

Aus der  
Medizinischen Klinik und Poliklinik III  
Klinik der Universität München  
Direktor: Prof. Dr. Dr. Michael von Bergwelt

# **T-Zellen von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie zeigen keinen Anhalt für Erschöpfung**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Katharina Veronika Bian

aus

Regensburg

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Marion Subklewe
Mitberichterstatter:	PD Dr. Hanna-Mari Baldauf PD Dr. Christian Wichmann
Mitbetreuung durch die promovierten Mitarbeiter:	Dr. Felix Lichtenegger Dr. Frauke Schnorfeil
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	07.12.2023

## **Inhaltsverzeichnis:**

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>3</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>5</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>7</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>8</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>9</b>
1.1 Akute Myeloische Leukämie (AML) .....	9
1.1.1 Biologie und Epidemiologie der AML.....	9
1.1.2 Therapieoptionen .....	10
1.1.3 Neue Therapieansätze .....	11
1.2 Angeborene und erworbene Immunität.....	11
1.3 T-Zellen im menschlichen Immunsystem und Differenzierung von T Memory Zellen .....	11
1.3.1 CD8-T-Zellen .....	12
1.3.2 CD4-T-Zellen .....	12
1.3.3 T-Gedächtniszellen .....	13
1.3.4 Regulatorische T-Zellen .....	13
1.3.5 NK-T-Zellen .....	14
1.3.6 $\gamma\delta$ -Zellen .....	14
1.4 T-Zell Erschöpfung .....	14
1.4.1 Definition und Entstehung.....	14
1.4.2 Inhibitorische Rezeptoren auf T-Zellen.....	15
1.3.2.1 CD244 .....	15
1.3.2.2 CD160 .....	16
1.3.2.3 PD-1 .....	16
1.3.2.4 Tim-3.....	16
1.4.3 T-Zell Erschöpfung bei malignen Erkrankungen.....	17
1.5 Fragestellung .....	17
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>18</b>
2.1 Material .....	18
2.1.1 Zustimmung der Ethikkommission .....	18
2.1.2 Patientenproben.....	18
2.1.3 Antikörper.....	18
2.1.4 Kulturmedien.....	19
2.1.5 Zell Stimuli .....	19
2.1.6 Chemikalien, Laborausstattung .....	20
2.1.6.1 Chemikalien .....	20

2.1.6.2	Laborausstattung – Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	20
2.1.7	Lösungen .....	21
2.2	Methoden.....	21
2.2.1	Isolierung von PBMCs .....	21
2.2.2	Immunfluoreszenz-Färbung und Analyse mittels Durchflusszytometrie .....	22
2.2.3	Intrazelluläre Färbung.....	22
2.2.4	MACS Separation .....	22
2.2.5	Intrazelluläre Zytokin-Färbung.....	23
2.2.6	CFSE Assay .....	24
2.2.7	Einfrieren .....	24
2.2.8	Auftauen.....	24
2.2.9	Statistik.....	25
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>26</b>
3.1	Expression von CD244, CD160, PD-1 und TIM-3 in AML-Patienten und Vergleichsgruppen	26
3.1.1	Erhöhte Expression von inhibitorischen Rezeptoren auf T-Zellen von HIV-Patienten ..	26
3.1.2	Erhöhte Expression von CD244 in CD4 <sup>+</sup> T-Zellen von AML Patienten bei Erstdiagnose	28
3.1.3	Anstieg von CD244 und PD-1 in CD8 <sup>+</sup> bzw. CD4 <sup>+</sup> T-Zellen von AML Patienten mit Rezidiv .....	30
3.1.4	Die Expression der inhibitorischen Moleküle variiert in Abhängigkeit vom Alter, nicht jedoch vom CMV Status .....	32
3.2	Vergleich der Differenzierung von T-Gedächtniszellen (T Memory Cells).....	36
3.2.1	Verteilung der T Gedächtniszellen in Differenzierungsstadien .....	36
3.2.2	Expression von inhibitorischen Molekülen in Abhängigkeit von T Memory Differenzierung.....	41
3.3	Vergleich der T-Zell Funktionalität.....	42
3.3.1	Zytokin-Produktion .....	43
3.3.2	Proliferation.....	44
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>47</b>
<b>5.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>51</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>56</b>
	<b>Affidavit.....</b>	<b>57</b>
	<b>Publikationsliste.....</b>	<b>58</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.1 Durchflusszytometrische Analyse und Gatingstrategie in gesunden Spendern und HIV-positiven Patienten .....	27
Abb. 3.2 Anteil von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut von gesunden Spendern (HC, healthy control) und HIV-positiven Patienten. ....	27
Abb. 3.3 Die inhibitorischen Rezeptoren CD244, CD160 und PD-1, nicht jedoch TIM-3, sind in CD8 <sup>+</sup> T-Zellen von HIV-Patienten signifikant erhöht gegenüber gesunden Individuen. ....	28
Abb. 3.4 In CD4 <sup>+</sup> T-Zellen von HIV-Patienten ist lediglich die Expression von PD-1 gegenüber gesunden Individuen erhöht. ....	28
Abb. 3.5 In CD8 <sup>+</sup> T-Zellen von nicht therapierten AML Patienten ist bei Erstdiagnose die Expression von CD160 erniedrigt. ....	29
Abb. 3.6 In CD4 <sup>+</sup> T-Zellen von nicht therapierten AML Patienten ist bei Erstdiagnose die Expression von CD244 signifikant erhöht. ....	29
Abb. 3.7 Die Expression von CD244, CD160, PD-1 und TIM-3 In CD8 <sup>+</sup> T-Zellen von AML Patienten variiert je nach Krankheitsphase. ....	30
Abb. 3.8 Die Expression von CD244 und PD-1 ist in CD4 <sup>+</sup> T-Zellen von AML Patienten in distinkten Krankheitsphasen stark erhöht. ....	31
Abb. 3.9 Die Expression von CD244, CD160, PD-1 und TIM-3 in CD8 <sup>+</sup> T-Zellen ist vom Alter abhängig	33
Abb. 3.10 Die Expression von CD244, CD160, PD-1 und TIM-3 in CD4 <sup>+</sup> T-Zellen ist vom Alter abhängig. ....	35
Abb. 3.11 Die Expression von CD244, CD160, PD-1 und TIM-3 auf CD8 <sup>+</sup> T-Zellen und CD4 <sup>+</sup> T-Zellen ist unabhängig vom CMV Serostatus. ....	36
Abb. 3.12 Durchflusszytometrische Analyse und Gatingstrategie von T <sub>naiv</sub> (CD45RA <sup>+</sup> /CCR7 <sup>+</sup> ), T <sub>CM</sub> (CD45RA <sup>-</sup> /CCR7 <sup>+</sup> ), T <sub>EM</sub> (CD45RA <sup>-</sup> /CCR7 <sup>-</sup> ) und T <sub>EMRA</sub> (CD45RA <sup>+</sup> /CCR7 <sup>-</sup> ) .....	37
Abb. 3.13 Die Differenzierung der Gedächtniszell-Population auf CD8 <sup>+</sup> T-Zellen ist lediglich bei AML Patienten nach allo-SCT zugunsten von Effektor Gedächtniszellen verschoben. ....	38
Abb. 3.14 Die Differenzierung der Gedächtniszell-Population auf CD4 <sup>+</sup> T-Zellen ist bei AML Patienten nach allo-SCT zugunsten von Effektor Gedächtniszellen verschoben. ....	39
Abb. 3.15 Verteilung von T Gedächtniszell-Phänotypen in T-Zellen zu unterschiedlichen Erkrankungszeitpunkten. ....	40
Abb. 3.16 Der Anteil an CD27 <sup>+</sup> T-Zellen in CD8 <sup>+</sup> und CD4 <sup>+</sup> T-Zellen ist bei AML Patienten im Rezidiv und im Rezidiv nach allo-SCT vergleichbar mit HIV-Patienten erhöht. ....	41
Abb. 3.17 Bis auf eine leicht erhöhte Expression von PD-1 auf naiven CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien zeigt sich insbesondere bei Effektor Gedächtniszellen keine signifikant erhöhte Expression von CD244 und PD-1. ....	42

Abb. 3.18 Durchflusszytometrische Analyse und Dotplot Darstellung der CD3+CD4-CD8+ und CD3+CD4+CD8- T-Zellen, aufgetragen gegen die Darstellung der Produktion von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ und IL-2 ohne Stimulation und nach Stimulation mit PMA und Ionomycin. ....	43
Abb. 3.19 Bis auf eine Abnahme der Produktion von IFN- $\gamma$ durch CD4+ T-Zellen bei AML Patienten bei Erstdiagnose zeigt sich keine signifikante Veränderung der Zytokinproduktion der T-Zellen von AML Patienten. ....	44
Abb. 3.20 Durchflusszytometrische Analyse und Dotplot- sowie graphische Darstellung der Proliferation nach Selektion von CD3+ T-Zellen im CFSE-Proliferations-Essay ohne Stimulation und nach Stimulation mit CD3/CD28 beads. ....	45
Abb. 3.21 Die Proliferation der T-Zellen ist bei Patienten mit AML in allen Krankheitsstadien nicht beeinträchtigt. ....	45

## Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1 Liste der verwendeten Antikörper .....	19
Tab. 2.2 Liste der verwendeten Zell Stimuli .....	19
Tab. 2.3 Liste der verwendeten Chemikalien .....	20
Tab. 2.4 Liste der verwendeten Laborausstattung .....	21
Tab. 3.1 Angaben zu Krankheitsstatus, durchschnittlichem Alter und Anzahl der Patienten bzw. Kontrollpersonen. HD: gesunde Spender .....	26
Tab. 3. 2 Angaben zu Krankheitsstatus, durchschnittlichem Alter und Anzahl der Patienten bzw. Kontrollprobanden mit einem Alter von 40 Jahren oder darunter, bzw. einem Alter über 40 Jahre. HD: gesunde Spender .....	32

## Zusammenfassung

Immuntherapeutische Strategien versprechen ein spezifisches Targeting von malignen Zellen in der Therapie der akuten myeloischen Leukämie (AML), sind jedoch auf eine intakte T-Zell Funktion angewiesen. In verschiedenen hämatologischen malignen Erkrankungen wurde jedoch eine T-Zell Dysfunktion beschrieben. Diese ähnelt der bei chronischen Virusinfektionen wie HIV beschriebenen T-Zell Erschöpfung. Für die Entwicklung neuer immuntherapeutischer Ansätze zur Behandlung der AML ist daher die Kenntnis über die Funktionalität der T-Zellen entscheidend.

In einer Analyse des T-Zell Phänotyps von an AML erkrankten Patienten in unterschiedlichen Erkrankungsstadien mittels Durchflusszytometrie wurde die Expression der inhibitorischen Rezeptoren CD244, CD160, PD-1 und TIM-3 bestimmt. Außerdem untersuchen wir die Funktionalität der T-Zellen hinsichtlich ihrer Zytokinexpression und Proliferationsaktivität.

Die Expression der inhibitorischen Rezeptoren unterschied sich zum Zeitpunkt der Erstdiagnose nicht von gesunden Probanden. Nach allogener Stammzelltransplantation zeigt sich jedoch eine erhöhte Expression von PD-1 auf CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Hierbei konnten Störfaktoren im Sinne von Altersunterschieden oder CMV Serostatus ausgeschlossen werden, scheint jedoch mit einem erhöhten Anteil von T Effektor Gedächtniszellen bei diesen Patienten assoziiert zu sein. Hinsichtlich der Zytokinexpression oder der Proliferation der T-Zellen zeigte sich zu keinem Zeitpunkt der Erkrankung ein signifikanter Unterschied zu den T-Zellen gesunder Probanden.

Wir schließen hieraus, dass AML-Patienten im Rezidiv einen Shift der T-Zell Population vom naiven Zustand hin zu differenzierten Effektor Zellen zeigen, welcher von einer Hochregulation der Expression inhibitorischer Moleküle begleitet ist, jedoch ohne Defekt ihrer Funktionalität einhergeht. Im Gegensatz hierzu unterscheiden sich die T-Zellen von AML-Patienten bei Erstdiagnose nicht signifikant von denen der gesunden Spender der gleichen Altersgruppe. Immuntherapeutische Ansätze haben somit eine gute Aussicht auf Erfolg bei an AML erkrankten Patienten.



## 1. Einleitung

In der aktuellen Forschung zur Behandlung vieler Tumorerkrankungen eröffnen immuntherapeutische Strategien interessante und neuartige Therapieoptionen. Diese versprechen ein spezifisches Targeting von malignen Zellen bei deutlich reduzierten Nebenwirkungen im Vergleich zur klassischen Chemotherapie.

Viele der immuntherapeutischen Strategien, an denen derzeit geforscht wird, erfordern eine intakte T-Zell Funktion. Diese ist jedoch oftmals im Krankheitskontext nicht gegeben. In der Mehrzahl der Tumorarten wird eine Dysfunktion der T-Zellen des Patienten festgestellt, wodurch der Tumor einer direkten Antwort des Immunsystems entgehen kann. In diesen Problemkreis gehört die sogenannte T-Zell Erschöpfung<sup>1,2</sup>, die durch eine Überexpression inhibitorischer Moleküle auf der T-Zell Oberfläche gekennzeichnet ist, einhergehend mit einer verminderten Zytokinproduktion und reduzierten T-Zell Proliferation bis hin zum Zelltod. Bei der akuten myeloischen Leukämie wurde die T-Zell Funktion bislang hauptsächlich im Mausmodell untersucht<sup>3, 4</sup>. In diesem Modellsystem ergaben sich Hinweise auf eine mögliche Dysfunktion.

Die Funktionalität der T-Zellen ist von zentraler Bedeutung für immunologische Therapieansätze in der Behandlung der AML. Daher ist es das Ziel der vorliegenden Arbeit die Funktionalität der T-Zellen bei an AML erkrankten Patienten zu untersuchen.

### 1.1 Akute Myeloische Leukämie (AML)

#### 1.1.1 Biologie und Epidemiologie der AML

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine Erkrankung der weißen Blutzellen. Sie definiert sich durch die klonale Proliferation von undifferenzierten Blasten hämatologischer Zellen der myeloischen Zelllinie im Knochenmark. Durch genetische Mutationen und chromosomale Umlagerungen werden verschiedene Onkogene aktiviert und Antionkogene/Tumorsuppressoren deaktiviert. Dies führt zu einer Störung von Wachstum, Differenzierung und Apoptose von Leukozyten der myeloischen Zellreihe und damit einhergehend eine ungebremste Proliferation der betroffenen Zellen.

Nach aktuellem Kenntnisstand ist die Entstehung der AML ein mehrstufiger Prozess. Vermutlich sind mindestens zwei genetische Veränderungen innerhalb einer hämatologischen Stammzelle nötig. Diese führen zur Begünstigung der Proliferation sowie zur Beeinträchtigung der Apoptose.<sup>5,6</sup> Häufig bei AML diagnostizierte genetische Veränderungen sind beispielsweise eine Überexpression des *WT-1* Gens, oder Mutationen des *FLT-3* oder des *NPM 1* Gens.<sup>7</sup>

Diese Mutationen führen zu einer deregulierten und ungebremsten Proliferation unreifer, nicht differenzierter Zellen der myeloischen Zellreihe, welche das umliegende Gewebe des Knochenmarkes

infiltrieren und die reguläre Hämatopoese verdrängen. Die Folge ist eine Anämie, Thrombozytopenie, sowie ein Mangel an funktionsfähigen Leukozyten. Die Patienten klagen infolge dessen über Schwäche, Leistungsminderung, Belastungsdyspnoe, sowie eine erhöhte Blutungsneigung und Infektanfälligkeit.

Häufig besteht eine ausgeprägte Leukozytose aufgrund der klonalen Vermehrung der funktionsdefizienten Blasten. Wenn diese aus dem Knochenmark ausgeschwemmt werden, kommt es in extremen Fällen auch zu Symptomen einer Leukostase.

Die AML tritt mit einer jährlichen Inzidenz von 3,5/100.000 auf, und ist damit die häufigste Leukämie des Erwachsenenalters. Unbehandelt führt sie innerhalb weniger Wochen zum Tod.

### **1.1.2 Therapieoptionen**

Die klassische Therapie der akuten myeloischen Leukämie erfolgt mittels Chemotherapie. Es werden dabei zwei Phasen unterschieden: Die Induktion und die Erhaltungstherapie.

Ziel der Induktionstherapie ist die möglichst vollständige Eliminierung der leukämischen Zellen, mindestens jedoch die Verringerung von deren Anzahl um den Faktor 1000-10000. Bei etwa 70-80% der jüngeren Patienten kann eine komplette Remission erreicht werden. Hierbei kommt es zu einer vollständigen Normalisierung des Blutbildes, wobei im Blutaussstrich keine Blasten mehr nachweisbar sind, mit einem verbleibenden Blastenanteil des Knochenmarks von < 5%.<sup>8,9</sup>

Selbst bei optimaler Wirksamkeit der Chemotherapie mit Erreichen einer kompletten Remission bleibt jedoch eine geschätzte Tumorlast von etwa  $10^8$ - $10^9$  Zellen. Dadurch besteht ein hohes Risiko für ein Rezidiv. Ohne eine weiterführende Therapie kommt es oft innerhalb weniger Monate zu einer Neuerkrankung.<sup>10</sup>

Der Ursprung dieses Rezidivs ist eine kleine Population therapieresistenter leukämischer Zellen in der Stammzellnische, die aufgrund ihrer Fähigkeit zur Selbsterneuerung als leukämische Stammzellen bezeichnet wird. Diese wird durch die Induktionschemotherapie häufig nicht eliminiert.<sup>11</sup> Die Induktion führt somit lediglich zu einer Reduktion der Tumorlast sowie zu einer Besserung der Symptomatik, indem die Blasten im Knochenmark zurückgedrängt werden und die normale Hämatopoese wieder mehr Raum einnehmen kann. Die eigentliche, tumorbildende leukämische Stammzelle bleibt jedoch erhalten und führt so zum Rezidiv.

Um dieses Risiko zu minimieren, erfolgt sofern möglich nach Erreichen der Remission eine weitere Therapie Einheit. In welcher Form eine solche Postremissionstherapie durchgeführt werden sollte, ist abhängig von Alter und Risikoprofil der Patienten, und ist Gegenstand intensiver Forschung und zahlloser Therapiestudien. Heute durchgeführte Ansätze beinhalten unter anderem hochdosiertes Cytarabin, eine der Induktionstherapie ähnliche Erhaltung-Chemotherapie, die autologe

Stammzelltransplantation oder die allogene Stammzelltransplantation. Die niedrigste Rezidivrate weist hierbei die allogene Stammzelltransplantation auf, auch sie liegt jedoch bei etwa 30%.<sup>12, 13</sup>

Neue Strategien zur Therapiefortsetzung nach einer Induktionstherapie werden daher dringend benötigt.

### **1.1.3 Neue Therapieansätze**

Derzeit wird an vielen neuen Möglichkeiten zu Verbesserung insbesondere der Postremissionstherapie der AML geforscht. Eine der vielversprechendsten Ansätze ist dabei die Immuntherapie. In den letzten Jahren wurden Medikamente wie der Tyrosinkinaseinhibitor Midastaurin<sup>14</sup> für Patienten mit einer FLT3 Mutation und das an einen CD33-Antikörper gebundene Toxin Gemtuzumab Ozogamicin<sup>15</sup> entwickelt. Weitere mögliche Therapieansätze sind beispielsweise die Verwendung monoklonaler Antikörper, wie in der Therapie des B-Zell Lymphoms mit Rituximab schon lange etabliert, die adoptive Therapie mit NK Zellen oder T-Zellen, Immuntherapie mittels systemischer Zytokine, oder die Impfung mittels Peptiden, modifizierten leukämischen Zellen oder dendritischen Zellen.<sup>16</sup>

Voraussetzung für all diese Strategien ist jedoch ein funktionales Immunsystem. In der aktuellen Forschung wird immer wieder festgestellt, wie verschiedenste Tumoren Wege finden, der Erkennung durch das Immunsystem zu entgehen, oder die Funktionalität desselben zumindest in unmittelbarer Umgebung einer Tumorzellmasse, teils aber auch im gesamten Körper, reduzieren.<sup>17,18</sup>

## **1.2 Angeborene und erworbene Immunität**

Das menschliche Immunsystem dient der Abwehr potentiell schädlicher Erreger. Dabei werden zwei Mechanismen unterschieden: Das angeborene Immunsystem, welches zum einen auf unspezifischen humoralen Mechanismen wie dem Komplementsystem und proinflammatorischen Zytokinen und zum anderen auf unspezifischen Abwehrzellen wie Granulozyten, NK-Zellen, Monozyten und Makrophagen beruht; und das erworbene Immunsystem, welches auf spezifische zelluläre Reaktionen durch B- und T-Zellen auf bestimmte Krankheitserreger beruht und somit zwar erst der Aktivierung bedarf, jedoch im Folgenden eine deutlich höhere Effektivität aufweist als die angeborene Immunität. Zum Zweck dieser Arbeit werden wir uns im Folgenden auf die spezifische Immunität insbesondere durch T-Zellen konzentrieren.

### **1.3 T-Zellen im menschlichen Immunsystem und Differenzierung von T Memory Zellen**

T-Zellen sind ein wichtiger Bestandteil des Immunsystems. Sie bilden eine Untergruppe der Lymphozyten und spielen eine zentrale Rolle in der zellvermittelten Immunabwehr.

