

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III

Klinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. Dr. Michael von Bergwelt

**Verlust der p53-Funktion als intrinsischer Resistenzmechanismus
gegen das T-Zell-rekrutierende Antikörperkonstrukt AMG 330
zur Therapie der akuten myeloischen Leukämie**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Lea Pawlowsky

aus

München

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatterin: Prof. Dr. Marion Subklewe

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Christoph Walz
Prof. Dr. Michael Albert

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Dr. Bettina Brauchle

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 22.06.2023

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
1.1 Die akute myeloische Leukämie	1
1.2 Grundlagen der T-Zell-basierten Immuntherapie	4
1.3 Der BiTE AMG 330 als neuer immuntherapeutischer Ansatz	6
1.4 Funktionsverlust von p53 als Resistenzmechanismus der AML	9
1.4.1 Physiologische Grundlagen von p53	9
1.4.2 Funktionsverlust von p53	11
1.4.3 Rolle des p53-Funktionsverlustes in der AML	12
1.5 Zielsetzung	14
2. Material	15
2.1 Zelllinien	15
2.2 Spenderblut	16
2.3 BiTEs	16
2.4 Antikörper für die Durchflusszytometrie	16
2.5 Fluoreszenzfarbstoffe	17
2.6 Zytokine	17
2.7 Kits	18
2.8 Zellkultur-Chemikalien	18
2.9 Western Blot-Chemikalien	19
2.10 Weitere Chemikalien	21
2.11 Verbrauchsmaterialien	21
2.12 Geräte	22
2.13 Softwareprogramme	23
3. Methoden	24
3.1 Zellkultur	24
3.2 Bestimmung der Zellkonzentration	24
3.3 Blutentnahme bei gesunden Spendern	24
3.4 Isolierung von PBMCs aus Vollblut	24
3.5 Kryokonservierung und Auftauen von PBMCs	25
3.6 Isolierung von T-Zellen aus PBMCs	25
3.7 Stimulation der T-Zellen	25
3.8 Durchflusszytometrie	26

3.8.1	Analyse der Expression von Oberflächenantigenen	26
3.8.2	Differenzierung von vitalen und toten Zellen	26
3.8.3	Evaluation der Zellproliferation	26
3.8.4	Differenzierung von T- und AML-Zellen durch Gating	27
3.9	Western Blot	28
3.10	Bestimmung der Zellwachstumskinetik	28
3.11	Cokultur zur Bestimmung der Lyse der AML-Zellen und T-Zell-Proliferation	28
3.12	Cytometric Bead Array	29
3.13	Expressionsprofil vor und nach Zytokinstimulation	29
3.14	Kultivierung von T-Zellen in Überständen einer serumfreien AML-Kultur	30
3.15	Transwell-Experiment	30
3.16	Statistik	30
4.	Ergebnisse	31
4.1	Validierung des p53-Knockdowns durch Western Blotting	31
4.2	Keine Auswirkung des p53-Knockdowns auf Zellwachstumskinetik	31
4.3	Erhöhte Resistenz gegen AMG 330 vermittelte Zytotoxizität und Inhibition der T-Zell-Proliferation durch p53-Knockdown in Cokultur	32
4.4	Variable Zytokinproduktion der Cokulturen	35
4.5	Einfluss des p53-Knockdowns auf das Oberflächenexpressionsmuster der AML-Zelllinien	36
4.6	Entfall des inhibitorischen Effekts auf die Proliferation bei Kultivierung der T-Zellen in AML-Überstand	40
4.7	Inhibition der AMG 330 vermittelten Zytotoxizität und T-Zell-Proliferation durch das Sekretom von p53 kd AML-Zellen im Transwell	41
5.	Diskussion	43
5.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	43
5.2	Eignung der p53 kd Zelllinien als Modell	43
5.3	Zellinterne Auswirkungen des p53-Verlustes: Störung des AMG 330 induzierten Apoptosesignalweges	44
5.4	Zellexterne Auswirkungen des p53-Verlustes: Resistenz durch Inhibition der T-Zell-Aktivität	45
5.5	Einfluss des p53-Status auf die Zellinteraktion: Expressionsprofil und Sekretom	46
5.6	Translatationaler Ausblick auf den p53-Verlust als Resistenzmechanismus gegen AMG 330	48
5.7	Fazit	49
6.	Zusammenfassung	51
7.	Literaturverzeichnis	52
8.	Danksagung	62
9.	Eidesstattliche Versicherung	63

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Überlebenswahrscheinlichkeit von AML-Patienten in Abhängigkeit vom Therapiezeitraum	4
Abbildung 2:	Beispielhafter Aufbau und Wirkmechanismus eines BiTE-Konstrukts anhand von AMG 330	7
Abbildung 3:	Ansprechen der AML auf AMG 330 Therapie	9
Abbildung 4:	Das p53-Netzwerk	11
Abbildung 5:	Negative Auswirkung der <i>TP53</i> -Mutation auf die Prognose der AML	13
Abbildung 6:	Analyse der Zellen mittels Durchflusszytometrie	27
Abbildung 7:	Validierung des p53-Knockdowns	31
Abbildung 8:	Kein Einfluss des p53-Knockdowns auf die Zellwachstumskinetik	32
Abbildung 9:	Exemplarische Auswertung der Cokultur per Durchflusszytometrie	32
Abbildung 10:	Negativer Einfluss des p53-Knockdowns auf Lyse der AML-Zellen und Proliferation der T-Zellen in Cokultur mit AMG 330	34
Abbildung 11:	Variable Zytokinproduktion der Cokulturen	36
Abbildung 12:	Exemplarische Auswertung des Oberflächenexpressionsprofils per Durchflusszytometrie	37
Abbildung 13:	Keine Veränderung des Expressionsprofils unstimulierter AML-Zellen durch p53-Knockdown	38
Abbildung 14:	Einfluss des p53-Knockdowns auf das Oberflächenexpressionsmuster stimulierter AML-Zelllinien	39
Abbildung 15:	Entfall des inhibitorischen Effekts auf die Proliferation bei Kultivierung der T-Zellen in AML-Überstand	40
Abbildung 16:	Aufbau des Transwell-Versuchs und der Cokultur	41
Abbildung 17:	Inhibition der AMG 330 vermittelten Zytotoxizität und T-Zell-Proliferation durch das Sekretom von p53 kd AML-Zellen im Transwell und in der Cokultur	42

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	WHO-Klassifikation der AML	2
Tabelle 2:	ELN-Klassifikation: Risikoeinteilung der AML	2
Tabelle 3:	Charakterisierung der AML-Zelllinien	15
Tabelle 4:	Antikörper für die Durchflusszytometrie	16
Tabelle 5:	Fluoreszenzfarbstoffe	17
Tabelle 6:	Zytokine	17
Tabelle 7:	Kits	18
Tabelle 8:	Zellkultur-Chemikalien	18
Tabelle 9:	Zellkultur Medien und Puffer	19
Tabelle 10:	Western Blot-Chemikalien	19
Tabelle 11:	Western Blot Puffer und Gele	20
Tabelle 12:	Weitere Chemikalien	21
Tabelle 13:	Verbrauchsmaterialien	21
Tabelle 14:	Geräte	22
Tabelle 15:	Kulturbedingungen der Zelllinien	24
Tabelle 16:	AMG 330 vermittelte spezifische Lyse der AML-Zellen in Cokultur mit T-Zellen	33
Tabelle 17:	T-Zell-Proliferation in Cokultur mit p53 wt oder p53 kd AML-Zellen	33

Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
ATCC	American Type Culture Collection
Bax	BCL2 Associated X
bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bid	BH3-interacting domain death agonist
BiTE	Bispezifischer T-Zell-rekrutierender Antikörper (engl.: bispecific T-cell engager)
BSA	Bovines Serumalbumin
BV421	Brilliant Violet 421
c	Konzentration
CAR	Chimärer Antigenrezeptor
CBA	Cytometric bead array
cBiTE	Kontroll-BiTE (engl.: control)
CD	Unterscheidungsgruppen (engl.: cluster of differentiation)
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidylester
CR	Vollständige Remission (engl.: complete remission)
CRS	Zytokinfreisetzungssyndrom (engl.: cytokine release syndrome)
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
DLBCL	Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom (engl.: diffuse large B-cell lymphoma)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
E:T	Effektor:Ziel (engl.: effektor:target)
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELN	European Leukemia Net
FAB	French-American-British
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (engl.: fluorescence activated cell sorting)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FLT3	Fms like tyrosine kinase 3
FKS	Fetales Kälberserum
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonat
HRP	Meerrettichperoxidase (engl.: horseradish peroxidase)
IDH 1	Isocitrat-Dehydrogenase 1

IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
IL	Interleukin
kd	Knockdown
M	Molar
Mdm2	Murine double minute 2
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität (engl.: mean fluorescence intensity)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: major histocompatibility complex)
MOMP	Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran (engl.: mitochondrial outer membrane permeabilization)
MRD	Minimale Resterkrankung (engl.: minimal residual disease)
mRNA	Messenger RNA
n	Anzahl der Replikate
NOXA	NADPH-Oxidase-Aktivator
OX40L	OX40-Ligand
p	Signifikanzwert
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzelle (engl.: peripheral blood mononuclear cell)
PD-L1	Programmed cell death ligand 1
PE	Phycoerythrin
PerCP/Cy5.5	Peridininchlorophyllprotein/Cyanin 5.5
PUMA	P53 upregulated modulator of apoptosis
PVDF	Polyvinylidenfluorid
r/r	Rezidiv oder refraktär
RAEB	Refraktäre Anämie mit Blastenüberschuss
RIPA	Radioimmunpräzipitationstest (engl.: radioimmunoprecipitation assay)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: rounds per minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
scFv	Einzelketten-Antikörperfragment (engl.: single chain variable fragments)
shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA
tBid	gekürztes Bid (engl.: truncated Bid)
Tim-3	T-Zell-Immunglobulin und Mucin-Domäne-3
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Einheit (engl.: Unit)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl.: World Health Organization)

wt

Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Die akute myeloische Leukämie

Bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) handelt es sich um eine maligne Neoplasie der myeloischen Zellreihe [1]. Jährlich erkranken etwa 4.100 Menschen in Deutschland an AML. Sie ist mit 80 % der Fälle die häufigste Form der akuten Leukämien im Erwachsenenalter. Die Inzidenz nimmt mit steigendem Alter deutlich zu und liegt in der Altersgruppe > 80 Jahren bei etwa 30 Neuerkrankungen/100.000 Einwohnern pro Jahr. Das mediane Erkrankungsalter liegt bei 72 Jahren [2, 3].

Im Rahmen der Hämatopoese entwickeln sich aus den pluripotenten, hämatopoetischen Stammzellen lymphatische sowie myeloische Progenitorzellen. Die myeloischen Progenitorzellen sind die Vorläufer der myeloischen Zellreihe und können sich zu Granulozyten, Monozyten, Thrombozyten sowie Erythrozyten differenzieren [4, S. 6].

Die AML ist pathogenetisch durch die übermäßige, klonale Proliferation undifferenzierter pluripotenter Stammzellen oder myeloischer Progenitorzellen charakterisiert [5].

Diese leukämischen Blasten verdrängen das physiologische Knochenmark und führen zur Insuffizienz der Hämatopoese mit daraus resultierender Neutro-, Thrombo- und Erythrozytopenie. Als Folge entwickeln sich die diversen klinischen Symptome der AML wie Infektanfälligkeit, hämorrhagischer Diathese und Minderung der Leistungsfähigkeit. Bei 60 % der Patienten manifestiert sich zudem eine Leukozytose, die bei einer Steigerung der Leukozytenzahl über 100.000/ μ l zum Leukostase-Syndrom, einem hämatologischen Notfall, führen kann [1, 6].

Unbehandelt führt die AML innerhalb eines Jahres zum Tod [7].

Die Diagnose AML ist gesichert, wenn der Blastenanteil im Ausstrich von peripherem Blut oder Knochenmark 20 % übersteigt oder wenn AML definierende genetische Aberrationen nachgewiesen werden können [1, 8]

Die Einteilung der AML erfolgt gemäß der „World Health Organization“ (WHO)-Klassifikation basierend auf morphologischen, genetischen, immunologischen sowie klinischen Charakteristika (siehe Tabelle 1)[9].

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der AML [9]

AML-Subgruppen
AML mit rekurrenter genetischer Abnormität
AML mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen
Therapieassoziierte AML
AML not otherwise specified ¹ (NOS)
Myelosarkom
AML in Zusammenhang mit Trisomie 21

Es handelt sich um eine genetisch sehr heterogene Erkrankung, deren vielfältige genetische Veränderungen die Prognose beeinflussen. Die Klassifikation des „European Leukemia Net“ (ELN) von 2017 teilt die AML anhand ihres molekular- und zytogenetischen Profils in eine günstige, eine intermediäre und eine ungünstige („favorable, intermediate, adverse“) Risikogruppe ein (siehe Tabelle 2)[8, 10].

Tabelle 2: ELN-Klassifikation: Risikoeinteilung der AML [8]

Risikogruppe	Genetischer Befund
Günstig	t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1 inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11 Mutiertes NPM1 mit FLT3-ITD oder mit FLT3-ITD ^{low} Biallelisch mutiertes CEBPA
Intermediär	Mutiertes NPM1 und FLT3-ITD ^{high} Wildtyp NPM1 ohne FLT3-ITD oder mit FLT3-ITD ^{low} (ohne ungünstige genetische Veränderungen) t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A Sonstige zytogenetische Aberrationen (weder günstig noch ungünstig klassifiziert)
Ungünstig	t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214 t(v;11q23.3); rearrangiertes KMT2A t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1 inv(3)(q21.3q26.2) oder t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2,MECOM(EVI1) -5 oder del(5q); -7; -17/abn(17p) Komplexer Karyotyp, monosomaler Karyotyp Wildtyp NPM1 und FLT3-ITD ^{high} Mutiertes RUNX1/Mutiertes ASXL1/Mutiertes TP53

¹ nicht anderweitig spezifiziert (Übersetzung der Verfasserin)

Die Therapie setzt sich grundsätzlich aus einer Induktionstherapie zum Erreichen einer Remission sowie einer Postremissionstherapie zum Erhalt der Remission zusammen.

Initial wird anhand des „Eastern Cooperative Oncology Group“ (ECOG)-Aktivitätsstatus und der Komorbiditäten evaluiert, ob der Patient für eine intensive Induktions-Chemotherapie tauglich ist. Diese basiert auf dem 7+3 Therapieschema mit der Gabe von Cytarabin für sieben Tage und eines Anthrazyklins für drei Tage. Je nach genetischem Profil der AML kann das Schema noch um die Kombinationssubstanzen Gemtuzumab Ozogamicin und Midostaurin erweitert werden oder alternativ CPX-351 eingesetzt werden [1, 8].

Die Remissionsraten sind abhängig vom genetischen Risikoprofil der AML sowie vom Alter des Patienten. Patienten mit günstigem Profil, die jünger als 60 Jahre sind, erreichen mit dem 7+3 Therapieschema in 80 bis 90 % der Fälle eine vollständige Remission (CR), Patienten, die älter als 60 Jahre sind, nur in 70 bis 80 % der Fälle. Bei Patienten mit einem ungünstigen genetischen Profil liegen die CR-Raten in beiden Altersgruppen unter 35 % [11].

Zur Vermeidung eines Rezidivs muss eine Postremissionstherapie durchgeführt werden. Diese wird je nach genetischem Risikoprofil der AML sowie des Allgemeinzustands des Patienten ausgewählt. Generell wird bei geringerem Rezidivrisiko meist eine Chemotherapie mit Cytarabin durchgeführt, bei ungünstigem Risikoprofil und ausreichender Fitness des Patienten eine allogene Stammzelltransplantation [1, 8].

Allerdings sind etwa 40 % der Patienten, vor allem Ältere, für die intensive Induktionstherapie nicht geeignet. Sie können mit supportiver Therapie und hypomethylierenden Substanzen oder niedrigdosierter Chemotherapie, ggf. in Kombination mit Venetoclax oder Glasdegib, behandelt werden [1, 2].

Die Standard-Therapie der AML hatte sich 40 Jahre lang nicht wesentlich verändert. Seit 2017 erfolgte jedoch die Zulassung mehrerer neuer Medikamente, welche gezielter auf tumorfördernden Signalwege und Oberflächenmarker, sogenannte „cluster of differentiation“ (CD), der AML-Zellen wirken. Beispielsweise inhibieren Midostaurin und Ivosidenib die häufig mutierten Enzyme „fms like tyrosine kinase 3“ (FLT3) bzw. Isocitrat-Dehydrogenase 1 (IDH 1)[12, 13]. Venetoclax hemmt das überexprimierte, antiapoptotische Protein „B-cell lymphoma 2“ (Bcl-2) und das Antikörperkonjugat Gemtuzumab Ozogamicin bindet an den AML-spezifischen Oberflächenmarker CD33 [14, 15].

Für einige Subgruppen der AML sowie für ältere, unfitte Patienten, denen früher nur sehr limitierte Therapiemöglichkeiten zur Verfügung standen, haben diese Fortschritte zu einer Verbesserung der Prognose geführt [12, 13, 14, 15].

Allerdings ist die Prognose der AML insgesamt weiterhin schlecht (siehe Abbildung 1). Das relative Fünfjahresüberleben liegt bei jüngeren Patienten bei etwa 40 % und sinkt in höheren Altersgruppen rapide [16].

Anhand dieser Daten wird deutlich, dass die Notwendigkeit für neue Therapieformen besteht.

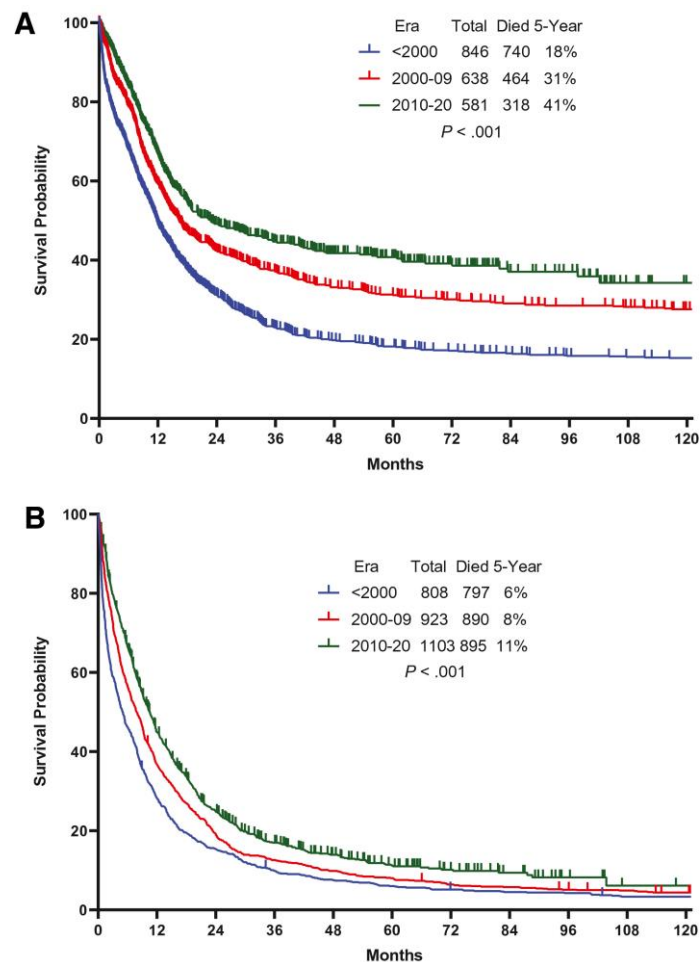


Abbildung 1: Überlebenswahrscheinlichkeit von AML-Patienten in Abhängigkeit vom Therapiezeitraum

(A) Jüngere (<60 Jahre) und (B) ältere (≥60 Jahre) AML-Patienten [16]

1.2 Grundlagen der T-Zell-basierten Immuntherapie

Vielversprechende neue Ansätze für die Behandlung der AML liefert das Forschungsgebiet der Immuntherapie. Diese basieren auf der Eliminierung der Tumorzellen durch das eigene Immunsystem des Patienten. Das Immunsystem ist physiologisch nicht nur für die Bekämpfung eingedrungener Krankheitserreger zuständig, sondern spielt auch eine zentrale Rolle in der Beseitigung oder Eindämmung entarteter Körperzellen. Zur Beschreibung dieser Prozesse entwickelten Dunn et al. 2002 das dreistufige Konzept des „Immunoediting“.

In der ersten Stufe „Elimination“ erkennt das Immunsystem mutierte Zellen, beseitigt diese und verhindert somit frühzeitig die Entstehung von Tumoren. An diesem Prozess sind Bestandteile des angeborenen und des adaptiven Immunsystems beteiligt, in dem T-Zellen eine zentrale Rolle spielen [17, 18].

T-Zellen gehören zum zellulären Anteil des adaptiven Immunsystems. Sie werden im Knochenmark aus lymphatischen Progenitorzellen gebildet und reifen im Thymus zu naiven T-Zellen mit einem antigenspezifischen T-Zell-Rezeptor heran [4, Kapitel 8.2]. Sie können anhand ihrer immunphänotypischen Oberflächenmerkmale in zwei Gruppen unterschieden werden. Die CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen (CTL) können über die Ausschüttung von Granzymen und Perforin oder die Expression des Fas-Liganden ihre Zielzellen direkt lysieren. Die CD4⁺ T-Helferzellen fördern die Immunantwort über die Rekrutierung und Stimulation weiterer Zellen des Immunsystems [4, Kapitel 9.3, 17, 18].

Um diese Funktionen ausführen zu können, müssen die naiven T-Zellen zuvor über mindestens zwei von drei Signalen aktiviert werden. Zunächst muss die T-Zelle mit ihrem T-Zell-Rezeptor an ihr spezifisches Antigen binden. Dieses Antigen kann direkt von der Tumorzelle selbst über ein Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-I-Molekül einer CD8⁺ T-Zelle präsentiert werden. Zusätzlich werden Tumorantigene von antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems prozessiert und über MHC-II-Moleküle CD4⁺ T-Zellen präsentiert. Das zweite Signal besteht aus der Stimulation der T-Zellen über costimulatorische Oberflächenmoleküle, wie beispielsweise CD80 und CD86. Sie führen zur gesteigerten Produktion von Interleukin (IL)-2 und zur Proliferation der T-Zellen. Das dritte Signal umfasst die Modulation der Effektorfunktion durch Zytokine. Diese können die T-Zellen stimulieren und die Differenzierung in verschiedenen Untergruppen induzieren [4, Kapitel 6.1/9.2].

Allerdings können Tumorzellen durch Mutationen Mechanismen entwickeln, um dieser Kontrolle durch das Immunsystem zu entkommen. Beispielsweise werden Tumorzellen, die die Expression ihrer Antigene oder MHC-I-Moleküle reduzieren, schlechter durch das Immunsystem detektiert. Zusätzlich können sie inhibitorische Oberflächenmoleküle exprimieren, wie z.B. „programmed cell death ligand 1“ (PD-L1), oder inhibitorische Zytokine, wie z.B. IL-10, sekretieren, um die Aktivierung der Immunzellen zu reduzieren [17, 18, 19].

Aufgrund dieser Mechanismen kommt es in der zweiten Stufe des Immunoediting, dem „Equilibrium“, zunächst zu einem temporären Gleichgewicht zwischen den Kontrollmechanismen des Immunsystems und den genetisch instabilen Tumorzellen. D.h. es kommt zwar zu keiner unkontrollierten Proliferation des Tumors, jedoch können nie sämtliche genetische Varianten der Tumorzellen beseitigt werden. Die zweite Stufe kann sich über Jahre hinweg erstrecken, bis sich schließlich eine Tumorzelle entwickelt, die durch ihre Mutationen gegenüber dem Immunsystem vollständig resistent geworden ist. Diese

dritte Stufe des Immunoediting, der „Escape“, markiert den Übergang in eine klinisch relevante Tumorerkrankung [19, 20].

Im Rahmen der Immuntherapie sollen diese Escape-Mechanismen überwunden werden, um die Kontrolle des Tumors durch das Immunsystem wieder zu ermöglichen.

