine-Blutentnahme werden Ihnen ca. 10 - 20 ml Blut für die oben beschriebenen Forschungszwecke entnommen.

Sollten Sie aufgrund der Ergebnisse der ersten Analyse für die oben erwähnten weiterführenden Untersuchungen zur Funktionsfähigkeit der NK-Zellen und zur

Vermehrung dieser Zellen in Frage kommen, wird, Ihr Einverständnis vorausgesetzt, bei Ihnen einmalig eine Entnahme von 80-100ml Blut durchgeführt.

5. Abbruch der Untersuchung

Wenn Sie sich dazu bereit erklären, an der Untersuchung teilzunehmen, haben Sie das Recht, jederzeit ohne Angabe von Gründen die Zusage zur Teilnahme an der Untersuchung zurückzuziehen und die Untersuchung abzubrechen.

Der verantwortliche Leiter der Studie hat das Recht, Ihre Teilnahme an der Untersuchung zu beenden, wenn schwerwiegende Begleiterkrankungen, unannehmbare unerwünschte Ereignisse, Verletzungen des Untersuchungsprotokolls oder andere Gründe vorliegen, denen zufolge der Abbruch im besten medizinischen Interesse liegt.

6. Risiken und Nebenwirkungen der Untersuchung

Zusätzliche Risiken oder Nebenwirkungen sind bei Entnahme von 5 - 10ml Blut im Rahmen einer Routine-Blutentnahme nicht zu erwarten. Bei Entnahme einer größeren Blutmenge (80 - 100 ml) sollten Sie darauf achten, genügend Flüssigkeit zu sich zu nehmen, um möglicherweise auftretenden Schwindel und ein Schwächegefühl im Anschluss an die Blutentnahme zu vermeiden. Außerdem sollten Sie in den ersten Stunden nach Durchführung dieser Blutentnahme vorsichtig bei Lageänderungen, z.B. beim Aufstehen aus liegender Position, sein.

7. Schweigepflicht/Vertraulichkeit der Daten/Datenschutz

Bei dieser Untersuchung werden die Vorschriften über die ärztliche Schweigepflicht und den Datenschutz eingehalten. Es werden persönliche Daten und Befunde über Sie erhoben, gespeichert und weitergegeben werden diese Daten jedoch nur in verschlüsselter (pseudonymisierter) Form, d.h. weder Ihr Name noch ihre Initialen oder das exakte Geburtsdatum erscheinen im Verschlüsselungscode.

Es kann Einsicht in die Originaldaten durch autorisierte Personen genommen werden, vor allem zur Überwachung der Untersuchungssicherheit. Im Falle eines Widerrufs der Einwilligung werden die gespeicherten Daten irreversibel anonymisiert und weiter verwendet.

Der Zugang zu den Originaldaten und zum Verschlüsselungscode ist auf folgende Personen beschränkt: Studienleiter Herr Prof. Dr. R. Issels und Frau PD Dr. M. Subklewe, ihre Stellvertreter Herr Prof. Dr. W. Hiddemann, Frau Dr. D. Sauter und Herr V. Bücklein.

Die Unterlagen werden in der Medizinischen Klinik und Poliklinik III aufbewahrt. Die außerhalb der Krankenakte aufgezeichneten Daten werden 10 Jahre, die in die Krankenakte aufgenommenen Daten 30 Jahre aufbewahrt und danach gelöscht bzw. vernichtet.

Im Falle von Veröffentlichungen der Studienergebnisse bleibt die Vertraulichkeit ihrer persönlichen Daten in jedem Fall gewährleistet; wenn überhaupt, werden die Daten in verschlüsselter Form verwendet.

Wenn Sie diese Patienten- und Probandeninformation in Ruhe gelesen und mit der Teilnahme an der Untersuchung einverstanden sind, dann bestätigen Sie dies bitte mit Ihrer Unterschrift auf der Einwilligungserklärung. Dieses Einverständnis kann von Ihnen selbstverständlich jederzeit und ohne Angaben von Gründen widerrufen werden.

Wir danken Ihnen für Ihre Bereitschaft zur Teilnahme an dieser Untersuchung!