Ihre Vorläufer werden im Knochenmark gebildet, reifen im Thymus, und treten als sogenannte naive T-Zellen in den Blutkreislauf ein. Sie zirkulieren dann durch die peripheren lymphatischen Gewebe wie

Lymphknoten, mukosales lymphatisches Gewebe und Milz. Treffen T-Zellen hier auf ihr spezifisches Antigen, differenzieren sie sich zu T-Effektorzellen.

Alle T-Zellen nutzen den T-Zell Rezeptor (TCR) zur Antigenerkennung. Dieser wird durch CD3 stabilisiert<sup>19</sup>, welches als Erkennungsmolekül für das Vorliegen eines TCR auf der Zelle dienen kann. Der TCR ist ein Heterodimer, das meist aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Polypeptid-Kette besteht.<sup>20</sup> Ein geringer Anteil der T-Zellen exprimiert allerdings einen TCR, der aus einem  $\gamma$ : $\delta$ -Heterodimer aufgebaut ist. Diese kommen vorwiegend in epithelialen Geweben vor.<sup>21</sup>

Nach Differenzierung im Thymus liegen T-Zellen in zwei Hauptklassen vor, welche im Folgenden näher erläutert werden.

### **1.3.1 CD8-T-Zellen**

Naive CD8-T-Zellen differenzieren zu zytotoxischen T-Zellen, deren Aufgabe die Lyse von infizierten oder geschädigten Zellen ist.

CD8-T-Zellen erkennen über den T-Zell Rezeptor Antigene, die über einen major histocompatibility complex class 1 (MHC-I) präsentiert werden. Die Erkennung eines kompatiblen Antigens löst eine klonale Expansion der Zellen, sowie deren Differenzierung zu Effektor-Zellen aus. Als Effektorzellen exprimieren sie Zytotoxine wie Perforin, Granzym B und FasL, und produzieren Zytokine wie IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ . Auf diesem Weg triggern sie die Apoptose in antigentragenden Zielzellen. CD8 dient hierbei als Corezeptor für die Bindung des TCR an MHC-I von antigenpräsentierenden Zellen.<sup>22</sup>

Nach der Beseitigung des Antigens wird in einem Großteil der klonal expandierten CD8-T-Zellen die Apoptose ausgelöst.<sup>23</sup> Ein geringer Prozentsatz differenziert zu T-Gedächtniszellen, die später beschrieben werden.

### **1.3.2 CD4-T-Zellen**

Naive CD4-T-Zellen können zu unterschiedlichen Subtypen mit unterschiedlichen Eigenschaften heranreifen, wie beispielsweise  $T_H1$ ,  $T_H2$ ,  $T_H17$  und regulatorische T-Zellen. Sie werden aufgrund der Cytokine, die von diesen Zellen freigesetzt werden, differenziert. Diese T-Zellen interagieren mit anderen Zellen des Immunsystems wie B-Lymphozyten und Makrophagen.

$T_H1$ -Zellen produzieren dabei Zytokine wie IFN- $\gamma$ , IL-2 und TNF- $\alpha$ , welche eine Aktivierung und Differenzierung von Makrophagen bewirken, während  $T_H2$ -Zellen mit B-Zellen interagieren, und die Produktion und Ausschüttung von Antikörpern bewirken.  $T_H17$ -Zellen sind dagegen nach dem von ihnen produzierten IL-17 benannt, welches neutrophile Granulozyten aktiviert und zur Ausschüttung von proinflammatorischen Proteinen wie unter anderem IL-1 und IL-6 führt.<sup>24</sup>

Regulatorische T-Zellen werden im Folgenden separat beschrieben.

### 1.3.3 T-Gedächtniszellen

T-Gedächtniszellen oder „T memory cells“ sind im Blut persistierende aktivierte Effektor T-Zellen. Sie sind äußerst langlebig, vermitteln die Immunantwort bei Reinfektionen mit zuvor erkannten Erregern und ermöglichen eine schnellere und effizientere Reaktion. Sowohl CD4- als auch CD8-Effektor-T-Zellen können sich zu Gedächtniszellen differenzieren. Gedächtniszellen können anhand unterschiedlicher Oberflächenmoleküle und Effektorfunktionen identifiziert werden. Hierzu gehört die Expression von CD45RO, die von Gedächtniszellen exprimiert wird, während naive T-Zellen die Isoform CD45RA exprimieren.<sup>25</sup>

Es gibt verschiedene Arten von Gedächtniszellen mit unterschiedlichen Aktivierungsmerkmalen. T-Effektorgedächtniszellen, auch T<sub>EM</sub> genannt, können nach Aktivierung schnell zu funktionsfähigen T-Effektorzellen heranreifen. Sie sind für einen raschen Eintritt in entzündetes Gewebe spezialisiert und stehen damit für eine direkte Immunabwehr bereit.

Eine weitere Gruppe von Gedächtniszellen sind die zentralen Gedächtniszellen oder T<sub>CM</sub>. Diese Zellen benötigen länger, um sich in T-Effektorzellen zu differenzieren. Im Gegensatz zu T<sub>EM</sub> exprimieren T<sub>CM</sub> CCR7, einen Chemokinrezeptor, der mit dem „Homing“ von Lymphozyten zu den Lymphknoten assoziiert ist.<sup>26</sup> Es wird vermutet, dass diese Zellen für die Aufrechterhaltung eines langfristigen Immungedächtnisses verantwortlich sind und sich bei Antigenkontakt in Effektorgedächtniszellen differenzieren.

Neben den beiden genannten Zellgruppen sowie den naiven T-Zellen gibt es noch eine weitere Gruppe von Gedächtniszellen, die sich dadurch auszeichnen, dass sie wie T<sub>CM</sub> CCR7 exprimieren, aber wie naive T-Zellen CD45RA exprimieren. Sie werden T<sub>EMRA</sub> Zellen genannt. Sie stellen eine hochspezialisierte Gruppe von Gedächtniszellen, die in Abwesenheit des betreffenden Antigens aus T<sub>CM</sub> entsteht und vermutlich eine Rolle in der Homöostase des heterogenen Pools der Gedächtniszellen spielt.<sup>27</sup>

### 1.3.4 Regulatorische T-Zellen

Eine spezielle Untergruppe der CD4 positiven T-Zellen bilden die regulatorischen T-Zellen. Sie exprimieren FoxP3 als definierenden Transkriptionsfaktor. Im Gegensatz zu anderen T-Zellen liegt ihre Aufgabe in der Unterdrückung von Immunreaktionen, welche durch autoreaktive T-Zellen ausgelöst werden können, die der Selektion im Thymus entgangen sind. Dies geschieht über unterschiedliche Mechanismen, wie beispielsweise die Freisetzung von Zytokinen wie IL-10 und TGF-β oder die Expression von CTLA-4. Sie verhindern so die Entstehung von Autoimmunerkrankungen.<sup>28</sup>

### 1.3.5 NK-T-Zellen

Diese Zellen gehören zu den sogenannten „innate-like“ Lymphozyten und bilden funktionell eine Brücke zwischen angeborener und erworbener Immunität. Sie exprimieren sowohl einen T-Zell-Rezeptor, als auch den Rezeptor von NK-Zellen. Sie erkennen mikrobielle Lipide, die auf speziell durch Infektionen exprimierten CD1-Proteinen präsentiert werden und spielen insbesondere bei der Abwehr von Mycobakterien eine Rolle.<sup>29</sup>

### 1.3.6 $\gamma\delta$ -T-Zellen

$\gamma\delta$ -T-Zellen sind eine kleine Gruppe von T-Zellen, deren TCR nicht aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette zusammengesetzt ist, sondern aus einer  $\gamma$ - und einer  $\delta$ -Kette. Diese Zellen findet man hauptsächlich in Epithelien. Sie scheinen im Gegensatz zu  $\alpha\beta$ -T-Zellen mit ihrem TCR keine Peptide, sondern spezielle Liganden wie Lipide zu binden.<sup>30</sup>

## 1.4 T-Zell Erschöpfung

Ein funktionstüchtiges Immunsystem eliminiert nicht nur körperfremde Organismen wie Bakterien oder Viren, sondern auch beschädigte oder entartete körpereigene Zellen. Viele Tumoren haben jedoch Mechanismen entwickelt, um der Kontrolle durch das Immunsystem zu entgehen. Häufig wird dabei eine T-Zell Dysfunktion beobachtet, nicht nur bei soliden Tumoren<sup>31,32</sup>, sondern auch bei hämatologischen Erkrankungen wie adulter T-Zell Leukämie<sup>33,34</sup>, chronischer myeloischer Leukämie (CML)<sup>35,36</sup> und chronischer lymphatischer Leukämie (CLL)<sup>37,38,39</sup> vor.

Diese T-Zell Dysfunktion wurde zuerst bei chronischen Virusinfektionen wie beispielsweise HIV beobachtet und in den letzten Jahren bei immer mehr Tumorerkrankungen nachgewiesen.

### 1.4.1 Definition und Entstehung

Mit T-Zell Erschöpfung wird ein dysfunktionaler Zustand von T-Zellen beschrieben, der definiert ist durch den Verlust der Effektorfunktion und eine erhebliche Einschränkung der T-Zell Aktivierung. In funktioneller Hinsicht charakteristisch für erschöpfte T-Zellen sind die reduzierte Expression von Cytokinen, sowie die Abnahme der Proliferation und der cytotoxischen Wirksamkeit. Phänotypisch ist die vermehrte Expression inhibitorischer Rezeptoren und ein von funktionalen Effektor- oder Memory-Zellen abweichender Transkriptionsstatus charakteristisch. Dies ist vor allem mit chronischen viralen Infektionen und Tumorerkrankungen assoziiert.<sup>1</sup>

Während der initialen Infektion differenzieren naive T-Zellen nach Antigenkontakt und Kostimulation zu Effektor T-Zellen. Nach der Eliminierung der Infektion differenzieren diese zu polyfunktionalen Memory T-Zellen, welche lange Zeit ohne Antigenkontakt überleben können.<sup>40</sup>

Während chronischen Infektionen persistiert das Antigen auch nach der Effektorphase. Bei zunehmender Dauer der Antigenpersistenz und/oder zunehmender Antigenlast durchschreiten T-Zellen mehrere Stadien der Dysfunktion.<sup>41,42</sup>

Diese Dysfunktion wird durch drei verschiedene Pfade eingeleitet: Durch inhibitorische Oberflächen-Rezeptoren und Checkpoint-Moleküle wie PD-1<sup>43</sup>, durch lösliche Faktoren wie Interleukin-10<sup>44</sup>, und inhibitorische Zelltypen wie regulatorische T-Zellen<sup>41</sup>. Im Folgenden werden die für T-Zell Erschöpfung relevanten inhibitorischen Rezeptoren besprochen.

#### **1.4.2 Inhibitorische Rezeptoren auf T-Zellen**

T-Zellen exprimieren an ihre Oberfläche eine Vielzahl von Rezeptoren, welche bei Bindung des richtigen Liganden eine Immunreaktion inhibieren oder aktivieren können.<sup>45</sup> Sie modulieren und regulieren über inhibierende oder aktivierende Oberflächenrezeptoren die Dauer und das Ausmaß der T-Zell Aktivierung, um für eine ausreichende protektive Immunantwort zu sorgen und Autoimmunreaktionen zu vermeiden.<sup>46,47</sup>

Im Rahmen einer chronischen Antigenstimulation, wie beispielsweise bei chronischen viralen Infektionen kann es dabei zu einer Überexpression von inhibitorischen Rezeptoren kommen, was bei den betroffenen T-Zellen zu einem zunehmenden Verlust der Effektor-Funktion führt. Dabei korreliert das Ausmaß des Funktionsverlustes mit einer Koexpression einer zunehmenden Anzahl von inhibitorischen Rezeptoren.<sup>43</sup>

Diesen Mechanismus zur machen sich jedoch auch maligne Erkrankungen zunutze. Maligne Zellen exprimieren Liganden dieser inhibitorischen Rezeptoren, um eine Immunreaktion gegen sie zu unterdrücken.<sup>48</sup> Daher sollen diese inhibitorischen Rezeptoren als eines der wichtigsten Merkmale der T-Zell Erschöpfung im Folgenden vorgestellt werden.

##### **1.3.2.1 CD244**

CD244 (2B4) ist ein Glykoprotein auf der Oberfläche von NK- und T-Zellen. Je nach Expressionsstärke von CD244 kommt es nach Bindung des Liganden CD48 zu einem aktivierenden oder inhibitorischem Signal für die exprimierende Zelle des Immunsystems.<sup>49</sup> So zeigt CD244 *in vitro* bei NK-Zellen mit niedriger Oberflächen-Expression eine aktivierende Wirkung, bei starker Expression resultiert jedoch ein inhibitorisches Signal, wobei die Konzentration der intrazellulären an den Rezeptor bindenden Moleküle hier ebenfalls eine Rolle spielt.<sup>50</sup> Die Wirkung in T-Zellen ist analog hierzu. So konnte gezeigt werden, dass bei LCMV-spezifischen T-Zellen mit einer niedrigen Expression von CD244 nach Applikation eines anti-CD48 Antikörpers, der zur Blockade des CD244-Pathways führt, die Produktion von IFN- $\gamma$  abnahm, während bei Zellen mit einer hohen Expression von CD244 die Produktion von IFN- $\gamma$  zunahm.<sup>43</sup>

### 1.3.2.2 CD160

CD160 gehört zur Familie der Immunglobuline. Es ist als Corezeptor auf unterschiedlichen Arten von cytotoxischen T-Zellen zu finden, sowie auf einer kleinen Untergruppe von CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist die Expression von CD160 nach Verlust von CD28 hochreguliert, CD28 positive CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimieren CD160 nur nach chronischer Antigenstimulation.<sup>51,52</sup>

CD160 kann in 2 Isoformen vorliegen, mit GPI-Anker und als lösliche Form. In Abhängigkeit der vorwiegend vorhandenen Isoform und der Anwesenheit unterschiedlicher Liganden können über CD160 aktivierende, oder inhibierende Signale vermittelt werden.<sup>53,54,55,56</sup>

Insbesondere in der Situation einer chronischen Antigenstimulation ist CD160 zusammen mit anderen inhibitorischen Rezeptoren auf der Oberfläche von T-Zellen deutlich in seiner Expression erhöht und mit einer T-Zell Erschöpfung assoziiert.<sup>43</sup>

### 1.3.2.3 PD-1

PD-1 oder „Programmed Death-1“ wird vorübergehend auf aktivierten T-Zellen, B-Zellen und Monozyten exprimiert und bindet 2 Liganden, PD-L1 und PD-L2.<sup>57</sup> Die Bindung von PD-1 an seine Liganden resultiert in einer verminderten Proliferation und Produktion von Zytokinen wie IL-2 und IFN- $\gamma$ .<sup>58</sup>

Dabei dient die Bindung von PD-L1 der Regulation der Immuntoleranz, indem eine Aktivierung von autoreaktiven Lymphozyten inhibiert wird. So entwickeln beispielsweise PD-L1 defiziente Mäuse spontan Autoimmunerkrankungen.<sup>59,60</sup>

Auch die Bindung von PD-L2, welches von aktivierten antigenpräsentierenden Zellen exprimiert wird, vermindert die T-Zell-Rezeptor gesteuerte Proliferation und Zytokinproduktion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration des Antigens.<sup>61</sup>

Beide Pfade reduzieren die Effektivität der T-Zell Reaktion in verschiedenen viralen und nicht-viralen Infektionen und Tumorerkrankungen.<sup>41,62</sup> Dieser Mechanismus wird inzwischen therapeutisch durch verschiedene Antikörper wie beispielsweise Pembrolizumab genutzt.

### 1.3.2.4 Tim-3

Tim-3, oder „T-cell Ig and mucin-containing domain-3“, wird von NK-Zellen, DCs und T<sub>H</sub>1-Zellen exprimiert. Nach Bindung seines Liganden Galectin-9 werden T<sub>H</sub>1-Zellen inhibiert.<sup>63</sup> Bei erhöhter Expression von Tim-3 konnte ein dysfunktionaler Zustand von T-Zellen nachgewiesen werden, insbesondere auch in Coexpression mit anderen inhibitorischen Molekülen wie PD-1.<sup>64,65</sup>



### **1.4.3 T-Zell Erschöpfung bei malignen Erkrankungen**

Die T-Zell Erschöpfung wurde erstmals bei chronischen Viruserkrankungen wie LCMV und HIV nachgewiesen. Wie bereits zuvor erwähnt, wurde eine ähnliche Dysfunktion von T-Zellen auch in verschiedenen Tumorerkrankungen nachgewiesen.

PD-1 wurde beispielsweise in tumorinfiltrierenden Lymphozyten in verschiedenen Tumorarten nachgewiesen.<sup>66,67</sup> Umgekehrt werden seine Liganden, PD-L1 und PD-L2 von diversen Tumorarten exprimiert.<sup>68,69</sup> Durch Interaktionen wie diese kommt es schließlich zu einer Dysfunktion von insbesondere den Tumor infiltrierenden T-Zellen, mit verminderter Proliferation und Zytokinausschüttung.

Für die Erkenntnis, dass es möglich ist, sich diese Mechanismen unterschiedlicher inhibitorischer Rezeptoren therapeutisch mittels inhibitorischer Antikörper zunutze zu machen, und so eine Reaktion des Immunsystems gegen die Tumorerkrankung zu ermöglichen, erhielten 2018 James P. Allison und Tasuku Honjo den Nobelpreis für Medizin.

### **1.5 Fragestellung**

Bisher wurde die T-Zell Erschöpfung überwiegend im Rahmen chronischer viraler Infektionen, sowie solider Tumoren nachgewiesen. Im Rahmen hämatologischer Erkrankungen wurde teils eine erhöhte Expression einzelner inhibitorischer Marker wie PD-1 nachgewiesen.

In der akuten myeloischen Leukämie wurden Untersuchungen diesbezüglich nur am Mausmodell untersucht, hier konnte eine Untergruppe von T-Zellen mit verminderter Zytokinproduktion bei erhöhter Coexpression von PD-1 und Tim-3 nachgewiesen werden. Die Anzahl dieser Zellen stieg bei Progress der AML.<sup>3</sup>

Da insbesondere die betroffenen T-Zellen oft hochspezifisch für ihr Antigen sind, ist deren Funktionalität für jegliche Therapiestrategie, die auf einer Aktivierung des Immunsystems basiert, entscheidend. Dies gilt für Ansätze wie Checkpoint-Inhibitoren, Impfungen mittels Peptiden, modifizierte leukämische Zellen oder dendritische Zellen.

Daher soll in der folgenden Arbeit die Expression und Koexpression der inhibitorischen Rezeptoren CD244, CD160, PD-1 und TIM-3 auf den T-Zellen von an AML erkrankten Patienten in unterschiedlichen Stadien der Erkrankung untersucht werden. Außerdem untersuchen wir die Funktionalität der T-Zellen hinsichtlich ihrer Zytokinexpression und Proliferationsaktivität nach Stimulation in unterschiedlichen Erkrankungsstadien. Dabei dienen HIV positive Patienten als Positivkontrolle und gesunde Spender als Negativkontrolle.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zustimmung der Ethikkommission

Wir erhielten eine schriftliche Einverständniserklärung von allen Patienten im Einverständnis mit der Deklaration von Helsinki. Alle Versuche wurden von der Ethikkommission der Ludwigs-Maximilians-Universität München, Deutschland, genehmigt.

#### 2.1.2 Patientenproben

Proben von peripher gewonnenem Blut wurden von 41 Patienten erhalten, die am Klinikum Großhadern in München, Deutschland, mit akuter myeloischer Leukämie (AML) diagnostiziert wurden. Alle Patienten waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme unbehandelt. Die Patientenproben wurden zu den folgenden Phasen der Krankheit gesammelt: Bei der Erstdiagnose der Erkrankung (medianes Alter 53, 23-87), bei der Diagnosestellung einer refraktären Erkrankung nach Induktionstherapie (medianes Alter 63, 40-70), bei der Diagnose Rezidiv (medianes Alter 70, 40-85) oder nach Stammzelltransplantation (medianes Alter 59, 39-71).

Proben aus peripherem Blut wurden auch von einer Kontrollgruppe von 30 gesunden Spendern im Alter von 22 bis 60 Jahren gewonnen, mit einem Altersmedian von 38,5 Jahren.

Proben von HIV-positiv getesteten Patienten bei Erstdiagnose wurden freundlicherweise von Frau PD Dr. Rika Draenert zur Verfügung gestellt (Abteilung für Klinische Infektiologie des Klinikums der Universität München, Campus Innenstadt, in München, Deutschland).

Der CMV Serostatus von gesunden Spendern wurde von der Abteilung Virologie des Max von Pettenkofer-Instituts in München, Deutschland, bestimmt. 10/24 (41,7%) der gesunden Spender wurden CMV positiv getestet.