Eine seit Jahrzehnten erfolgreich eingesetzte Form der Immuntherapie ist die allogene Stammzelltransplantation. Im Rahmen des „Graft-versus-Leukemia“-Effektes werden Leukämiezellen durch die Immunzellen des Spenders, insbesondere T-Zellen und natürliche Killerzellen, eliminiert. Allerdings ist die allogene Stammzelltransplantation durch ihre hohe Komplikationsrate und begrenzte Verfügbarkeit an Spendern nicht für jeden Patienten eine Option [17, 21].

Daher wurde der immuntherapeutische Ansatz weiterentwickelt, und es stehen inzwischen neue Therapieoptionen zur Verfügung. Dazu gehören Vakzinierungen mit dendritischen Zellen oder Peptiden sowie die relativ neu zugelassene chimärer-Antigenrezeptor-T-Zell-Therapie (CAR-T-Zell-Therapie). Vielfältige Anwendung finden zudem Antikörper-basierte Therapieansätze. Neben Checkpoint-Inhibitoren und Toxin-konjugierten Antikörpern wurden bispezifische T-Zell-rekrutierende Antikörperkonstrukte, auch BiTEs (engl.: Bispecific T cell engager) genannt, entwickelt, deren Konzept und Anwendung in der Therapie der AML im folgenden Kapitel vorgestellt werden [17, 22].

1.3 Der BiTE AMG 330 als neuer immuntherapeutischer Ansatz

BiTEs sind ein vielversprechender immuntherapeutischer Ansatz, der in vielen Tumorentitäten verfolgt wird. Ein BiTE-Konstrukt (siehe Abbildung 2) basiert auf einem Tandem aus zwei unterschiedlichen „single chain variable fragments“ (scFv). Die scFvs setzen sich jeweils aus den variablen, antigenspezifischen Domänen einer leichten und schweren Immunglobulin-Kette zusammen und sind mit einem Polypeptidlinker verknüpft. Somit können simultan das Oberflächenantigen CD3 ϵ , ein Bestandteil des T-Zell-Rezeptors, sowie ein weiteres Antigen einer Zielzelle gebunden werden [23, 24]. Diese Interaktion ist vollständig unabhängig von der Spezifität des T-Zell-Rezeptors und der Antigenpräsentation durch den MHC-Komplex. Die simultane Bindung des BiTEs durch beide Zellen führt zur Ausbildung einer zytolytischen Synapse, deren Aufbau einer natürlichen immunologischen Synapse fast identisch ist. Die T-Zellen werden unabhängig von costimulatorischen Signalen aktiviert und zur Proliferation stimuliert. Durch die Sekretion von Zytokinen, Granzym B und Perforin wird die Apoptose der Zielzelle induziert. Immun-Escape-Mechanismen der AML, beispielsweise die verminderte Expression von MHC-I oder die defekte Tumorantigenprozessierung, können daher mit BiTEs überwunden werden [25, 26, 27, 28].

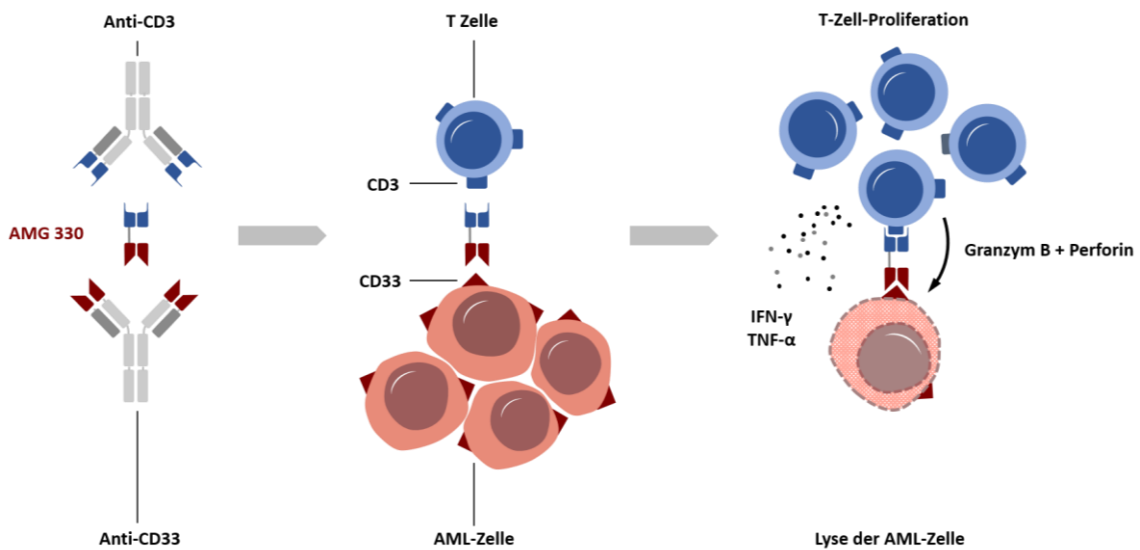


Abbildung 2: Beispielhafter Aufbau und Wirkmechanismus eines BiTE-Konstrukts anhand von AMG 330

Die klinische Wirksamkeit der BiTE-Technologie konnte bereits anhand des BiTEs Blinatumomab gezeigt werden. Blinatumomab bindet spezifisch an CD3ε sowie an das Oberflächenmolekül CD19 auf B-Zellen. In einer klinischen Phase-III-Studie konnte bei Patienten mit refraktärer oder rezidivierender (r/r) B-Vorläufer akuten lymphatischen Leukämie (ALL) eine Remissionsrate von 44 % gezeigt werden. Des Weiteren sprachen 78 % der Patienten, bei denen nach intensiver Chemotherapie eine minimale Resterkrankung (MRD) der ALL nachweisbar war, auf Blinatumomab an. Die US-amerikanische Arzneimittelbehörde und die europäische Arzneimittel-Agentur erteilten 2014 bzw. 2015 die Zulassung von Blinatumomab für die Therapie der r/r B-Vorläufer-ALL sowie 2018 bzw. 2019 die Zulassung für die Therapie der MRD der B-Vorläufer-ALL [29, 30, 31, 32]

Analog zu Blinatumomab für die Therapie der ALL wurde der BiTE AMG 330 von Amgen für die Therapie der AML entwickelt. Statt CD19 wird das Zielantigen CD33 spezifisch gebunden. CD33 ist ein Sialinsäure-bindendes Zelladhäsionsmolekül und Differenzierungsmarker der myeloischen Zellreihe. Es wird von mehr als 99 % der AML-Patienten exprimiert. Die Intensität der Expression variiert zwischen den Patienten und ist am stärksten auf den Bulk-Zellen, die den Großteil der AML-Zellen ausmachen [33].

Einige Studien unterstützen die Hypothese, dass CD33 zudem auf den leukämischen Stammzellen einiger AML-Subtypen exprimiert wird [5, 33]. So konnten AML-Zellen, die mit AMG 330 und T-Zellen inkubiert wurden, nach Injektion in Mäuse keine AML-Erkrankung mehr auslösen [34]. Somit hat CD33 als Zielantigen großes Potential, da durch die Eradikation der CD33⁺ leukämischen Stammzellen Rezidive verhindert werden könnten [5].

Ein weiteres Kriterium ist die Expression auf physiologischen Zellen. Gesunde hämatopoetische Stammzellen exprimieren CD33 im Vergleich signifikant geringer. Die *in vitro* Exposition von Knochenmarksproben gesunder Spender gegenüber hohen Dosen von AMG 330 hatte dementsprechend keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung der Progenitorzellen [33, 35].

Aufgrund der CD33-Expression auf Granulozyten, Monozyten und Makrophagen könnte jedoch insbesondere eine langfristige AMG 330-Exposition zu Komplikationen, wie beispielsweise einer erhöhten Infektanfälligkeit, führen [36, 37].

Die Wirksamkeit von AMG 330 wurde in mehreren präklinischen Studien evaluiert. *In vitro* Experimente mit AML-Zelllinien und primären Patientenproben zeigten eine effektive Rekrutierung sowie Aktivierung von T-Zellen, die zur Lyse der AML-Zellen führten. Dabei konnten sowohl allogene T-Zellen gesunder Spender als auch die autogenen T-Zellen der Patienten durch AMG 330 aktiviert werden. Die Kinetik der Lyse wurde durch die Konzentration von AMG 330, die Intensität der CD33-Expression und das Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen (E:T Ratio) beeinflusst. Durch eine Verlängerung der Expositionszeit mit AMG 330 auf bis zu 36 Tage konnte jedoch unabhängig von diesen Faktoren eine hohe Lyse erreicht werden. Lediglich bei Proben mit sehr geringer E:T Ratio (< 1:80) konnte keine Lyse festgestellt werden [33, 38, 39].

Seit 2015 wird die Sicherheit, Verträglichkeit und adäquate Dosierung von AMG 330 in einer klinischen Phase-I-Studie (NCT02520427) bei Patienten mit r/r AML untersucht. Bislang sprachen acht von 42 Patienten auf die Therapie an. Vier dieser Patienten wiesen ein ungünstiges genetisches Risikoprofil auf und bei drei Patienten hatten zuvor vier oder mehr alternative Therapien versagt [40, 41].

Die Gründe für das fehlende Ansprechen der anderen Patienten sind allerdings bislang nicht geklärt. Aus Abbildung 3 geht hervor, dass viele dieser Patienten eine relativ geringe Dosis AMG 330 erhielten. Diese wurde im Verlauf der Studie weiter gesteigert, doch auch Patienten mit höheren Dosen zeigten eine Progression der AML [40].

Bindungsdomäne, einer Oligomerisierungs- sowie einer Regulationsdomäne am C-Terminus zusammen [46].

Unter Normalbedingungen übt p53 in der Zelle keinen Effekt aus, da es nur in sehr geringen Mengen vorliegt. Durch die E3-Ubiquitin-Protein-Ligase „murine double minute 2“ (Mdm2) wird der kontinuierliche proteasomale Abbau von p53 gefördert. Zudem kann Mdm2 über die Blockade der N-terminalen Transaktivierungsdomäne und den Export von p53 aus dem Nukleus dessen Funktion als Transkriptionsfaktor direkt hemmen [47, 48, 49].

Wird die Zelle allerdings in einen Stresszustand versetzt, kommt es über posttranslationale Modifikationen sowie direkte Proteininteraktionen zur Aktivierung von p53 und zur Hemmung von Mdm2. Es gibt zahlreiche Ursachen zellulären Stresses, wie beispielsweise DNA-Schäden, Mangel an Sauerstoff oder Nährstoffen sowie übermäßige Wachstumssignale aufgrund deregulierter Onkogene [45, 50].

In Folge dieser Auslöser akkumuliert somit aktiviertes p53-Protein und steuert die Stressreaktion der Zelle. Im Mittelpunkt stehen dabei die drei Haupteffekte von p53. Über die Transkription, unter anderem des p21 kodierenden *CDKN1A*-Gens, wird ein potenziell reversibler Zellzyklusarrest in der G1- oder G2-Phase ausgelöst, um der Zelle die Reparatur der DNA-Schäden zu ermöglichen [51, 52]. Dieser Arrest kann auch langfristig als sogenannte Seneszenz bestehen bleiben [53]. Des Weiteren kann p53 über die Induktion pro-apoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie, wie „P53-Upregulated Modulator Of Apoptosis“ (PUMA), „NADPH-Oxidase-Aktivator“ (NOXA), „BH3-interacting domain death agonist“ (Bid) und „BCL2 Associated X“ (Bax), zur Apoptose der Zelle führen [54, 55, 56].

p53 wurde daher auch als „guardian of the genome“¹ [57] bezeichnet, da es durch die Ermöglichung der DNA-Reparatur oder alternativ der Elimination von mutierten Zellen verhindert, dass bereits geschädigte Zellen weitere Mutationen akkumulieren oder unkontrolliert proliferieren. In den letzten Jahren zeigte sich jedoch, dass p53 weitaus mehr Zielgene aktiviert und komplexe Funktionen steuert (siehe Abbildung 4). Neben Zellzyklusarrest und Apoptose trägt es über diverse Mechanismen zur genomischen Stabilität bei und ist unter anderem an Autophagie, Metabolismus sowie der Interaktion mit dem Immunsystem beteiligt. Diese Signalwege sind zudem stark miteinander verknüpft. Es ist noch nicht abschließend geklärt, durch welche Mechanismen bestimmt wird, welche zellulären Abläufe aktiviert werden. Die durch p53 vermittelte Reaktion variiert abhängig von Art und Intensität des Stressauslösers, Zelltyp und aktuellem Zellzustand. Dies erlaubt eine differenzierte und dynamische Antwort auf die akuten Bedingungen und fördert die Wiederherstellung der Homöostase [45, 58].

¹ Wächter des Genoms (Übersetzung der Verfasserin)

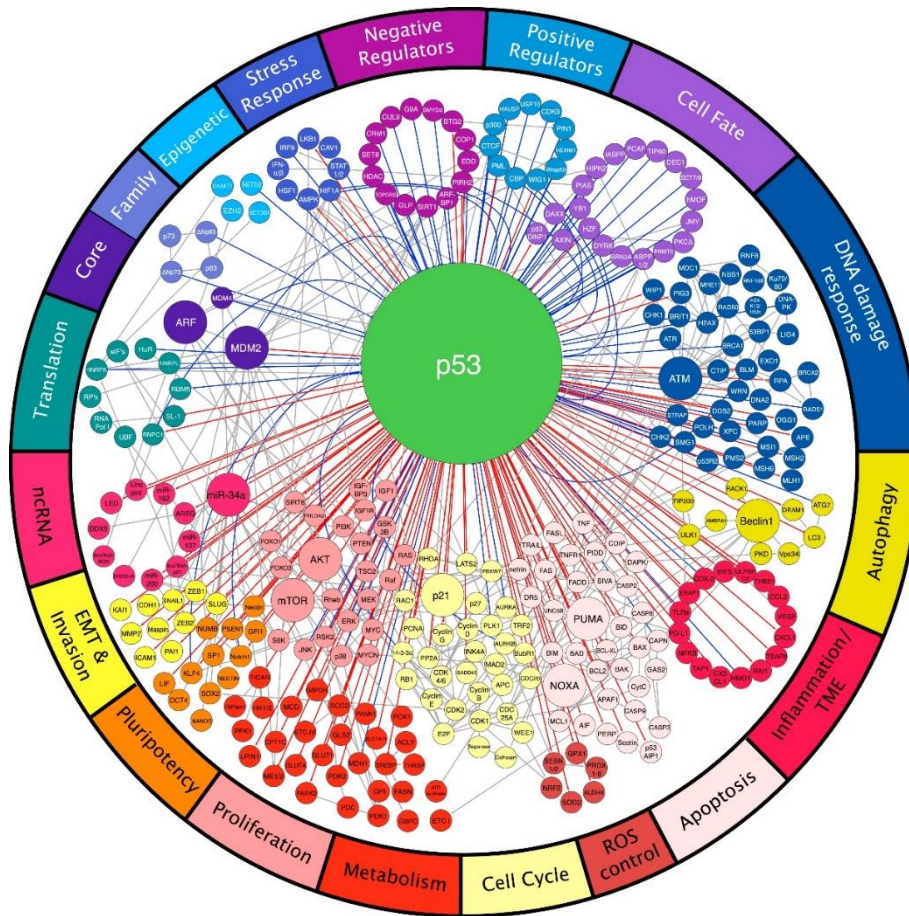


Abbildung 4: Das p53-Netzwerk [58]

Aufgrund dieser zentralen Steuerfunktion des p53-Proteins über zahlreiche zelluläre Kontrollprozesse wird ersichtlich, dass sein Verlust einen entscheidenden Schritt für die Tumorentstehung darstellt [45].

1.4.2 Funktionsverlust von p53

Die Wirkung von p53 kann auf vielfältige Weise beeinträchtigt oder komplett aufgehoben werden.

Der Hauptmechanismus ist die Mutation des *TP53*-Gens. Es ist das am häufigsten mutierte Gen in Tumoren generell. Die Prävalenz variiert abhängig von der Tumorentität zwischen 5 % und über 80 % [43, 59].

Es treten verschiedene Mutationstypen des *TP53*-Gens auf. In den meisten Fällen handelt es sich um Missense-Mutationen im Bereich der DNA-Bindungsdomäne in Kombination mit einer Deletion des zweiten Allels auf Chromosom 17. Dies führt zur Dysfunktion des Wildtyp-p53 als Transkriptionsfaktor und fördert, insbesondere durch die verminderte Induktion von Zyklusarrest und Apoptose, die Tumorentstehung [60, 61].

Des Weiteren können einige Formen des mutierten p53-Proteins zusätzliche negative Effekte auf die Zelle ausüben. Mutiertes p53 kann die Transkription neuer Zielgene aktivieren, die zur gesteigerten Proliferation, Apoptoseresistenz und Invasivität führen [62, 63]. Alternativ kann es durch Amplifikation des *MDM-2* Gens zum übermäßigen Mdm2 vermittelten Abbau von p53 kommen [64].

Die Mutation von *TP53* ist in vielen Tumorentitäten mit einer schlechten Prognose assoziiert [43]. Zudem konnte eine erhöhte Resistenz gegen Strahlentherapie sowie zahlreiche Chemotherapeutika gezeigt werden [44, 65].

1.4.3 Rolle des p53-Funktionsverlustes in der AML

Im Rahmen der Hämatopoese verhindert p53 die Selbsterneuerung von Stammzellen mit DNA-Schäden. Der Verlust von p53 kann zur deregulierten Proliferation und malignen Transformation der hämatopoetischen Stammzellen führen und somit das Risiko für das Auftreten einer AML deutlich erhöhen [66, 67].

Paradoxerweise weist die AML im Vergleich zu soliden Tumoren eine niedrige Prävalenz der *TP53*-Mutation von 5-10 % auf. Die Prävalenz steigt allerdings bei Patienten älter als 60 Jahre auf 10-20 % an [68].

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass in einem großen Anteil an AML-Fällen mit Wildtyp-p53 erhöhte Mdm2-Level vorliegen. Ursächlich ist die Überexpression des *MDM2* -Gens oder erniedrigte Expression des Mdm2-Inhibitors p14ARF. Somit liegt die Rate der AML-Fälle mit Funktionsverlust von p53 deutlich höher als die Rate der *TP53*-Mutation [69, 70].

Die Dysfunktion von p53 ist mit einem komplexen Karyotyp sowie einer signifikant schlechteren Prognose assoziiert (siehe Abbildung 5A)[69, 71]. Seit 2017 werden Patienten mit mutiertem *TP53* daher in der ELN-Klassifikation in die ungünstige Risikogruppe eingeteilt [8]. Patienten mit Mutation oder Deletion von *TP53* haben eine signifikant kürzere Überlebenszeit von 6 Monaten im Vergleich zu Patienten mit Wildtyp-p53 mit einer mittleren Überlebenszeit von 36 Monaten [72].

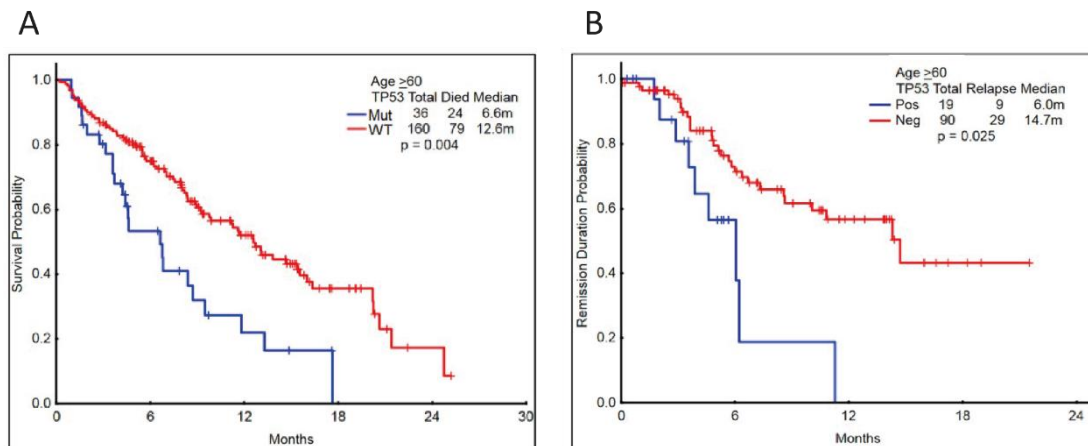


Abbildung 5: Negative Auswirkung der *TP53*-Mutation auf die Prognose der AML

Adaptiert von [73]

- (A) Überlebenswahrscheinlichkeit von AML-Patienten mit *TP53*-Mutation oder -Wildtyp
- (B) Remissionsdauerwahrscheinlichkeit von AML-Patienten mit *TP53*-Mutation oder -Wildtyp nach Chemotherapie

Dies ist unter anderem durch die erhöhte Resistenz der AML mit *TP53*-Mutation gegen Chemotherapie begründet. Die Patienten haben unabhängig von ihrem Alter und Art der Chemotherapie eine geringere Remissionsrate (CR-Rate *TP53*-Mutation vs. *TP53*-Wildtyp: 41 % vs. 57 %) und -dauer (siehe Abbildung 5B)[73]. Zudem konnte gezeigt werden, dass die therapieassoziierte AML, die nach Chemotherapie einer anderen malignen Erkrankung auftritt, eine erhöhte Prävalenz der *TP53*-Mutation von 33 % hat. Es wird vermutet, dass bereits vorhandene AML-Klone mit *TP53*-Mutation aufgrund ihrer Resistenz selektiert werden [74].

Des Weiteren zeigte sich auch bei Therapie mit allogener Stammzelltransplantation eine schlechtere Prognose bei *TP53*-Mutation. Die Patienten hatten eine signifikant kürzere Überlebenszeit (3-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit *TP53*-Mutation vs. *TP53*-Wildtyp: 10 % vs. 33,1 %) und erhöhte Rezidivraten (3-Jahres-Rückfallraten *TP53*-Mutation vs. *TP53*-Wildtyp: 60 % vs. 42,2 %) [75, 76].

Zusammenfassend führt der Verlust von p53 in der AML zum verminderten Ansprechen sowohl auf Chemotherapie als auch Stammzelltransplantation und ist somit ein aussichtsreicher Kandidat als Resistenzmechanismus gegen AMG 330.

1.5 Zielsetzung

Die AML ist trotz bestehender Therapieformen mit einer hohen Letalität und kurzen Überlebenszeit verbunden. Insbesondere für den hohen Anteil an älteren, unfitten Patienten besteht die Notwendigkeit für neue Therapieoptionen. Der BiTE AMG 330 stellt einen vielversprechenden immuntherapeutischen Ansatz dar. AMG 330 wird in einer Phase-I-Studie (NCT02520427) bei Patienten mit r/r AML untersucht und bei sieben von 42 Patienten konnte eine Remission erreicht werden. Die Ursachen für das fehlende Ansprechen der anderen Patienten sind bislang jedoch unzureichend geklärt. Die Beeinträchtigung der p53-Funktion ist mit einer ausgesprochen schlechten Prognose der AML assoziiert sowie als negativer Einflussfaktor im Rahmen von Chemotherapien und allogener Stammzelltransplantation vorbekannt.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, den Verlust der p53-Funktion als einen potenziellen Resistenzmechanismus der AML gegen AMG 330 zu evaluieren.

Dazu werden drei AML-Zelllinien mit Wildtyp-p53 mit den entsprechenden p53-Knockdown Zelllinien verglichen. In Cokulturen der AML-Zelllinien und T-Zellen gesunder Spender werden die AMG 330 vermittelte spezifische Lyse der AML-Zellen, die Proliferation der T-Zellen sowie die Zytokinproduktion analysiert. Zur Differenzierung der Vermittlung des Resistenzmechanismus wird der Einfluss des p53-Knockdowns auf das Oberflächenexpressionsprofil sowie Sekretom der AML-Zellen untersucht.

Diese Arbeit soll eine Grundlage für die weitere Evaluation einer vom p53-Status abhängigen Resistenz gegen AMG 330 im klinischen Kontext bieten, damit langfristig die Therapie mit AMG 330 gezielt für Patienten mit bestmöglichem Nutzen-Risiko-Verhältnis ausgewählt werden kann.

2. Material

2.1 Zelllinien

Für die Versuchsdurchführungen wurden die Zelllinien MV4-11 N/C, MV4-11 K/D, Molm-13 N/C, Molm-13 K/D, OCI-AML3 N/C und OCI-AML3 K/D verwendet.