Einwilligungserklärung

In-vitro-Studien zur Etablierung neuer Immuntherapien bei Patienten mit Weichteilsarkomen

Name _____

Vorname _____

Geburtsdatum _____

Patienten/Probandennummer _____

Ich habe die von Frau/Herrn Dr. med. _____ unternommene Aufklärung über Art und Durchführung sowie die Risiken der betreffenden wissenschaftlichen Untersuchung verstanden und hatte ausreichend Gelegenheit, meine Fragen hierzu in einem Gespräch mit dem aufklärenden Arzt zu klären. Ferner hatte ich die Gelegenheit, die „Patienten- und Probandeninformation“ durchzulesen und auch dazu Fragen zu stellen. Die von mir gestellten Fragen wurden zufriedenstellend beantwortet. Ich konnte mir genügend Zeit nehmen, bevor ich meine Entscheidung zur Teilnahme getroffen habe.

Eine Kopie dieser Patienten- und Probandeninformation sowie der vorliegenden Einwilligungserklärung habe ich vom aufklärenden Arzt erhalten.

Ich bin bereit an der wissenschaftlichen Untersuchung im Rahmen der o.g. Studie teilzunehmen.

Die Teilnahme ist freiwillig. Mir ist bekannt, dass ich meine Einwilligung jederzeit ohne Angabe von Gründen und ohne nachteilige Folgen für mich zurückziehen und einer Weiterverarbeitung meiner Daten jederzeit widersprechen kann.

Ich bin damit einverstanden, dass der Studienleiter oder -arzt sich mit meinem/r behandelndem/n Arzt/Ärztin im Rahmen dieser Studie in Verbindung setzt.

Ich bin darüber aufgeklärt, dass die vorliegende Untersuchung nach nationalen sowie internationalen Qualitätsstandards durchgeführt wird. Dementsprechend gelten die nachfolgenden

Datenschutzbestimmungen:

Bei dieser Studie werden die Vorschriften über die ärztliche Schweigepflicht und den Datenschutz eingehalten. Es werden persönliche Daten und Befunde über Sie erhoben, und gespeichert, aber nur in verschlüsselter (pseudonymisierter) Form weitergegeben, d.h. weder Ihr Name noch Ihre Initialen oder das exakte Geburtsdatum erscheinen im Verschlüsselungscode.

Es kann Einsicht in die Originaldaten durch autorisierte Personen genommen werden, vor allem zur Überwachung der Studiensicherheit. Im Falle eines Widerrufs der Einwilligung werden die gespeicherten Daten irreversibel anonymisiert und weiter verwendet.

Der Zugang zu den Originaldaten und zum Verschlüsselungscode ist auf folgende Personen beschränkt: Studienleiter Herr Prof. Dr. R. Issels und Frau PD Dr. M. Subklewe, ihre Stellvertreter Herr Prof. Dr. W. Hiddemann, Frau Dr. D. Sauter und Herr V. Bücklein. Die Unterlagen werden in der Medizinischen Klinik und Poliklinik III aufbewahrt. Die außerhalb der Krankenakte aufgezeichneten Daten werden 10 Jahre, die in die

Krankenakte aufgenommenen Daten 30 Jahre aufbewahrt und danach gelöscht bzw. vernichtet.

Im Falle von Veröffentlichungen der Studienergebnisse bleibt die Vertraulichkeit meiner persönlichen Daten ebenfalls gewährleistet; wenn überhaupt, werden die Daten in verschlüsselter Form verwendet.

Die Beachtung des Bundesdatenschutzgesetzes ist in vollem Umfange sichergestellt.

Den Inhalt der vorliegenden Einwilligungserklärung habe ich verstanden; mit der vorstehend geschilderten Vorgehensweise bin ich einverstanden.

Einwilligungserklärung zur Datenverarbeitung

Ich willige darin ein, dass die wissenschaftliche Einrichtung Klinikum der Universität München, Medizinische Klinik und Poliklinik III, Campus Großhadern, mich betreffende personenbezogene Daten und Gesundheits- bzw. Krankheitsdaten im Rahmen und zum Zweck des o.g. Forschungsvorhabens verarbeitet.