#### 2.1.3 Antikörper

Antikörper	Farbe	Klon	Firma
CCR7	PE	G043H7	BioLegend
CD127	PE	eBioRDR5	eBioscience
CD160	APC	#688327	R&D Systems
CD244	PE	C1.7	BioLegend
CD244	APC	C1.7	BioLegend
CD25	Brilliant Violet 421	BC96	BioLegend
CD27	APC	O323	BioLegend
CD3	AlexaFluor 488	UCHT1	BioLegend

CD3	APC	UCHT1	BioLegend
CD4	APC-H7	RPA-T4	BD
CD45RA	Brilliant Violet 421	HI100	BioLegend
CD8	PerCP-eFlour 710	SK1	eBioscience
FoxP3	APC	236A/E7	eBioscience
IFN- $\gamma$	PE	B27	BioLegend
IL-2	Brilliant Violet 421	MQ1-17H12	BioLegend
Iso	PE	MOPC-21	BioLegend
Iso	APC	133303	R&D Systems
Iso	Brilliant Violet 421	MOPC-21	BioLegend
LAG-3	Atto 647 N	17B4	AdipoGen
PD-1	Brilliant Violet 421	EH 12.2 H7	BioLegend
PD-1	APC	EH 12.2 H7	BioLegend
TIM-3	PE		R&D Systems
TNF- $\alpha$	APC	MAb11	BioLegend

Tab. 2.1 Liste der verwendeten Antikörper

#### 2.1.4 Kulturmedien

##### Substituiertes RPMI 1640 Medium

RPMI 1640 (PAN Biotech), substituiert mit 10 % (v/v) FCS (Gibco)

##### Einfrier (Kryo-) -Medium

80% FCS

20% DMSO

#### 2.1.5 Zell Stimuli

CD28	BD, Franklin Lakes
CD49d	BD, Franklin Lakes
CEFT	jpt, Innovative Peptide Solutions, Berlin
Ionomycin	Sigma-Aldrich, München
PHA	Sigma-Aldrich, München
PMA	Sigma-Aldrich, München

Tab. 2.2 Liste der verwendeten Zell Stimuli

## 2.1.6 Chemikalien, Laborausstattung

### 2.1.6.1 Chemikalien

Brefeldin A	Sigma-Aldrich, München
BSA (Bovines Serumalbumin)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD3 MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CellTrace CFSE Cell Proliferation Kit	Invitrogen, Darmstadt
DMSO (Dimethylsulfoxid)	SERVA Electrophoresis GMBH, Heidelberg
Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28	Gibco, invitrogen, Carlsbad, USA
EDTA (0,5M) (Ethylendiamintetraessigsäure)	Gibco Life Technologies, Eggenstein
FcR Blocking Reagent	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
FCS	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA
Ficoll 1,077 g/ml (Bicoll Separating Solution)	Biochrome EG, Berlin
Formaldehyd (37%)	Carl Roth, Karlsruhe
FoxP3 Staining Set	eBioscience, Wien
Intracellular Staining Set	eBioscience, Wien
Intracellular Staining Set	BD, Franklin Lakes
LIFE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Staining Kit	Life technologies, Invitrogen, Carlsbad
MACS Separation Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Monensin	Sigma-Aldrich, München
PBS	PAN Biotech, Aidenbach
RPMI 1640 mit L-Glutamine, NaHCO <sub>3</sub>	PAN Biotech, Aidenbach

Tab. 2.3 Liste der verwendeten Chemikalien

### 2.1.6.2 Laborausstattung – Geräte und Verbrauchsmaterialien

CO <sub>2</sub> - Inkubator	Binder, Tuttlingen
FACS Röhrcen Polystyrene Round-Bottom Tube	BD Biosciences, Heidelberg
FACS LSR II	BD Biosciences, Heidelberg
Falcon Röhrcen Polypropylene Conical Tube	BD Biosciences, Heidelberg
Einfrier-Container Nalgene Freezing Container	Thermo Scientific, Waltham, MA
Gefrierschränke Hera freeze (-80°C)	Thermo Electron Corporation, Waltham, MA
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr, Bulle, Schweiz
Kyroröhrcen Cryogenic vilas	Star Lab, Hamburg
Lamina-flow Werkbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Lithium-Heparin Röhrcen S-Monovette	Sarstedt, Nümbrecht
MACS Blunt-End Needles 16-gauge (steril)	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach

MACS Multi Stand	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikroskop DM IL	Leica, Solms
Navios	Beckmann Coulter, Krefeld
Pasteur Pipette	VWR International, Radnor, PA
Pipetboy acu	Integra Biosciences, Fernwald
Pipetten (10-1000 µl)	Eppendorf Research, Hamburg
Pipetten Costar (2-25 ml)	Corning, Kennebunk, ME
Pipettenspitzen (10-1000 µl)	Eppendorf Research, Hamburg
Sicherheitsflügelkanüle S-Multifly-Set	Sarstedt, Nümbrecht
Sterile Abdecktücher Secu-Drape	Sengewald, Rohrdorf
Tischzentrifuge	Fisher Scientific, Schwerte
Vortexer Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY
Wasserbad ED 13	Julaba, Seelbach
Zellkultur Wellplatten	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Zählplättchen	Invitrogen, Darmstadt
Zellkulturflaschen	BD Bioscience, Heidelberg
Zellkulturplatten Gridding Scoring Dishes	Stemcell Technologies, Köln
Zellzähler Countess	Invitrogen, Darmstadt
Zentrifuge Multifuge 3 s-r	Thermo scientific, Waltham, MA

Tab. 2.4 Liste der verwendeten Laborausstattung

### 2.1.7 Lösungen

#### FACS/MACS Puffer:

500 ml PBS

2 ml EDTA 0,5 mM

2,5 ml BSA

#### FACS FIX

500 ml PBS FACS Puffer

2% Formaldehyd (37%)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Isolierung von PBMCs

Proben von peripher gewonnenem Blut wurden mit 10 ml Spritzen abgenommen, die Heparin als Antikoagulans enthalten. Mononukleäre Zellen (PBMCs) wurden mittels Dichtegradient-Zentrifugation isoliert. Das Blut wurde in einem 1:3 Verhältnis mit Phosphat Salin Puffer (PBS, Pan-Biotech,

Aidenbach, Deutschland) verdünnt. Das verdünnte Blut (25 ml) wurde dann zu Ficoll (12 ml, Biochrom, Berlin, Deutschland) zugefügt und bei Raumtemperatur für 30 Minuten bei 860 *g* zentrifugiert. Die PBMCs wurden entnommen und in RPMI 1640 (Pan-Biotech, Aidenbach, Deutschland) resuspendiert. Die Zellen wurden zweimal mit RPMI 1640 gewaschen, gezählt, und entweder direkt für weitere Versuche verwendet oder eingefroren und bei -163 °C in flüssigem Stickstoff gelagert.

### **2.2.2 Immunfluoreszenz-Färbung und Analyse mittels Durchflusszytometrie**

Nach der Isolierung wurden die PBMCs mit FACS Puffer (1 ml) gewaschen und zur Anfärbung von Oberflächenmolekülen weiterbehandelt. Dazu wurden die Zellen mit FcR Blocking Reagenz (10 µl, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Danach wurden monoklonale, mit Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelte Antikörper zugefügt und ebenfalls 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wieder mit FACS Puffer (1 ml) gewaschen, entweder mit FACS FIX (100 µl) fixiert und mittels Durchflusszytometrie innerhalb von maximal 3 Tagen analysiert, oder direkt zur intrazellulären Färbung weiterverwendet.

### **2.2.3 Intrazelluläre Färbung**

Zu den Zellen, in denen intrazellulär FoxP3 nachgewiesen werden sollte, wurde aus dem FoxP3 Nachweis Kit (eBioscience, San Diego, USA) Fix Perm Lösung (1 ml, siehe 2.1.6) zugegeben. Die Zellen wurden dann 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach anschließendem Abzentrifugieren und zweimaligem Waschen mit Perm Puffer (2 ml, 1:10 Verdünnung), wurde Anti-FoxP3 mAb (20 µl; APC, 236A/E7; eBioscience, San Diego, USA) zugegeben und die Zellen erneut 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Perm Puffer (1 ml, 1:10 Verdünnung) gewaschen, mit FACS FIX fixiert und innerhalb von maximal 3 Tagen mittels Durchflusszytometrie analysiert.

### **2.2.4 MACS Separation**

Ungefärbte PBMCs wurden gezählt und in MACS Puffer (80 µl pro  $1 \times 10^7$  Zellen) gelöst. CD3 MicroBeads (20 µl pro  $1 \times 10^7$  Zellen, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) wurden zugegeben und 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die MACS Säule wurde nach der Anzahl der verfügbaren Zellen gewählt. Für eine Gesamtzellzahl von bis zu  $2 \times 10^8$  Zellen oder eine erwartete Anzahl von bis zu  $10^7$  CD3 positiven Zellen wurde die MS Säule (Miltenyi Biotec) gewählt, für eine größere Anzahl an Zellen wurde die LS Säule verwendet.

Die Säule wurde nach Herstelleranweisung vorbereitet und nach den Reinigungsschritten die Zellsuspension zugefügt. Die CD3 markierten Zellen wurden dreimal gespült, wobei der nächste Waschschritt jeweils nach vollständiger Leerung des Reservoirs durchgeführt wurde.

Die Säule wurde dann aus dem Separator entfernt und in ein 10 ml Falcon platziert. 1 ml MACS Puffer wurde ins Reservoir von MS Säulen gegeben, 5 ml in LS Säulen, und die Zellen mithilfe des Stempels vom Säulenmaterial eluiert und weiteren Versuchen zugeführt.

### **2.2.5 Intrazelluläre Zytokin-Färbung**

Nach der Wahl einer passenden Zahl von PBMCs wurden diese 5 Minuten bei 550 *g* zentrifugiert und in RPMI 1640/10% FCS (100  $\mu$ l pro  $2 \times 10^5$  Zellen) resuspendiert. Je 100  $\mu$ l der Lösung wurden in einem Well einer 96-well Platte transferiert und über Nacht bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Mit Ausnahme der nicht-stimulierten Kontrollen wurde zu den Zellen in den Wells anschließend einer von zwei verschiedenen Stimuli gegeben.

Einem Drittel der Zellen wurden PMA (2  $\mu$ l einer 1:100 Verdünnung) und Ionomycin (1,5  $\mu$ l einer 1:10 Verdünnung) zugegeben.

Ein weiteres Drittel wurde mit CD3/CD28 Dynabeads ( $4 \times 10^7$  beads/ $\mu$ l, Gibco, Carlsbad, California, USA), die nach Herstellerprotokoll vorbereitet wurden, versetzt. Die Beads wurden in einem Verhältnis von 3:1 von Zellen zu Beads verwendet ( $0,5 \times 10^5$  Beads pro Well bei  $2 \times 10^5$  Zellen pro Well).

Alle Zellproben wurden eine Stunde bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde Golgi Stop, bestehend aus in Ethanol gelöstem Monensin, mit einer Endkonzentration von 8  $\mu$ g/ml, und Brefeldin A mit einer Endkonzentration von 10  $\mu$ g/ml zugegeben, und die Zellen anschließend für 5 Stunden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Nach dieser Inkubation wurden die Zellen geerntet und die Zellen, die den gleichen Stimulus erhalten hatten in einem FACS Röhrchen gepoolt. Die mit CD3 CD28 Dynabeads stimulierten Zellen wurden zunächst 2 Minuten in einem Magneten platziert, die überschüssige Flüssigkeit entfernt und die Beads mit PBS (200  $\mu$ l) gewaschen. Anschließend wurden alle Zellen mit FACS Puffer (1 ml) gewaschen und 5 Minuten bei 550 *g* zentrifugiert. Die extrazelluläre Färbung wurde wie oben beschrieben (siehe 2.2.2) durchgeführt.

Die Intrazelluläre Färbung für Interferon  $\gamma$ , Tumornekrosefaktor  $\alpha$  und Interleukin-2 wurde mithilfe des Intrazellulären Färbekits (BD, Franklin Lakes, USA) durchgeführt. Die Zellen wurden in Cytotfix/Cytoperm Lösung (100  $\mu$ l pro Well) suspendiert und 20 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach Waschen mit Perm/Wash Lösung (1 ml, 1:10 Verdünnung) wurden mAb für IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-2 (siehe 2.1.3) zugegeben und 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Zuletzt wurden die Zellen mit Perm/Wash Lösung (1 ml, 1:10 Lösung) gewaschen, mit FACS FIX (100  $\mu$ l) fixiert und innerhalb von 3 Tagen mittels Durchflusszytometrie analysiert.

### **2.2.6 CFSE Assay**

Eine erforderliche Anzahl an Zellen wurde in ein 15 ml Falcon (BD, Franklin Lakes, USA) transferiert, mit FACS Puffer gewaschen (1 ml) und in PBS (4 ml) mit 0,1% BSA gelöst. Die Zellen wurden dann mit CFSE (1 µl) gefärbt und 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das Falcon mit eisgekühltem RPMI 1640/10% FCS aufgefüllt und die Lösung 5 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden dann 5 Minuten bei 550 g zentrifugiert, zweimal mit RPMI 1640/10% FCS (15 ml) gewaschen und anschließend im Medium resuspendiert (200 µl pro  $2 \times 10^5$  Zellen). Die PBMCs wurden auf einer 96-well Platte in je 200 µl MACS-Lösung pro Well verteilt. Zellen in den Wells, die als Negativkontrolle dienten, wurden nicht stimuliert, die übrigen Zellen wurden mit Dynabeads (Verhältnis von 3:1 von Zellen zu Beads) stimuliert. Die Zellen wurden anschließend 7 Tage bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Nach 7 Tagen wurden alle Zellen, die den gleichen Stimulus erhalten hatten, in je einem FACS Röhrchen gesammelt und mit FACS Puffer gewaschen (1 ml). Bei Stimulation mittels Dynabeads wurden die Beads vor dem Waschen magnetisch entfernt. Die Zellen wurden mit FcR Blocking Reagenz (10 µl, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) 10 Minuten bei 4 °C inkubiert, dann wurden monoklonale Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelte Antikörper für CD3 (APC, UCHT1; BioLegend), CD4 (APC-H7, RPA-T4; BD Biosciences) und CD8 (PerCP-eFluor 710, SK1; eBioscience) zugefügt und ebenfalls 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wieder mit FACS Puffer (1 ml) gewaschen und entweder direkt analysiert, oder mit FACS FIX (100 µl) fixiert und mittels Durchflusszytometrie innerhalb von maximal 3 Tagen analysiert.

### **2.2.7 Einfrieren**

Eine zum Einfrieren vorgesehene Zellsuspension wurde zunächst 5 Minuten bei 550 g zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde Kryo-Medium in geeigneter Menge vorbereitet (s. 2.1.4). Nach abgeschlossener Zentrifugation wurde der Überstand abgegossen und die Zellen in FCS resuspendiert mit einer Konzentration von maximal  $2 \times 10^7$  Zellen je 500 µl. Je 500 µl wurden in ein KryoTube überführt, und dann langsam 800 µl Kryo-Medium dazugetropft. Anschließend erfolgte die zügige Unterbringung bei -80 °C.

### **2.2.8 Auftauen**

Der Inhalt einer geeigneten Anzahl Kryoröhrchen wurde durch Schwenken im Wasserbad aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falcon übertragen und anschließend das Kryoröhrchen zweimal mit 1,5 ml R10 gespült, diese Suspension wurde ebenfalls in das Falcon zugegeben. Langsam wurden weitere 7 ml Medium zugegeben und die Suspension dann 5 Minuten bei 550 g zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstandes erfolgte die Resuspension in 10 ml R10, mit anschließendem Zählen der Zellen. Nach erneutem Zentrifugieren für 5 Minuten bei 550 g erfolgte die erneute Resuspension in geeigneter Konzentration für weiterführende Versuche.



### 2.2.9 Statistik

Die Daten wurden mit Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) analysiert und in Scatter Plots dargestellt. Die statistische Signifikanz von Unterschieden wurde mittels Mann-Whitney U Test ermittelt, ein  $p \leq 0,05$  wurde als statistisch signifikant betrachtet (\* in allen Grafiken),  $p \leq 0.01$  wurde bezeichnet mit \*\*,  $p \leq 0.001$  mit \*\*\*, und  $p \leq 0.0001$  mit \*\*\*\*.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Expression von CD244, CD160, PD-1 und TIM-3 in AML-Patienten und Vergleichsgruppen

CD244, CD160, PD-1 und TIM-3 repräsentieren Oberflächenmarker auf T-Zellen und modulieren nach Interaktion mit ihren spezifischen Liganden die T-Zell Antwort. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Expression dieser Proteine in T-Zellen aus peripherem Blut (PB) von AML Patienten und Vergleichsgruppen analysiert. Für die Analysen standen Proben von insgesamt 63 AML Patienten mit unterschiedlichen Krankheitsstadien, nämlich AML Erstdiagnose, refraktär, Rezidiv, und Rezidiv nach allogener Stammzelltransplantation (allo-SCT) zur Verfügung. Die Kontrollgruppen beinhalteten Blutproben von 30 gesunden Spendern (HD, healthy donors) sowie 10 HIV-positiven Patienten (Tab. 3.1).

Status	Durchschnittl. Alter	Anzahl
HD	38,5	30
HIV-positiv	44,0	10
AML Erstdiagnose	53,0	23
AML refraktär	63,0	4
AML Rezidiv	70,0	9
AML Rezidiv nach allo-SCT	59,0	7

Tab. 3.1 Angaben zu Krankheitsstatus, durchschnittlichem Alter und Anzahl der Patienten bzw. Kontrollpersonen. HD: gesunde Spender

##### 3.1.1 Erhöhte Expression von inhibitorischen Rezeptoren auf T-Zellen von HIV-Patienten

Da T-Zellen bei HIV-positiven Patienten bekanntlich einen erschöpften T-Zell Phänotyp aufweisen<sup>70,71</sup>, wurde die Expression von CD244, CD160, PD-1 und TIM-3 auf T-Zellen dieser Personengruppe mit Probenmaterial aus gesunden Spendern verglichen. Hierfür wurden Lymphozyten über Ficoll Dichtegradienten-Zentrifugation aus peripherem Blut angereichert und nachfolgend zunächst mittels spezifischen Fluoreszenz-markierten Antikörpern und Durchflusszytometrie CD3<sup>+</sup> T-Zellen identifiziert sowie der prozentuale Anteil von CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen bestimmt. Abb. 3.1. zeigt repräsentative Dotplots dieser Analysen von einem gesunden Spender sowie einem HIV-positiven Patienten. In Übereinstimmung mit publizierten Daten<sup>72</sup> war der Anteil von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in HIV-Patienten hoch signifikant erniedrigt gegenüber der gesunden Kontrollgruppe (Abb. 3.2 A).

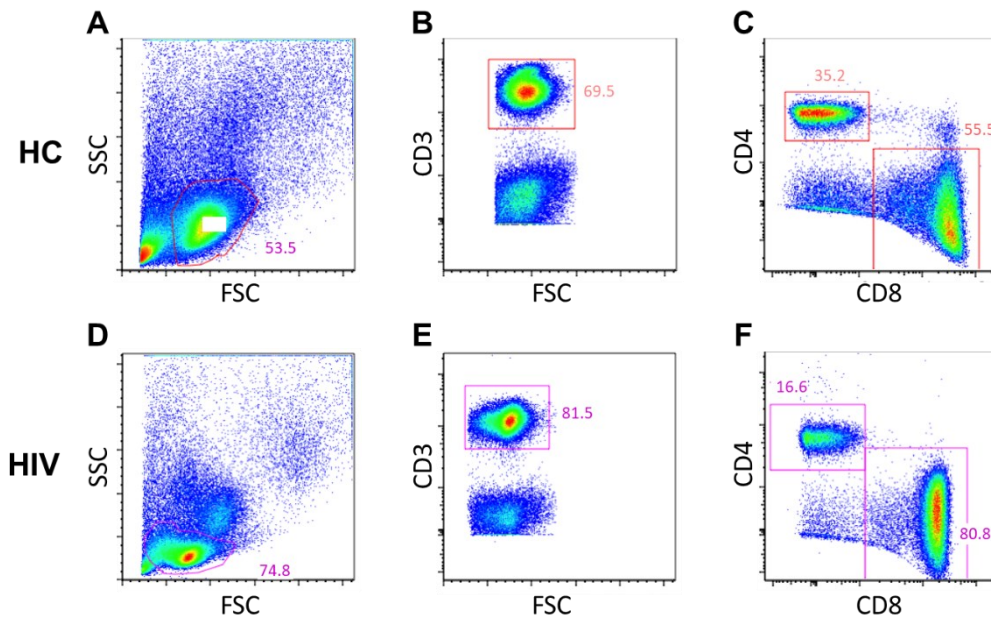


Abb. 3.1 Durchflusszytometrische Analyse und Gatingstrategie. Dotplot Darstellung der jeweiligen Zellverteilung in gesunden Spendern (A-C) und HIV-Patienten (D-F). (A, D) Darstellung der FSC und SSC Werte der angereicherten Lymphozytenproben. (B, E) Identifizierung von CD3<sup>+</sup> T-Zellen. (C, F) Anteil von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. (A-F) Die Zahlen geben jeweils den Prozentanteil an Lymphozyten, CD3<sup>+</sup> T-Zellen, sowie von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen an.

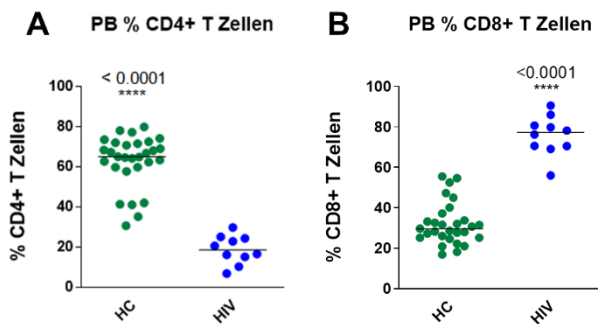


Abb. 3.2 Anteil von CD4<sup>+</sup> T-Zellen (A) und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (B) im peripheren Blut von gesunden Spendern (HC, healthy control) und HIV-positiven Patienten. Die horizontalen Linien geben die jeweiligen Mittelwerte von  $n = 30$  (HC) und  $n = 10$  (HIV) an, die  $p$ -Werte die Signifikanz der statistischen Unterschiede (\*\*\*\*  $p < 0.0001$ ).