Diese Zelllinien wurden freundlicherweise im Rahmen einer Kooperation von Michael Andreeff, M.D., Ph.D, des MD Anderson Cancer Centers, Houston, Texas zur Verfügung gestellt. Sie leiten sich von den AML-Zelllinien MV4-11, Molm-13 und OCI-AML3 ab, die das *TP53*-Wildtyp-Gen exprimieren.

Weitere zentrale Eigenschaften der Zelllinien sind in Tabelle 3 aufgelistet. Die Expression von *TP53* wurde mithilfe eines lentiviralen Vektors und short hairpin RNA (shRNA) inhibiert [77]. Die daraus entstandenen sogenannten p53-Knockdown (kd) Zelllinien wurden mit der Endung K/D versehen und die p53-Wildtyp (wt) Zelllinien mit der Endung N/C.

Des Weiteren wurde die murine pro-B-Zelllinie Ba/F3 verwendet, die mit humanem CD33 und CD86 transduziert wurde. Die Vektoren zur Generierung dieser Zelllinie wurden freundlicherweise im Rahmen einer Kooperation von Prof. Dr. med. Karsten Spiekermann der Medizinischen Klinik und Poliklinik III der Universität München zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3: Charakterisierung der AML-Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Zytogenetik	Molekulargenetik	CD-Expression
MV4-11 [78]	Zehnjähriger Junge mit biphenotypischer B-myelomonozytischer Leukämie	48, XY, t(4;11)(q21;q23), +8, +19	FLT3-ITD [79]	CD4 ⁺ CD10 ⁻ CD15 ⁺ CD33 ⁺
Molm-13 [80]	20-jähriger Mann mit Rezidiv einer AML FAB M5a nach initialem MDS (RAEB)	humaner hyperdiploider Karyotyp mit 4 % Polyploidie 51(48-52)<2n>XY, +8, +8, +8, +13, del(8)(p1?p2?), ins(11;9) (q23;p22p23) Nebenlinie idem, +19	KMT2A-MLLT3 (MLL-MLLT3; MLL-AF9) Fusion; FLT3-ITD; CBL deltaExon8 Mutation	CD3 ⁻ CD4 ⁺ CD13 ⁽⁺⁾ CD14 ⁻ CD15 ⁺ CD19 ⁻ CD33 ⁺ CD34 ⁻ cyCD68 ⁺
OCI-AML3 [81]	57-jähriger Mann mit Erstdiagnose AML FAB M4	humaner hyperdiploider Karyotyp 48(45-50)<2n>X/XY, +1, +5, +8, der(1)t(1;18)(p11;q11), i(5p), del(13)(q13q21), dup(17)(q21q25) Nebenlinie r(Y)x1-2 - hemizygot für RB1	NPM1 Mutation Typ A; DNMT3A R882C Mutation	CD3 ⁻ CD4 ⁺ CD13 ⁺ CD14 ⁻ CD15 ⁺ CD19 ⁻ cyCD68 ⁺

2.2 Spenderblut

Das verwendete Blut wurde von gesunden Probanden gespendet. Die Spender erklärten vor der Blutentnahme ihr Einverständnis. Es wurden pro Spender maximal 300 ml Blut im Abstand von mindestens drei Monaten entnommen. Ausschlusskriterien für die Spende waren bekannte hämatologische oder onkologische Erkrankungen.

2.3 BiTEs

Die BiTEs AMG 330 und cBiTE wurden von der AMGEN Research GmbH, München, Deutschland bezogen. Bei cBiTE handelt es sich um ein Kontroll-Antikörperkonstrukt, das statt an CD33 spezifisch an ein Herbizid bindet und ansonsten einen identischen Aufbau zu AMG 330 hat.

2.4 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Alle Antikörper sind spezifisch für humane Antigene.

Tabelle 4: Antikörper für die Durchflusszytometrie

Spezifität	Fluoreszenzfarbstoff	Klon	Katalognr.	Hersteller
CD2	Brilliant Violet 421 (BV421)	TS1/8	309218	BioLegend, SanDiego, CA, USA
CD33	Allophycocyanin (APC)	WM53	303408	BioLegend, SanDiego, CA, USA
CD33	Peridininchlorophyllprotein/ Cyanin 5.5 (PerCP/Cy5.5)	WM53	303414	BioLegend, SanDiego, CA, USA
CD33	Phycoerythrin (PE)-Cyanin 7	WM53	25-0338-42	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
CD80	Fluorescein Isothiocyanat (FITC)	2D10	305206	BioLegend, SanDiego, CA, USA
CD86	FITC	2331 (FUN-1)	555657	BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA
CD86	PE	IT2.2	305406	BioLegend, SanDiego, CA, USA
CD112	PE	TX31	337410	BioLegend, SanDiego, CA, USA
CD252	PE	Ik.1	558164	BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA
CD274	APC	MIH1	7-5983-42	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

CD366	BV421	F38-2E2	345008	BioLegend, SanDiego, CA, USA
IgG1k Isotyp	APC	MOPC-21	400120	BioLegend, SanDiego, CA, USA
IgG1k Isotyp	BV421	MOPC-21	400158	BioLegend, SanDiego, CA, USA
IgG1k Isotyp	FITC	MOPC-21	400108	BioLegend, SanDiego, CA, USA
IgG1k Isotyp	PE	MOPC-21	400112	BioLegend, SanDiego, CA, USA
IgG1k Isotyp	PerCP/Cy5.5	MOPC-21	400150	BioLegend, SanDiego, CA, USA

2.5 Fluoreszenzfarbstoffe

Tabelle 5: Fluoreszenzfarbstoffe

Farbstoff	Anregung/Emission	Hersteller
CellTrace™ Carboxyfluorescein Succinimidylester (CFSE)	492/517 nm	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
CellTrace™ Far Red	630/661 nm	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain	367/526 nm	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.6 Zytokine

Tabelle 6: Zytokine

Zytokin	Produktbezeichnung	Hersteller
Interferon (IFN)- γ	Recombinant Human IFN- γ	PeproTech, Inc., Rocky Hill, NJ, USA
IL-2	Recombinant Human IL-2	R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA
Tumornekrosefaktor (TNF)- α	Recombinant Human TNF- α	PeproTech, Inc., Rocky Hill, NJ, USA

2.7 Kits

Tabelle 7: Kits

Funktion	Produktbezeichnung	Hersteller
Isolierung CD3 ⁺ T-Zellen aus PBMCs	EasySep™ Human T Cell Isolation Kit	STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, BC, Canada
Mykoplasmen Test	MycoAlert™ PLUS	Lonza Group, Basel, Schweiz
Stimulationsbeads CD3/CD28	Dynabeads® CD3/CD28	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zytokinanalyse	Cytometric Bead Array Human Th1/Th2 Cytokine Kit II	BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA

2.8 Zellkultur-Chemikalien

Im Folgenden werden zunächst die Ausgangsmaterialien und anschließend die Zusammensetzung der daraus selbst hergestellten Medien und Puffer für die Zellkultur aufgelistet.

Tabelle 8: Zellkultur-Chemikalien

Ausgangsmaterial	Produktbezeichnung	Hersteller
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonat (HEPES)	HEPES Buffer Solution (1 M)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Antibiotischer Zusatz für Zellkulturmedien	Penicillin-Streptomycin-Glutamin (100X)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	MACS BSA Stock Solution	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Dimethylsulfoxid	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	UltraPure™ 0.5M EDTA, pH 8.0	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Fetales Kälberserum (FKS), hitze-inaktiviert	Heat-Inactivated Fetal Bovine Serum	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Formaldehyd	Formaldehydlösung 37 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS), P04-36500	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Serumfreies Medium	UltraCULTURE™	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
Zellkulturmedium	Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, P04-16500	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland

Tabelle 9: Zellkultur Medien und Puffer

Medium, Puffer	Zusammensetzung
Ba/F3-Medium	RPMI 1640 1 % Pen/Strep/L-Glutamin 10 % FKS 10 % WEHI-Zellkultur Überstand
Fluorescence activated cell sorting (FACS)-Puffer	DPBS 1 % BSA 2 mM EDTA
FACS-FIX	FACS-Puffer 5 % Formaldehyd-Lösung (37 %ig)
Medium für Kryokonservierung	FKS 10 % DMSO
Serumfreies Medium	UltraCULTURE™ 1 % HEPES 1 % Pen/Strep/L-Glutamin
Zelllinien-Kulturmedium (R10)	RPMI 1640 1 % HEPES 1 % Pen/Strep/L-Glutamin 10 % FKS

2.9 Western Blot-Chemikalien

Im Folgenden werden zunächst die Ausgangsmaterialien und anschließend die Zusammensetzung der daraus selbst hergestellten Puffer und Gele für den Western Blot aufgelistet.

Tabelle 10: Western Blot-Chemikalien

Ausgangsmaterial	Produktbezeichnung	Hersteller
2-Mercaptoethanol	2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
30 %ige Acrylamid-Lösung	ROTIPHORESE® NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Anti-Maus-IgGk HRP-konjugierter Antikörper	m-IgGk BP-HRP Katalognr: sc-516102	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
Anti-p53 Maus-Antikörper	p53-Antikörper (DO-1) Katalognr: sc-126	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
APS	Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Bromphenolblau	Bromphenolblau Natriumsalz	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Glycerin ROTIPURAN®	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Glycin	Glycin PUFFERAN®	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
HCl	Salzsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Horseradish peroxidase (HRP) Substrat	Immobilon ECL Ultra Western HRP Substrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Methanol	Methanol ROTIPURAN®	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
MG132	MG132	Selleck Chemicals, München, Deutschland
Milchpulver	Milchpulver, Blotting Grade	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
NaCl	Sodium Chlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Radioimmunoprecipitation assay (RIPA) Puffer	Pierce™ RIPA Buffer	Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
SDS	SDS ultra pure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
TEMED	TEMED	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
TRIS	TRIS PUFFERAN®	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
TWEEN 20	TWEEN 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Tabelle 11: Western Blot Puffer und Gele

Puffer und Gele	Zusammensetzung
Lade-Puffer (2x Laemmli Puffer) pH 6,8	4 % SDS 10 % 2-Mercaptoethanol 20 % Glycerol 0,004 % Bromophenolblau 0,125 M Tris-HCl
Lauf-Puffer	25 mM Tris 190 mM Glycin 0,1 % SDS
SDS-PAGE Ladegel	5,5 ml Wasser 1,7 ml 30 %ige Acrylamid-Lösung 2,6 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) 0,1 ml 10 %iges SDS 0,1 ml 10 %iges APS 0,01 ml TEMED

SDS-PAGE Trenngel	20 ml Wasser 16,5 ml 30 %ige Acrylamid-Lösung 12,5 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) 0,5 ml 10 %iges SDS 0,5 ml 10 %iges APS 0,02 ml TEMED
Transfer-Puffer	5 mM Tris 190 mM Glycin 20 % Methanol
Tris-buffered saline with Tween 20 (TBST) buffer	20 mM Tris (pH 7,5) 150 mM NaCl 0,1 % Tween 20

2.10 Weitere Chemikalien

Tabelle 12: Weitere Chemikalien

Chemikalie	Produktbezeichnung	Hersteller
Heparin	Heparin-Natrium-25000-ratiopharm®	ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Separationslösung für Dichtegradientenzentrifugation	Biocoll Separating Solution	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Trypanblau	Trypanblau 0,4 %	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.11 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 13: Verbrauchsmaterialien

Material	Produktbezeichnung	Hersteller
Blutentnahmekanüle	Safety-Multifly®-Kanüle	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
FACS-Röhrchen 5 ml	Falcon Rundboden-Polystyrolröhrchen	Corning, Corning, USA
Kryoröhrchen 1,8 ml	Cryogenic Vials	STARLAB INTERNATIONAL GmbH, Hamburg, Deutschland
Pasteurpipette	Einweg Transferpipetten	VWR International, Radnor, PA, USA
Pipettenspitzen	TipOne®	STARLAB INTERNATIONAL GmbH, Hamburg, Deutschland
Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran	Amersham Hybond-P	GE Healthcare, Chicago, IL, USA
Reaktionsgefäß 2 ml	Safe-Lock Tube	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Serologische Pipette	Costar® Stripette®	Corning, Corning, USA
Spritzen 50 ml	Original-Perfusor®-Spritze	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Zählkammer	Countess™ Cell Counting Chamber Slides	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zellkulturflasche 75 ml	Falcon® Zellkulturflasche	Corning, Corning, USA
Zellkultureinsatz/Transwell, 3,0 µm Porendurchmesser	24 Well ThinCert™ Zellkultur Einsatz, transparente PET-Membran	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturplatte 96 Well-Rundbodenplatte 6/12/24/48-Flachbodenplatte	Falcon® Zellkulturplatte	Corning, Corning, USA
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Centrifuge Tube	Corning, Corning, USA

2.12 Geräte

Tabelle 14: Geräte

Gerät	Produktbezeichnung	Hersteller
Akku-betriebene Pipettierhilfe	pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Automatisierter Zellzähler	Countess™ II	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Chemolumineszenz Imager	Amersham™ Imager 600	GE Healthcare, Chicago, IL, USA
Durchflusszytometer	CytoFLEX S	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Elektrophorese Kammer	Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Inkubator	Model CB150	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Kryobox	Mr. Frosty™ Gefrierbehälter	Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Mikrozentrifuge	Centrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipette	Eppendorf Research® plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sicherheitswerkbank	Safe 2020	Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Wasserbad	VWB 12	VWR International, Radnor, PA, USA
Zentrifuge	Rotina 420R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland

2.13 Softwareprogramme

Die Datenanalyse der Durchflusszytometrie erfolgte mithilfe von FlowJo™ Software-Version 10 von Becton, Dickinson and Company, Ashland, USA.

Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe von GraphPad Prism version 8.1.2 von GraphPad Software, La Jolla California, USA.

3. Methoden

3.1 Zellkultur

Die Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen mit einer Oberfläche von 75 cm² in 20 ml Medium kultiviert und alle drei Tage gesplittet.

Tabelle 15: Kulturbedingungen der Zelllinien

Zelllinie	Kulturmedium	Split-Verhältnis	Zelldichte
MV4-11 N/C, MV4-11 K/D	R10	1:4	0,2-1,0 x 10 ⁶ /ml
Molm-13 N/C, Molm-13 K/D	R10	1:10	0,4-2,0 x 10 ⁶ /ml
OCI-AML3 N/C, OCI-AML3 K/D	R10	1:10	0,5-2,0 x 10 ⁶ /ml
Ba/F3	R10 10 % WEHI	1:20	< 2,0 x 10 ⁶ /ml

In den Inkubatoren herrschte eine Temperatur von 37°C mit 5 %iger CO₂-Atmosphäre und 95 %iger Luftfeuchtigkeit. Die Zelllinien wurden monatlich mithilfe des MycoAlert™ PLUS Test-Kits gemäß dem Protokoll des Herstellers auf eine Kontamination mit Mykoplasmen getestet.

3.2 Bestimmung der Zellkonzentration

Es wurden 20 µl der Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau vermischt und in eine Zählkammer pipettiert. Die Konzentration wurde mit dem automatischen Zellzähler Countess™ II gemessen.

3.3 Blutentnahme bei gesunden Spendern

Vor der Blutentnahme wurden 50 ml Spritzen mit je 150 µl Heparin benetzt. Die Blutentnahme erfolgte aus den Venen der Armbeuge. Der Punktionsbereich wurde fachgerecht desinfiziert und das Blut mithilfe einer Butterflykanüle und den 50 ml Spritzen entnommen. Das Blut wurde direkt zur Isolierung der peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) weiterverwendet.

3.4 Isolierung von PBMCs aus Vollblut

Zu den PBMCs gehören Lymphozyten, Monozyten sowie myeloische Vorläuferzellen. Sie können mit dem Verfahren der Dichtegradientenzentrifugation von den restlichen Bestandteilen des Blutes getrennt werden. Dazu wird das Vollblut gemeinsam mit Biocoll-Lösung zentrifugiert. Diese Lösung enthält das Polymer Polysucrose und hat eine Dichte von 1,077 g/ml. Da PBMCs eine geringere Dichte haben, bilden sie durch die Zentrifugation eine Schicht auf der Biocoll-Lösung und können isoliert aspiriert werden [82].

Das frisch entnommene, heparinisierte Blut wurde im Verhältnis 1:1 mit DPBS verdünnt. In 50 ml Falcons wurden je 15 ml Biocoll-Lösung vorgelegt. Anschließend wurden sehr langsam 25 ml der Blutlösung zugegeben, sodass sie eine Schicht auf der Biocoll-Lösung bildete, ohne sich mit dieser zu vermischen. Die Falcons wurden bei Raumtemperatur für 30 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Beim Anfahren der Zentrifuge wurde die Drehzahl nur langsam erhöht und das Auslaufen erfolgte ohne Bremsen. Die PBMC-Schicht wurde mit einer Pasteurpipette aspiriert. Diese Zellsuspension wurde mit DPBS in 50 ml Falcons in einem Verhältnis von 1:1 verdünnt und bei 1800 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und die Zellen wurden in 50 ml DPBS resuspendiert und erneut für 5 Minuten bei 550 rpm zentrifugiert. Anschließend konnten die Zellen für Experimente eingesetzt oder für den späteren Gebrauch kryokonserviert werden.

3.5 Kryokonservierung und Auftauen von PBMCs

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen in einem Einfriermedium, bestehend aus 90 % FKS und 10 % DMSO, suspendiert. Je Kryoröhrchen wurden 1,5 ml Lösung mit $1-2 \times 10^7$ Zellen in einer Mr. Frosty Box bei -80°C eingefroren. Nach 12 Stunden konnten die Kryoröhrchen in eine Kühltruhe mit -150°C transferiert werden. Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen aus der Kühlung entnommen und direkt in einem 37°C Wasserbad erwärmt. Sobald die Zelllösung aufgetaut war, wurde sie in ein 50 ml Falcon mit 20 ml auf 37°C erwärmtem R10 Medium übertragen.

3.6 Isolierung von T-Zellen aus PBMCs

Die Isolation von CD3^+ T-Zellen aus PBMCs per immunomagnetischer negativer Selektion erfolgte mithilfe des EasySep™ Human T Cell Isolation Kits gemäß dem Protokoll des Herstellers.

3.7 Stimulation der T-Zellen

Die T-Zellen wurden im Verhältnis 2:1 mit Dynabeads® CD3/CD28 stimuliert. Diese Eisenoxid-Beads sind kovalent an anti-CD3- und anti-CD28-Antikörper gebunden. Die Beads wurden vor der Antikörperfärbung mittels Magnetdepletion entfernt. Des Weiteren wurden 30 U/ml rekombinantes IL-2 zugegeben.

3.8 Durchflusszytometrie

Die Auswertung der Experimente erfolgte hauptsächlich per Durchflusszytometrie. Bei diesem Verfahren passieren Zellen einzeln einen Laser, sodass durch die Beugung und Brechung des Lichtes das Volumen und die Granularität der Zellen unterschieden werden können.

Des Weiteren können die Zellen mit im Folgenden beschriebenen Methoden mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Diese werden durch den Laser angeregt und emittieren höherwelliges Licht. Die Detektion des emittierten Lichtes erlaubt die Differenzierung zwischen gefärbten und ungefärbten Zellen.

3.8.1 Analyse der Expression von Oberflächenantigenen

Das Expressionsmuster der Zellen kann mithilfe von Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern, die spezifisch an Oberflächenantigene binden, bestimmt werden. Deren Fluoreszenzintensität kann zusätzlich durch die Färbung einer Kontrollprobe mit den entsprechenden Isotyp-Antikörpern, mit der Fluoreszenz durch unspezifische Bindung des Fc-Teils verglichen werden (siehe Abbildung 6A).

Vor der Färbung wurden die Proben zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 50 µl Färbelösung resuspendiert. Diese wurde aus FACS-Puffer und den für das jeweilige Experiment benötigten Antikörpern hergestellt. Nach 20 Minuten Inkubation bei 4°C wurden die Zellen erneut mit FACS-Puffer gewaschen und in 200 µl FACS-Fix fixiert.

3.8.2 Differenzierung von vitalen und toten Zellen

Vitale und tote Zellen können per Färbung mit LIVE/DEAD® Fixable Aqua Dead Cell Stain unterschieden werden. Dieser Farbstoff bindet kovalent an Amine im Inneren und an der Oberfläche von toten Zellen. Bei vitalen Zellen mit einer intakten Membran kann der Farbstoff nur an der Oberfläche binden, und die Fluoreszenzintensität ist deutlich niedriger.

Diese Färbung wurde bei sämtlichen Versuchen, die per Durchflusszytometrie ausgewertet wurden, angewendet. Sie erfolgte parallel zur Färbung der Oberflächenantigene durch Zugabe von LIVE/DEAD® Fixable Aqua Dead Cell Stain zur Färbelösung.

3.8.3 Evaluation der Zellproliferation

Die T-Zellen wurden entweder mit CellTrace™ CFSE oder Far Red gefärbt. Diese Farbstoffe binden kovalent an Aminogruppen intrazellulärer Proteine und werden bei jeder Zellteilung gleichmäßig auf die beiden Tochterzellen aufgeteilt. Die Proliferation kann anhand der Abnahme der Fluoreszenz im Vergleich zu unstimulierten T-Zellen, die sich nicht teilen, quantifiziert werden (siehe Abbildung 6B).

Für die Färbung mit CFSE wurden $1,0 \times 10^6$ T-Zellen in $0,5 \mu\text{l}$ CFSE und $4,0 \text{ ml}$ DPBS mit $0,1 \%$ BSA resuspendiert und 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 11 ml eisgekühltes R10 hinzugegeben und die Lösung für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden dreimal mit kaltem R10 gewaschen und konnten anschließend für Experimente verwendet werden.

Für die Färbung mit CellTrace™ Far Red wurden $1,0 \times 10^6$ T-Zellen in $1 \mu\text{l}$ CellTrace™ Far Red und $999 \mu\text{l}$ erwärmtem DPBS resuspendiert und 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 20 ml R10 hinzugegeben und die Zellsuspension erneut für 5 Minuten inkubiert.

3.8.4 Differenzierung von T- und AML-Zellen durch Gating

Verschiedene Zellpopulationen können basierend auf ihrer Lichtstreuung und Fluoreszenz unterschieden werden. Zuerst wurden per Vorwärtsstreulicht die Einzelzellen ausgewählt und durch die Fluoreszenzintensität von LIVE/DEAD® Fixable Aqua Dead Cell Stain die vitalen Zellen. Daraufhin konnten die $\text{CD}2^+$ T-Zellpopulation und die $\text{CD}33^+$ AML-Zellpopulation durch die Fluoreszenz der entsprechenden Antikörper definiert werden (siehe Abbildung 6C).