Ich willige darin ein, dass meine im Rahmen der o.g. Studie erhobenen Krankheitsdaten aufgezeichnet, verschlüsselt (pseudonymisiert), verschlüsselt (pseudonym) gespeichert und die pseudonymisierten Ergebnisse veröffentlicht werden.

Darüber hinaus bin ich mit der Entnahme, Herauslösung, Untersuchung sowie verschlüsselten (pseudonymisierten) Lagerung meines im Rahmen dieser klinischen Studie entnommenen Blutes für den Zweck der Studie durch den/die Studienarzt/-Studienärztin bzw. das Labor für Leukämiediagnostik einverstanden.

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass die vorgenannte Untersuchung einschließlich der dafür notwendigen ärztlichen Untersuchungen an mir durchgeführt wird, und ich stimme der Aufzeichnung meiner Daten/Krankheitsdaten sowie der Einsichtnahme in meine Akte in der oben beschriebenen Form zu.

München, den _____

Unterschrift Proband / Patient

Hiermit erkläre ich, den/die o.g. Versuchsteilnehmer/in am _____ über Wesen, Bedeutung, Tragweite und Risiken dieser klinischen Prüfung mündlich und schriftlich aufgeklärt und ihm/ihr eine Ausfertigung der Information sowie dieser Einwilligungserklärung übergeben zu haben.

München, den _____

Unterschrift Prüfarzt

8.5. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt allen, die am Gelingen meiner Dissertation beteiligt waren. Allen voran sind hier Herr Prof. Dr. Wolfgang Hiddemann und sein Nachfolger Herr Prof. Dr. Dr. Michael von Bergwelt zu nennen, denen ich für die Möglichkeit danke, meine Doktorarbeit an der Medizinischen Klinik und Poliklinik III der LMU durchführen zu können. Meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Marion Subklewe danke ich für die freundliche Aufnahme in ihre außergewöhnliche Arbeitsgruppe und insbesondere für die Bereitstellung dieses spannenden Themas für meine Dissertation. Darüber hinaus bin ich der Deutschen José Carreras Leukämie-Stiftung sehr dankbar, die die vorliegende Dissertation in Zusammenarbeit mit der DGHO mit einem Promotionsstipendium unterstützte und mir dadurch ermöglichte, für die Dauer eines Jahres meine volle Konzentration auf meine Doktorarbeit zu richten.

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. Veit Bücklein für seine ausdauernde und engagierte Unterstützung während des gesamten Arbeitsprozesses. Hoher Arbeitsbelastung zum Trotz stand er stets für Fragen aller Art zur Verfügung und hat mit seinen Anregungen maßgeblichen Anteil am Gelingen der vorliegenden Dissertation. Des Weiteren möchte ich Frau Dr. Christina Krupka danken, die mich nicht nur in alle praktischen Fertigkeiten im Labor einführte, sondern auch am Gesamtkonzept der Arbeit entscheidend mitwirkte.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen im Labor für Translationale Tumormunologie, die mir nicht nur in allen methodischen Belangen eine große Hilfe waren, sondern wegen derer ich meine Zeit im Labor in schöner Erinnerung behalten werde. Besonders gilt das für Bettina und Anetta, bei denen ich zudem auch jede Frage loswerden konnte. Daneben möchte ich mich auch bei den Mitarbeiterinnen im Labor für Leukämiediagnostik, insbesondere bei Elke, für ihre Unterstützung bei der Probenauswertung bedanken.

Last but not least gilt meiner Familie großer Dank für ihre nicht nur moralische, sondern auch tatkräftige Unterstützung: Meiner Schwester insbesondere für ihre technische Hilfe und meinem Vater vor allem für seinen Rückhalt in langwierigen Phasen. Allen voran aber meiner Mutter Eva für ihre unermüdlichen und kritischen Korrekturen genauso wie für alles andere. Und natürlich Tom, ohne dessen offenes Ohr und bestärkende Worte ich diese Arbeit nicht zum Abschluss gebracht hätte.

Danke!