In beiden Zellpopulationen, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, wurde anschließend die Expression von CD244, CD160, PD-1, TIM-3 und LAG-3 analysiert. In Übereinstimmung mit vorherigen Publikationen<sup>73,74</sup> war auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen HIV positiver Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern die Expression von CD244 (Median 71,0 vs. 39,55;  $n = 10$  und  $n = 30$ ;  $p = 0,0015$ ; Fig. 3.3 A), CD160 (Median 39,55 vs. 20,3;  $n = 10$  und  $n = 30$ ;  $p = 0,0003$ ; Fig. 3.3 B) und PD-1 (Median 37,3 vs. 16,8;  $n = 10$  und  $n = 30$ ;  $p = 0,0032$ ; Fig. 3.3 C) signifikant erhöht. Hingegen war die Expression von TIM-3 in beiden Gruppen unverändert niedrig und nicht unterschiedlich (Fig. 3.3 D).

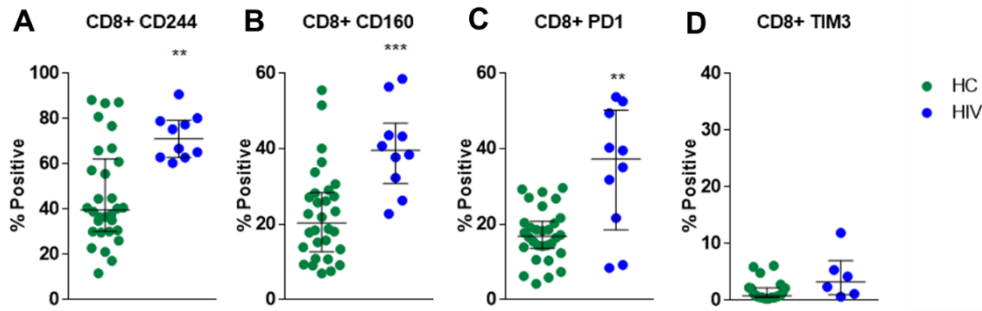


Abb. 3.3 Die inhibitorischen Rezeptoren CD244, CD160 und PD-1, nicht jedoch TIM-3, sind in CD8<sup>+</sup> T-Zellen von HIV-Patienten signifikant erhöht gegenüber gesunden Individuen. Die Punkte repräsentieren die relative Expression von CD244 (A), CD160 (B), PD-1 (C) und TIM-3 (D) in CD8<sup>+</sup> T-Zellen von gesunden Spendern (HC) und HIV-Patienten (HIV). Die horizontalen Linien indizieren die Mittelwerte ( $\pm$  SD) von  $n = 30$  (HC) sowie  $n = 10$  (HIV) individuellen Proben, die  $p$ -Werte die Signifikanz der statistischen Unterschiede (\*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).

Generell war die Expression der ausgewählten inhibitorischen Rezeptoren in CD4<sup>+</sup> T-Zellen geringer (Abb. 3.4) mit einer ähnlichen Verteilung zwischen beiden Gruppen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe aus gesunden Spendern war einzig die Expression von PD-1 in der Gruppe der HIV-Patienten signifikant erhöht (Abb. 3.4 C), in Übereinstimmung mit der Literatur.<sup>75</sup>

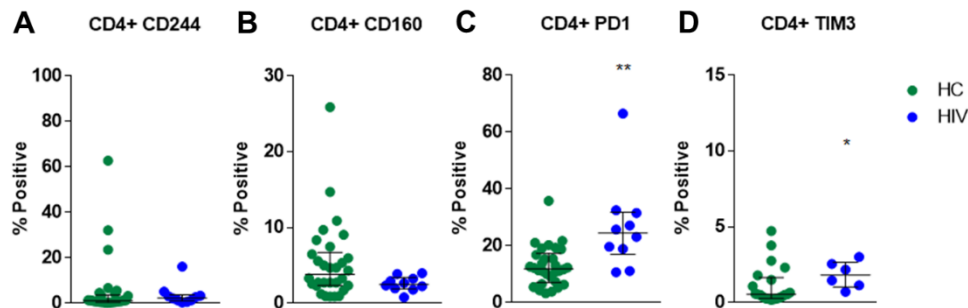


Abb. 3.4 In CD4<sup>+</sup> T-Zellen von HIV-Patienten ist lediglich die Expression von PD-1 gegenüber gesunden Individuen erhöht. Die Punkte repräsentieren die relative Expression von CD244 (A), CD160 (B), PD-1 (C) und TIM-3 (D) in CD4<sup>+</sup> T-Zellen von gesunden Spendern (HC) und HIV-Patienten (HIV). Die horizontalen Linien indizieren die Mittelwerte ( $\pm$  SD) von  $n = 30$  (HC) sowie  $n = 10$  (HIV) individuellen Proben, die  $p$ -Werte die Signifikanz der statistischen Unterschiede (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ).

### 3.1.2 Erhöhte Expression von CD244 in CD4<sup>+</sup> T-Zellen von AML Patienten bei Erstdiagnose

Nach Etablierung des methodischen Ansatzes zur Expressionsanalyse der inhibitorischen Markerproteine in den beiden Kontrollgruppen aus gesunden Spendern bzw. HIV-Patienten wurde die Analyse zunächst auf T-Zellen von Patienten, die neu an akuter myeloischer Leukämie erkrankt waren, ausgedehnt. Die Blutentnahme erfolgte zum Zeitpunkt der Erstdiagnose vor Therapiebeginn. Wie vorher wurden CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen getrennt betrachtet. Innerhalb der CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulation war zum Zeitpunkt der AML Erstdiagnose in den Patienten gegenüber der gesunden Kontrollgruppe lediglich die Expression von CD160 signifikant erniedrigt (Median 13,50 vs. 20,30;  $n = 23$  und  $n = 30$ ;  $p$

= 0,0079; Fig. 3.5 B) sowie TIM-3 schwach erhöht (Median 1,67 vs. 0,79; n = 22 und n = 21; p = 0,0167; Fig. 3.5 D). Die Expression von CD244 und PD-1 in CD8<sup>+</sup> T-Zellen war bei an AML erkrankten Patienten zumindest bei Erstdiagnose ähnlich wie bei gesunden Probanden ohne statistisch signifikante Unterschiede (Abb. 3.5 A und C).<sup>76</sup>

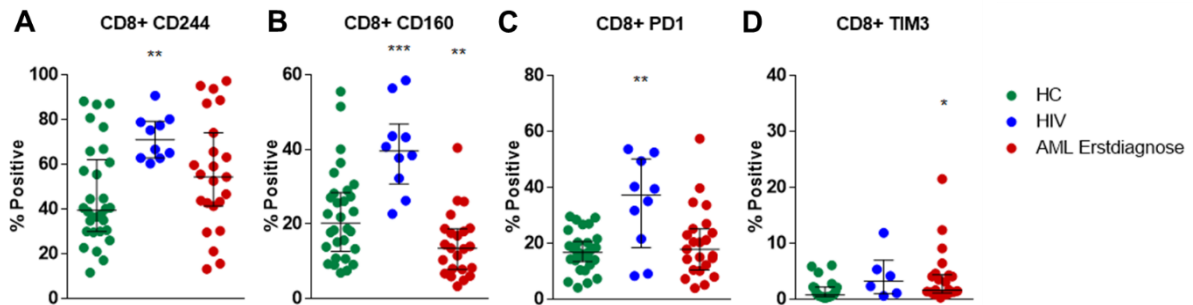


Abb. 3.5 In CD8<sup>+</sup> T-Zellen von nicht therapierten AML Patienten ist bei Erstdiagnose die Expression von CD160 erniedrigt.<sup>mod. nach 76</sup> Die roten Punkte repräsentieren die relative Expression von CD244 (A), CD160 (B), PD-1 (C) und TIM-3 (D) in CD8<sup>+</sup> T-Zellen von AML-Patienten bei Erstdiagnose (n = 23). Die Werte der Kontrollgruppen aus gesunden Spendern (HC, n=30) und HIV-Patienten (HIV, n = 10) sind aus Abb. 3.3 entnommen. Die horizontalen Linien indizieren die Mittelwerte ( $\pm$  SD) der individuellen Proben, die p-Werte die Signifikanz der statistischen Unterschiede bezogen auf gesunde Probanden (\* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001).

Ähnlich zeigten CD4<sup>+</sup> T-Zellen der neu an AML erkrankten Patienten eine geringe Abnahme der Expression von CD160 (Median 2,46 vs. 3,81; n = 23 und n = 30; p = 0,01; Fig. 3.6 B) gegenüber gesunden Spendern, aber keine höher signifikanten Expressionsunterschiede der Marker PD-1 und TIM-3. Überraschenderweise war die Menge an CD244 in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen in dieser AML Patientengruppe im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen, HC und HIV, sehr signifikant erhöht (Median 7,17 vs. 1,02; n = 23 und n = 30; p = 0,0008; Fig. 3.6 A).<sup>76</sup>

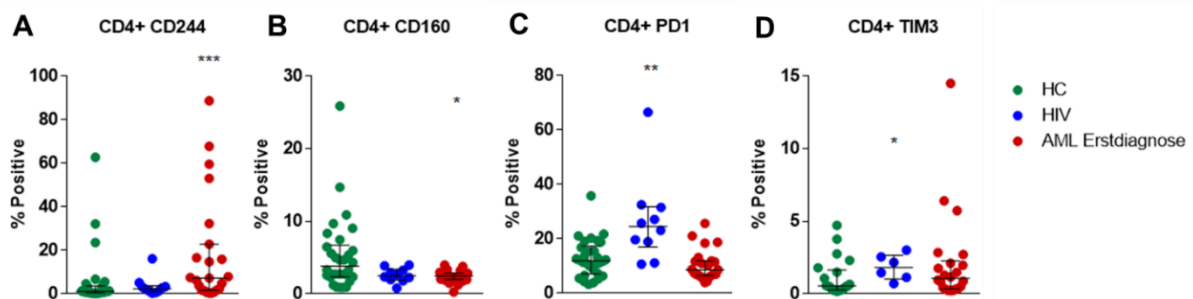


Abb. 3.6 In CD4<sup>+</sup> T-Zellen von nicht therapierten AML Patienten ist bei Erstdiagnose die Expression von CD244 signifikant erhöht.<sup>mod. nach 76</sup> Die roten Punkte repräsentieren die relative Expression von CD244 (A), CD160 (B), PD-1 (C) und TIM-3 (D) in CD4<sup>+</sup> T-Zellen von AML-Patienten bei Erstdiagnose (n=23). Die Werte der Kontrollgruppen aus gesunden Spendern (HC, n = 30) und HIV-Patienten (HIV, n = 10) sind aus Abb. 3.3 entnommen. Die horizontalen Linien indizieren die Mittelwerte ( $\pm$  SD) der individuellen Proben, die p-Werte die Signifikanz der statistischen Unterschiede bezogen auf gesunde Probanden (\* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001).

### 3.1.3 Anstieg von CD244 und PD-1 in CD8<sup>+</sup> bzw. CD4<sup>+</sup> T-Zellen von AML Patienten mit Rezidiv

Zur Evaluierung von Veränderungen der Expression von CD244, CD160, PD-1 und TIM-3 im weiteren Krankheitsverlauf wurden Proben von Patienten in späteren Krankheitsstadien betrachtet. Besonderes Interesse galt dabei Patienten mit refraktärer Erkrankung, die auf die Chemotherapie nicht ausreichend angesprochen hatten, Patienten mit neu diagnostiziertem Rezidiv nach erfolgreicher Behandlung der Ersterkrankung, und Patienten mit Rezidiv nach allogener Stammzelltransplantation (allo-SCT).

In CD8<sup>+</sup> T-Zellen von Patienten mit refraktärer Erkrankung war TIM-3 geringfügig, aber dennoch signifikant überexprimiert (Median 4,79 vs. 0,79; n = 4 und n = 21; p = 0,0245; Fig. 3.7 D, orange) im Vergleich zu den gesunden Kontrollprobanden.

Andererseits zeigten Patienten, die ein Rezidiv erlitten hatten, eine signifikant erhöhte Expression von CD244 in diesen Zellen (Median 78,20 vs. 39,55; n = 9 und n = 30; p = 0,0006; Fig. 3.7 A, lila). CD244 war ebenfalls erhöht, wenngleich schwächer, in Patienten mit einem Rezidiv nach einer allogenen Stammzelltransplantation (Median 70,90 vs. 39,55; n = 7 und n = 30; p = 0,0161; Fig. 3.7 A, braun). In dieser Patientengruppe wurden außerdem erhöhte Expressionswerte für PD-1 mit ausgeprägter individueller Bandbreite (Median 37,90 vs. 16,80; n = 7 und n = 30; p = 0,0097; Fig. 3.7 C, braun) und TIM-3 (Median 5,29 vs. 0,79; n = 7 und n = 21; p = 0,0101; Fig. 3.7 D, braun) gemessen, sowie eine verminderte Expression von CD160 (Median 10,38 vs. 20,30; n = 6 und n = 30; p = 0,0331; Fig. 3.7 B, braun).<sup>76</sup>

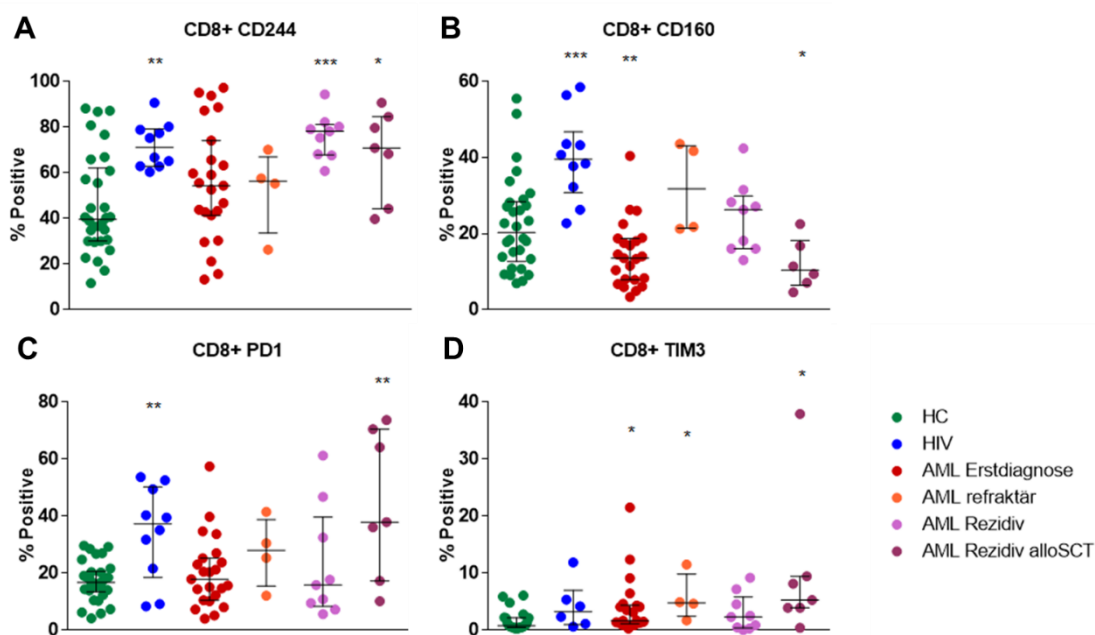


Abb. 3.7 Die Expression von CD244, CD160, PD-1 und TIM-3 In CD8<sup>+</sup> T-Zellen von AML Patienten variiert je nach Krankheitsphase. <sup>mod. nach</sup> 76 Die Punkte repräsentieren die relative Expression von CD244 (A), CD160 (B), PD-1 (C) und TIM-3 (D)

in CD8<sup>+</sup> T-Zellen von AML-Patienten bei Erstdiagnose (n = 23, rot), Therapie-refraktären Patienten (n = 4, orange), Patienten mit Rezidiv (n = 9, lila) und Patienten mit Rezidiv nach allo-SCT (n = 7, braun). Die Werte der Kontrollgruppen aus gesunden Spendern (HC, n = 30), HIV-Patienten (HIV, n = 10) und AML-Patienten bei Erstdiagnose (n = 23) sind aus Abb. 3.5 übernommen. Die horizontalen Linien indizieren die Mittelwerte ( $\pm$ SD) der individuellen Proben, die p-Werte die Signifikanz der statistischen Unterschiede bezogen auf gesunde Probanden (\* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney U Test.

Generell betrachtet waren die analysierten inhibitorischen Moleküle, abgesehen von zwei markanten Ausnahmen, in CD4<sup>+</sup> Zellen während aller Krankheitsstadien nur schwach exprimiert und damit quantitativ vergleichbar zu gesunden Probanden. Allerdings war in Patienten mit Rezidiv die Menge an CD244 um etwa 10-fach angestiegen (Median 10,4 vs. 1,022; n = 9 und n = 30; p = 0,0005; Fig. 3.8 A, lila) und damit ähnlich erhöht wie bei Patienten bei Erstdiagnose (Fig. 3.8 A, rot), nicht jedoch bei Patienten mit Rezidiv nach Stammzelltransplantation (Fig. 3.8 A, braun). In letzterer und nur in dieser AML-Patientengruppe war hingegen ein sehr deutlicher Anstieg an PD-1 zu verzeichnen (Median 62,9 vs. 11,9; n = 7 und n = 30; p < 0,0001; Fig. 3.8 C, braun).<sup>76</sup>

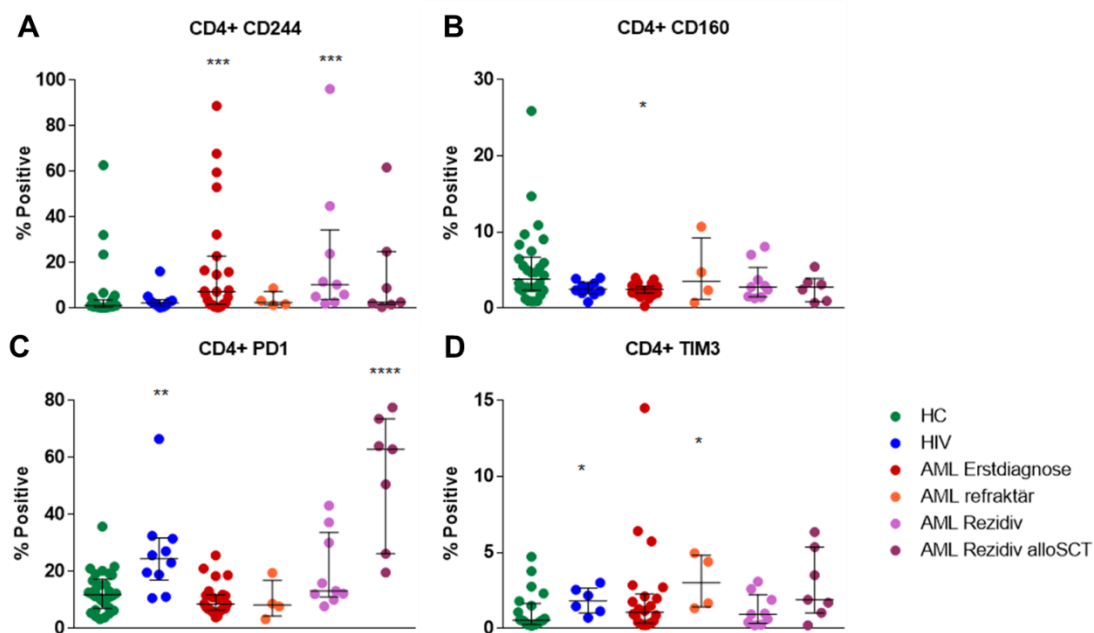


Abb. 3.8 Die Expression von CD244 und PD-1 ist in CD4<sup>+</sup> T-Zellen von AML Patienten in distinkten Krankheitsphasen stark erhöht. <sup>mod. nach 76</sup> Die Punkte repräsentieren die relative Expression von CD244 (A), CD160 (B), PD-1 (C) und TIM-3 (D) in CD4<sup>+</sup> T-Zellen von AML-Patienten bei Erstdiagnose (n = 23, rot), Therapie-refraktären Patienten (n = 4, orange), Patienten mit Rezidiv (n = 9, lila) und Patienten mit Rezidiv nach allo-SCT (n = 7, braun). Die Werte der Kontrollgruppen aus gesunden Spendern (HC, n = 30), HIV-Patienten (HIV, n = 10) und AML-Patienten bei Erstdiagnose (n = 23) sind aus Abb. 3.6 übernommen. Die horizontalen Linien indizieren die Mittelwerte ( $\pm$ SD) der individuellen Proben, die p-Werte die Signifikanz der statistischen Unterschiede bezogen auf gesunde Probanden (\* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001; \*\*\*\* p < 0.0001). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney U Test.

### 3.1.4 Die Expression der inhibitorischen Moleküle variiert in Abhängigkeit vom Alter, nicht jedoch vom CMV Status

Zur besseren Berücksichtigung des unterschiedlichen Alters der Patienten und um eine alters-bedingte Verzerrung der Daten in den einzelnen Gruppen zu vermeiden, erfolgte eine Aufteilung der Daten entsprechend des Alters der Patienten in  $\leq 40$  und  $> 40$  Jahre. Der Vergleich der Expressionsstärken der Marker erfolgte nun innerhalb der jeweiligen Altersgruppen. In Tab. 3 ist die Altersverteilung der Patienten und Kontrollprobanden.