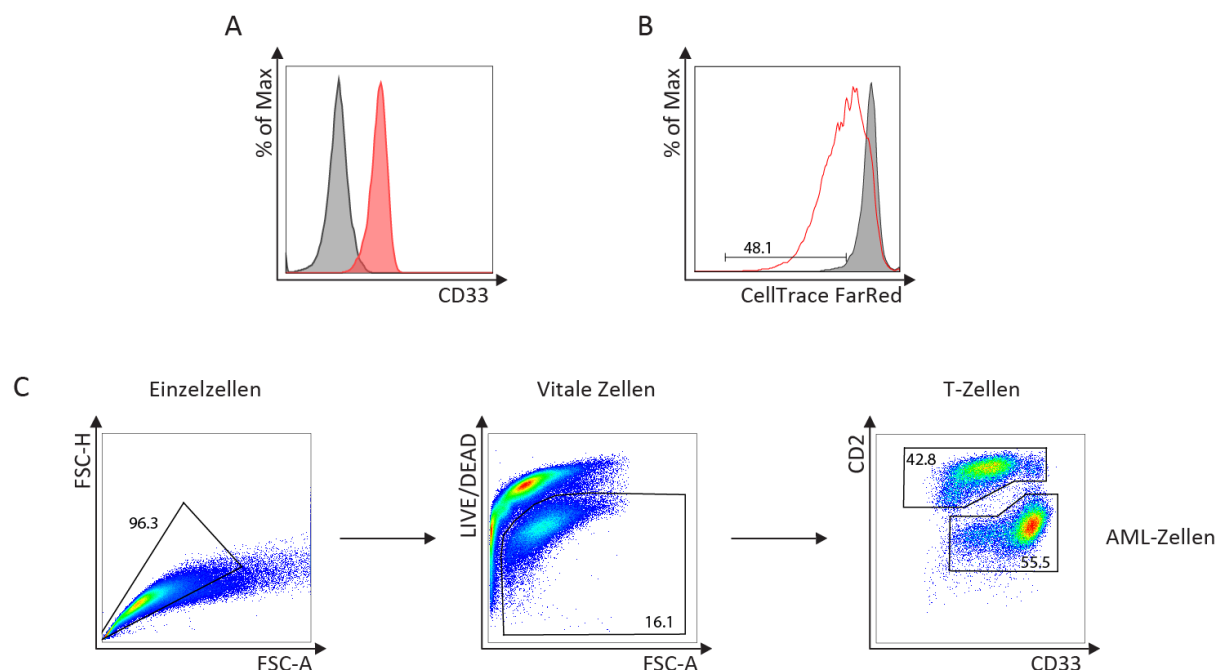


Abbildung 6: Analyse der Zellen mittels Durchflusszytometrie

- (A) Fluoreszenzintensität eines spezifischen Anti-CD33 Antikörpers (rot) und des unspezifischen Isotyp-Antikörpers (grau)
- (B) CellTrace™ Far Red Fluoreszenz proliferierender (rot) und unstimulierter (grau) T-Zellen
- (C) Gating Abfolge zur Differenzierung von T- und AML-Zellen

3.9 Western Blot

Zur Vorbereitung des Zellmaterials für den Western Blot wurde der proteasomale Abbau von p53 durch Zugabe von M132, einem zellgängigen, reversiblen Proteasominhibitor, gehemmt.

Dazu wurden in einer 6 Well-Platte $2,0 \times 10^6$ Zellen pro Zelllinie in 2 ml R10 kultiviert. Es wurden pro Zelllinie ein Well mit $10 \mu\text{M}$ MG132 gelöst in $2 \mu\text{l}$ DMSO versetzt sowie ein Kontroll-Well mit $2 \mu\text{l}$ reinem DMSO. Die Zellsuspension wurde vier Stunden inkubiert und anschließend in einem 2 ml Reaktionsgefäß bei 4°C für 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Die Zellen wurden mit $200 \mu\text{l}$ DPBS gewaschen und ohne Überstand bei -80°C eingefroren.

Für den Western Blot wurden die Zellen mit RIPA-Puffer lysiert und das Lysat durch SDS-PAGE fraktioniert. Die Proteine wurden mithilfe der Mini-PROTEAN Tetra Cell Elektrophoresekammer entsprechend des Herstellerprotokolls auf eine PVDF-Membran übertragen. Anschließend wurde die Membran eine Stunde in 5 %iger Milchpulverlösung in TBST und danach für 12 Stunden bei 4°C mit dem primären, murinen anti-p53-Antikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran in TBST wurde sie für eine Stunde mit dem sekundären, HRP-gekoppelten anti-Maus Antikörper inkubiert. Die Membran wurde erneut dreimal gewaschen und die anschließende Chemolumineszenz-Reaktion durch Zugabe des HRP Substrates mithilfe des Amersham™ Imager 600 ausgewertet.

3.10 Bestimmung der Zellwachstumskinetik

Die Zelllinien wurden in einer Konzentration von $1,0 \times 10^5$ Zellen/ml in einer 48-Well Platte kultiviert. Die Zellzahl wurde an Tag 0 und nach 72 Stunden Inkubation per Durchflusszytometrie bestimmt.

Der Wachstumsindex wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Wachstumsindex} = \frac{N(\text{Tag 3}) - N(\text{Tag 0})}{N(\text{Tag 0})}$$

3.11 Cokultur zur Bestimmung der Lyse der AML-Zellen und T-Zell-Proliferation

T-Zellen von gesunden Spendern und AML-Zellen wurden gemeinsam mit AMG 330 oder cBiTE (jeweils 5 ng/ml) in einer 96-Well Platte kultiviert. Für jedes Replikat wurden T-Zellen desselben Spenders jeweils für die p53 wt und p53 kd AML-Zellen verwendet.

Die T-Zellen wurden zuvor mit CellTrace™ CFSE oder Far Red gefärbt und zum Vergleich der Proliferation wurden ein Negativkontrolle mit unstimulierten T-Zellen sowie eine Positivkontrolle mit stimulierten T-Zellen durchgeführt.

Pro Well wurden insgesamt $4,0 \times 10^5$ Zellen in 200 μ l R10 kultiviert. Das Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen (E:T Ratio), also T-Zellen zu AML-Zellen, betrug 1:6.

Die Zellen wurden zwischen drei und fünf Tagen kultiviert. Bei einer Versuchsdauer über drei Tagen wurde am dritten Tag in jedem Well die Hälfte des Mediums durch frisches Medium mit entsprechenden Mengen von AMG 330 oder cBiTE sowie, in der Positivkontrolle, IL-2 ersetzt.

Am letzten Tag des Experiments wurden die Zellen mit anti-CD2 sowie anti-CD33 Antikörpern gefärbt. Die AMG 330 vermittelte spezifische Lyse der AML-Zellen wurde durch Bestimmung der absoluten AML Zellzahlen in den Proben mit AMG330 sowie cBiTE per Durchflusszytometrie und Verwendung der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Spezifische Lyse} = 100 - \frac{\text{AML Zellen AMG 330}}{\text{AML Zellen cBiTE}} * 100$$

3.12 Cytometric Bead Array

Durch ein Cytometric Bead Array (CBA) Assay können verschiedene Zytokine im Überstand von Zellkulturen analysiert werden. Im Rahmen der Cokulturen wurden vor der Färbung der Zellen an Tag 3 100 μ l Überstand abgenommen und bei -20°C eingefroren. Die Menge der enthaltenen Zytokine TNF- α , INF- γ , IL-2, IL-4, IL-6 und IL-10 wurden später mithilfe des Cytometric Bead Array Human Th1/Th2 Cytokine Kits II gemäß dem Protokoll des Herstellers analysiert.

3.13 Expressionsprofil vor und nach Zytokinstimulation

Zur Evaluation der Expression mehrerer Oberflächenantigene wurden jeweils $3,0 \times 10^5$ AML-Zellen in 200 μ l R10 in einer 96 Well-Platte für drei Tage inkubiert. Die Zelllinien wurden entweder nicht stimuliert oder mit einem Zusatz von 5 ng/ml TNF- α sowie 500 U/ml INF- γ stimuliert. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern für CD33, CD80, CD86, CD252, CD112, CD274 und CD366 sowie eine Kontrollfärbung mit den entsprechenden unspezifischen Isotyp-Antikörpern.

Die Stärke der Antigenexpression wurde durch die Berechnung der Median Fluorescence Intensität (MFI) Ratio quantifiziert. Dafür wurde die MFI der Zellen, die mit einem spezifischen Antikörper gefärbt wurden, durch die MFI der Zellen, die mit dem Isotyp-Antikörper gefärbt wurden, dividiert. Ab einer MFI Ratio von 1,5 wurde von einer biologisch relevanten Expression des Moleküls ausgegangen.

$$\text{MFI Ratio} = \frac{\text{MFI Antikörper}}{\text{MFI Isotyp}}$$

3.14 Kultivierung von T-Zellen in Überständen einer serumfreien AML-Kultur

Zur Gewinnung der Überstände wurde $1,5 \times 10^6$ AML-Zellen in 2 ml serumfreiem UltraCULTURE Medium in einer 24 Well-Platte für drei Tage inkubiert. Die Zellsuspension wurde in FACS-Röhrchen übertragen und bei 550 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Daraufhin wurden 1,5 ml des Überstandes abgenommen. Die T-Zellen wurden mit CFSE gefärbt und wie in Abschnitt 3.7 beschrieben stimuliert. Anschließend wurden $1,0 \times 10^5$ T-Zellen in 90 % serumfreiem AML-Überstand und 10 % Serum für drei bis fünf Tage kultiviert. Als Vergleichskontrolle wurden stimulierte sowie unstimulierte T-Zellen in 90 % serumfreiem UltraCULTURE Medium und 10 % Serum inkubiert. Für jedes Replikat wurden T-Zellen desselben Spenders jeweils in Überständen der p53 wt und p53 kd AML-Zellen kultiviert. Zur Auswertung wurden die Zellen mit spezifischen Antikörpern für CD2 gefärbt.

3.15 Transwell-Experiment

Im Rahmen dieses Versuches wurden Transwell-Einsätze verwendet, deren Inhalt durch eine permeable Membran mit $3,0 \mu\text{m}$ Poren vom Haupt-Well der Zellkulturplatte getrennt ist. Dadurch wird ein direkter Zell-Zell-Kontakt zwischen den beiden Kompartimenten verhindert, und nur der Austausch von löslichen Faktoren ist möglich. In einer 24 Well-Platte wurden für drei Tage im Transwell $1,5 \times 10^6$ MV4-11-Zellen und im Haupt-Well $9,0 \times 10^4$ T-Zellen und $9,0 \times 10^5$ Ba/F3-Zellen in einer E:T Ration von 1:10 mit 5 ng/ml AMG 330 oder cBiTE kultiviert. Zum Vergleich des Transwell-Versuchs mit einer klassischen Kokultur wurden $1,8 \times 10^5$ T-Zellen in einer E:T Ratio von 1:10 mit 5 ng/ml AMG 330 oder cBiTE in einer 24 Well-Platte für drei Tage kultiviert. Die Zielzellen setzten sich in einem 1:1 Verhältnis aus $9,0 \times 10^5$ MV4-11-Zellen und $9,0 \times 10^5$ Ba/F3-Zellen zusammen.

Für jedes Replikat wurden T-Zellen desselben Spenders jeweils für die Transwell-Versuche sowie Kokulturen mit p53 wt und p53 kd MV4-11-Zellen verwendet.

Die Zellen wurden mit spezifischen Antikörpern für CD2, CD33 und CD86 gefärbt.

3.16 Statistik

Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe von GraphPad Prism. Zum Vergleich der Ergebnisse der Kokulturen, CBAs, Kultivierung der T-Zellen in AML-Zellkultur-Überständen und Transwell Experimente wurde der gepaarte Wilcoxon-Vorzeichen-Rang Test verwendet und der Mittelwert mit Standardfehler sowie Signifikanzwert p im Ergebnisteil aufgeführt. Zur statistischen Beurteilung der Wachstumskinetik und Oberflächenexpressionsprofile der AML-Zelllinien wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet und der Mittelwert mit dem Standardfehler dargestellt. Das Signifikanzniveau lag bei beiden Tests bei $p = 0,05$.

4. Ergebnisse

4.1 Validierung des p53-Knockdowns durch Western Blotting

Um den p53-Status der Zelllinien zu überprüfen, wurde ein Western Blot mit p53-spezifischen Antikörpern durchgeführt (siehe Abbildung 7).

Da die p53-Konzentration in ruhenden Zellen aufgrund des proteasomalen Abbaus sehr gering ist, wurde dieser durch Zugabe von MG132 gehemmt, um die Proteindetektion zu erleichtern. Die drei behandelten p53 wt Zelllinien zeigten starke Banden für p53. Bei den Kontrollproben, die mit reinem DMSO behandelt wurden, wies nur die OCI-AML3 Zelllinie eine deutliche p53-Bande auf. Die p53 kd Zelllinien zeigten sowohl in der Kontroll- als auch in der MG132-Gruppe nur sehr leichte Banden.

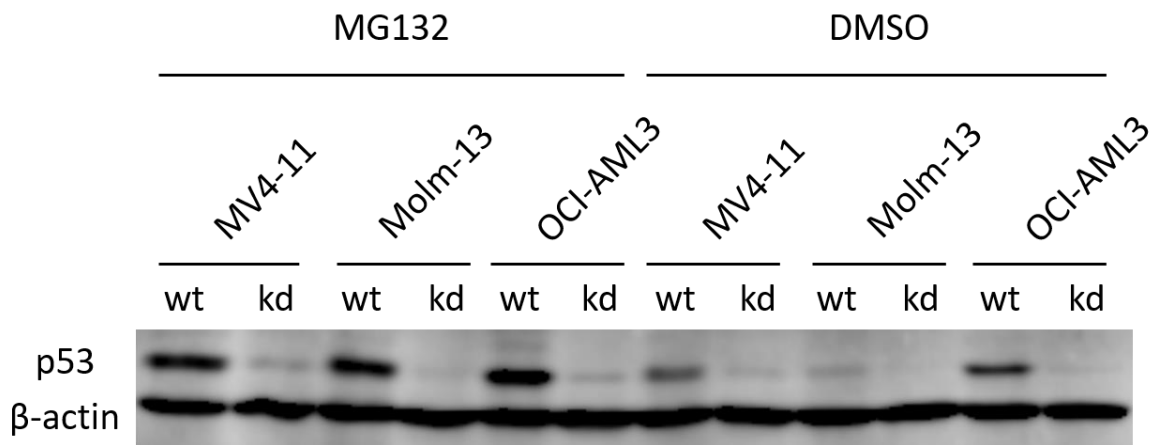


Abbildung 7: Validierung des p53-Knockdowns

p53 spezifischer Western Blot der p53 wt und p53 kd Zelllinien MV4-11, Molm-13 und OCI-AML3

Links nach Vorbehandlung der Zelllinien mit MG132, rechts DMSO-Kontrollgruppe

4.2 Keine Auswirkung des p53-Knockdowns auf Zellwachstumskinetik

Da der p53-Knockdown potenziell die Wachstumskinetik der Zelllinien beeinflussen könnte, wurden diese für 72 Stunden in R10 kultiviert und der Wachstumsindex bestimmt. Das Experiment wurde sechsmal repliziert. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Wachstumsindices der p53 wt und der p53 kd Zelllinien (siehe Abbildung 8).

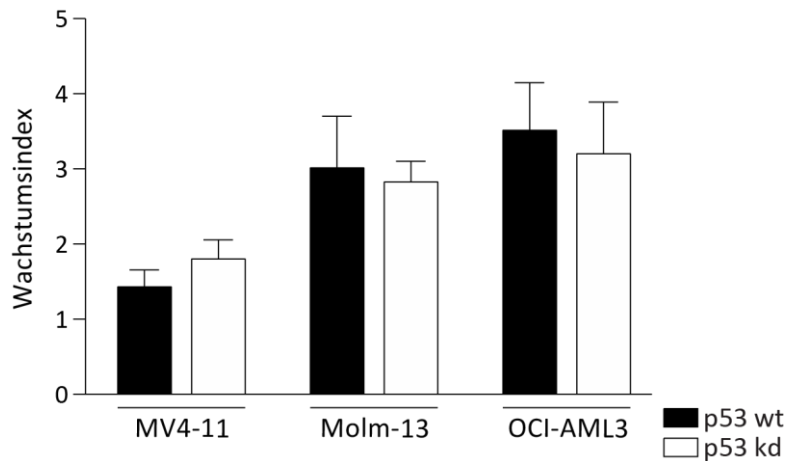


Abbildung 8: Kein Einfluss des p53-Knockdowns auf die Zellwachstumskinetik

Wachstumsindices der Zelllinien nach 72 Stunden Inkubation; n = 6

4.3 Erhöhte Resistenz gegen AMG 330 vermittelte Zytotoxizität und Inhibition der T-Zell-Proliferation durch p53-Knockdown in Cokultur

Der Einfluss des p53-Knockdowns auf die Sensitivität der AML-Zellen gegenüber AMG 330 vermittelter Zytotoxizität wurde in Cokulturen mit T-Zellen gesunder Spender untersucht.

Die Zellen wurden in einer E:T Ratio von 1:6 für fünf Tage kultiviert, und die spezifische Lyse der AML-Zellen sowie die Proliferation der T-Zellen wurden an Tag 3, Tag 4 und Tag 5 analysiert. In Abbildung 9 ist eine exemplarische Auswertung dargestellt. Das Experiment wurde sechsmal repliziert.

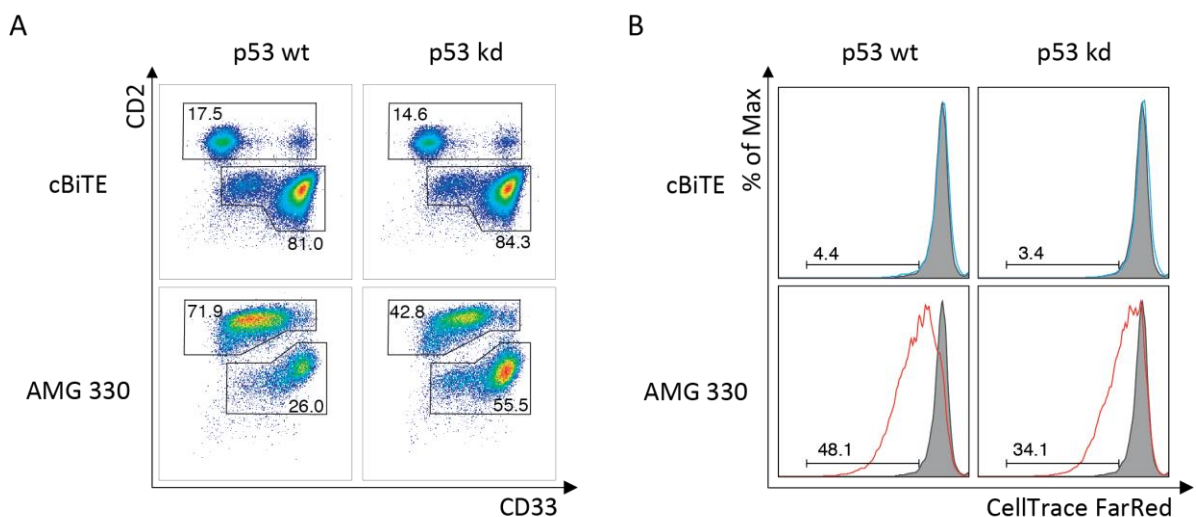


Abbildung 9: Exemplarische Auswertung der Cokultur per Durchflusszytometrie

(A) AMG 330 vermittelte spezifische Lyse der AML-Zellen und (B) T-Zell-Proliferation in einer Cokultur mit MV4-11-Zellen an Tag 5

Die Auswertung der Lyse der Zelllinien ist in Tabelle 16 und Abbildung 10A dargestellt. Die Lyse der p53 kd Zellen war bei den Zelllinien MV4-11 und OCI-AML3 an allen Tagen signifikant geringer als die der entsprechenden p53 wt Zellen ($p = 0,03$). Bei Molm-13 ist die Lyse der p53 kd Zellen, außer an Tag 4 ($p = 0,06$), ebenfalls signifikant geringer ($p = 0,03$).

Tabelle 16: AMG 330 vermittelte spezifische Lyse der AML-Zellen in Cokultur mit T-Zellen

Mittelwert und Standardfehler aus sechs Replikaten

Zeitpunkt	p53 wt vs. kd MV4-11	p53 wt vs. kd Molm-13	p53 wt vs. kd OCI-AML3
Tag 3	51,4 % \pm 3,6 vs. 34,5 % \pm 3,8	41,3 % \pm 5,5 vs. 32,6 % \pm 3,8	55,5 % \pm 2,0 vs. 48,8 % \pm 2,9
Tag 4	71,6 % \pm 4,0 vs. 54,9 % \pm 4,8	64,8 % \pm 7,3 vs. 56,3 % \pm 5,6	71,5 % \pm 2,0 vs. 61,0 % \pm 3,0
Tag 5	89,2 % \pm 2,7 vs. 70,4 % \pm 4,6	88,6 % \pm 2,4 vs. 80,4 % \pm 4,9	87,5 % \pm 2,1 vs. 80,1 % \pm 2,1

Des Weiteren wurde der Einfluss der Cokultur mit p53 kd oder p53 wt AML-Zellen auf die Proliferation der gesunden Spender-T-Zellen analysiert.

Die Auswertung der Proliferation der T-Zellen ist in Tabelle 17 und Abbildung 10B dargestellt.

T-Zellen, die mit p53 kd AML-Zellen kultiviert wurden, hatten an Tag 4 und Tag 5 bei allen Zelllinien signifikant geringere Proliferationsraten als T-Zellen, die mit p53 wt AML-Zellen kultiviert wurden ($p = 0,03$). An Tag 3 ist dieser signifikante Unterschied nur bei der Zelllinie Molm-13 zu beobachten, während bei Cokulturen der anderen beiden Zelllinien die Proliferationsrate insgesamt noch sehr niedrig war.

Tabelle 17: T-Zell-Proliferation in Cokultur mit p53 wt oder p53 kd AML-Zellen

Mittelwert und Standardfehler aus sechs Replikaten

Zeitpunkt	p53 wt vs. kd MV4-11	p53 wt vs. kd Molm-13	p53 wt vs. kd OCI-AML3
Tag 3	5,7 % \pm 1,0 vs. 5,7 % \pm 1,5	17,6 % \pm 3,8 vs. 14,3 % \pm 3,2	3,3 % \pm 0,4 vs. 3,2 % \pm 0,3
Tag 4	25,6 % \pm 4,2 vs. 16,8 % \pm 3,9	61,0 % \pm 4,1 vs. 52,5 % \pm 5,2	7,3 % \pm 0,7 vs. 6,0 % \pm 0,5
Tag 5	71,2 % \pm 5,8 vs. 60,1 % \pm 7,2	85,9 % \pm 2,0 vs. 83,4 % \pm 2,5	36,0 % \pm 3,2 vs. 26,6 % \pm 2,5

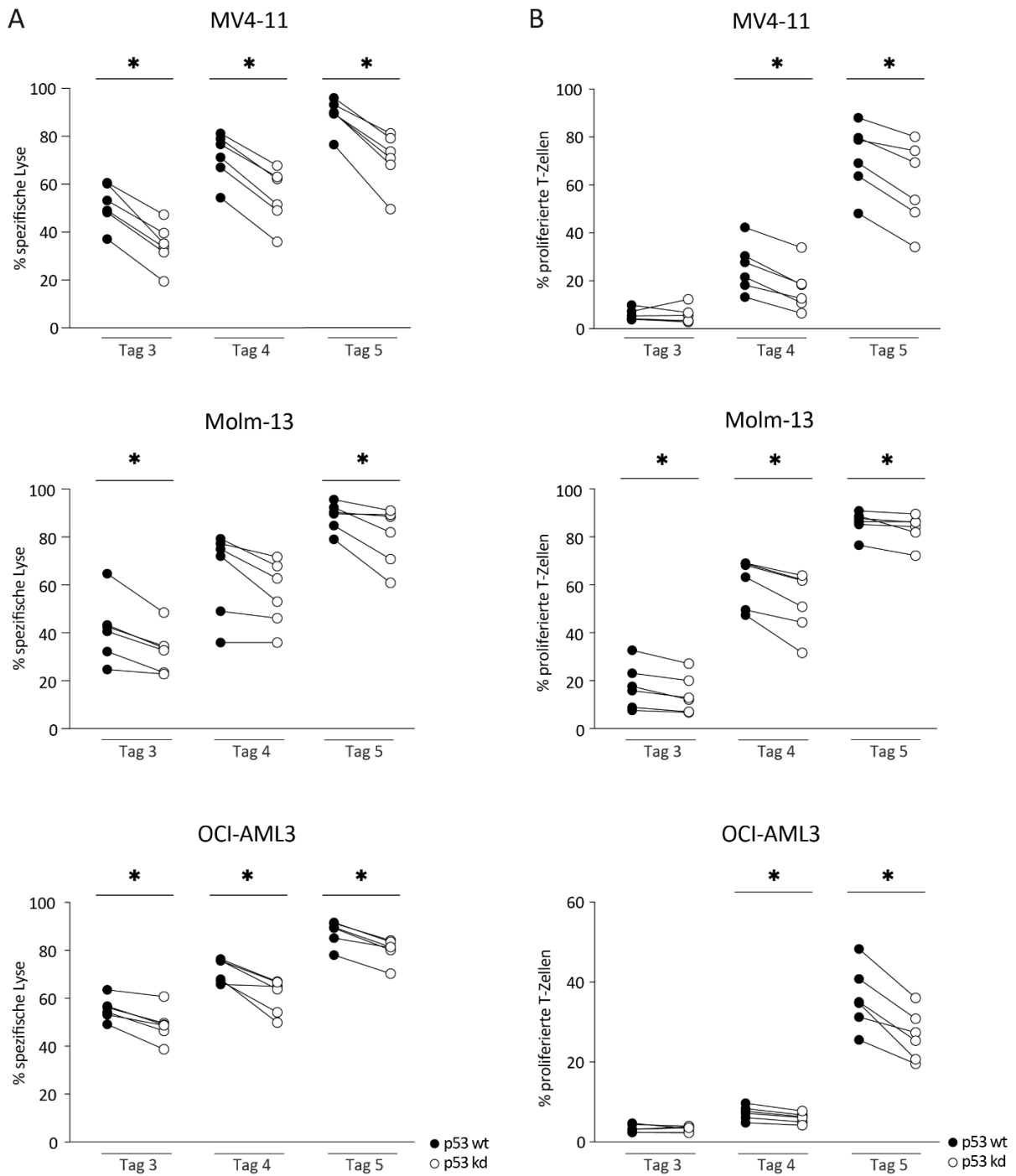


Abbildung 10: Negativer Einfluss des p53-Knockdowns auf Lyse der AML-Zellen und Proliferation der T-Zellen in Kokultur mit AMG 330

- (A) AMG 330 vermittelte spezifische Lyse der p53 wt (schwarz) und p53 kd (weiß) AML-Zellen; n = 6; E:T = 1:6; verbundene Kreise repräsentieren Kokulturen mit T-Zellen des selben Spenders
- (B) Proliferation der T-Zellen in Kokultur mit p53 wt (schwarz) und p53 kd (weiß) AML-Zellen; n = 6; E:T = 1:6; verbundene Kreise repräsentieren Kokulturen mit T-Zellen des selben Spenders

4.4 Variable Zytokinproduktion der Cokulturen

Zur weiteren Evaluation der Auswirkung des p53-Status auf die AMG 330 vermittelte T-Zell-Reaktion wurde das Sekretom der Cokultur aus Abschnitt 4.3 untersucht.