	40 Jahre		> 40 Jahre	
	Median	Anzahl	Median	Anzahl
HD	25,0	15	58,0	15
HIV	29,5	4	47,5	6
AML Erstdiagnose	35,0	7	59,0	16
AML refraktär	-	-	63,0;	4
AML Rezidiv	40,0	1	71,0	8
AML Rezidiv nach alloSCT	39,0	1	59,0	6

Tab. 3. 2 Angaben zu Krankheitsstatus, durchschnittlichem Alter und Anzahl der Patienten bzw. Kontrollprobanden mit einem Alter von 40 Jahren oder darunter, bzw. einem Alter über 40 Jahre. HD: gesunde Spender

Alle AML Patienten mit refraktärer Erkrankung waren älter als 40 Jahre. Daher wurde die Expression der inhibitorischen Moleküle in CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen hier nur in der betreffenden Altersgruppe verglichen.

Die Aufteilung nach Alter ermöglichte größtenteils eine differenzierte Aussagekraft über alle Patienten/Kontrollgruppen hinweg. Im Einzelnen beschränkte sich der Anstieg an CD244 in CD8<sup>+</sup> T-Zellen von HIV-positiven Patienten auf die Altersgruppe  $\leq 40$  Jahre (Median 78,15 vs. 34,8; n = 4 und n = 15; p = 0,0005; Abb. 3.9 A), ebenso der Anstieg von CD160 (Median 42,0 vs. 17,8; n = 4 und n = 15; p = 0,0005; Abb. 3.9 B) und PD-1 (Median 39,9 vs. 18,5; n = 4 und n = 15; p = 0,0005; Abb. 3.9 C). In der Altersgruppe der  $> 40$ -jährigen HIV positiven Patienten erreichten die Unterschiede keine statistische Signifikanz, jedoch gab es eine Tendenz hin zu stärkerer Expression aller vier Rezeptoren, CD244 (Median 65,9 vs. 60,9; n = 6 und n = 15; p = 0,52; Abb. 3.9 A), CD160 (Median 35,0 vs. 25,7; n = 6 und n = 15; p = 0,13; Abb. 3.9 B), PD-1 (Median 26,7 vs. 14,8; n = 6 und n = 15; p = 0,16; Abb. 3.9 C) und TIM-3 (Median 1,7 vs. 0,9; n = 4 und n = 15; p = 0,53; Abb. 3.9 D).



In CD8<sup>+</sup> T-Zellen von AML Patienten bei Erstdiagnose war nunmehr die Expression von CD160 ausschließlich in der Gruppe > 40 Jahre reduziert (Median 14,2 vs. 25,70; n = 16 und n = 15; p = 0,0075; Abb. 3.9 B), die Expression von TIM-3 in der Gruppe ≤ 40 Jahre geringfügig verstärkt (Median 1,67 vs. 0,69; n = 7 und n = 6; p = 0,0221; Abb. 3.9 D).

Patienten im Rezidiv einer AML oder mit refraktärer Erkrankung zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Expression der analysierten Inhibitoren im Vergleich zu gesunden Spendern, im Gegensatz zu Patienten > 40 Jahre mit Rezidiv nach allogener Stammzelltransplantation. In der Patientengruppe war die Expression von CD160 reduziert (Median 11,4 vs. 25,7; n = 5 und n = 15; p = 0,0193; Abb. 3.9 B), Expression von PD-1 (Median 51,05 vs. 14,8; n = 6 und n = 15; p = 0,0084; Abb. 3.9 C) und TIM-3 (Median 6,72 vs. 0,93; n = 6 und n = 15; p = 0,0365; Abb. 3.9 D) jeweils erhöht.

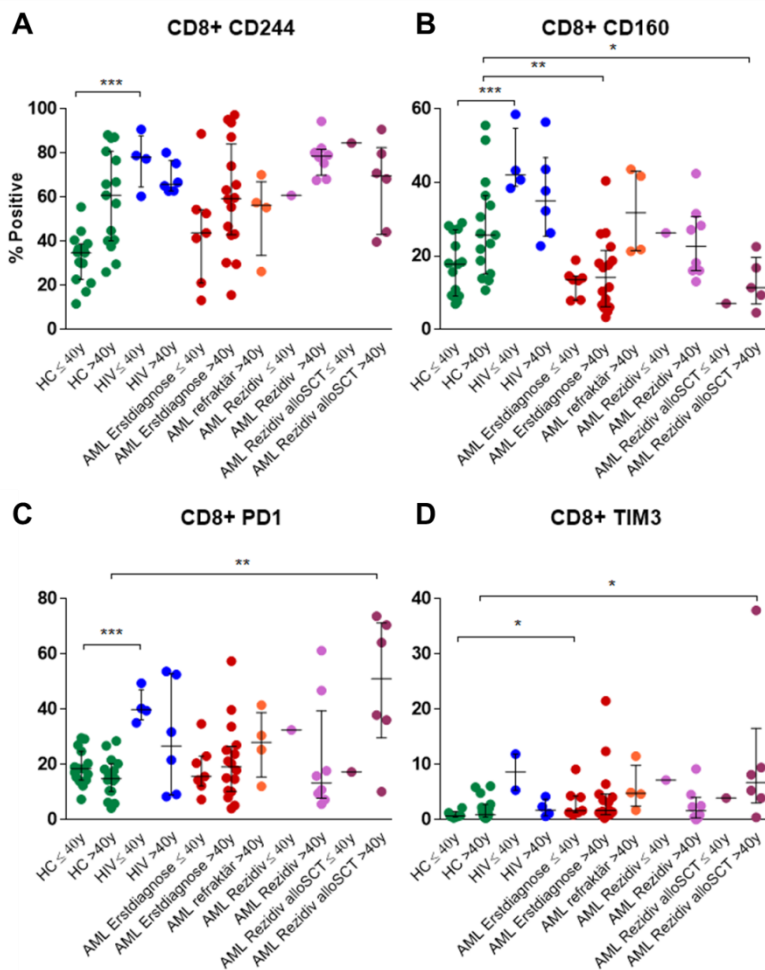


Abb. 3.9 Die Expression von CD244, CD160, PD-1 und TIM-3 in CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist vom Alter abhängig. *mod. nach 76* Die Punkte repräsentieren die relative Expression von CD244 (A), CD160 (B), PD-1 (C) und TIM-3 (D) in CD8<sup>+</sup> T-Zellen von gesunden Spendern (HC, grün), HIV-Patienten (blau), AML-Patienten bei Erstdiagnose (rot), Therapie-refraktären Patienten (orange), Patienten mit Rezidiv (lila) und Patienten mit Rezidiv nach allo-SCT (braun). Die Anzahl der Patienten bzw. Kontrollprobanden ist in Tab. 3.3 angegeben. Die horizontalen Linien indizieren die Mittelwerte ( $\pm$ SD) der individuellen Proben, die p-Werte die Signifikanz der statistischen Unterschiede bezogen auf gesunde Probanden (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney U Test.

Aufgeschlüsselt nach dem Alter der Patienten zeigten auch CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ≤ 40-jährigen HIV-positiven Patienten eine verstärkte Expression von CD244 (Median 2,54 vs. 0,49; n = 4 und n = 15; p = 0,0273; Abb. 3.10 A), und PD-1 (Median 24,4 vs. 13,0; n = 4 und n = 15; p = 0,0036; Abb. 3.10 C). Bei den über 40-jährigen wurde eine verminderte Expression von CD160 (Median 2,15 vs. 4,68; n = 6 und n = 15; p = 0,0233; Abb. 3.10 B) und, wie in der Altersgruppe ≤ 40 Jahre, eine vermehrte Expression von PD-1 (Median 25,2 vs. 10,7; n = 6 und n = 15; p = 0,0449; Abb. 3.10 C) beobachtet.

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose exprimieren AML Patienten in der Altersgruppe ≤ 40 Jahren in CD4<sup>+</sup> T-Zellen vermehrt CD244 (Median 4,81 vs. 0,49; n = 7 und n = 15; p = 0,0011; Fig. 3.10 A), und in der Altersgruppe > 40 Jahren vermindert CD160 (Median 2,31 vs. 4,68; n = 16 und n = 15; p = 0,0023; Abb. 3.10 B).

Patienten im Rezidiv einer AML ohne vorangegangene Stammzelltransplantation und einem Alter von > 40 Jahren zeigten eine erhöhte Expression von CD244 (Median 10,95 vs. 1,36; n = 8 und n = 15; p = 0,0337; Abb. 3.10 A), während Patienten dieser Altersgruppe im Rezidiv nach Stammzelltransplantation vermehrt PD-1 (Median 63,45 vs. 10,7; n = 6 und n = 15; p < 0,0001; Abb. 3.10 C) exprimierten.

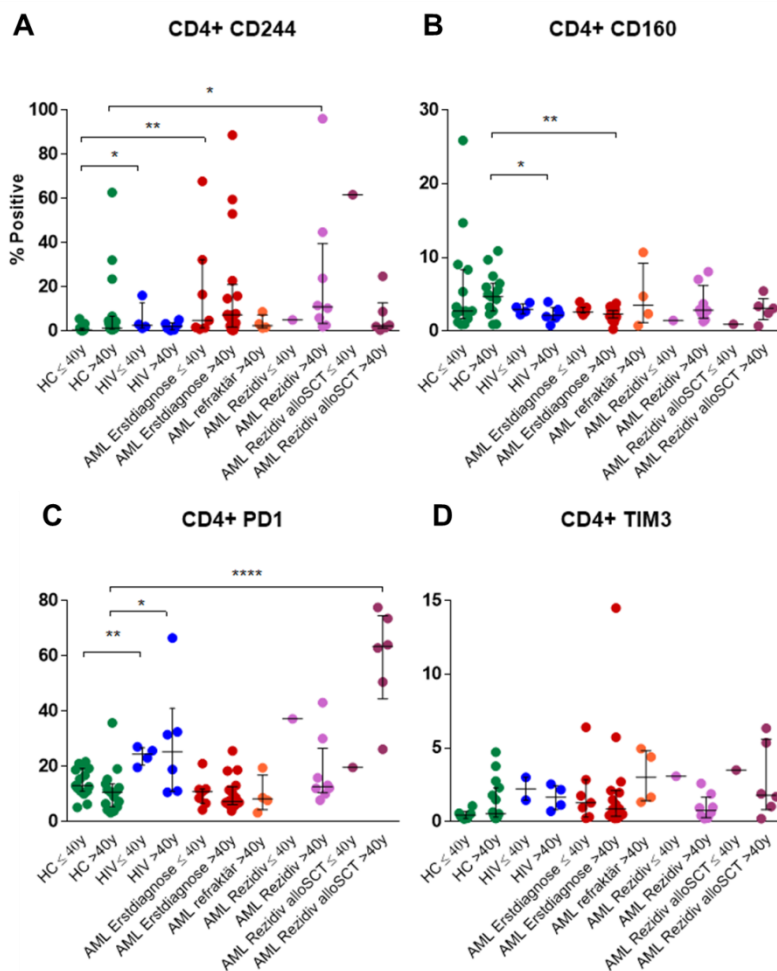


Abb. 3.10 Die Expression von CD244, CD160, PD-1 und TIM-3 in CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist vom Alter abhängig. <sup>mod. nach 76</sup> Die Punkte repräsentieren die relative Expression von CD244 (A), CD160 (B), PD-1 (C) und TIM-3 (D) in CD8<sup>+</sup> T-Zellen von gesunden Spendern (HC, grün), HIV-Patienten (blau), AML-Patienten bei Erstdiagnose (rot), Therapie-refraktären Patienten (orange), Patienten mit Rezidiv (lila) und Patienten mit Rezidiv nach allo-SCT (braun). Die Anzahl der Patienten bzw. Kontrollprobanden ist in Tab. 3.3 angegeben. Die horizontalen Linien indizieren die Mittelwerte ( $\pm$  SD) der individuellen Proben, die p-Werte die Signifikanz der statistischen Unterschiede bezogen auf gesunde Probanden (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney U Test.

Zusammenfassend zeigt sich ein signifikanter Unterschied in der Expression verschiedener Oberflächenmarker sowohl in CD8<sup>+</sup> als auch in CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den betrachteten Altersgruppen. Um eine Verzerrung der Ergebnisse durch unterschiedliche Altersstrukturen der Probandengruppen zu vermeiden ist daher die altersabhängige Analyse die sinnvollere Art der Auswertung.

Neben dem Einfluss des Alters auf die Expression der inhibitorischen Moleküle wurde auch die Bedeutung des CMV Serostatus analysiert. Hierzu wurde die Expression von CD244, CD160, PD-1 und TIM-3 auf CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen von 24 gesunden Spendern mit bestätigtem positivem oder negativem Serostatus in den beiden Altersgruppen untersucht. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Expression der inhibitorischen Oberflächenmoleküle nach Differenzierung in die oben genannten Alterskohorten oder/und in Abhängigkeit des CMV Status (Abb. 3.11).<sup>76</sup>

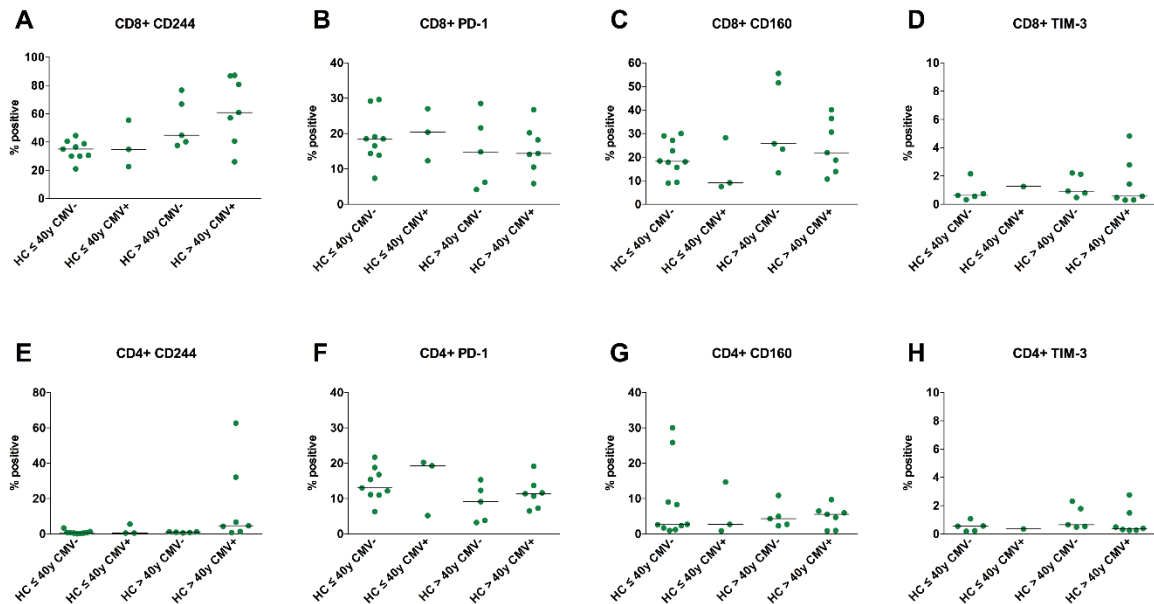


Abb. 3.11 Die Expression von CD244, CD160, PD-1 und TIM-3 auf CD8<sup>+</sup> (A, B, C, D) T-Zellen und CD4<sup>+</sup> (E, F, G, H) T-Zellen ist unabhängig vom CMV Serostatus. *mod. nach 76* Die Punkte repräsentieren die relative Expression von CD244 (A, E), PD-1 (B, F) CD160 (C, G), und TIM-3 (D, H) in CD8<sup>+</sup> (A, B, C, D) T-Zellen und CD4<sup>+</sup> (E, F, G, H) T-Zellen in Abhängigkeit von CMV Serostatus und Alter ≤ 40 Jahre oder > 40 Jahre. Die Darstellung erfolgt in folgenden Gruppen: Gesunde Spender (HC) ≤ 40 Jahre (≤ 40y) mit negativem Test für CMV (CMV-) (n = 9), ≤ 40 Jahre (≤ 40y) mit positivem Test für CMV (CMV+) (n = 3), > 40 Jahre (> 40y) mit negativem Test für CMV (CMV-) (n = 5), und > 40 Jahre (> 40y) mit positivem Test für CMV (CMV+) (n = 7).

### 3.2 Vergleich der Differenzierung von T-Gedächtniszellen (T Memory Cells)

Im nächsten Schritt wurde die Verteilung der T-Zellen innerhalb der verschiedenen T Gedächtniszell-Kompartimente untersucht. Eine Verschiebung der T Gedächtniszell-Differenzierung zugunsten antigen-erfahrener Gedächtniszellen könnte zur beobachteten Erhöhung der Expression inhibitorischen Moleküle wie PD-1 auf T-Zellen von Patienten beitragen und so eine Verzerrung der Ergebnisse verursachen.

#### 3.2.1 Verteilung der T Gedächtniszellen in Differenzierungsstadien

Zur Identifizierung der Gedächtniszellen wurde auf CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen jeweils die Expression von CCR7 und CD45RA gemessen, und entsprechend in die folgenden Kompartimente unterteilt: Naive Gedächtniszellen (CD45RA<sup>+</sup>/CCR7<sup>+</sup>), zentrale Gedächtniszellen (CM, CD45RA<sup>-</sup>/CCR7<sup>+</sup>), Effektor Gedächtniszellen (EM, CD45RA<sup>-</sup>/CCR7<sup>-</sup>) und EMRA (CD45RA<sup>+</sup>/CCR7<sup>-</sup>).

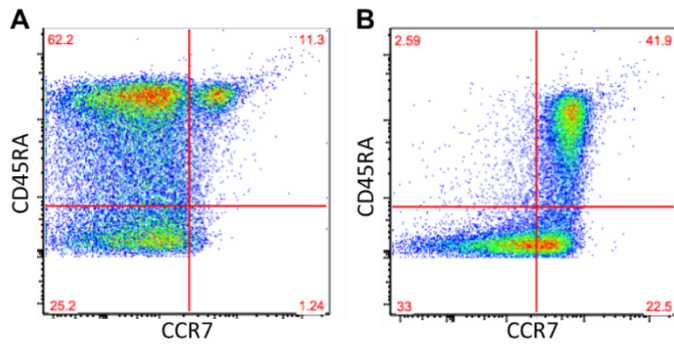


Abb. 3.12 Nach Identifikation der Lymphozyten erfolgte die Selektion der CD3<sup>+</sup> T-Zellen mit anschließendem Gating auf CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen (hier nicht gezeigt, siehe Abb. 3.1). Nach dieser Selektion erfolgt die Durchflusszytometrische Analyse und Dotplot Darstellung der Expression von CD45RA und CCR7 auf CD8<sup>+</sup> (A) und CD4<sup>+</sup> (B) T-Zellen eines gesunden Spenders, nach Identifizierung von CD3<sup>+</sup> T-Zellen (hier nicht gezeigt). Die Zahlen geben jeweils den Anteil an  $T_{naiv}$  (CD45RA<sup>+</sup>/CCR7<sup>+</sup>),  $T_{CM}$  (CD45RA<sup>-</sup>/CCR7<sup>+</sup>),  $T_{EM}$  (CD45RA<sup>-</sup>/CCR7<sup>-</sup>) und  $T_{EMRA}$  (CD45RA<sup>+</sup>/CCR7<sup>-</sup>) an.

Zunächst wurde die Verteilung der T-Zellen in die relevanten Gedächtnis-Differenzierungsstadien bei den unterschiedlichen Patienten- und Kontrollgruppen  $\leq 40$  und  $> 40$  Jahren bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.13 zusammengefasst.

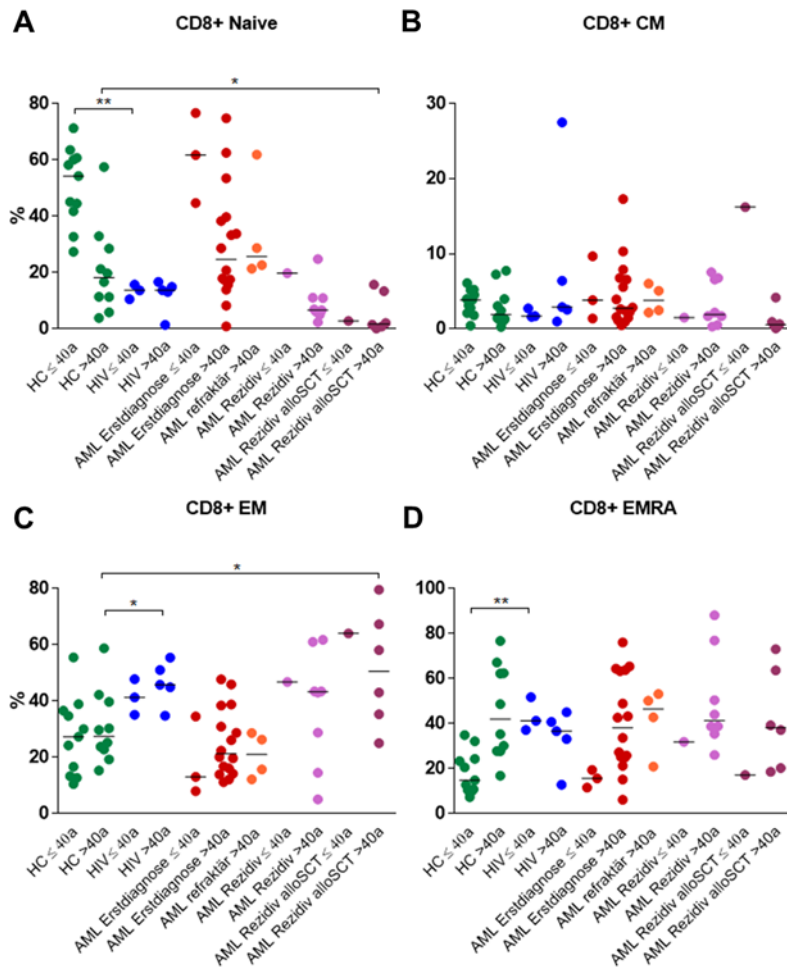


Abb. 3.13 Die Differenzierung der Gedächtniszell-Population auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist lediglich bei AML Patienten nach allo-SCT zugunsten von Effektor Gedächtniszellen verschoben.<sup>mod. nach 76</sup> Die Punkte repräsentieren den relativen Anteil der naiven Gedächtniszellen (A), zentralen Gedächtniszellen (B), Effektor Gedächtniszellen (C) und EMRA (D) an der CD8<sup>+</sup> T-Zell Population von gesunden Spendern (HC, grün), HIV-Patienten (blau), AML-Patienten bei Erstdiagnose (rot), Therapie-refraktären Patienten (orange), Patienten mit Rezidiv (lila) und Patienten mit Rezidiv nach allo-SCT (braun), in den Altersgruppen ≤ und > 40 Jahre. Die Anzahl der Patienten bzw. Kontrollprobanden ist in Tab. 3.3 angegeben. Die horizontalen Linien indizieren die Mittelwerte ( $\pm$ SD) der individuellen Proben, die p-Werte die Signifikanz der statistischen Unterschiede bezogen auf gesunde Probanden (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney U Test.

Auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Altersgruppe ≤ 40 Jahre zeigten HIV Patienten eine verstärkte Differenzierung zu EMRA Zellen (Median 41,2 vs. 14,8;  $n = 3$  und  $n = 11$ ;  $p = 0,0055$ ; Abb. 3.13 D), auf Kosten der naiven Gedächtniszellen (Median 13,6 vs. 54,3;  $n = 3$  und  $n = 11$ ;  $p = 0,0055$ ; Abb. 3.13 A) die signifikant abnahmen. Der prozentuale Anteil der T<sub>CM</sub> und T<sub>EM</sub> bei HIV Patienten dieser Altersgruppe ist vergleichbar mit der gesunden Kontrollgruppe (Abb. 3.13 B, C).

In der Altersgruppe > 40 Jahren hingegen zeigte sich für die CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine Verschiebung zugunsten der Effektor Gedächtniszellen bei HIV Patienten (Median 45,8 vs. 27,45;  $n = 5$  und  $n = 10$ ;  $p = 0,028$ ; Abb. 3.13 C), ebenso bei AML Patienten im Rezidiv nach allogener Stammzelltransplantation (Median 50,55 vs. 27,45;  $n = 6$  und  $n = 10$ ;  $p = 0,042$ ; Abb. 3.13 C). Auch bei den Patienten nach allogener Stammzelltransplantation erfolgte diese Verschiebung zulasten der naiven Gedächtniszellen (Median

1,73 vs. 18,15; n = 6 und n = 10; p = 0,016; Abb. 3.13 A). In dieser Altersgruppe der HIV-Patienten gab es in den anderen Kompartimenten keine signifikante Veränderung.

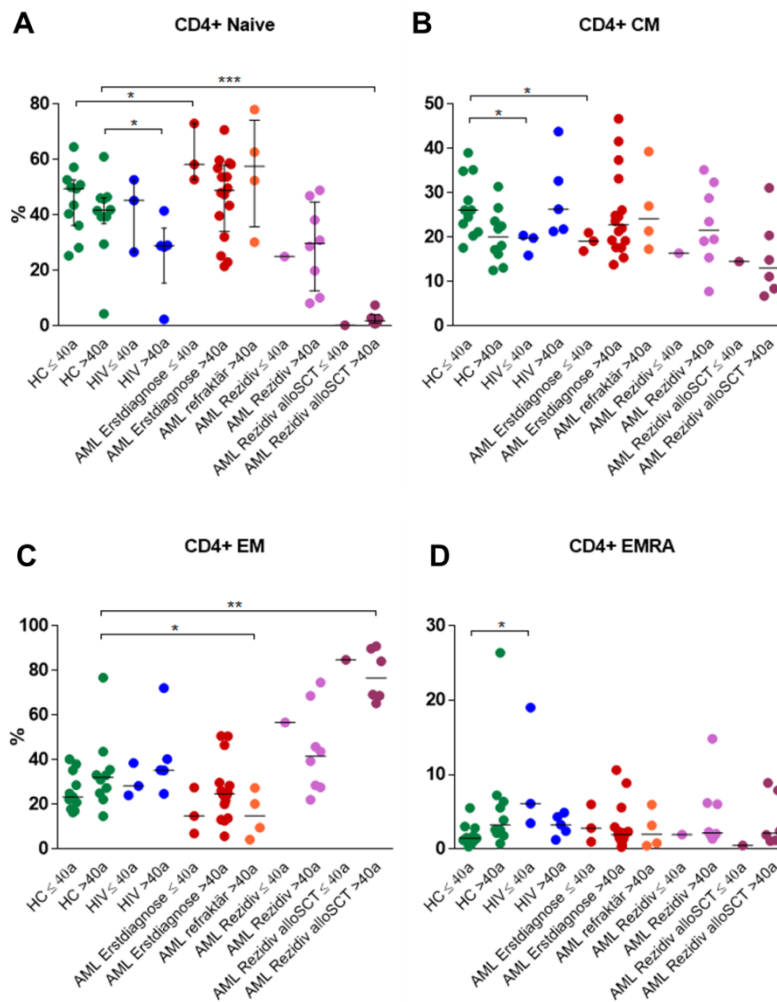


Abb. 3.14 Die Differenzierung der Gedächtniszell-Population auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist bei AML Patienten nach allo-SCT zugunsten von Effektor Gedächtniszellen verschoben <sup>mod. nach 76</sup> Bei Patienten mit Rezidiv zeigt sich eine verminderte Gruppe von Effektor T-Zellen. Die Punkte repräsentieren den relativen Anteil der naiven Gedächtniszellen (A), zentralen Gedächtniszellen (B), Effektor Gedächtniszellen (C) und EMRA (D) an der CD8<sup>+</sup> T-Zell Population von gesunden Spendern (HC, grün), HIV-Patienten (blau), AML-Patienten bei Erstdiagnose (rot), Therapie-refraktären Patienten (orange), Patienten mit Rezidiv (lila) und Patienten mit Rezidiv nach allo-SCT (braun), in den Altersgruppen  $\leq$  und  $>$  40 Jahre. Die Anzahl der Patienten bzw. Kontrollprobanden ist in Tab. 3.3 angegeben. Die horizontalen Linien indizieren die Mittelwerte ( $\pm$ SD) der individuellen Proben, die p-Werte die Signifikanz der statistischen Unterschiede bezogen auf gesunde Probanden (\* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney U Test.

In der Altersgruppe  $>$  40 Jahren zeigten AML Patienten mit Rezidiv nach allogener Stammzelltransplantation auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen, ähnlich wie auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen, einen signifikant erhöhten Anteil an Effektor Gedächtniszellen (Median 76,65 vs. 32,00; n = 6 und n = 10; p = 0,0017; Abb. 3.14 C) zulasten der naiven Zellen (Median 1,83 vs. 41,75; n = 6 und n = 10; p = 0,0004; Abb. 3.14 A). Im Gegensatz dazu nahm in dieser Altersgruppe bei AML Patienten mit refraktärer Erkrankung die Population an Effektor Gedächtniszellen ab (Median 14,88 vs. 32,00; n = 4 und n = 10; p = 0,026; Abb. 3.14 C). Hier wurde allerdings keine signifikante Erhöhung eines anderen Kompartiments beobachtet.<sup>76</sup>

Als nächstes wurde nun mittels linearer Regression die Korrelation zwischen Alter und der Häufigkeit von naiven und T Effektor Gedächtniszellen innerhalb der Patientengruppen dargestellt (Abb. 3.15).

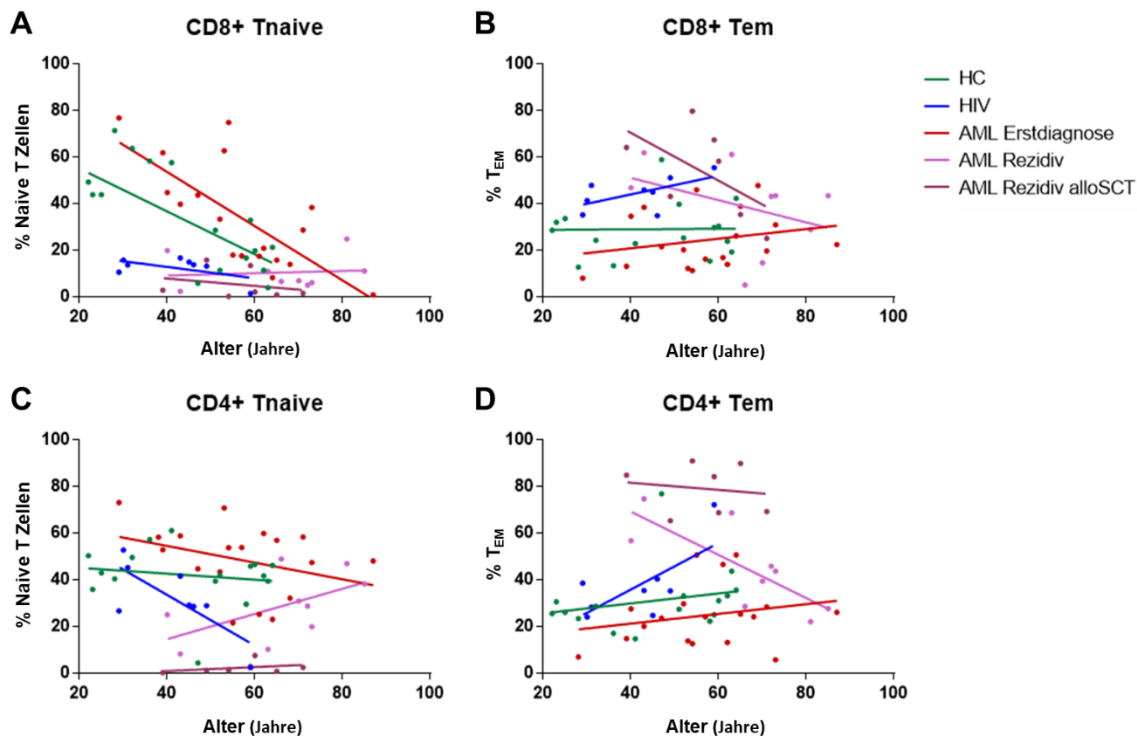


Abb. 3.15 Die Verteilung von T Gedächtniszell-Phänotypen in T-Zellen von Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose einer AML entspricht der von gesunden Spendern. <sup>mod. nach 76</sup> Patienten in fortgeschrittenen Krankheitsstadien zeigen einen erhöhten Anteil an Effektor Gedächtniszellen. Regressionsanalyse zur Korrelation der Häufigkeit von T Memory Phänotypen und Alter. (A) Naive CD8<sup>+</sup> T-Zellen, (B) Effektor Memory CD8<sup>+</sup> T-Zellen, (C) Naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen, (D) Effektor Memory CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Bei gesunden Spendern wurde ein starker Rückgang des Anteils naiver T-Zellen mit zunehmendem Alter der Probanden beobachtet, was mit vorher beschriebenen Ergebnissen übereinstimmt. Dieses Muster zeigte sich auch bei AML Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose.<sup>76, 77</sup>

Im Gegensatz dazu zeigten HIV positive Patienten und AML Patienten im Rezidiv mit oder ohne Transplantation einen insgesamt niedrigeren Anteil an naiven T-Zellen zugunsten von Effektor Gedächtniszellen bereits in jungem Alter, sowohl auf CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> Zellen.

Zusätzlich bestimmten wir die Expression von CD27. CD27 ist ein kostimulierender Immuncheckpoint, welcher nach Bindung von CD70 zur Differenzierung von T-Zellen zu T-Gedächtniszellen beiträgt.<sup>78</sup> Dabei entsprechen CD27 negative T-Zellen einer Gruppe von differenzierten Gedächtniszellen.<sup>79,80</sup>



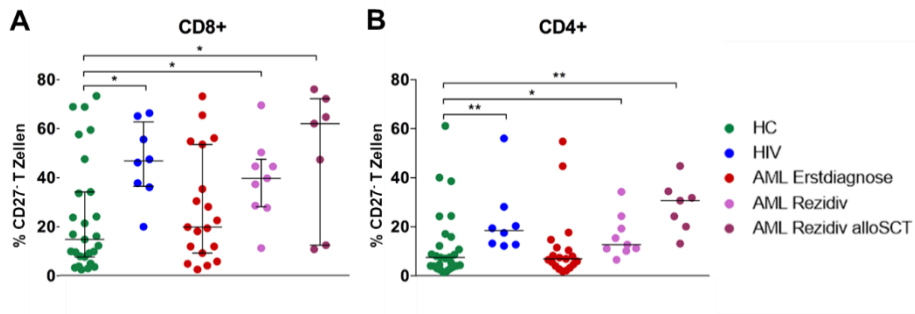


Abb. 3.16 Der Anteil an CD27<sup>-</sup> T-Zellen in CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist bei AML Patienten im Rezidiv und im Rezidiv nach allo-SCT vergleichbar mit HIV-Patienten erhöht. <sup>mod. nach 76</sup> Die Punkte repräsentieren die relative Häufigkeit von CD27<sup>-</sup> T-Zellen in CD8<sup>+</sup> (A) und CD4<sup>+</sup> (B) T-Zellen von gesunden Spendern (HC, n = 27, grün), HIV-Patienten (n = 8, blau), AML Patienten bei Erstdiagnose (n = 19, rot), Patienten mit Rezidiv (n = 9, lila) und Patienten mit Rezidiv nach allo-SCT (n = 7, braun). Die horizontalen Linien indizieren die Mittelwerte ( $\pm$ SD) der individuellen Proben, die p-Werte die Signifikanz der statistischen Unterschiede bezogen auf gesunde Probanden (\* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney U Test.

AML Patienten bei Erstdiagnose zeigten dabei einen ähnlichen Anteil an CD27 negativen T-Zellen wie gesunde Spender (CD8<sup>+</sup>: Median 19,8 vs. 14,7; p = 0,46; CD4<sup>+</sup>: Median 6,9 vs. 7,4; p = 0,92), während AML Patienten im Rezidiv (CD8<sup>+</sup>: Median 39,7; p = 0,03; CD4<sup>+</sup>: Median 12,7; p = 0,04) sowie im Rezidiv nach allogener Stammzelltransplantation (CD8<sup>+</sup>: Median 62,0; p = 0,03; CD4<sup>+</sup>: Median 30,6; p = 0,002) ähnlich HIV Patienten (CD8<sup>+</sup>: Median 46,8; p = 0,01; CD4<sup>+</sup>: Median 18,5; p = 0,006) einen signifikant erhöhten Anteil an CD27 negativen und damit differenzierteren T-Zellen zeigen.<sup>76</sup>

### 3.2.2 Expression von inhibitorischen Molekülen in Abhängigkeit von T Memory Differenzierung

Um eine Aussage darüber zu ermöglichen, ob die unterschiedlichen Häufigkeiten der verschiedenen T Gedächtniszell-Phänotypen die beobachtete Expression der inhibitorischen Moleküle beeinflussen, wurden CD244 und PD-1 auf den Memory Kompartimenten untersucht.

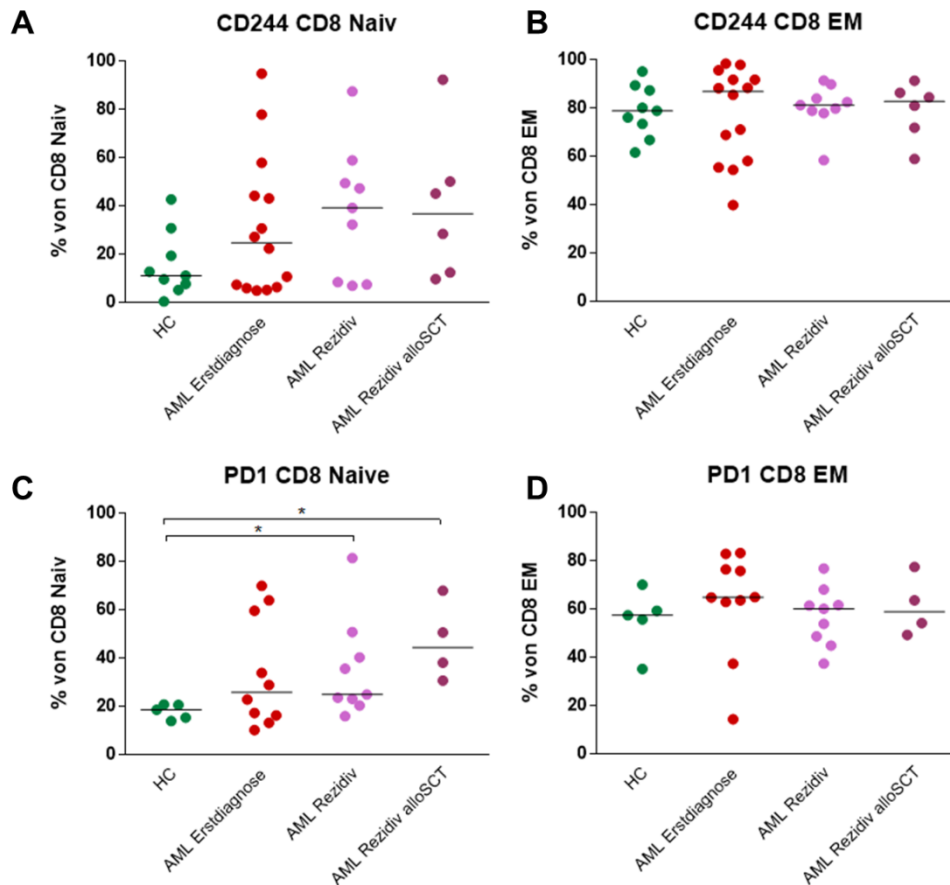


Abb. 3.17 Bis auf eine leicht erhöhte Expression von PD-1 auf naiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien zeigt sich insbesondere bei Effektor Gedächtniszellen keine signifikant erhöhte Expression von CD244 und PD-1. <sup>mod. nach 76</sup> Die Punkte repräsentieren die relative Häufigkeit von CD244 (A, B) und PD-1 (C, D) auf naiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen (A, C) und Effektor Gedächtniszellen (A, C) von gesunden Spendern (HC, n = 5, grün), AML Patienten bei Erstdiagnose (n = 10, rot), Patienten mit Rezidiv (n = 9, lila) und Patienten mit Rezidiv nach allo-SCT (n = 4, braun). Die horizontalen Linien indizieren die Mittelwerte der individuellen Proben, die p-Werte die Signifikanz der statistischen Unterschiede bezogen auf gesunde Probanden (\* p < 0.05)

Es zeigten sich generell ähnliche Expressionsstärken von CD244 und PD-1 in allen Patientengruppen. Es wurde lediglich eine leicht erhöhte Expression von PD-1 auf naiven T-Zellen von AML Patienten im Rezidiv ohne (Median 24,9 vs. 18,5; n = 9 und n = 5; p = 0,019; Abb. 3.17 C) und nach Stammzelltransplantation (Median 44,25 vs. 18,5; n = 4 und n = 5; p = 0,0159; Abb. 3.17 C) festgestellt. Unter den T<sub>EM</sub> zeigten alle Patientengruppen ähnliche Expression von CD244 und PD-1.<sup>76</sup>

### 3.3 Vergleich der T-Zell Funktionalität

Abschließend wurde die Funktion der T-Zellen in allen Patientengruppen mittels Messung der Zytokin-Produktion und der Proliferation der Zellen ermittelt.

### 3.3.1 Zytokin-Produktion

Die Produktion von Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-2 (IL-2) wurde auf T-Zellen aller AML Patientengruppen nach Stimulation mit PMA und Ionomycin bestimmt und mit der Produktion nicht stimulierter T-Zellen verglichen.