Dazu wurde ein CBA durchgeführt und die Zytokine IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6 sowie IL-10 in den Überständen an Tag 3 quantifiziert. Das Experiment wurde sechsmal repliziert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt.

IFN- γ war insgesamt das am stärksten produzierte Zytokin der Cokulturen. Es konnte eine signifikant geringere Konzentration in den Überständen der p53 kd Cokulturen der Zelllinien MV4-11 und OCI-AML3 festgestellt werden (p53 wt vs. p53 kd: MV4-11: 4418 pg/ml \pm 927 vs. 2626 pg/ml \pm 753; OCI-AML3: 4134 pg/ml \pm 989 vs. 2405 pg/ml \pm 564; p = 0,03). Die Cokulturen mit p53 kd Molm-13-Zellen zeigten hingegen einen Trend zur erhöhten IFN- γ Produktion (p53 wt vs. p53 kd: 5264 pg/ml \pm 923 vs. 6747 pg/ml \pm 1045; p = 0,06). IL-2 wurde am zweitstärksten produziert. Cokulturen mit p53 kd MV4-11-Zellen hatten eine signifikant geringere IL-2 Konzentration (p53 wt vs. p53 kd: 1204 pg/ml \pm 151 vs. 634 pg/ml \pm 117; p = 0,03). Bei Cokulturen der Zelllinien Molm-13 und OCI-AML3 konnte dies hingegen nicht beobachtet werden. IL-6 und IL-10 konnten in höheren Konzentrationen nur in den Überständen der Cokulturen der Zelllinie Molm-13 gemessen werden. Es zeigte sich hierbei kein signifikanter Unterschied zwischen den p53 wt und p53 kd Molm-13-Zellen. Die Zytokine TNF- α und IL-4 konnten in keinem Überstand detektiert werden.

Zusammenfassend zeigt sich ein sehr inhomogenes Bild der Zytokinkonzentrationen zwischen den Cokulturen der drei Zelllinien.

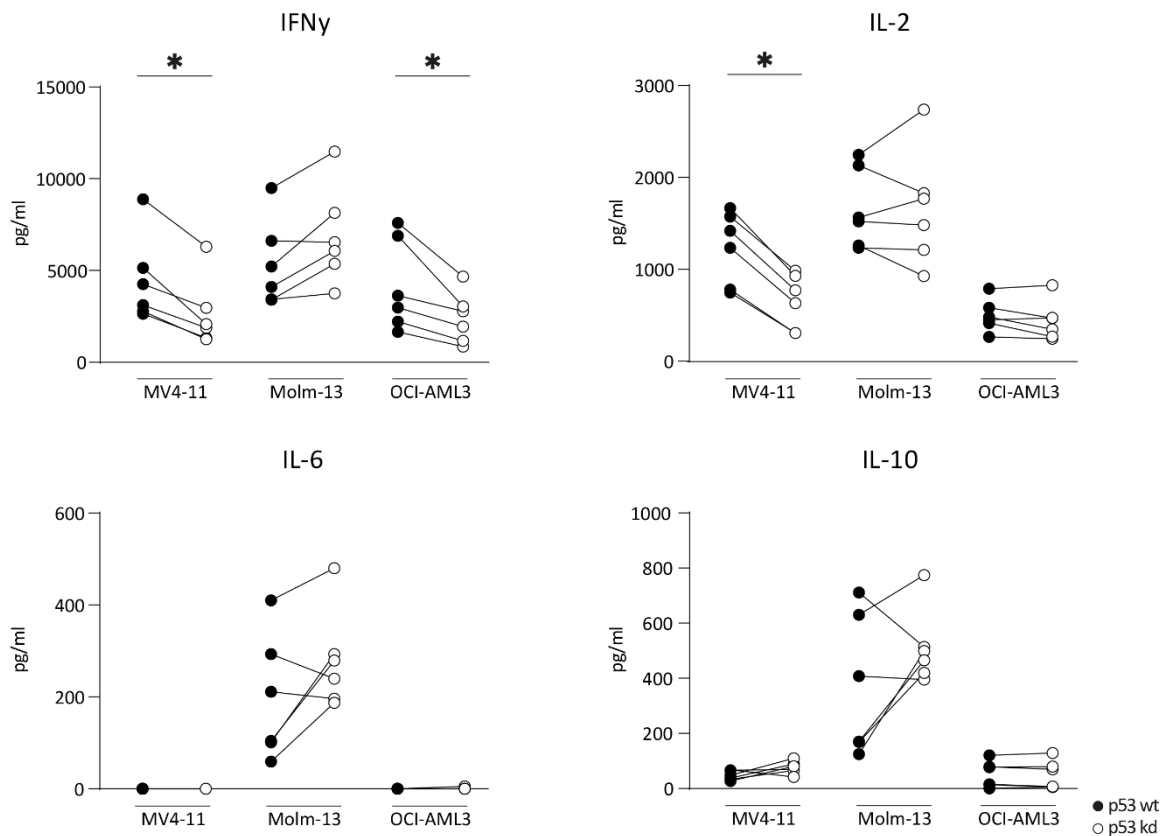


Abbildung 11: Variable Zytokinproduktion der Cokulturen

Menge der Zytokine IFN- γ , IL-2, IL-6 und IL-10 in Cokulturen aus Abschnitt 4.3 an Tag 3; n= 6; verbundene Kreise repräsentieren Cokulturen mit T-Zellen desselben Spenders

4.5 Einfluss des p53-Knockdowns auf das Oberflächenexpressionsmuster der AML-Zelllinien

Ein möglicher zugrundeliegender Mechanismus der Resistenz und Inhibition der T-Zellen ist die Veränderung des Expressionsprofils der AML-Zellen durch den p53-Knockdown.

Das Expressionsprofil beeinflusst die Interaktion der Zellen. Daher wurden im Folgenden mehrere Oberflächenmoleküle analysiert, die an der Aktivierung und Proliferation von T-Zellen beteiligt sind. In Abbildung 12 ist eine exemplarische Auswertung dargestellt. Die Experimente wurden viermal repliziert.

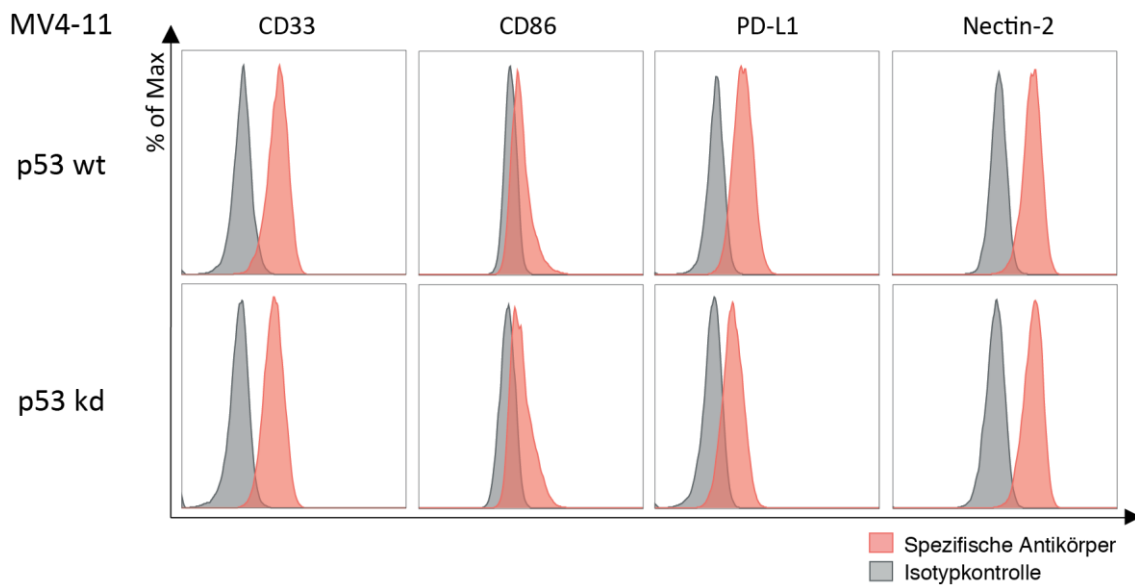


Abbildung 12: Exemplarische Auswertung des Oberflächenexpressionsprofils per Durchflusszytometrie
 Fluoreszenzintensität von CD33, CD86, PD-L1 und Nectin-2 sowie Isotypkontrolle von MV4-11 Zellen

Zur ersten Orientierung wurden zunächst unstimulierte AML-Zellen verwendet. Es wurde die Expression des Zielmoleküls CD33, des costimulatorischen Moleküls CD86 sowie des coinhibitorischen Moleküls PD-L1 analysiert.

Das Zielmolekül CD33 wurde von den Zelllinien verschieden stark exprimiert. Die OCI-AML3 Zellen exprimierten insgesamt nur wenig CD33, allerdings zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen p53 wt und p53 kd AML-Zellen. Die Expression der Oberflächenmoleküle CD86 und PD-L1 war sehr niedrig, und es konnte ebenfalls kein Einfluss des p53-Status beobachtet werden. Die Ergebnisse der Auswertung sind in Abbildung 13 dargestellt.

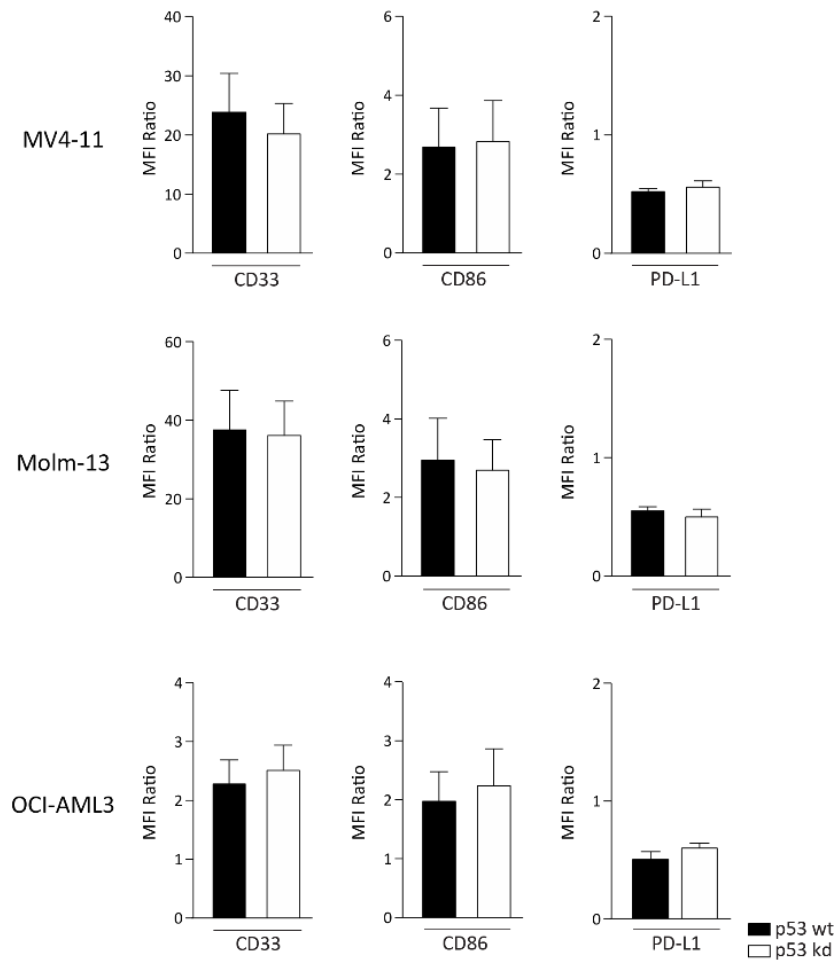


Abbildung 13: Keine Veränderung des Expressionsprofils unstimulierter AML-Zellen durch p53-Knockdown

MFI Ratio der Oberflächenmoleküle CD33, CD86 und PD-L1 der p53 wt (schwarz) und p53 kd (weiß)

AML-Zelllinien MV4-11, Molm-13 und OCI-AML3; n = 4

Um die Bedingungen der Cokultur mit T-Zellen zu simulieren, wurden die AML-Zellen im nächsten Schritt für 72 Stunden mit TNF- α und INF- γ stimuliert. Es wurde die Expression von CD33, mehrerer costimulatorischer Oberflächenmoleküle (CD80, CD86, OX40-Ligand (OX40L)) und coinhibitorischer Moleküle (PD-L1, T-Zell-Immunglobulin und Mucin-Domäne-3 (Tim-3)) sowie von Nectin-2 untersucht. Die Expressionsstärke von CD33 (siehe Abbildung 14A) unterschied sich zwischen den drei Zelllinien auch im stimulierten Zustand, jedoch konnte erneut keine Beeinflussung durch den p53-Status beobachtet werden. Die Expression der costimulatorischen Moleküle (siehe Abbildung 14B) war generell bei allen Zelllinien sehr niedrig. Einzig CD86 wurde von den Zelllinien Molm-13 und OCI-AML3 biologisch relevant exprimiert. Das coinhibitorische Molekül PD-L1 (siehe Abbildung 14C) zeigte bei allen Zelllinien eine schwache Expression. Die MFI Ratio von Tim-3 hingegen lag bei allen Zelllinien unter der Grenze von 1,5. Bei Nectin-2 (siehe Abbildung 14D) konnte in allen Zelllinien eine relevante

Expression beobachtet werden, die sich allerdings nicht zwischen p53 wt und p53 kd Zellen unterschied.

Zusammenfassend konnte keine signifikante Veränderung des Expressionsprofils beobachtet werden, die bei allen Zelllinien gleich ist und die Ergebnisse der Cokultur erklären würde. Daher wurde im nächsten Schritt die Möglichkeit untersucht, dass der inhibitorische Effekt der p53 kd AML-Zellen durch das AML-Sekretom vermittelt wird.

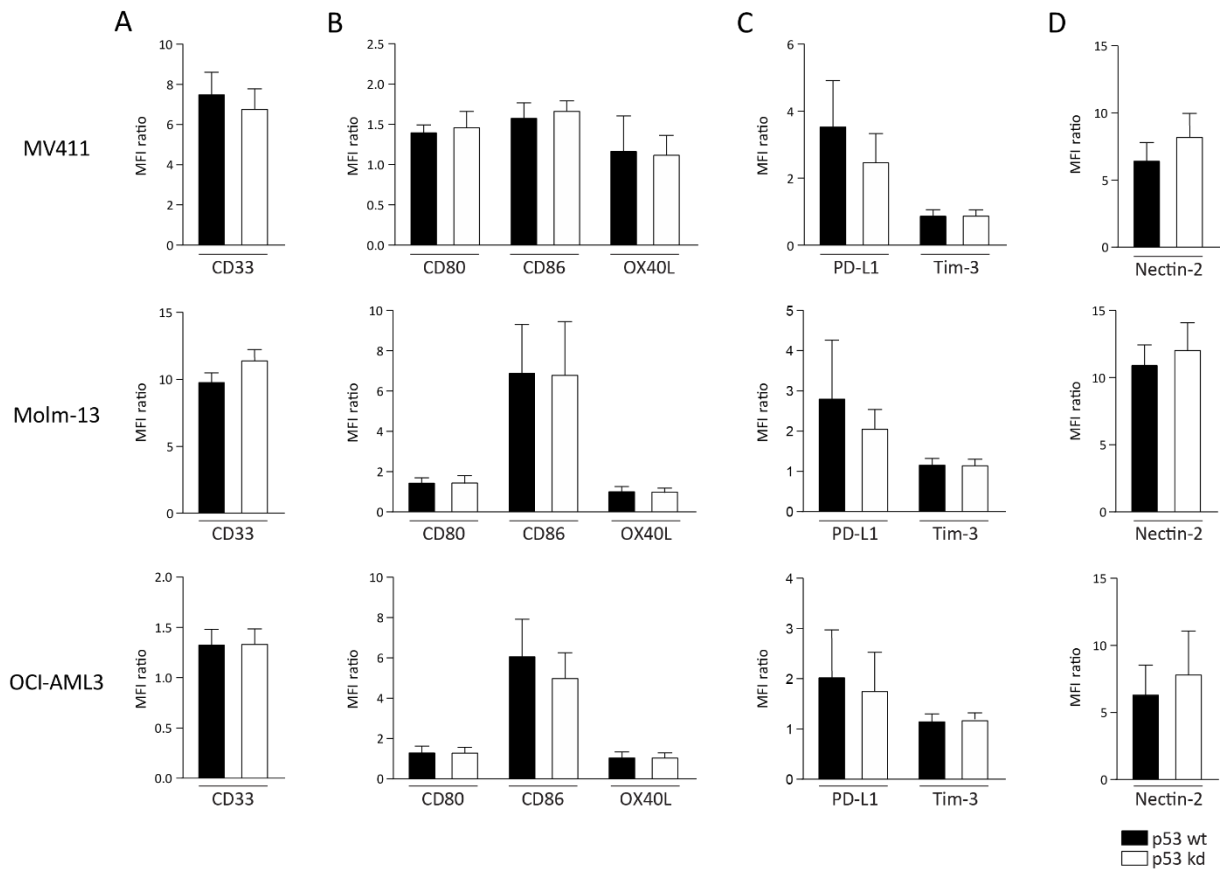


Abbildung 14: Einfluss des p53-Knockdowns auf das Oberflächenexpressionsmuster stimulierter AML-Zelllinien

MFI Ratio der p53 wt (schwarz) und p53 kd (weiß) AML-Zelllinien MV4-11, Molm-13 und OCI-AML3

nach 72 Stunden Stimulation mit TNF- α und INF- γ ; n = 4

- (A) CD33
- (B) Costimulatorische Moleküle CD80, CD86 und OX40L
- (C) Coinhibitorische Moleküle PD-L1 und Tim-3
- (D) Nectin-2

4.6 Entfall des inhibitorischen Effekts auf die Proliferation bei Kultivierung der T-Zellen in AML-Überstand

Um den Einfluss des AML Sekretoms isoliert von Zell-Zell-Kontakten zu untersuchen, wurden die T-Zellen in Überständen einer dreitägigen AML-Kultur inkubiert und mit CD3/CD28 Beads und IL-2 zur Proliferation stimuliert. Für dieses Experiment wurden die AML-Zellen nicht in R10 sondern in serumfreiem UltraCULTURE Medium kultiviert. Dieses serumfreie Medium wurde gewählt, da es kein Albumin enthält und die Überstände somit für eine potenzielle, spätere Analyse per Massenspektrometrie geeignet wären. Für das folgende Proliferationsexperiment wurde das Serum nachträglich zu den T-Zellen hinzugefügt, da diese nur in serumhaltigem Medium proliferieren. Das Experiment wurde fünfmal an Tag 3 und Tag 4 sowie viermal an Tag 5 ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 dargestellt.

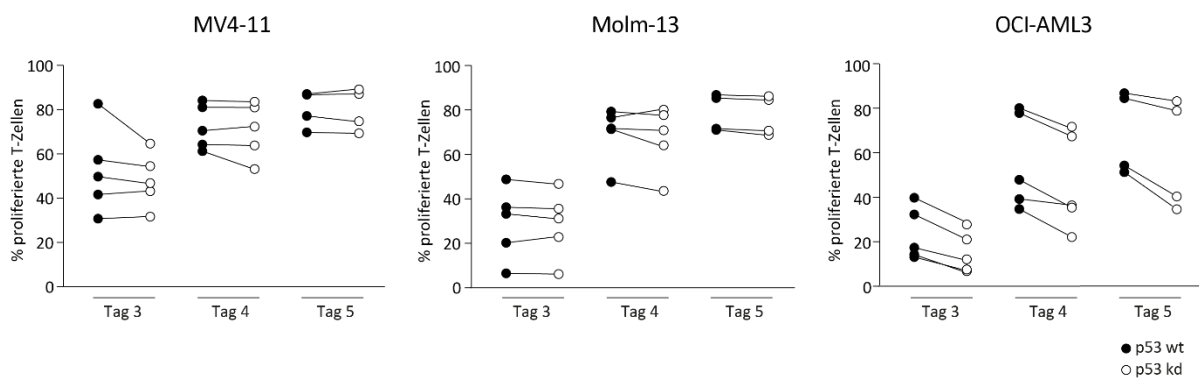


Abbildung 15: Entfall des inhibitorischen Effekts auf die Proliferation bei Kultivierung der T-Zellen in AML-Überstand

Proliferation der gesunden T-Zellen in serumfreiem Überstand einer dreitägigen Zellkultur der p53 wt (schwarz) und p53 kd (weiß) AML-Zelllinien MV4-11, Molm-13 und OCI-AML3.

Stimulation der T-Zellen mit Serum, CD3/CD28 Beads sowie IL-2; n = 4-5;

verbundene Kreise repräsentieren Cokulturen mit T-Zellen desselben Spenders

Die Proliferation der T-Zellen in den Überständen von p53 wt oder p53 kd Zellen der Linien MV4-11 und Molm-13 zeigten an allen Tagen nahezu keinen Unterschied. Die Proliferation der T-Zellen im Überstand der Zelllinie OCI-AML3 hingegen zeigt konstant eine niedrigere Proliferation in p53 kd Zellkultur-Überständen, ähnlich den Beobachtungen in der Cokultur (p53 wt vs. p53 kd: Tag 3: 23,4 % \pm 5,4 vs. 15,1 \pm 4,1; Tag 4: 56,0 \pm 9,6 vs. 46,6 \pm 9,7; Tag 5: 69,2 \pm 9,5 vs. 59,3 \pm 12,7). Aufgrund des n < 6 reicht die Power des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang Tests für eine Bewertung der statistischen Signifikanz nicht aus.

4.7 Inhibition der AMG 330 vermittelten Zytotoxizität und T-Zell-Proliferation durch das Sekretom von p53 kd AML-Zellen im Transwell

Da die AML-Zellen in der Kokultur durch die sezernierten Zytokine der aktivierten T-Zellen beeinflusst werden, könnte sich ihr Sekretom im Vergleich zu einer isolierten AML-Zellkultur verändern und erst dadurch den inhibitorische Effekt auf die T-Zell-Proliferation entwickeln. Daher wurde der Einfluss des Sekretoms im Folgenden erneut in einem Transwell-Versuch untersucht.