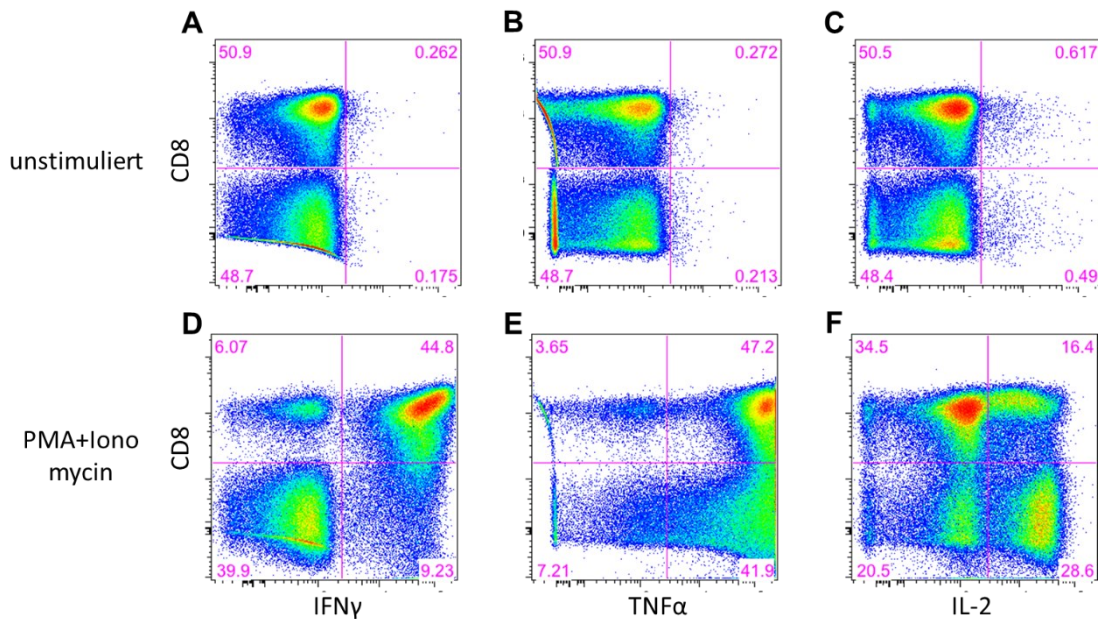


Abb. 3.18 Nach Identifikation der Lymphozyten erfolgte die Selektion der CD3+ T-Zellen mit anschließendem Gating auf CD8+ und CD4+ T-Zellen (hier nicht gezeigt, siehe Abb. 3.1). Nach dieser Selektion erfolgt die Durchflusszytometrische Analyse und Dotplot Darstellung der CD3+CD4-CD8+ und CD3+CD4+CD8- T-Zellen, aufgetragen gegen die Darstellung der Produktion von IFN- $\gamma$  (A, D), TNF- $\alpha$  (B, E) und IL-2 (C, F) ohne Stimulation (A, B, C) und nach Stimulation mit PMA und Ionomycin (D, E, F).

Zunächst erfolgte der ein Vergleich zwischen 20 gesunden Spendern und 4 HIV Patienten.

Die Produktion der getesteten Zytokine in T-Zellen von HIV Patienten war vermindert für IFN- $\gamma$  (CD8<sup>+</sup>: Median 43,7 vs. 68,5;  $p=0,22$ ; Abb. 3.19 A; CD4<sup>+</sup>: Median 11,6 vs. 18,1; Abb. 3.19 B), TNF- $\alpha$  (CD8<sup>+</sup>: Median 50,0 vs. 74,1;  $p=0,06$ ; Abb. 3.19 C; CD4<sup>+</sup>: Median 56,0 vs. 81,2;  $p=0,01$ ; Abb. 3.19 D) und IL-2 (CD8<sup>+</sup>: Median 11,7 vs. 30,4;  $p<0,0001$ ; Abb. 3.19 E; CD4<sup>+</sup>: Median 21,6 vs. 50,4;  $p=0,007$ ; Abb. 3.19 F). Statistische Signifikanz wurde nicht immer erreicht, dies liegt vermutlich an der geringen Anzahl an Proben von HIV positiven Patienten.

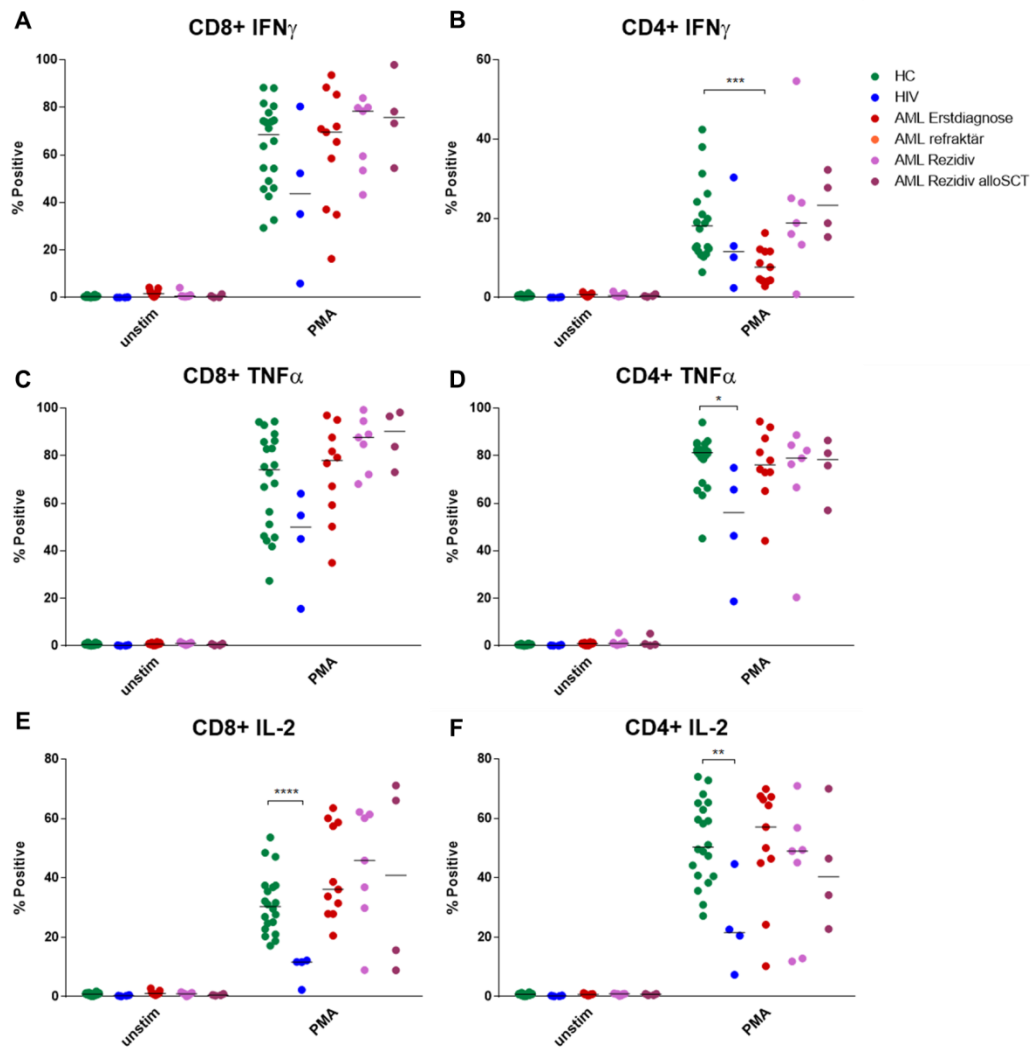


Abb. 3.19 Bis auf eine Abnahme der Produktion von IFN- $\gamma$  durch CD4 $^+$  T-Zellen bei AML Patienten bei Erstdiagnose zeigt sich keine signifikante Veränderung der Zytokinproduktion der T-Zellen von AML Patienten. *mod. nach* <sup>76</sup> Die Punkte repräsentieren den relativen Anteil an CD8 $^+$  (A, C, E) und CD4 $^+$  (B, D, F) T-Zellen, welche IFN- $\gamma$  (A, B), TNF- $\alpha$  (C, D) und IL-2 (E, F) produzieren, von gesunden Spendern (HC, n = 20, grün), HIV-Patienten (n = 4, blau), AML Patienten bei Erstdiagnose (n = 11, rot), Patienten mit Rezidiv (n = 7, lila) und Patienten mit Rezidiv nach allo-SCT (n = 4, braun). Die horizontalen Linien indizieren die Mittelwerte der individuellen Proben, die p-Werte die Signifikanz der statistischen Unterschiede bezogen auf gesunde Probanden (\* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney U Test.

Mit Ausnahme der signifikanten Abnahme von IFN- $\gamma$  in CD4 $^+$  T-Zellen von AML Patienten bei Erstdiagnose (Median 7,7 vs. 18,1; p = 0,0002; Abb. 3.19 B) zeigten AML Patienten aller Gruppen keinerlei signifikante Unterschiede in der Zytokinproduktion.<sup>76</sup>

### 3.3.2 Proliferation

Nach der Aktivierung vermehren sich T-Zellen bevor eine signifikanten Zytokinbildung erfolgen kann. Daher gilt neben der Zytokinproduktion auch die Proliferationsrate ein wichtiges Merkmal zur Beurteilung der Funktionalität von T-Zellen. Zu Bestimmung derselben erfolgte eine Markierung der Zellen mit CFSE mit anschließender Stimulation mit CD3/CD28 *beads*. Die Zellen wurden anschließend

für 7 Tage inkubiert und die Dichte der Markierung mit CFSE zur Bestimmung der Anzahl der vollzogenen Zellteilungen gemessen.

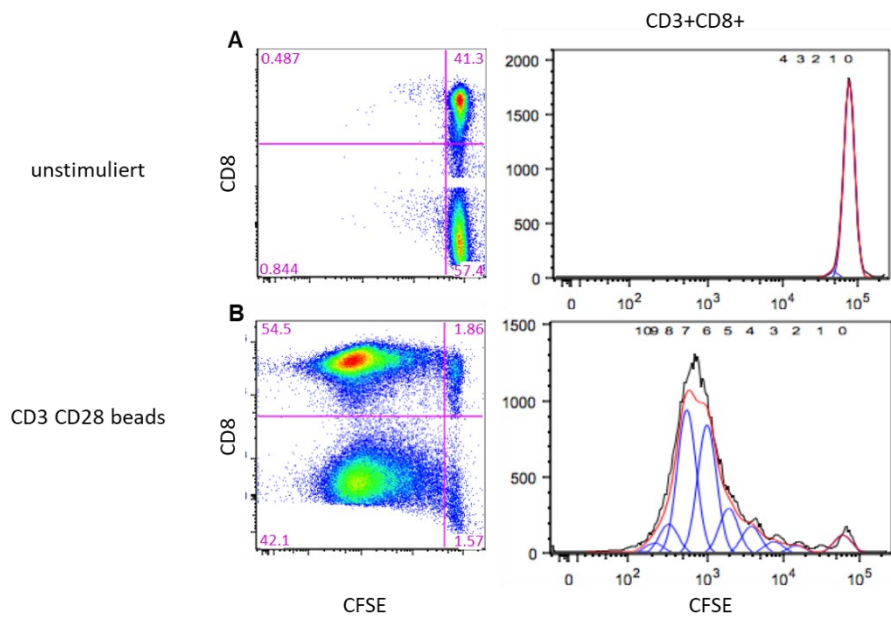


Abb. 3.20 Nach Identifikation der Lymphozyten erfolgte die Selektion der CD3+ T-Zellen mit anschließendem Gating auf CD8+ und CD4+ T-Zellen (hier nicht gezeigt, siehe Abb. 3.1). Nach dieser Selektion erfolgt die Durchflusszytometrische Analyse und Dotplot- sowie graphische Darstellung der Proliferation nach Selektion von CD3+ T-Zellen im CFSE-Proliferations-Essay ohne Stimulation (A) und nach Stimulation mit CD3/CD28 beads (B). Die Zahlen geben die Anzahl der erfolgten Zellteilungen mit abnehmender Dichte von CFSE auf der Zelloberfläche bei mit CD3/CD28 beads stimulierten Zellen im Vergleich zu unstimulierten Zellen an.

Für die Auswertung wurde betrachtet, welcher Anteil der ursprünglich vorhandenen und CFSE-gefärbten Zellen eine Zellteilung durchlaufen ist.

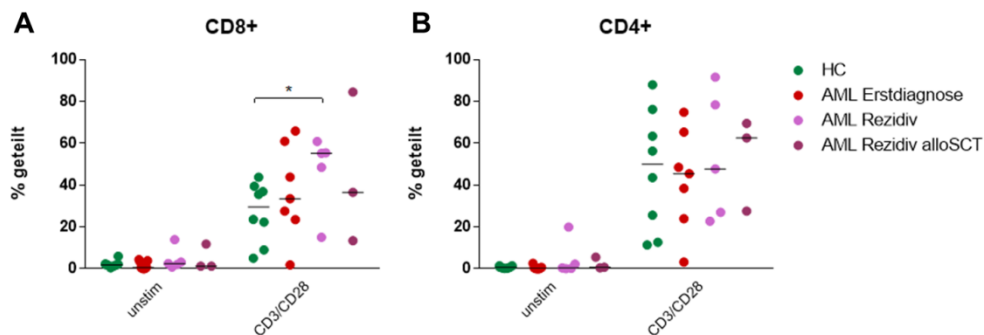


Abb. 3.21 Die Proliferation der T-Zellen ist bei Patienten mit AML in allen Krankheitsstadien nicht beeinträchtigt. <sup>mod. nach 76</sup> Die Punkte repräsentieren den Anteil an geteilten CD8+ (A) und CD4+ (B) T-Zellen nach sieben-tägiger Inkubation mit und ohne Stimulation mit und ohne Stimulation mit CD3/CD28 beads von gesunden Spendern (HC, n = 8, grün), AML-Patienten bei Erstdiagnose (n = 7, rot), Patienten mit Rezidiv (n = 5, lila) und Patienten mit Rezidiv nach allo-SCT (n = 3, braun). Die horizontalen Linien indizieren die Mittelwerte ( $\pm$  SD) der individuellen Proben, die p-Werte die Signifikanz der statistischen Unterschiede bezogen auf gesunde Probanden (\*  $p < 0.05$ )

Bei Patienten im Erkrankungsrezidiv zeigte sich unter Stimulation mit CD3/CD28 beads auf den CD8+ T-Zellen sogar eine erhöhte Proliferationsrate im Vergleich zu gesunden Spendern. In anderen

Erkrankungsstadien konnte keine Beeinträchtigung der Proliferationsrate der T-Zellen von AML-Patienten nachgewiesen werden.<sup>76</sup>

#### 4. Diskussion

Die akute myeloische Leukämie ist eine Erkrankung, welche nach wie vor eine hohe Sterblichkeit sowie eine hohe Rezidivrate aufweist. Vielversprechende neue Therapieansätze entstammen dabei zu weiten Teilen dem Feld der Immuntherapie. Hier sind beispielsweise bispezifische Antikörper<sup>15</sup> oder Impfungen mittels modifizierter leukämischer Zellen oder dendritischer Zellen zu nennen.<sup>16</sup>

Eine Voraussetzung für die Wirkung der Immuntherapie ist ein funktionales Immunsystem. Bei vielen Tumorerkrankungen wurden jedoch bereits Veränderungen der Immunabwehr mit phänotypischen Veränderungen und funktionellen Defekten von T-Zellen nachgewiesen. So konnte beispielsweise bei an chronisch lymphatischer Leukämie (CLL) erkrankten Patienten eine erhöhte Expression der inhibitorischen Rezeptoren CD244, CD160 und PD-1 vor allem auf den CD8<sup>+</sup> T-Zellen unbehandelter Patienten nachgewiesen werden.<sup>38</sup>

Diese Rezeptoren werden auf der Oberfläche von Zellen des Immunsystems exprimiert und wirken hier als Korezeptoren, welche bei Bindung des entsprechenden Liganden eine Immunreaktion inhibieren können. So können überschießende Immunantworten und Autoimmunreaktionen vermieden werden.<sup>46,47</sup> Diese Rezeptoren, oder auch Immun-Checkpoints, werden bei chronischer Antigenstimulation von T-Zellen überexprimiert, was durch deren inhibierende Wirkung auf die T-Zellen zu einer verminderten Proliferation und Zytokinproduktion und somit zum Funktionsverlust führt. Dieser Mechanismus wird T-Zell Erschöpfung genannt. Diese wurde zuerst bei chronischen viralen Infektionen wie beispielsweise HIV nachgewiesen.<sup>1</sup> Seither konnte dieser Mechanismus jedoch auch bei diversen soliden<sup>31,32</sup> und hämatologischen Tumorerkrankungen<sup>31-39</sup> nachgewiesen werden.

Im Einklang hiermit fiel bei den bereits erwähnten an CLL erkrankten Patienten eine verminderte Proliferationsrate auf, bei jedoch erhaltener Produktion von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ .<sup>38</sup> Die klinische Relevanz dieser Veränderungen konnte ebenso gezeigt werden. In einer Patientengruppe in einem frühen Krankheitsstadium konnte eine Gruppe von CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit starker Expression von PD-1 identifiziert werden, deren Auftreten ein unabhängiger Prädiktor für eine schlechtere Prognose war.<sup>37</sup> Unter Chemotherapie konnte außerdem eine zunehmende Expression von inhibitorischen Rezeptoren beobachtet werden, welche durch Lenalidomid reversibel waren.<sup>39</sup>

Im Vergleich dazu sind von Patienten mit AML bisher kaum Daten zur T-Zell Funktion verfügbar.

In einer frühen Studie von 1998 wurde eine erhöhte Expression von Oberflächenmolekülen mit aktivierendem Effekt auf T-Zellen, wie HLA-DR, CD69, CD71 und CD57, zum Zeitpunkt der Erstdiagnose beschrieben.<sup>81</sup> Deutlich später (2009) konnte die Arbeitsgruppe von Le Dieu et al. eine veränderte T-Zell Aktivierung bei AML Patienten mittels Genomexpressionsanalysen nachweisen.<sup>82</sup>

Bezüglich der Aktivierbarkeit der T-Zellen bei Patienten mit AML konnte eine reduzierte Stimulierbarkeit nach CD3+-Stimulation nachgewiesen werden, unter optimaler Kostimulation war eine jedoch eine normale Proliferation möglich.<sup>84</sup> Die Expression von inhibitorischen Rezeptoren wurde dabei jedoch nicht untersucht. Lediglich nach allogener Stammzelltransplantation wurde eine erhöhte Expression von PD-1 auf spezifischen T-Zellen nachgewiesen werden, und es wurde eine Untergruppe von TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>-</sup> T-Zellen beschrieben, aber nicht weiter charakterisiert.<sup>85</sup> Generell wurden die Expression von inhibitorischen Oberflächenmolekülen und die Funktionalität der T-Zellen in verschiedenen Phasen der Erkrankung bisher nicht untersucht.

Neben der Beurteilung der T-Zell Funktionalität ist die Expression der inhibitorischen Rezeptoren jedoch auch in therapeutischer Hinsicht von Interesse. James P. Allison und Tasuku Honjo erhielten 2018 den Nobelpreis für Medizin für die Erkenntnis, dass inhibitorische Rezeptoren wie CTLA-4 und PD-1 auch als therapeutisches Ziel genutzt werden können. Bei einer Blockade der inhibitorischen Rezeptoren durch monoklonale Antikörper gegen dieselben wie beispielsweise Pembrolizumab, sogenannte Checkpoint-Inhibitoren, kann eine Aktivierung des Immunsystems gegen den malignen Tumor erreicht werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Blut von an AML erkrankten Patienten im Rezidiv nach allogener Stammzelltransplantation eine erhöhte Expression von PD-1 zeigen, welches die T-Zellen von Patienten bei Erstdiagnose nicht exprimieren. Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen verhalten sich analog hierzu. Somit scheint eine längere Antigen-Exposition die erhöhte Expression von PD-1 hervorzurufen.<sup>86</sup>

Die Expression von inhibitorischen Rezeptoren kann jedoch auch auf gesunden, nicht-erschöpften T-Zellen von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst werden. Beispielsweise erscheint eine erhöhte Expression dieser Moleküle bei zunehmendem Alter nach multiplen, möglicherweise auch längerfristigen Antigenexpositionen im Laufe eines Lebens plausibel. Nach Aufteilung der Proben nach dem Alter der Spender zeigten sich hier jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Expression der inhibitorischen Rezeptoren.

Ein weiterer möglicher Störfaktor in der Interpretation der Ergebnisse ist die Seropositivität für das Cytomegalovirus (CMV). Bei gesunden Probanden und Patienten, die an chronisch lymphatischer Leukämie (CLL) leiden, konnte bei Seropositivität für CMV eine Vermehrung von spezifischen T-Gedächtniszellen nachgewiesen werden.<sup>87,88</sup> Auf den T-Zellen CMV-seropositiver Patienten konnte eine veränderte Expression inhibitorischer Rezeptoren nachgewiesen werden.<sup>89</sup> Aber auch bei gesunden Probanden unterscheidet sich die Expression der inhibitorischen Rezeptoren CD244 und PD-1 auf unterschiedlichen T-Gedächtniszellen, wie hier gezeigt werden konnte. Somit erscheint eine



Beeinflussung der Expression inhibitorischer Rezeptoren, betrachtet auf eine Patientengruppe, durch CMV-Seropositivität oder -Seronegativität wahrscheinlich. Nach Bestimmung des CMV-Serostatus zeigte sich, dass die Expressionsmuster von inhibitorischen Oberflächenmolekülen unabhängig hiervon war.

Die Expression inhibitorischer Rezeptoren unterschied sich jedoch stark zwischen einzelnen Untergruppen der T-Gedächtniszellen. Diese können anhand der Expression der Oberflächenmoleküle CD45RA und CCR7 differenziert werden in naive T-Zellen, Effektorgedächtniszellen ( $T_{EM}$ ), welche nach Antigenkontakt zu funktionalen Effektorzellen reifen, zentrale Gedächtniszellen ( $T_{CM}$ ), welche ein langfristiges Immungedächtnis aufrechterhalten, und  $T_{EMRA}$ , die zur Homöostase des heterogenen Pools an Gedächtniszellen beitragen. Wie zuvor beschrieben<sup>77</sup> verringert sich mit zunehmendem Alter der Anteil an naiven T-Zellen. Patienten im Krankheitsrezidiv zeigten dagegen einen signifikant höheren Anteil an T Effektor Gedächtniszellen, unabhängig vom Alter der Patienten.

Wir konnten zeigen, dass diese T Effektor Gedächtniszellen sowohl bei AML Patienten als auch bei gesunden Probanden eine höhere Expression der inhibitorischen Rezeptoren CD244 und PD-1 zeigen als naive T-Zellen.