Die MV4-11-Zellen sind in einem Einsatz durch eine permeable Membran vom restlichen Well getrennt (siehe Abbildung 16). Diese lässt nur den Austausch von Molekülen kleiner 3,0 µm zu und erlaubt damit die Differenzierung zwischen einem Zell-Zell-Kontakt oder einem Sekretom basiertem Effekt. Um die T-Zellen möglichst analog zur Kokultur in Abschnitt 4.3 zu stimulieren, wurden nicht Beads sondern AMG 330 und CD33⁺ CD86⁺ Ba/F3-Zellen als Zielzellen verwendet. Zur Vergleichskontrolle wurden die T-Zellen, MV4-11-Zellen und Ba/F3-Zellen auch ohne Einsatz kokultiviert. In beiden Versuchsansätze wurden die Zellen in einer E:T Ratio von 1:10 für drei Tage kultiviert und die spezifische Lyse der Zielzellen und Proliferation der T-Zellen analysiert. Das Experiment wurde sechsmal repliziert.

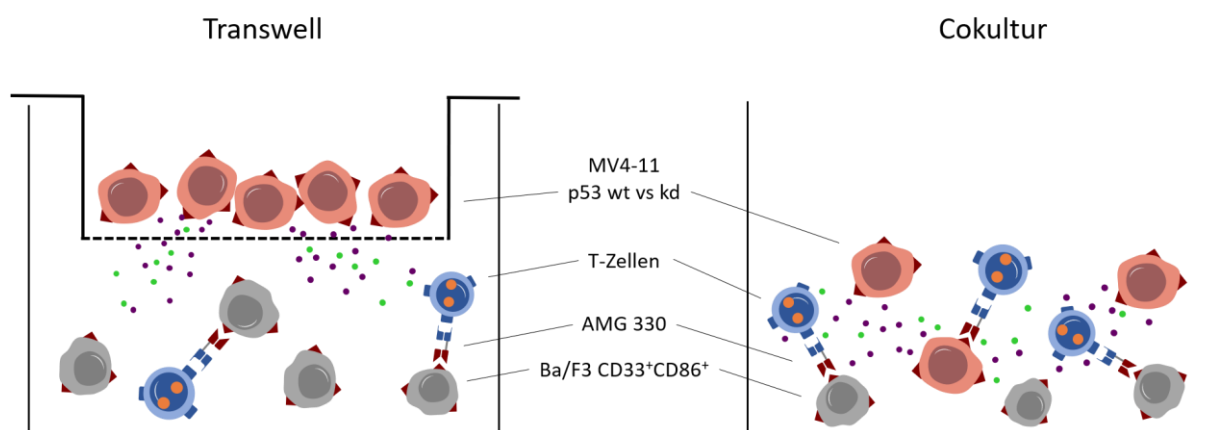


Abbildung 16: Aufbau des Transwell-Versuchs und der Kokultur

Die AMG 330 vermittelte spezifische Lyse (siehe Abbildung 17A) der Ba/F3-Zellen im Transwell war signifikant geringer, wenn p53 kd statt p53 wt MV4-11-Zellen im Einsatz kultiviert wurden (p53 wt vs. p53 kd: 73,7 % ± 4,4 vs. 62,1 % ± 4,6; p = 0,03). Die Lyse der CD33⁺ Zielzellen der Kokulturen war ebenfalls signifikant geringer (p53 wt vs. p53 kd: 65,2 % ± 4,4 vs. 47,6 % ± 3,0; p = 0,03). Da sich die CD33⁺ Zielzellen in der Kokultur aus MV4-11-Zellen und Ba/F3-Zellen zusammensetzen, wurde deren Lyse zusätzlich getrennt analysiert (siehe Abbildung 17B). Dabei zeigte sich sowohl eine signifikant geringere Lyse der p53 kd MV4-11-Zellen (p53 wt vs. p53 kd: 61,4 % ± 4,4 vs. 40,2 % ± 3,1; p = 0,03) als auch eine signifikant geringere Lyse der Ba/F3-Zellen in der Kokultur mit diesen p53 kd MV4-11 Zellen

(p53 wt vs. p53 kd: 82,2 % ± 3,1 vs. 70,9 % ± 2,8; p = 0,03). Die Lyse der Ba/F3-Zellen war insgesamt höher als die Lyse der MV4-11 Zellen.

Die Proliferation der T-Zellen (siehe Abbildung 17C) war in der Cokultur mit p53 kd MV4-11 Zellen signifikant geringer als mit p53 wt MV4-11 Zellen (p53 wt vs. p53 kd: 32,3 % ± 9,9 vs. 20,7 % ± 7,5; p = 0,03). Des Weiteren zeigte sich allerdings auch im Transwell eine signifikant geringere T-Zell-Proliferation, wenn p53 kd Zellen im Einsatz kultiviert wurden (p53 wt vs. p53 kd: 67,5 % ± 3,8 vs. 53,8 % ± 6,8; p = 0,03).

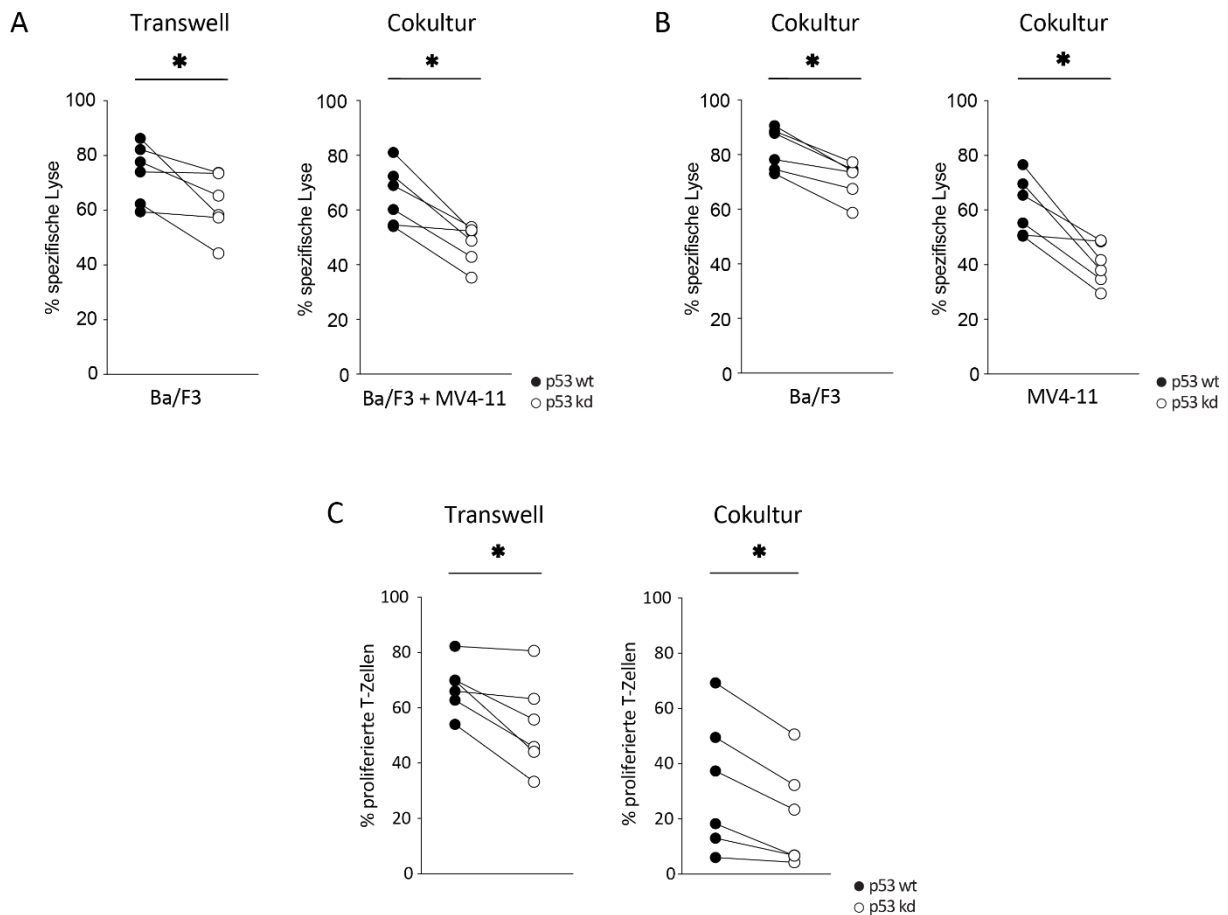


Abbildung 17: Inhibition der AMG 330 vermittelten Zytotoxizität und T-Zell-Proliferation durch das Sekretom von p53 kd AML-Zellen im Transwell und in der Cokultur

- (A) AMG 330 vermittelte spezifische Lyse der Ba/F3-Zellen des Transwells und der CD33⁺ Zielzellen der Cokultur; n = 6; E:T = 1:10; verbundene Kreise repräsentieren Cokulturen mit T-Zellen des selben Spenders
- (B) AMG 330 vermittelte spezifische Lyse der Ba/F3-Zellen und MV4-11-Zellen der Cokultur; n = 6; E:T = 1:10; verbundene Kreise repräsentieren Cokulturen mit T-Zellen des selben Spenders
- (C) Proliferation der T-Zellen im Transwell und in der Cokultur; n = 6; E:T = 1:10; verbundene Kreise repräsentieren Cokulturen mit T-Zellen des selben Spenders

5. Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde der Verlust der p53-Funktion als intrinsischer Resistenzmechanismus gegen die Therapie mit AMG 330 anhand von p53 kd AML-Zelllinien evaluiert.

Zunächst wurde der p53-Status der Zelllinien per Western Blot validiert und es konnte kein Einfluss des Knockdowns auf die Wachstumskinetik der Zellen festgestellt werden. In Kokulturen der p53 kd AML-Zelllinien und der T-Zellen gesunder Spender zeigte sich eine signifikant verminderte AMG 330 vermittelte spezifische Lyse der AML-Zellen kombiniert mit einer geringeren Proliferation der T-Zellen. Die Analyse der Überstände der Kokulturen mit MV4-11 und OCI-AML3 per CBA ergab zusätzliche Hinweise auf eine verminderte Aktivierung der T-Zellen. Zur Differenzierung des hemmenden Effektes der p53 kd AML-Zellen auf die T-Zellen wurde die Expression des Zielantigens sowie costimulatorischer und -inhibitorischer Oberflächenmoleküle unstimulierter sowie durch Zytokine stimulierter AML-Zellen analysiert. Dabei konnte allerdings kein vom p53-Status abhängiger Unterschied festgestellt werden, der die Inhibition der T-Zellen erklären würde. Daraufhin wurde eine Vermittlung des Effektes durch das Sekretom der AML-Zellen evaluiert. Durch alleinigen Transfer der konditionierten Überstände der p53 kd AML-Zellkulturen auf stimulierte T-Zellen wurde deren Proliferation nicht beeinträchtigt. Im Transwell-Versuch zeigten sich jedoch, bei separater Kultivierung der p53 kd AML-Zellen im Well-Einsatz, erneut eine signifikant geringere T-Zell-Proliferation und signifikant geringere AMG 330 vermittelte Lyse der CD33⁺ Ba/F3-Zielzellen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der p53-Knockdown zu einer verminderten Sensitivität der AML-Zellen auf AMG 330 vermittelte Lyse sowie einer niedrigeren Proliferation der kokultivierten T-Zellen führt. Die Untersuchung des zugrundeliegenden Mechanismus ergab Hinweise auf eine Inhibition der T-Zellen basierend auf dem Sekretom der p53 kd AML-Zellen.

5.2 Eignung der p53 kd Zelllinien als Modell

Zur Modellierung des p53-Verlustes wurden die drei *TP53*-Wildtyp AML-Zelllinien MV4-11, Molm-13 und OCI-AML3 sowie ihre korrespondierenden p53 kd Zelllinien verwendet.

Trotz der Wildtyp-Allele weisen viele Tumorzelllinien aufgrund anderer genetischer Alterationen eine eingeschränkte p53-Funktion auf. In einer Analyse mehrerer Datenbanken wurde nachgewiesen, dass die hier ausgewählten Zelllinien p53-messenger RNA (mRNA) exprimieren sowie auf die Therapie mit Mdm2-Inhibitoren ansprechen. Dies ist nur bei funktionierendem p53-Signalweg gegeben [59].

Der Knockdown wurde per Western Blot validiert und es zeigten sich nahezu keine p53-Banden der Knockdown-Zelllinien. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass noch eine Restaktivität mit funktionellen Auswirkungen besteht. Im Mausmodell konnte demonstriert werden, dass abhängig von der Effizienz des p53-Knockdowns durch shRNA in hämatopoetischen Stammzellen unterschiedlich ausgeprägte Lymphome entstehen [83]. Die p53 kd AML-Zelllinien können dennoch als geeignetes Modell für den p53-Verlust in der AML verwendet werden, da der absolute Verlust auch bei vielen AML-Patienten nicht gegeben ist. Sie weisen nur eine Einschränkung der p53-Funktion durch genetische Alteration eines einzelnen Allels oder gesteigerten Mdm2-vermittelten Abbaus auf [70]. Zur detaillierten Abbildung der p53-Dysfunktion in der AML sollte in weiteren Untersuchungen die *TP53*-Deletion und -Mutation eingeschlossen werden. Insbesondere *TP53*-Mutationen üben oft zusätzliche tumorfördernde Effekte auf die Zellen aus [63].

5.3 Zellinterne Auswirkungen des p53-Verlustes: Störung des AMG 330 induzierten Apoptosesignalweges

Die Auswertung der AMG 330 vermittelten Zytotoxizität zeigt konstant eine signifikant geringere Lyse der p53 kd AML-Zelllinien. Eine Beeinflussung der Analyse der Lyserate durch unterschiedliche Wachstumskinetik der p53 kd versus p53 wt AML-Zelllinien konnte ausgeschlossen werden.

AMG 330 induziert die Apoptose der AML-Zellen über die Formation einer zytolytischen Synapse mit den T-Zellen. Diese schütten Zytokine, Perforin und Granzym B aus [26, 28].

Perforin bildet Poren in der Zellmembran und ermöglicht den Transport von Granzym B ins Zytosol [84]. Die Serinprotease Granzym B löst über mehrere Mechanismen die Apoptose der Zelle aus. Sie kann die Effektorcaspase 3 direkt aktivieren sowie durch die Spaltung von Bid zu gekürztem Bid (tBid) den mitochondrialen Apoptoseweg initiieren. tBid führt über die Interaktion mit Bax zur Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran (MOMP) und zur folgenden Cytochrom c Freisetzung [85].

Es konnte gezeigt werden, dass p53 in diese Prozesse involviert ist. In Melanomzellen löste die Inkubation mit antigenspezifischen CTL oder Perforin und Granzym B die Akkumulation von p53 aus. Die Hemmung der p53-Expression per small interfering RNA (siRNA) bewirkte die verminderte Lyse der Melanomzellen durch CTL oder Perforin und Granzym B [86].

In weiteren Untersuchungen an Brustkrebszellen wurde festgestellt, dass die p53-Akkumulation in den Mitochondrien erfolgte. p53 interagiert dort direkt mit dem antiapoptotischen Protein Bcl-2. Dadurch wurde die Inhibition von Bax und tBid durch Bcl-2 gestört und die MOMP ausgelöst. Durch Blockade

der p53-Bcl-2-Interaktion mit Pifithrin- μ konnte die CTL vermittelte Lyse hingegen deutlich reduziert werden [87].

Mittels dieser Verknüpfung der, durch rekrutierte T-Zellen induzierten, apoptotischen Signalwege mit p53 ließe sich die beobachtete Resistenz der p53 kd AML-Zellen gegen AMG 330 erklären.

5.4 Zellexterne Auswirkungen des p53-Verlustes: Resistenz durch Inhibition der T-Zell-Aktivität

Die Effektivität von AMG 330 lässt sich neben der Lyse der AML-Zellen auch anhand der Proliferation und Zytokinfreisetzung der rekrutierten T-Zellen evaluieren [24].

Hierbei zeigte sich eine Verminderung der T-Zell-Proliferation bei Kultivierung mit p53 kd AML-Zellen. Des Weiteren konnten signifikant geringere Konzentrationen von IL-2 in Cokulturen mit p53 kd MV4-11 sowie IFN- γ in Cokulturen mit p53 kd MV4-11 und p53 kd OCI-AML3 festgestellt werden. Dies spricht insgesamt für eine Inhibition der T-Zell-Reaktion, da IFN- γ und IL-2 von aktivierten T-Zellen sezerniert werden [88, 89]. IFN- γ fördert autokrin die frühe T-Zell-Aktivierung und wirkt, beispielsweise über die Modulation von IL-10 Signalwegen, proinflammatorisch [90, 91]. IL-2 induziert die T-Zell-Proliferation und -Differenzierung, Sekretion von IFN- γ , TNF- α und Granzym B sowie Perforin [92, 93, 94]. Somit könnte die verringerte Lyse der p53 kd AML-Zellen teilweise auch durch eine reduzierte Aktivität der T-Zellen begründet sein.

Der genaue Aktivierungszustand der T-Zellen kann mittels Messung der Proliferation und der begrenzten Anzahl an Zytokinen nur begrenzt beurteilt werden. Zur detaillierten Beurteilung sollten weitere Zytokine sowie Oberflächenmarker der Aktivierung, wie zum Beispiel CD25 und CD69 [24], bestimmt werden.

Des Weiteren ist auffallend, dass die Cokulturen der Molm-13 Zelllinie im Vergleich zu MV4-11 und OCI-AML3 ein abweichendes Zytokinprofil aufweisen. IL-6 und IL-10 wurden in höheren Mengen produziert und die IFN- γ -Konzentration zeigte einen konträren Trend ($p = 0,06$) zwischen p53 wt und p53 kd. Die AML ist eine genetisch sehr heterogene Erkrankung [8] und die induzierte Zytokinproduktion hängt von weiteren genetischen Faktoren ab. In dieser Arbeit ist die Abbildung des Spektrums der AML durch die Verwendung dreier Zelllinien limitiert. Es sollte durch den Einschluss zusätzlicher AML-Zelllinien sowie primärer Patientenproben ergänzt werden.

Eine Vielzahl an Studien hat die Immun-Escape-Mechanismen (siehe Abschnitt 1.3) der AML und ihren negativen Einfluss auf T-Zellen beleuchtet. Es konnten unter anderem eine reduzierte Antigenpräsentation der Blasten [95], die Induktion regulatorischer T-Zellen [96] sowie erhöhte Anteile erschöpfter T-Zellen im AML-Mausmodell [97] und in Blut- und Knochenmarkspalten von AML-

Patienten [98] festgestellt werden. Bezüglich der spezifischen Effekte einer p53-Alterationen in AML-Zellen auf T-Zellen wurden bisher jedoch wenige und teils widersprüchliche Daten berichtet.

Die Einzelzellanalyse der Proteinsekretion von T-Zellen unbehandelter AML-Patienten zeigte eine Dysfunktion der T-Zellen von Patienten mit mutiertem p53. Sie produzierten signifikant weniger IFN- γ , TNF- α , Granzym B und Perforin [99]. Vadakekolathu et al. zeigten hingegen mittels Analyse des Genexpressionsprofils der Knochenmarksproben von AML-Patienten mit *TP53*-Mutation eine immunsuppressive Tumorumgebung durch Überexpression IFN- γ assoziierter Zielgene und Immuncheckpoints [100]. Dies erscheint zunächst konträr zur Funktion von IFN- γ als T-Zell-Aktivator, jedoch konnte gezeigt werden, dass IFN- γ bei langer Stimulation durch die Induktion der Expression des coinhibitorischen Oberflächenmoleküls PD-L1 immunsuppressiv wirkt [101, 102].

Die Auswirkung des p53-Status auf die Effektivität T-Zell-basierter Immuntherapien wurde bisher nur in anderen hämatologischen Tumorentitäten untersucht. In der CD19-CAR-T-Zell-Therapie bei r/r diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen (DLBCL) [103] und r/r B-Linien-ALL [104] ist die *TP53*-Mutation mit niedrigeren Remissionsraten sowie kürzeren Überlebenszeiten assoziiert. Die RNA-Analyse der Gewebeproben neu diagnostizierter DLBCL-Patienten mit *TP53*-Mutation zeigte eine verminderte Expression der IFN- α und IFN- γ Signalwege sowie Granzym- und Zytokin-induzierter Apoptose-Signalwege [103].

5.5 Einfluss des p53-Status auf die Zellinteraktion: Expressionsprofil und Sekretom

Eine zunehmende Zahl an Studien zeigt, dass p53 seine Rolle als Tumorsuppressor nicht nur durch zellinterne Prozesse, beispielsweise Apoptoseinduktion und Zellzyklusarrest, sondern auch durch die externe Kommunikation mit dem Immunsystem ausübt. p53 moduliert unter anderem die Antigenpräsentation durch MHC-I [105], Zytokinsignalwege [106] sowie die Immunsuppression durch myeloische Zellen und regulatorische T-Zellen [107].

In dieser Arbeit konnte die AMG 330 vermittelte Aktivierung der T-Zellen prinzipiell durch die Expression des Zielantigens, direkte Zell-Zell-Kontakte oder das AML-Sekretom beeinflusst werden.

Die Aktivierung und Proliferation der T-Zellen mittels BiTE ist zunächst abhängig von der Expressionsintensität des Zielantigens [25]. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien konnten allerdings keine p53-abhängigen Unterschiede der CD33-Expression festgestellt werden. Dieses Ergebnis stimmt überein mit der immunphänotypischen Analyse von AML-Patienten mit *TP53*-Mutation und komplexem Karyotyp im Vergleich zu AML-Patienten mit normalem Karyotyp. Dabei konnte ebenso kein Unterschied der CD33-Expression nachgewiesen werden [108].

Zusätzlich zum Zielantigen nimmt die Bindung an costimulatorische und -inhibitorische Oberflächenmoleküle Einfluss auf die T-Zellen [4, Kapitel 6.1/9.2]. Die Expressionsprofile der p53 wt im Vergleich zu den p53 kd AML-Zelllinien zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede. Dieses Ergebnis wird teilweise gestützt durch eine Analyse der Knochenmarksproben von AML-Patienten. Es gab keinen signifikanten Unterschied des Anteils der CD80, CD86 sowie OX40L positiven Blasten bei *TP53*-Mutation. Es konnte allerdings eine signifikante Erhöhung des Anteils PD-L1⁺-Blasten bei AML-Patienten mit *TP53*-Mutation festgestellt werden [96].

Die gesteigerte PD-L1 Expression ist mit einer verkürzten Überlebenszeit bei AML- sowie MDS-Patienten mit *TP53*-Mutation assoziiert [109]. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass p53 microRNA-34 induziert. Diese bindet an die *PD-L1* mRNA und blockiert dadurch die Translation [110]. Das abweichende Ergebnis der PD-L1 Expression in dieser Arbeit ist möglicherweise durch die modellierte Stimulation der AML-Zellen durch Zytokine bedingt, die das Tumormikromilieu des Knochenmarkes nicht ausreichend abbilden kann.

Zu berücksichtigen ist weiterhin die begrenzte Anzahl der analysierten Oberflächenmoleküle, die nur eine Auswahl der potenziellen Kandidaten darstellt. Im Rahmen weiterer Untersuchungen sollte das Expressionsprofil ergänzt werden. Diese Arbeit ist zudem auf die Evaluation der Oberflächenmoleküle der AML-Zellen begrenzt, die nur eine Seite der Zell-Zell-Interaktion ausmachen. Zu deren tiefergehenden Beurteilung sollte auch die T-Zell-Oberfläche untersucht werden.

Die AML- und T-Zellen interagieren allerdings nicht nur über direkte Oberflächenkontakte, sondern auch über sekretierte Faktoren. Orleans-Lindsay et al. zeigten, dass die Kultivierung stimulierter T-Zellen in konditionierten Medien der p53-defizienten AML-Zelllinie HL-60 [111] oder primären AML-Blasten die T-Zell-Proliferation inhibierte [112].

Die Proliferation der stimulierten T-Zellen wurde in dieser Arbeit durch die Überstände der p53 kd im Vergleich zu den p53 wt AML-Zelllinienkulturen nicht beeinträchtigt. Allerdings wurden die Überstände aus unbehandelten AML-Zellkulturen abgenommen. Diese AML-Zellen haben, im Unterschied zu den Cokulturen und Transwell-Experimenten, weder über direkte Zellinteraktion noch sekretierte Zytokine mit aktivierten T-Zellen Kontakt. Die Akkumulation und Aktivierung von Wildtyp-p53 wird allerdings erst durch zellulären Stress ausgelöst [45]. In der Kontrollprobe des p53 Western Blots der MV4-11 und Molm-13 Zelllinien war der Unterschied zwischen den p53 wt und p53 kd Zellen dementsprechend nur schwach. Ohne Differenz der p53-Konzentrationen kann keine p53-abhängige Veränderung des Sekretoms gezeigt werden. Die p53 wt OCI-AML3 Zellen zeigten im Vergleich zu den p53 kd Zellen hingegen eine deutlichere Bande. Dies könnte die leichte Verminderung der T-Zell-Proliferation in p53 kd OCI-AML3 Überständen erklären, deren Signifikanz jedoch nicht bewertet werden konnte.

Die Kultivierung der MV4-11 AML-Zellen im Einsatz der Transwells erlaubte über den Austausch löslicher Faktoren die Interaktion mit aktivierten T-Zellen. Die beobachtete Verminderung der T-Zell-Proliferation ohne direkten Zell-Zell-Kontakt unterstützt die Theorie eines sekretombasierten Effektes. Die niedrigere Lyse der Ba/F3-Zellen in Transwells mit p53 kd MV4-11-Zellen lässt sich durch ein schlechtere E:T Ratio aufgrund der geringeren T-Zell-Proliferation erklären [38]. Bei Verlängerung der Kokultur ließe sich dieser Effekt vermutlich aufheben [33].

Eine p53-spezifische Beeinflussung des AML-Sekretoms wurde bisher noch nicht analysiert, jedoch wurden potenzielle Mechanismen in der AML generell untersucht.

Beispielsweise demonstrierten Mussai et al., dass im Plasma von AML-Patienten die Aktivität des Arginin-abbauenden Enzyms Arginase II deutlich erhöht ist und der Argininmangel des Plasmas zur Inhibition der T-Zell-Proliferation führt [113]. Des Weiteren konnte eine Expression des Enzyms Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) von AML-Blasten gezeigt werden, die mit einer schlechten Prognose assoziiert ist [114]. IDO katalysiert den Abbau der Aminosäure Tryptophan zu zytotoxischen Metaboliten und beeinträchtigt dadurch die T-Zell-Proliferation [115, 116]. Es wurden einige Daten bezüglich eines Zusammenhanges zwischen p53 und IDO berichtet, bisher konnte dieser jedoch nicht abschließend geklärt werden. Eleftheriadis et al. vermuteten basierend auf Analysen gemischter Lymphozytenreaktionen die Induktion von p53 durch IDO [117]. In Gewebeproben nicht-kleinzelliger Lungenkarzinome konnte hingegen eine inverse Korrelation der Expression von p53 und IDO gezeigt werden [118].

Durch den Transwell-Versuch kann eine zusätzliche Beeinflussung der T-Zellen durch Oberflächenmoleküle der AML-Zellen in Kokulturen nicht ausgeschlossen werden. p53 aktiviert eine Vielzahl an Zielgenen und Signalwegen, daher könnte es sich auch um einen kombinierten Vermittlungsmechanismus handeln. Zur weiteren Evaluation der Auswirkung des p53-Status auf das AML-Sekretom und Identifizierung vermittelnder Faktoren könnte eine Analyse der Überstände per Massenspektrometrie erfolgen.

5.6 Translatinaler Ausblick auf den p53-Verlust als Resistenzmechanismus gegen AMG 330

In dieser Arbeit wurde der Verlust der p53-Funktion als intrinsischer Resistenzmechanismus gegen AMG 330 *in vitro* evaluiert und die Ergebnisse müssen in weiteren Versuchen und Studien validiert und detailliert untersucht werden. Langfristig gesehen könnte die Bestätigung dieses Resistenzmechanismus Auswirkungen auf die translationale Behandlung der Patienten mit AMG 330 haben.

In der Phase-I-Studie von AMG 330 an r/r AML-Patienten zeigte sich zwar ein akzeptables Sicherheitsprofil, dennoch kam es bei 67 % der Patienten zum Zytokinfreisetzungssyndrom (CRS). Bei 13 % handelte es sich dabei um ein CRS \geq Grad 3 [41].

Falls der p53-Status als Einflussfaktor auf das Therapieansprechen in klinischen Studien bestätigt werden kann, sollte dies somit in der Nutzen-Risiko-Abwägung der AMG 330 Therapie berücksichtigt werden.

Des Weiteren könnte die AMG 330 Sensitivität der Patienten mit Dysfunktion von p53 durch eine Kombinationstherapie erhöht werden. Aktuell werden diverse niedermolekulare synthetische Verbindungen, sogenannte „small molecules“, zur Wiederherstellung der p53-Funktion entwickelt. Eprenetapopt (APR-246) wird im Rahmen mehrerer klinischer Studien als Kombinationstherapie mit Azacitidin bei AML- sowie MDS-Patienten mit *TP53*-Mutation getestet. APR-246 bindet an Cysteinreste und löst dadurch eine Konformationsänderung des mutierten p53 aus, die die Wildtypstruktur wiederherstellt und die DNA-Bindung ermöglicht [119].

In einer Phase-Ib/II-Studie (NCT03072043) konnten Remissionsraten von 44 % gezeigt werden [120]. Eine weitere Phase-II-Studie (NCT03931291) untersucht die Kombination als Erhaltungstherapie nach allogener Stammzelltransplantation [121].

Patienten mit übermäßigem p53-Abbau bei Steigerung der Mdm2-Konzentration oder -Aktivität könnten von Mdm2-Inhibitoren profitieren. Idasanutin wurde als Kombinationstherapie mit Venetoclax in einer Phase-Ib-Studie (NCT02670044) mit älteren r/r AML-Patienten getestet und es wurden Ansprechraten von 41 % festgestellt [122]. Siremadlin zeigte in einer Phase-I-Studie (NCT02143635) dosisabhängig Ansprechraten von bis zu 22 % bei Patienten mit akuter Leukämie [123].

5.7 Fazit

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen in Zusammenschau mit anderen Studien daraufhin, dass der Verlust der p53-Funktion der AML-Zellen sowohl durch zellinterne Störung des AMG 330 induzierten Apoptosesignalweges als auch einer zusätzlichen zellexternen Inhibition der T-Zellen zur Therapieresistenz führt.

Zur Abbildung des breiten Spektrums der AML und p53-Dysfunktion sollten Untersuchungen an primären Patientenproben durchgeführt werden. Zudem sollte die weitere Differenzierung des zugrundeliegenden Mechanismus der T-Zell-Inhibition durch die Analyse des AML-Sekretoms per Massenspektrometrie erfolgen. Da p53 in eine Vielzahl an Signalwegen involviert ist, kann ein kombinierter Vermittlungsmechanismus nicht ausgeschlossen werden und es sollte zusätzlich die Evaluation des Expressionsprofils erweitert werden.

Sollte sich eine Resistenz der AML durch Verlust der p53-Funktion im klinischen Kontext bestätigen, könnte die Therapie mit AMG 330 gezielter für Patienten mit bestmöglichem Nutzen-Risiko-Verhältnis ausgewählt oder durch eine Kombinationstherapie optimiert werden. Des Weiteren hätte eine T-Zell-Inhibition neben AMG 330 auch Auswirkungen auf andere T-Zell-basierte Immuntherapien.

6. Zusammenfassung

Die akute myeloische Leukämie ist trotz bestehender Therapieoptionen mit einer schlechten Prognose verbunden. Das bispezifische T-Zell-rekrutierende Antikörperkonstrukt AMG 330 stellt einen vielversprechenden immuntherapeutischen Ansatz dar. Durch die simultane Bindung der Zielantigene CD3 auf T-Zellen sowie CD33 auf AML-Zellen führt AMG 330 unabhängig von der Spezifität des T-Zell-Rezeptors zur Aktivierung der T-Zelle und Lyse der AML-Zelle. In einer Phase-I-Studie (NCT02520427) konnte durch AMG 330 bei ersten Patienten mit r/r AML eine Remission erreicht werden. Die Ursachen für das fehlende Ansprechen der anderen Patienten sind bislang jedoch unzureichend geklärt. Ein potenzieller Resistenzmechanismus ist die Beeinträchtigung der p53-Funktion. Diese ist mit einer ausgesprochen schlechten Prognose der AML assoziiert sowie als negativer Einflussfaktor im Rahmen von Chemotherapien und Stammzelltransplantation vorbekannt.

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Verlust der p53-Funktion als intrinsischen Resistenzmechanismus der AML gegen die Therapie mit AMG 330 zu evaluieren.

Dazu wurden drei p53-Wildtyp AML-Zelllinien (MV4-11, Molm-13, OCI-AML3) mit den entsprechenden p53-Knockdown Zelllinien verglichen. In Cokulturen der AML-Zelllinien und der T-Zellen gesunder Spender zeigte sich eine signifikant verminderte AMG 330 vermittelte spezifische Lyse der p53 kd AML-Zellen kombiniert mit einer geringeren Proliferation der T-Zellen. Die Analyse der Cokultur-Überstände per CBA ergab zusätzliche Hinweise auf eine verminderte T-Zell-Aktivierung. Dieser hemmende Effekt der p53 kd AML-Zellen auf die T-Zellen konnte nicht durch eine veränderte Expression des Zielantigens CD33 oder costimulatorischer und -inhibitorischer Oberflächenmoleküle (CD80, CD86, OX40L, PD-L1, Tim-3, Nectin-2) erklärt werden. Zur Differenzierung des Einflusses durch das AML-Sekretom wurden die Zellen im Transwell-Versuch durch eine semipermeable Membran getrennt kultiviert. Trotz des fehlenden Zell-Zell-Kontaktes war die T-Zell-Proliferation erneut signifikant geringer bei Kultivierung mit p53 kd AML-Zellen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der p53-Knockdown zu einer verminderten AMG 330 vermittelte Lyse der AML-Zellen sowie einer niedrigeren Proliferation der kokultivierten T-Zellen führt. Die Untersuchung des zugrundeliegenden Mechanismus weist auf einen inhibitorischen Effekt des Sekretoms der p53 kd AML-Zellen hin. Im Rahmen weiterer Untersuchungen sollten primäre Patientenproben eingeschlossen werden sowie das AML-Sekretom per Massenspektrometrie analysiert werden. Langfristig könnte die Evaluation einer vom p53-Status abhängigen AMG 330-Resistenz im klinischen Kontext erfolgen, damit die Therapie gezielt für Patienten mit bestmöglichem Nutzen-Risiko-Verhältnis ausgewählt oder durch eine Kombinationstherapie optimiert werden kann.

7. Literaturverzeichnis

- [1] C. Röllig u. a., „Akute Myeloische Leukämie (AML)“, *Onkopedia Leitlinien*, 2021. <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/akute-myeloische-leukaemie-aml/@@guideline/html/index.html> (zugegriffen Jan. 13, 2022).
- [2] G. Juliusson u. a., „Age and acute myeloid leukemia: Real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry“, *Blood*, Bd. 113, Nr. 18, S. 4179–4187, 2009, doi: 10.1182/blood-2008-07-172007.
- [3] K. Kraywinkel und C. Spix, „Epidemiologie akuter Leukämien in Deutschland“, *Onkologe*, Bd. 23, Nr. 7, S. 499–503, 2017, doi: 10.1007/s00761-017-0249-z.
- [4] K. M. Murphy und C. Weaver, *Janeway Immunologie*, 9. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum, 2018. doi: 10.1007/978-3-662-44228-9.
- [5] R. B. Walter, F. R. Appelbaum, E. H. Estey, und I. D. Bernstein, „Acute myeloid leukemia stem cells and CD33-targeted immunotherapy“, *Blood*, Bd. 119, Nr. 26, S. 6198–6208, 2012, doi: 10.1182/blood-2011-11-325050.
- [6] H. Döhner, D. J. Weisdorf, und C. D. Bloomfield, „Acute myeloid leukemia“, *New England Journal of Medicine*, Bd. 373, Nr. 12, S. 1136–1152, 2015, doi: 10.1056/NEJMra1406184.
- [7] C. Southam, L. F. Craver, H. W. Dargeon, und J. H. Burchenal, „A Study of the Natural History of Acute Leukemia With Special Reference to the Duration of the Disease and the Occurrence of Remissions“, *Cancer*, Bd. 4, Nr. 1, S. 39–59, 1951.
- [8] H. Döhner u. a., „Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel“, *Blood*, Bd. 129, Nr. 4, S. 424–448, 2017, doi: 10.1182/blood-2016-08-733196.424.
- [9] D. A. Arber u. a., „The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia“, *Blood*, Bd. 127, Nr. 20, S. 2391–2405, 2016, doi: 10.1182/blood-2016-03-643544.The.
- [10] Cancer Genome Atlas Research Network u. a., „Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia“, *New England Journal of Medicine*, Bd. 368, Nr. 22, S. 2059–2074, 2013, doi: 10.1056/NEJMoa1301689.
- [11] R. F. Schlenk und H. Döhner, „Genomic applications in the clinic: use in treatment paradigm of acute myeloid leukemia“, *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, S. 324–330, 2013, doi: 10.1182/asheducation-2013.1.324.
- [12] R. M. Stone u. a., „Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation“, *New England Journal of Medicine*, Bd. 377, Nr. 5, S. 454–464, Aug. 2017, doi: 10.1056/NEJMoa1614359/SUPPL_FILE/NEJMoa1614359_DISCLOSURES.PDF.
- [13] C. D. DiNardo u. a., „Durable Remissions with Ivosidenib in IDH1 -Mutated Relapsed or Refractory AML“, *New England Journal of Medicine*, Bd. 378, Nr. 25, S. 2386–2398, Juni 2018, doi: 10.1056/NEJMoa1716984/SUPPL_FILE/NEJMoa1716984_DISCLOSURES.PDF.
- [14] C. D. DiNardo u. a., „Azacitidine and Venetoclax in Previously Untreated Acute Myeloid Leukemia“, *New England Journal of Medicine*, Bd. 383, Nr. 7, S. 617–629, Aug. 2020, doi: 10.1056/NEJMoa2012971/SUPPL_FILE/NEJMoa2012971_DATA-SHARING.PDF.

- [15] J. Lambert *u. a.*, „Gemtuzumab ozogamicin for de novo acute myeloid leukemia: final efficacy and safety updates from the open-label, phase III ALFA-0701 trial“, *Haematologica*, Bd. 104, Nr. 1, S. 113, 2019, doi: 10.3324/HAEMATOL.2018.188888.
- [16] H. M. Kantarjian, T. M. Kadia, C. D. DiNardo, M. A. Welch, und F. Ravandi, „Acute myeloid leukemia: Treatment and research outlook for 2021 and the MD Anderson approach“, *Cancer*, Bd. 127, Nr. 8, S. 1186–1207, Apr. 2021, doi: 10.1002/CNCR.33477.
- [17] A. J. Barrett, „Acute myeloid leukaemia and the immune system: implications for immunotherapy“, *Br J Haematol*, Bd. 188, Nr. 1, S. 147–158, 2020, doi: 10.1111/bjh.16310.
- [18] L. Zitvogel, A. Tesniere, und G. Kroemer, „Cancer despite immunosurveillance: Immunoselection and immunosubversion“, *Nat Rev Immunol*, Bd. 6, Nr. 10, S. 715–727, 2006, doi: 10.1038/nri1936.
- [19] R. D. Schreiber, L. J. Old, und M. J. Smyth, „Cancer immunoediting: Integrating immunity’s roles in cancer suppression and promotion“, *Science (1979)*, Bd. 331, Nr. 6024, S. 1565–1570, 2011, doi: 10.1126/science.1203486.
- [20] G. P. Dunn, A. T. Bruce, H. Ikeda, L. J. Old, und R. D. Schreiber, „Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape“, *Nat Immunol*, Bd. 3, Nr. 11, S. 991–998, 2002, doi: 10.1016/B978-0-12-394296-8.00007-5.
- [21] R. R. Jenq und M. R. M. van den Brink, „Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: Individualized stem cell and immune therapy of cancer“, *Nat Rev Cancer*, Bd. 10, Nr. 3, S. 213–221, 2010, doi: 10.1038/nrc2804.
- [22] F. S. Lichtenegger, C. Krupka, S. Haubner, T. Köhnke, und M. Subklewe, „Recent developments in immunotherapy of acute myeloid leukemia“, *J Hematol Oncol*, Bd. 10, Nr. 1, S. 142, 2017, doi: 10.1186/s13045-017-0505-0.
- [23] Z. A. Ahmad, S. K. Yeap, A. M. Ali, W. Y. Ho, N. B. M. Alitheen, und M. Hamid, „ScFv antibody: Principles and clinical application“, *Clin Dev Immunol*, Bd. 2012, S. 980250, 2012, doi: 10.1155/2012/980250.
- [24] M. Friedrich *u. a.*, „Preclinical characterization of AMG 330, a CD3/CD33- bispecific T-cell-engaging antibody with potential for treatment of acute myelogenous leukemia“, *Mol Cancer Ther*, Bd. 13, Nr. 6, S. 1549–1557, 2014, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0956.
- [25] K. Brischwein *u. a.*, „Strictly target cell-dependent activation of T cells by bispecific single-chain antibody constructs of the BiTE class“, *Journal of Immunotherapy*, Bd. 30, Nr. 8, S. 798–807, Nov. 2007, doi: 10.1097/CJI.0b013e318156750c.
- [26] C. Haas *u. a.*, „Mode of cytotoxic action of T cell-engaging BiTE antibody MT110“, *Immunobiology*, Bd. 214, Nr. 6, S. 441–453, Juni 2009, doi: 10.1016/j.imbio.2008.11.014.
- [27] S. Hoves, M. Aigner, C. Pfeiffer, M. Laumer, E. C. Obermann, und A. Mackensen, „In situ analysis of the antigen-processing machinery in acute myeloid leukaemic blasts by tissue microarray“, *Leukemia*, Bd. 23, Nr. 5, S. 877–885, 2009, doi: 10.1038/leu.2008.391.
- [28] S. Offner, R. Hofmeister, A. Romaniuk, P. Kufer, und P. A. Baeuerle, „Induction of regular cytolytic T cell synapses by bispecific single-chain antibody constructs on MHC class I-negative tumor cells“, *Mol Immunol*, Bd. 43, Nr. 6, S. 763–771, 2006, doi: 10.1016/j.molimm.2005.03.007.

- [29] European Medicines Agency, „Blinicyto“, *European Medicines Agency*, 2019. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/blincyto> (zugegriffen Juni 23, 2020).
- [30] N. Gökbuget *u. a.*, „Blinatumomab for minimal residual disease in adults with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia“, *Blood*, Bd. 131, Nr. 14, S. 1522–1531, 2018, doi: 10.1182/blood-2017-08-798322.
- [31] E. Y. Jen *u. a.*, „FDA approval: Blinatumomab for Patients with B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia in Morphologic Remission with Minimal Residual Disease“, *Clinical Cancer Research*, Bd. 25, Nr. 2, S. 473–477, 2019, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-2337.
- [32] H. Kantarjian *u. a.*, „Blinatumomab versus chemotherapy for advanced acute lymphoblastic leukemia“, *New England Journal of Medicine*, Bd. 376, Nr. 9, S. 836–847, 2017, doi: 10.1056/NEJMoa1609783.
- [33] C. Krupka *u. a.*, „CD33 target validation and sustained depletion of AML blasts in long-term cultures by the bispecific T-cell-engaging antibody AMG 330.“, *Blood*, Bd. 123, Nr. 3, S. 356–65, Jan. 2014, doi: 10.1182/blood-2013-08-523548.
- [34] C. Krupka *u. a.*, „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*, Bd. 30, Nr. 2, S. 484–491, 2016, doi: 10.1038/leu.2015.214.
- [35] C. Arndt *u. a.*, „Redirection of T cells with a first fully humanized bispecific CD33-CD3 antibody efficiently eliminates AML blasts without harming hematopoietic stem cells“, *Leukemia*, Bd. 27, Nr. 4, S. 964–967, 2013, doi: 10.1038/leu.2013.18.
- [36] S. Haubner *u. a.*, „Coexpression profile of leukemic stem cell markers for combinatorial targeted therapy in AML“, *Leukemia*, Bd. 33, Nr. 1, S. 64, Jan. 2019, doi: 10.1038/S41375-018-0180-3.
- [37] S. S. Kenderian *u. a.*, „CD33-specific chimeric antigen receptor T cells exhibit potent preclinical activity against human acute myeloid leukemia“, *Leukemia*, Bd. 29, Nr. 8, S. 1637, Aug. 2015, doi: 10.1038/LEU.2015.52.
- [38] M. Aigner *u. a.*, „T lymphocytes can be effectively recruited for ex vivo and in vivo lysis of AML blasts by a novel CD33/CD3-bispecific BiTE antibody construct“, *Leukemia*, Bd. 27, Nr. 5, S. 1107–1115, 2013, doi: 10.1038/leu.2012.341.
- [39] G. S. Laszlo *u. a.*, „Cellular determinants for preclinical activity of a novel CD33/CD3 bispecific T-cell engager (BiTE) antibody, AMG 330, against human AML“, *Blood*, Bd. 123, Nr. 4, S. 554–561, 2014, doi: 10.1182/blood-2013-09-527044.
- [40] F. Ravandi *u. a.*, „A Phase 1 First-in-Human Study of AMG 330, an Anti-CD33 Bispecific T-Cell Engager (BiTE®) Antibody Construct, in Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia (R/R AML)“, *Blood*, Bd. 132, Nr. Supplement 1, S. 25, Nov. 2018, doi: 10.1182/blood-2018-99-109762.
- [41] F. Ravandi *u. a.*, „Updated results from phase I dose-escalation study of AMG 330, a bispecific T-cell engager molecule, in patients with relapsed/refractory acute myeloid leukemia (R/R AML).“, *Journal of Clinical Oncology*, Bd. 38, Nr. 15_suppl, S. 7508, Mai 2020, doi: 10.1200/jco.2020.38.15_suppl.7508.

- [42] G. S. Laszlo, C. J. Gudgeon, K. H. Harrington, und R. B. Walter, „T-cell ligands modulate the cytolytic activity of the CD33/CD3 BiTE antibody construct, AMG 330“, *Blood Cancer J*, Bd. 5, Nr. 8, S. 1–6, 2015, doi: 10.1038/bcj.2015.68.
- [43] C. Kandath u. a., „Mutational landscape and significance across 12 major cancer types“, *Nature*, Bd. 502, Nr. 7471, S. 333–339, 2013, doi: 10.1038/nature12634.
- [44] G. Zhu u. a., „Mutant p53 in Cancer Progression and Targeted Therapies“, *Front Oncol*, Bd. 10, Nov. 2020, doi: 10.3389/fonc.2020.595187.
- [45] A. J. Levine, „p53: 800 million years of evolution and 40 years of discovery“, *Nat Rev Cancer*, Bd. 20, Nr. 8, S. 471–480, Aug. 2020, doi: 10.1038/s41568-020-0262-1.
- [46] A. C. Joerger und A. R. Fersht, „Structural Biology of the Tumor Suppressor p53“, *Annu Rev Biochem*, Bd. 77, Nr. 1, S. 557–582, Juni 2008, doi: 10.1146/annurev.biochem.77.060806.091238.
- [47] Y. Haupt, R. Maya, A. Kazaz, und M. Oren, „Mdm2 promotes the rapid degradation of p53“, *Nature*, Bd. 387, Nr. 6630, S. 296–299, Mai 1997, doi: 10.1038/387296a0.
- [48] M. H. G. Kubbutat, S. N. Jones, und K. H. Vousden, „Regulation of p53 stability by Mdm2“, *Nature*, Bd. 387, Nr. 6630, S. 299–303, Mai 1997, doi: 10.1038/387299a0.
- [49] J. D. Oliner, J. A. Pietenpol, S. Thiagalingam, J. Gyuris, K. W. Kinzler, und B. Vogelstein, „Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53“, *Nature*, Bd. 362, Nr. 6423, S. 857–860, 1993, doi: 10.1038/362857a0.
- [50] C. L. Brooks und W. Gu, „New insights into p53 activation“, *Cell Res*, Bd. 20, Nr. 6, S. 614–621, Juni 2010, doi: 10.1038/cr.2010.53.
- [51] M. B. Kastan, O. Onyekwere, D. Sidransky, B. Vogelstein, und R. W. Craig, „Participation of p53 Protein in the Cellular Response to DNA Damage“, *Cancer Res*, Bd. 51, Nr. 23 Part 1, S. 6304–6311, 1991.
- [52] W. R. Taylor und G. R. Stark, „Regulation of the G2/M transition by p53“, *Oncogene*, Bd. 20, Nr. 15, S. 1803–1815, Apr. 2001, doi: 10.1038/sj.onc.1204252.
- [53] M. Serrano, A. W. Lin, M. E. McCurrach, D. Beach, und S. W. Lowe, „Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16(INK4a)“, *Cell*, Bd. 88, Nr. 5, S. 593–602, März 1997, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81902-9.
- [54] T. Miyashita u. a., „Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo“, *Oncogene*, Bd. 9, Nr. 6, S. 1799–1805, 1994, Zugegriffen: Jan. 10, 2022. [Online]. Available: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.emedien.uni-muenchen.de/8183579/>
- [55] A. Villunger u. a., „p53- and Drug-Induced Apoptotic Responses Mediated by BH3-Only Proteins Puma and Noxa“, *Science (1979)*, Bd. 302, Nr. 5647, S. 1036–1038, Nov. 2003, doi: 10.1126/science.1090072.
- [56] J. K. Sax, P. Fei, M. E. Murphy, E. Bernhard, S. J. Korsmeyer, und W. S. El-Deiry, „BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity“, *Nat Cell Biol*, Bd. 4, Nr. 11, S. 842–849, Okt. 2002, doi: 10.1038/NCB866.
- [57] D. P. Lane, „p53, guardian of the genome“, *Nature*, Bd. 358, S. 15–16, 1992.

- [58] E. R. Kasthuber und S. W. Lowe, „Putting p53 in Context“, *Cell*, Bd. 170, Nr. 6, S. 1062–1078, Sep. 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.08.028.
- [59] L. Bouaoun u. a., „TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data“, *Hum Mutat*, Bd. 37, Nr. 9, S. 865–876, Sep. 2016, doi: 10.1002/humu.23035.
- [60] M. Olivier, M. Hollstein, und P. Hainaut, „TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use.“, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, Bd. 2, Nr. 1, 2010, doi: 10.1101/cshperspect.a001008.
- [61] Y. Liu u. a., „Deletions linked to TP53 loss drive cancer through p53-independent mechanisms“, *Nature*, Bd. 531, Nr. 7595, S. 471–475, März 2016, doi: 10.1038/nature17157.
- [62] N. T. Pfister und C. Prives, „Transcriptional regulation by wild-type and cancer-related mutant forms of p53“, *Cold Spring Harb Perspect Med*, Bd. 7, Nr. 2, Feb. 2017, doi: 10.1101/cshperspect.a026054.
- [63] F. Mantovani, L. Collavin, und G. del Sal, „Mutant p53 as a guardian of the cancer cell“, *Cell Death Differ*, Bd. 26, Nr. 2, S. 199–212, Jan. 2019, doi: 10.1038/s41418-018-0246-9.
- [64] J. D. Oliner, A. Y. Saiki, und S. Caenepeel, „The role of MDM2 amplification and overexpression in tumorigenesis“, *Cold Spring Harb Perspect Med*, Bd. 6, Nr. 6, Juni 2016, doi: 10.1101/cshperspect.a026336.
- [65] K. Hientz, A. Mohr, D. Bhakta-Guha, und T. Efferth, „The role of p53 in cancer drug resistance and targeted chemotherapy“, *Oncotarget*, Bd. 8, Nr. 5, S. 8921–8946, Jan. 2017, doi: 10.18632/oncotarget.13475.
- [66] Z. Zhao u. a., „p53 loss promotes acute myeloid leukemia by enabling aberrant self-renewal“, *Genes Dev*, Bd. 24, Nr. 13, S. 1389–1402, Juli 2010, doi: 10.1101/gad.1940710.
- [67] V. Pant, A. Quintás-Cardama, und G. Lozano, „The p53 pathway in hematopoiesis: Lessons from mouse models, implications for humans“, *Blood*, Bd. 120, Nr. 26, S. 5118–5127, Dez. 2012, doi: 10.1182/blood-2012-05-356014.
- [68] L. Bullinger, K. Döhner, und H. Döhner, „Genomics of acute myeloid leukemia diagnosis and pathways“, *Journal of Clinical Oncology*, Bd. 35, Nr. 9, S. 934–946, März 2017, doi: 10.1200/JCO.2016.71.2208.
- [69] A. Quintás-Cardama u. a., „P53 pathway dysfunction is highly prevalent in acute myeloid leukemia independent of TP53 mutational status“, *Leukemia*, Bd. 31, Nr. 6, S. 1296–1305, Juni 2017, doi: 10.1038/leu.2016.350.
- [70] M. Prokocimer, A. Molchadsky, und V. Rotter, „Dysfunctional diversity of p53 proteins in adult acute myeloid leukemia: Projections on diagnostic workup and therapy“, *Blood*, Bd. 130, Nr. 6, S. 699–712, Aug. 2017, doi: 10.1182/blood-2017-02-763086.
- [71] E. Papaemmanuil u. a., „Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia“, *New England Journal of Medicine*, Bd. 374, Nr. 23, S. 2209–2221, Juni 2016, doi: 10.1056/nejmoa1516192.
- [72] A. Stengel, W. Kern, T. Haferlach, M. Meggendorfer, A. Fasan, und C. Haferlach, „The impact of TP53 mutations and TP53 deletions on survival varies between AML, ALL, MDS and CLL: An

- analysis of 3307 cases“, *Leukemia*, Bd. 31, Nr. 3, S. 705–711, März 2017, doi: 10.1038/leu.2016.263.
- [73] T. M. Kadia u. a., „TP53 mutations in newly diagnosed acute myeloid leukemia: Clinicomolecular characteristics, response to therapy, and outcomes“, *Cancer*, Bd. 122, Nr. 22, S. 3484–3491, Nov. 2016, doi: 10.1002/cncr.30203.
- [74] T. N. Wong u. a., „Role of TP53 mutations in the origin and evolution of therapy-related acute myeloid leukaemia“, *Nature*, Bd. 518, Nr. 7540, S. 552–555, Feb. 2015, doi: 10.1038/nature13968.
- [75] J. M. Middeke u. a., „TP53 mutation in patients with high-risk acute myeloid leukaemia treated with allogeneic haematopoietic stem cell transplantation“, *Br J Haematol*, Bd. 172, Nr. 6, S. 914–922, März 2016, doi: 10.1111/bjh.13912.
- [76] X. Poiré u. a., „Allogeneic stem cell transplantation in adult patients with acute myeloid leukaemia and 17p abnormalities in first complete remission: a study from the Acute Leukemia Working Party (ALWP) of the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT)“, *J Hematol Oncol*, Bd. 10, Nr. 1, S. 1–10, Jan. 2017, doi: 10.1186/s13045-017-0393-3.
- [77] R. Pan u. a., „Synthetic Lethality of Combined Bcl-2 Inhibition and p53 Activation in AML: Mechanisms and Superior Antileukemic Efficacy“, *Cancer Cell*, Bd. 32, Nr. 6, S. 748-760.e6, Dez. 2017, doi: 10.1016/J.CCELL.2017.11.003.
- [78] ATCC, „MV-4-11 ATCC® CRL-9591™“, 2016. https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-9591.aspx?geo_country=de#generalinformation (zugegriffen Feb. 24, 2020).
- [79] H. Quentmeier, J. Reinhardt, M. Zaborski, und H. G. Drexler, „FLT3 mutations in acute myeloid leukemia cell lines“, *Leukemia*, Bd. 17, Nr. 1, S. 120–124, Jan. 2003, doi: 10.1038/sj.leu.2402740.
- [80] DSMZ, „Molm-13, ACC 554“, 2013. <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-554> (zugegriffen Feb. 24, 2020).
- [81] DSMZ, „OCI-AML3, ACC 582“, 2013. <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-582> (zugegriffen Feb. 24, 2020).
- [82] I. J. Fuss, M. E. Kanof, P. D. Smith, und H. Zola, „Isolation of Whole Mononuclear Cells from Peripheral Blood and Cord Blood“, *Curr Protoc Immunol*, Bd. 85, Nr. 1, S. 7.1.1-7.1.8, Apr. 2009, doi: 10.1002/0471142735.im0701s85.
- [83] M. T. Hemann u. a., „An epi-allelic series of p53 hypomorphs created by stable RNAi produces distinct tumor phenotypes in vivo“, *Nature Genetics* 2003 33:3, Bd. 33, Nr. 3, S. 396–400, Feb. 2003, doi: 10.1038/NG1091.
- [84] J. Thiery u. a., „Perforin pores in the endosomal membrane trigger the release of endocytosed granzyme B into the cytosol of target cells“, *Nat Immunol*, Bd. 12, Nr. 8, S. 770–777, Aug. 2011, doi: 10.1038/NI.2050.

- [85] J. A. Heibein *u. a.*, „Granzyme B–Mediated Cytochrome C Release Is Regulated by the Bcl-2 Family Members Bid and Bax“, *Journal of Experimental Medicine*, Bd. 192, Nr. 10, S. 1391–1402, Nov. 2000, doi: 10.1084/JEM.192.10.1391.
- [86] F. Meslin, J. Thiery, C. Richon, A. Jalil, und S. Chouaib, „Granzyme B-induced Cell Death Involves Induction of p53 Tumor Suppressor Gene and Its Activation in Tumor Target Cells“, *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 282, Nr. 45, S. 32991–32999, Nov. 2007, doi: 10.1074/JBC.M705290200.
- [87] T. ben Safta *u. a.*, „Granzyme B–Activated p53 Interacts with Bcl-2 To Promote Cytotoxic Lymphocyte–Mediated Apoptosis“, *The Journal of Immunology*, Bd. 194, Nr. 1, S. 418–428, Jan. 2015, doi: 10.4049/JIMMUNOL.1401978/-/DCSUPPLEMENTAL.
- [88] A. Corthay *u. a.*, „Primary antitumor immune response mediated by CD4+ T cells“, *Immunity*, Bd. 22, Nr. 3, S. 371–383, März 2005, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2005.02.003/ATTACHMENT/41A3062B-DC09-40DB-8C85-B460C5A7E9E8/MMC1.PDF.
- [89] D. K. Sojka, D. Bruniquel, R. H. Schwartz, und N. J. Singh, „IL-2 Secretion by CD4+ T Cells In Vivo Is Rapid, Transient, and Influenced by TCR-Specific Competition“, *The Journal of Immunology*, Bd. 172, Nr. 10, S. 6136–6143, Mai 2004, doi: 10.4049/JIMMUNOL.172.10.6136.
- [90] J. M. Curtsinger, P. Agarwal, D. C. Lins, und M. F. Mescher, „Autocrine IFN- γ promotes naive CD8 T cell differentiation and synergizes with IFN- α to stimulate strong function“, *J Immunol*, Bd. 189, Nr. 2, S. 659–668, Juli 2012, doi: 10.4049/JIMMUNOL.1102727.
- [91] C. Herrero *u. a.*, „Reprogramming of IL-10 Activity and Signaling by IFN- γ “, *The Journal of Immunology*, Bd. 171, Nr. 10, S. 5034–5041, Nov. 2003, doi: 10.4049/JIMMUNOL.171.10.5034.
- [92] T. Kasahara, J. J. Hooks, S. F. Dougherty, und J. J. Oppenheim, „Interleukin 2-mediated immune interferon (IFN-gamma) production by human T cells and T cell subsets.“, *The Journal of Immunology*, Bd. 130, Nr. 4, 1983.
- [93] W. Liao, J. X. Lin, L. Wang, P. Li, und W. J. Leonard, „Modulation of cytokine receptors by IL-2 broadly regulates differentiation into helper T cell lineages“, *Nat Immunol*, Bd. 12, Nr. 6, S. 551–559, Juni 2011, doi: 10.1038/NI.2030.
- [94] M. E. Pipkin, J. A. Sacks, F. Cruz-Guilloty, M. G. Lichtenheld, M. J. Bevan, und A. Rao, „Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells“, *Immunity*, Bd. 32, Nr. 1, S. 79–90, Jan. 2010, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2009.11.012.
- [95] C. Toffalori *u. a.*, „Immune signature drives leukemia escape and relapse after hematopoietic cell transplantation“, *Nat Med*, Bd. 25, Nr. 4, S. 603–611, Apr. 2019, doi: 10.1038/S41591-019-0400-Z.
- [96] P. Williams *u. a.*, „The distribution of T-cell subsets and the expression of immune checkpoint receptors and ligands in patients with newly diagnosed and relapsed acute myeloid leukemia“, *Cancer*, Bd. 125, Nr. 9, S. 1470–1481, Mai 2019, doi: 10.1002/CNCR.31896.
- [97] Q. Zhou *u. a.*, „Coexpression of Tim-3 and PD-1 identifies a CD8+ T-cell exhaustion phenotype in mice with disseminated acute myelogenous leukemia“, *Blood*, Bd. 117, Nr. 17, S. 4501–4510, Apr. 2011, doi: 10.1182/BLOOD-2010-10-310425.

- [98] H. A. Knaus *u. a.*, „Signatures of CD8+ T cell dysfunction in AML patients and their reversibility with response to chemotherapy“, *JCI Insight*, Bd. 3, Nr. 21, Nov. 2018, doi: 10.1172/JCI.INSIGHT.120974.
- [99] N. Daver *u. a.*, „Abstract LB-222: Polyfunctionality determined by single-cell proteomics of bone marrow-derived CD4 T cells from patients with acute myeloid leukemia identifies patients responding to anti-PD-1-based therapy and discovers profound T cell defect in mutant T“, *Cancer Res*, Bd. 79, Nr. 13 Supplement, S. LB-222, Juli 2019, doi: 10.1158/1538-7445.AM2019-LB-222.
- [100] J. Vadakekolathu *u. a.*, „TP53 abnormalities correlate with immune infiltration and associate with response to flotetuzumab immunotherapy in AML“, *Blood Adv*, Bd. 4, Nr. 20, S. 5011–5024, Okt. 2020, doi: 10.1182/BLOODADVANCES.2020002512.
- [101] C. Berthon *u. a.*, „In acute myeloid leukemia, B7-H1 (PD-L1) protection of blasts from cytotoxic T cells is induced by TLR ligands and interferon-gamma and can be reversed using MEK inhibitors“, *Cancer Immunol Immunother*, Bd. 59, Nr. 12, S. 1839–1849, 2010, doi: 10.1007/S00262-010-0909-Y.
- [102] J. L. Benci *u. a.*, „Tumor Interferon Signaling Regulates a Multigenic Resistance Program to Immune Checkpoint Blockade“, *Cell*, Bd. 167, Nr. 6, S. 1540-1554.e12, Dez. 2016, doi: 10.1016/J.CELL.2016.11.022.
- [103] R. Shouval *u. a.*, „Impact of TP53 Genomic Alterations in Large B-Cell Lymphoma Treated With CD19-Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy“, *Journal of Clinical Oncology*, Dez. 2021, doi: 10.1200/jco.21.02143.
- [104] X. Zhang *u. a.*, „Efficacy and safety of anti-CD19 CAR T-cell therapy in 110 patients with B-cell acute lymphoblastic leukemia with high-risk features“, *Blood Adv*, Bd. 4, Nr. 10, S. 2325–2338, Mai 2020, doi: 10.1182/BLOODADVANCES.2020001466.
- [105] B. Wang, D. Niu, L. Lai, und E. C. Ren, „p53 increases MHC class I expression by upregulating the endoplasmic reticulum aminopeptidase ERAP1“, *Nat Commun*, Bd. 4, 2013, doi: 10.1038/NCOMMS3359.
- [106] S. M. Wörmann *u. a.*, „Loss of P53 Function Activates JAK2-STAT3 Signaling to Promote Pancreatic Tumor Growth, Stroma Modification, and Gemcitabine Resistance in Mice and Is Associated With Patient Survival“, *Gastroenterology*, Bd. 151, Nr. 1, S. 180-193.e12, Juli 2016, doi: 10.1053/J.GASTRO.2016.03.010.
- [107] J. Blagih *u. a.*, „Cancer-Specific Loss of p53 Leads to a Modulation of Myeloid and T Cell Responses“, *Cell Rep*, Bd. 30, Nr. 2, S. 481-496.e6, Jan. 2020, doi: 10.1016/J.CELREP.2019.12.028.
- [108] K. C. Dannheim, O. Pozdnyakova, P. D. Cin, und O. K. Weinberg, „Immunophenotypic dysplasia and aberrant T-cell antigen expression in acute myeloid leukaemia with complex karyotype and TP53 mutations“, *J Clin Pathol*, Bd. 71, Nr. 12, S. 1051–1059, Dez. 2018, doi: 10.1136/JCLINPATH-2018-205348.
- [109] D. A. Sallman *u. a.*, „TP53 mutations in myelodysplastic syndromes and secondary AML confer an immunosuppressive phenotype“, *Blood*, Bd. 136, Nr. 24, S. 2812–2823, Dez. 2020, doi: 10.1182/BLOOD.2020006158.

- [110] M. A. Cortez *u. a.*, „PDL1 Regulation by p53 via miR-34.“, *J Natl Cancer Inst*, Bd. 108, Nr. 1, Jan. 2016, doi: 10.1093/jnci/djv303.
- [111] D. Wolf und V. Rotter, „Major deletions in the gene encoding the p53 tumor antigen cause lack of p53 expression in HL-60 cells“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Bd. 82, Nr. 3, S. 790–794, 1985, doi: 10.1073/PNAS.82.3.790.
- [112] J. K. Orleans-Lindsay, L. D. Barber, H. G. Prentice, und M. W. Lowdell, „Acute myeloid leukaemia cells secrete a soluble factor that inhibits T and NK cell proliferation but not cytolytic function--implications for the adoptive immunotherapy of leukaemia.“, *Clin Exp Immunol*, Bd. 126, Nr. 3, S. 403–11, Dez. 2001, doi: 10.1046/J.1365-2249.2001.01692.X.
- [113] F. Mussai *u. a.*, „Acute myeloid leukemia creates an arginase-dependent immunosuppressive microenvironment“, *Blood*, Bd. 122, Nr. 5, S. 749–758, Aug. 2013, doi: 10.1182/BLOOD-2013-01-480129.
- [114] K. Fukuno *u. a.*, „Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in leukemic cells indicates an unfavorable prognosis in acute myeloid leukemia patients with intermediate-risk cytogenetics“, *Leuk Lymphoma*, Bd. 56, Nr. 5, S. 1398–1405, Mai 2015, doi: 10.3109/10428194.2014.953150.
- [115] D. H. Munn, E. Shafizadeh, J. T. Attwood, I. Bondarev, A. Pashine, und A. L. Mellor, „Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism“, *J Exp Med*, Bd. 189, Nr. 9, S. 1363–1372, Mai 1999, doi: 10.1084/JEM.189.9.1363.
- [116] P. Terness *u. a.*, „Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites“, *J Exp Med*, Bd. 196, Nr. 4, S. 447–457, Aug. 2002, doi: 10.1084/JEM.20020052.
- [117] T. Eleftheriadis, G. Pissas, G. Antoniadis, A. Spanoulis, V. Liakopoulos, und I. Stefanidis, „Indoleamine 2,3-dioxygenase increases p53 levels in alloreactive human T cells, and both indoleamine 2,3-dioxygenase and p53 suppress glucose uptake, glycolysis and proliferation“, *Int Immunol*, Bd. 26, Nr. 12, S. 673–684, Dez. 2014, doi: 10.1093/INTIMM/DXU077.
- [118] D. Tang *u. a.*, „P53 prevent tumor invasion and metastasis by down-regulating IDO in lung cancer“, *Oncotarget*, Bd. 8, Nr. 33, S. 54548–54557, 2017, doi: 10.18632/ONCOTARGET.17408.
- [119] Q. Zhang, V. J. N. Bykov, K. G. Wiman, und J. Zawacka-Pankau, „APR-246 reactivates mutant p53 by targeting cysteines 124 and 277“, *Cell Death Dis*, Bd. 9, Nr. 5, S. 439, Mai 2018, doi: 10.1038/s41419-018-0463-7.
- [120] D. A. Sallman *u. a.*, „Eprenetapopt (APR-246) and azacitidine in TP53-mutant myelodysplastic syndromes“, *Journal of Clinical Oncology*, Bd. 39, Nr. 14, S. 1584–1594, Mai 2021, doi: 10.1200/JCO.20.02341.
- [121] T. Cluzeau, M. Loschi, P. Fenaux, R. Komrokji, und D. A. Sallman, „Personalized Medicine for TP53 Mutated Myelodysplastic Syndromes and Acute Myeloid Leukemia“, *Int J Mol Sci*, Bd. 22, Nr. 18, S. 10105, Sep. 2021, doi: 10.3390/IJMS221810105.
- [122] N. G. Daver *u. a.*, „Updated Results from the Venetoclax (Ven) in Combination with Idasanutlin (Idasa) Arm of a Phase 1b Trial in Elderly Patients (Pts) with Relapsed or Refractory (R/R) AML Ineligible for Cytotoxic Chemotherapy“, *Blood*, Bd. 134, Nr. Supplement_1, S. 229–229, Nov. 2019, doi: 10.1182/BLOOD-2019-123711.

- [123] E. M. Stein *u. a.*, „Results from a First-in-Human Phase I Study of Siremadlin (HDM201) in Patients with Advanced Wild-Type TP53 Solid Tumors and Acute Leukemia“, *Clin Cancer Res*, Dez. 2021, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-21-1295.

8. Danksagung

Herzlich danken möchte ich Frau Prof. Dr. med. Marion Subklewe, Oberärztin der Medizinischen Klinik und Poliklinik III der Ludwig-Maximilians-Universität München und Leiterin der Arbeitsgruppe “Translational Cancer Immunology“ am Genzentrum der LMU für die Überlassung des Themas, ihren fachlichen Rat sowie die stete Unterstützung des Projektes. Insbesondere dankbar bin ich für das persönliche und berufliche Mentoring sowie die Möglichkeit die Ergebnisse dieser Arbeit auf einem internationalen Kongress zu präsentieren.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Michael von Bergwelt, dem Direktor der Medizinischen Klinik und Poliklinik III der LMU für die Möglichkeit meine Doktorarbeit an seiner Klinik durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt meinen Betreuerinnen Dr. Bettina Brauchle und Dr. Ana Ogrinc Wagner.

Dr. Bettina Brauchle danke ich für ihre stetige Hilfsbereitschaft, sachkundige Unterstützung und ihre Geduld bei der Beantwortung all meiner theoretischen und praktischen Fragen. Insbesondere für ihre unermüdliche Motivation, die Korrektur meiner Dissertation und die exzellente Betreuung auch über ihre Tätigkeit in der Arbeitsgruppe hinaus möchte ich mich von Herzen bedanken.

Dr. Ana Ogrinc Wagner danke ich für die Einführung in das Projekt und die experimentellen Arbeitsfelder der Immunologie. Vor allem für ihre Geduld und ihre Hilfestellungen bei meiner Einarbeitung in den Laboralltag sowie den unablässigen Rückhalt bedanke ich mich herzlich.

Des Weiteren danke ich Dr. Christian Augsburg, Dr. Veit Bücklein und Dr. Maryam Kazerani Pasikhani für die Korrektur und Beratung bei meinen Abstracts und Präsentationen sowie die kompetente Einarbeitung in weitere experimentelle Methoden.

Ich bedanke mich herzlich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für ihre überaus freundliche Aufnahme, stetige Hilfsbereitschaft und aufbauenden Worte sowie die fröhliche und kollegiale Atmosphäre.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für ihre Unterstützung und die perfekte Balance zwischen Ablenkung und Ansporn in allen Phasen meiner Promotion.

9. Eidesstattliche Versicherung



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Dekanat Medizinische Fakultät
Promotionsbüro



Eidesstattliche Versicherung

Pawlowsky, Lea

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Verlust der p53-Funktion als intrinsischer Resistenzmechanismus gegen das T-Zell-rekrutierende Antikörperkonstrukt AMG 330 zur Therapie der akuten myeloischen Leukämie

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, 30.01.2023

Ort, Datum

Lea Pawlowsky

Unterschrift Doktorandin/Doktorand