Da eine signifikante Erhöhung der Expression bezogen auf Patientengruppen lediglich bei Patienten im Krankheitsrezidiv nachzuweisen war, welche auch einen signifikant höheren Anteil an T Effektor Gedächtniszellen aufweisen, welche natürlicherweise eine erhöhte Expression von inhibitorischen Rezeptoren zeigen, schließen wir hieraus, dass diese erhöhte Expression eher der vermehrten Differenzierung der T-Zellen als T Effektor Gedächtniszellen entspricht, als einer T-Zell Erschöpfung.

Passend zu unseren Ergebnissen wurde eine Studie veröffentlicht, in der bei gesunden Spendern gezeigt werden konnte, dass eine Expression inhibitorischer Rezeptoren mehr von der Differenzierung und Aktivierung, als der Exhaustion von  $CD8^+$  T-Zellen abhängig ist.<sup>90</sup> In der zuvor erwähnten Studie an CLL-Patienten ging die erhöhte Expression von PD-1 auf T-Zellen von CLL-Patienten ebenso mit einem Shift zu T Effektor Gedächtniszellen einher.<sup>91</sup> In einer sehr detaillierten Studie zum T-Zell Status bei CLL-Patienten wurde außerdem ebenso beschrieben, dass eine Expression inhibitorischer Moleküle mit einer Differenzierung der T-Zell-Population hin zu T Effektor Gedächtniszellen einhergeht. Diese Studie analysiert jedoch keine Patienten nach allogener Stammzelltransplantation.<sup>38</sup> Mutmaßlich ist hier die chronische Antigenstimulation ursächlich für die Verschiebung der Expression der T-Gedächtniszellen.

In den Studien zu CLL-Patienten konnten jedoch funktionelle Defekte der T-Zellen nachgewiesen werden, insbesondere bezüglich Proliferation und Zytotoxizität,<sup>38</sup> während  $CMV^+$ -spezifische T-Zellen keine funktionelle Einschränkung zeigten.<sup>92</sup> In unserer Studie konnte keine funktionelle Einschränkung

bezogen auf Proliferation oder Zytokinproduktion von T-Zellen bei AML Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose oder im Rezidiv nachgewiesen werden. Die Zytokinproduktion wurde dabei nach antigen-unspezifischer T-Zell Stimulation mit PMA und Ionomycin nachgewiesen, welche die Signalkette des T-Zell-Rezeptors umgeht. Spezifische antileukämische T-Zell-Antworten waren leider zu selten um eine sinnvolle, valide Messung derselben durchzuführen. Selbst eine Stimulation mit CD3/CD28 erzielte lediglich minimale Antworten der T-Zellen in diesem Setting. Wir konnten jedoch nach der beschriebenen Stimulation mit PMA und Ionomycin eine verminderte Zytokinproduktion in HIV-Patienten nachweisen. Wir schließen hieraus, dass ein funktioneller Defekt unterhalb des TCR-Signals nachweisbar ist. Diese Daten passen zu einer kürzlichen Veröffentlichung, in welcher gezeigt werden konnte, dass die Expression von PD-1 und CD244 auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen differenzierte Zellen markiert, die intrinsisch mehr Zytokine produzieren.<sup>90</sup>

Das einzige Defizit in der Zytokinproduktion, welches hier nachgewiesen werden konnte, war eine signifikant verminderte Produktion von IFN- $\gamma$  auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei AML-Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose. Dies konnte bei Patienten im Rezidiv jedoch nicht nachgewiesen werden. Dies könnte eine wichtige Beobachtung darstellen und eine Rolle in zukünftigen immuntherapeutischen Ansätzen spielen, beispielsweise in einer Umkehrung dieses Defektes durch eine Th1-polarisierende Therapie.

In Messungen anderer Arbeitsgruppen fanden die Kollegen entweder identische<sup>93</sup> oder reduzierte Level von IFN- $\gamma$  bei unbehandelten AML-Patienten im Vergleich mit gesunden Spendern. Unsere Daten beziehen sich auf die Gesamtmenge der T-Zellen; antigenspezifische T-Zellen sind in der AML sehr selten und könnten von diesem Muster abweichen.

Fazit:

Anhand der hier vorgestellten Daten schließen wir, dass AML-Patienten im Rezidiv einen Shift der T-Zell Population vom naiven Zustand hin zu differenzierten Effektor Zellen zeigen, welcher von einer Hochregulation der Expression inhibitorischer Moleküle begleitet ist, jedoch ohne Defekt ihrer Funktionalität einhergeht. Im Gegensatz hierzu unterscheiden sich die T-Zellen von AML-Patienten bei Erstdiagnose nicht signifikant von denen der gesunden Spender der gleichen Altersgruppe. Dies legt nahe, dass ein länger bestehender Kontakt mit AML-Zellen eine chronische Stimulation induziert, welche eine Umdifferenzierung der T-Zellen hervorruft. Da bei AML-Patienten bereits zuvor Defekte der NK-Zellen gezeigt werden konnten,<sup>94</sup> scheinen unsere Daten zu zeigen, dass immuntherapeutische Strategien die auf funktionellen autologen T-Zellen basieren, wie beispielsweise bispezifische Antikörper oder eine therapeutische Impfung, eine gute Aussicht auf Erfolg bei der AML haben könnten.

## 5. Literaturverzeichnis

1. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol.* 2011;131(6):492–9
2. Schietinger A, Greenberg PD. Tolerance and exhaustion: defining mechanisms of T cell dysfunction. *Trends Immunol.* 2014;35:51–60
3. Zhou Q, Munger ME, Veenstra RG, Weigel BJ, Hirashima M, Munn DH, Murphy WJ, Azuma M, Anderson AC, Kuchroo VK. Coexpression of Tim-3 and PD-1 identifies a CD8+ T-cell exhaustion phenotype in mice with disseminated acute myelogenous leukemia. *Blood.* 2011; 117: 4501–4510.
4. Zhang L, Gajewski TF, Kline J. PD-1/PD-L1 interactions inhibit antitumor immune responses in a murine acute myeloid leukemia model. *Blood.* 2009; 114(8): 1545–1552.
5. Takahashi S. Current findings for recurring mutations in acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol.* 2011; 4: 36.
6. Kihara R, Nagata Y, Kiyoi H, Kato T, Yamamoto E, Suzuki K et al. Comprehensive analysis of genetic alterations and their prognostic impacts in adult acute myeloid leukemia patients. *Leukemia.* 2014; 28: 1586–1595.
7. Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2013; 368: 2059–2074.
8. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood.* 2010; 115(3): 453-74.
9. Löwenberg B, Griffin JD, Tallman MS. Acute myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2003; 82-101
10. Buchner T, Urbanitz D, Hiddemann W et al. Intensified induction and consolidation with or without maintenance chemotherapy for acute myeloid leukemia (AML): two multicenter studies of the German AML Cooperative Group. *J Clin Oncol.* 1985; 1583-1589
11. Hanekamp D et al. Leukemic stem cells: Identification and clinical application. *Int. J of Hematology.* 2017; 105: 549-557.
12. Harousseau J-L, Cahn J-Y, Pignon B, et al. Comparison of autologous bone marrow transplantation and intensive chemotherapy as post-remission therapy in adult acute myeloid leukemia. *Blood.* 1997; 90(8): 2978-2986.
13. Schuler E et al. Relapse patterns and treatment strategies in patients receiving allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for myeloid malignancies. *Ann Hematol.* 2019; 98(5): 1225-1235.
14. Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, et al. Midostaurin plus chemotherapy for acute myeloid leukemia with a FLT3 mutation. *N Engl J Med.* 2017; 377: 454-464.
15. Hills RK, Castaigne S, Appelbaum FR, et al. Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials. *Lancet Oncol.* 2014; 15: 986-996.
16. Lichtenegger FS et al. Current strategies in immunotherapy for acute myeloid leukemia. *Immunotherapy.* 2013.
17. Baitsch L, Baumgaertner P, Devevre E, et al. Exhaustion of tumor-specific CD8+ T cells in metastases from melanoma patients. *J. Clin. Investig.* 2011; 121: 2350–60.
18. Najafi, M, Farhood, B, Mortezaee, K. Contribution of regulatory T cells to cancer: A review. *J Cell Physiol.* 2019; 234: 7983– 7993.
19. Matthew E Call, Jason Pyrdol, Martin Wiedmann, Kai W Wucherpennig. The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. *Cell.* 2002; 111(7): 967-79.
20. Exley M, Terhorst C, Wileman T. Structure. Assembly and intracellular transport of the T cell receptor for antigen. *Semin. Immunol.* 1991; 3: 283–297.
21. Morten M. Nielsen, Deborah A. Witherden, Wendy L. Havran.  $\gamma\delta$  T cells in homeostasis and host defence of epithelial barrier tissues. *Nat Rev Immunol.* 2017; 17(12): 733–745.
22. Bruno Laugel, et al. Different T cell receptor affinity thresholds and CD8 coreceptor dependence govern cytotoxic T lymphocyte activation and tetramer binding properties. *J Biol Chem.* 2007; 282(33): 23799-810.

23. Badovinac VP, Harty JT. Programming, demarcating, and manipulating CD8+ T-cell memory. *Immunol Rev.* 2006; 211: 67–8.
24. Jinfang Zhu, William E Paul. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood.* 2008; 112(5): 1557-69.
25. Beverley PC. Functional analysis of human T cell subsets defined by CD45 isoform expression. *Semin. Immunol.* 1992; 4: 35–41.
26. F Sallusto, D Lenig, R Förster, M Lipp, A Lanzavecchia. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature.* 1999; 401(6754): 708-12.
27. Geginat J, Lanzavecchia A, Sallusto F. Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood.* 2003; 101(11): 4260-6.
28. Dominguez-Villar M., Hafler D.A. Regulatory T cells in autoimmune disease. *Nat Immunol.* 2018; 19: 665-673.
29. H R MacDonald. NK1.1+ T cell receptor-alpha/beta+ cells: new clues to their origin, specificity, and function. *J Exp Med.* 1995; 182(3): 633-8.
30. Y Tanaka, C T Morita, Y Tanaka, E Nieves, M B Brenner, B R Bloom. Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells. *Nature.* 1995; 375(6527): 155-8.
31. M. Ahmadzadeh, L.A. Johnson, B. Heemskerk, J.R. Wunderlich, M.E. Dudley, D.E. White, S.A. Rosenberg. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood.* 2009; 114: 1537-1544.
32. D.S. Thommen, J. Schreiner, P. Muller, P. Herzig, A. Roller, A. Belousov, P. Umana, P. Pisa, C. Klein, M. Bacac, et al. Progression of lung cancer is associated with increased dysfunction of T cells defined by coexpression of multiple inhibitory receptors. *Cancer Immunol. Res.* 2015; 3: 1344-1355.
33. Shimauchi T, Kabashima K, Nakashima D, Sugita K, Yamada Y, Hino R, et al. Augmented expression of programmed death-1 in both neoplastic and non-neoplastic CD4+ T-cells in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Int J Cancer.* 2007; 121(12): 2585–90.
34. Kozako T, Yoshimitsu M, Fujiwara H, Masamoto I, Horai S, White Y, et al. PD-1/PD-L1 expression in human T-cell leukemia virus type 1 carriers and adult T-cell leukemia/lymphoma patients. *Leukemia.* 2009; 23(2): 375–82.
35. Mumprecht S, Schürch C, Schwaller J, Solenthaler M, Ochsenein AF. Programmed death 1 signaling on chronic myeloid leukemia-specific T cells results in T-cell exhaustion and disease progression. *Blood.* 2009; 114(8): 1528–36.
36. Christiansson L, Söderlund S, Svensson E, Mustjoki S, Bengtsson M, Simonsson B, et al. Increased level of myeloid-derived suppressor cells, programmed death receptor ligand 1/programmed death receptor 1, and soluble CD25 in Sokal high risk chronic myeloid leukemia. *PLoS One.* 2013; 8(1).
37. Nunes C, Wong R, Mason M, Fegan C, Man S, Pepper C. Expansion of a CD8(+)/PD-1(+) replicative senescence phenotype in early stage CLL patients is associated with inverted CD4:CD8 ratios and disease progression. *Clin Cancer Res.* 2012; 18(3): 678–87.
38. Riches JC, Davies JK, McClanahan F, Fatah R, Iqbal S, Agrawal S, et al. T cells from CLL patients exhibit features of T-cell exhaustion but retain capacity for cytokine production. *Blood.* 2013; 121(9): 1612–21.
39. Gassner FJ, Zaborsky N, Neureiter D, Huemer M, Melchardt T, Egle A, et al. Chemotherapy-induced augmentation of T cells expressing inhibitory receptors is reversed by treatment with lenalidomide in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica.* 2014; 99(5): 67–9.
40. Williams, M.A. & Bevan, M.J. Effector and memory CTL differentiation. *Annu. Rev. Immunol.* 2007; 25: 171–192.
41. Virgin, H.W., Wherry, E.J. & Ahmed, R. Redefining chronic viral infection. *Cell.* 2009; 138: 30–50.
42. Wherry, E.J. & Ahmed, R. Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. *J. Virol.* 2004; 78: 5535–5545.
43. Blackburn SD, Shin H, Haining WN, Zou T, Workman CJ, Polley A, et al. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol.* 2009; 10(1): 29–37.
44. Brooks, D.G. et al. Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. *Nat. Med.* 2006; 12: 1301–1309.
45. P. Sharma, J. P. Allison. Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential. *Cell.* 2015; 161(2): 205–214.

46. Schildberg F.A., Klein S.R., Freeman G.J., Sharpe A.H. Coinhibitory Pathways in the B7-CD28 Ligand-Receptor Family. *Immunity*. 2016; 44: 955-972.
47. Ward-Kavanagh L.K., Lin W.W., Šedý J.R., Ware C.F., The TNF receptor superfamily in co-stimulating and co-inhibitory responses., *Immunity*. 2016; 44:1005-1019
48. Callahan M.K., Postow M.A., Wolchok J.D. Targeting T cell co-receptors for cancer therapy. *Immunity*. 2016; 44: 1069-1078.
49. Chlewicki LK, Velikovskiy CA, Balakrishnan V, Mariuzza RA, Kumar V. Molecular basis of the dual functions of 2B4 (CD244). *J Immunol*. 2008; 180(12): 8159–67.
50. Agresta L, Hoebe KHN, Janssen EM. The Emerging Role of CD244 Signaling in Immune Cells of the Tumor Microenvironment. *Front Immunol*. 2018; 9: 2809.
51. Anumanthan, A., Bensussan, A., Boumsell, L., Christ, A. D., Blumberg, R S., Voss, S. D., Patel, A. T., Robertson, M.J., Nadler, L. M., Freeman, G. J. Cloning of BY55, a novel Ig superfamily member expressed on NK cells, CTL, and intestinal intraepithelial lymphocytes. *J. Immunol*. 1998; 161: 2780– 2790.
52. Giustiniani, J., Bensussan, A., Marie-Cardine, A. Identification and characterization of a transmembrane isoform of CD160 (CD160-TM), a unique activating receptor selectively expressed upon human NK cell activation. *J. Immunol*. 2009; 182: 63–71.
53. Agrawal, S., Marquet, J., Freeman, G. J., Tawab, A., Bouteiller, P. L., Roth, P., Bolton, W., Ogg, G., Boumsell, L., Bensussan, A. Cutting edge: MHC class I triggering by a novel cell surface ligand costimulates proliferation of activated human T cells. *J. Immunol*. 1999; 162: 1223– 1226.
54. Giustiniani J, Marie-Cardine A, Bensussan A. A soluble form of the MHC class I-specific CD160 receptor is released from human activated NK lymphocytes and inhibits cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol*. 2007; 178(3): 1293-300.
55. El-Far M, Pellerin C et al. CD160 isoforms and regulation of CD4 and CD8 T-cell responses. *J Transl Med*. 2014; 12: 217.
56. Cai G, Anumanthan A, Brown JA, Greenfield EA, Zhu B, Freeman GJ. CD160 inhibits activation of human CD4+ T cells through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nat Immunol*. 2008; 9(2): 176–85.
57. Mary E Keir, Manish J Butte, Gordon J Freeman, Arlene H Sharpe. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2008; 26: 677-704.
58. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med*. 2000; 192: 1027.
59. H. Nishimura, M. Nose, H. Hiai, N. Minato, and T. Honjo, Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*. 1999; 11(2): 141–151.
60. H. Nishimura, T. Okazaki, Y. Tanaka et al. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science*. 2001; 291(5502): 319–322.
61. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat. Immunol*. 2001; 2:261.
62. Freeman, G.J., Wherry, E.J., Ahmed, R. & Sharpe, A.H. Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1-PD-1 ligand blockade. *J. exp. med*. 2006; 203: 2223– 2227.
63. Zhu C, Anderson AC, Schubart A, Xiong H, Imitola J, Khoury SJ, et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol*. 2005; 6(12): 1245–52.
64. Jones RB, Ndhlovu LC, Barbour JD, Sheth PM, Jha AR, Long BR, et al. Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1infection. *J ExpMed*. 2008; 205(12): 2763–79.
65. Fourcade J, Sun Z, Benallaoua M, Guillaume P, Luescher IF, Sander C, et al. Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8+ T cell dysfunction in melanoma patients. *J Exp Med*. 2010; 207(10): 2175–86.
66. Sfanos KS, et al. Human prostate-infiltrating CD8+ T lymphocytes are oligoclonal and PD-1+ Prostate. 2009; 69: 1694–1703.
67. Ahmadzadeh M, et al. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood*. 2009; 114: 1537–1544.
68. Iwai Y, et al. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2002; 99: 12293–12297.

69. Rosenwald A, et al. Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J. Exp. Med.* 2003; 198: 851–862.
70. Day CL, Kaufmann DE et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature.* 2006; 443(7109): 350-4.
71. Yamamoto et al. Surface expression patterns of negative regulatory molecules identify determinants of virus-specific CD8+ T-cell exhaustion in HIV infection. *Blood.* 2011;117(18): 4805-15.
72. Masur H, et al. CD4 counts as predictors of opportunistic pneumonias in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Ann Intern Med.* 1989; 111: 223–231.
73. Blackburn, S.D. et al. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat. Immunol.* 2009; 10: 29–37.
74. Crawford, A. & Wherry, E.J. The diversity of costimulatory and inhibitory receptor pathways and the regulation of antiviral T cell responses. *Curr. Opin. Immunol.* 2009; 21: 179–186.
75. Kaufmann DE, Walker BD. Programmed death-1 as a factor in immune exhaustion and activation in HIV infection. *Curr Opin HIV AIDS.* 2008; 3(3): 362–7.
76. Schnorfeil FM, Lichtenegger FS, Emmerig K, Schlueter M, Neitz JS, Draenert R, Hiddemann W, Subklewe, T cells are functionally not impaired in AML: increased PD-1 expression is only seen at time of relapse and correlates with a shift towards the memory T cell compartment. *M. J Hematol Oncol.* 2015 Jul 30; 8:93.
77. Koch S, Larbi A, Derhovanessian E, Ozcelik D, Naumova E, Pawelec G. Multiparameter flow cytometric analysis of CD4 and CD8 T cell subsets in young and old people. *Immun Ageing.* 2008; 5: 6.
78. Jannie Borst, Jenny Hendriks, Yanling Xiao. CD27 and CD70 in T cell and B cell activation. *Curr Opin Immunol.* 2005; 17(3): 275-81.
79. Schiott A, Lindstedt M, Johansson-Lindbom B, Roggen E, Borrebaeck CA. CD27- CD4+ memory T cells define a differentiated memory population at both the functional and transcriptional levels. *Immunology.* 2004; 113: 363–70.
80. Romero P, Zippelius A, Kurth I, Pittet MJ, Touvrey C, Iancu EM, et al. Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8+ T lymphocytes. *J Immunol.* 2007; 178(7): 4112–9.
81. Van den Hove LE, Vandenberghe P, Van Gool SW, Ceuppens JL, Demuyneck H, Verhoef GE, et al. Peripheral blood lymphocyte subset shifts in patients with untreated hematological tumors: evidence for systemic activation of the T cell compartment. *Leuk Res.* 1998; 22(2): 175–84.
82. Le Dieu R, Taussig DC, Ramsay AG, Mitter R, Miraki-Moud F, Fatah R, et al. Peripheral blood T cells in acute myeloid leukemia (AML) patients at diagnosis have abnormal phenotype and genotype and form defective immune synapses with AML blasts. *Blood.* 2009; 114(18): 3909–16.
83. Lichtenegger FS, Lorenz R, Gellhaus K, Hiddemann W, Beck B, Subklewe M. Impaired NK cells and increased T regulatory cell numbers during cytotoxic maintenance therapy in AML. *Leuk Res.* 2014; 38(8): 964–9.
84. Wendelbo Ø, Nesthus I, Sjo M, Paulsen K, Ernst P, Bruslerud Ø. Functional characterization of T lymphocytes derived from patients with acute myelogenous leukemia and chemotherapy-induced leukopenia. *Cancer Immunol Immunother.* 2004; 53(8): 740–7.
85. Flörcken A, van Lessen A, Terwey TH, Dörken B, Arnold R, Pezzutto A, et al. Anti-leukemia T cells in AML: TNF- $\alpha$ + CD8+ T cells may escape detection and possibly reflect a stage of functional impairment. *Hum Vaccin Immunother.* 2013; 9(6): 1200–4.
86. Han S, Asoyan A, Rabenstein H, Nakano N, Obst R. Role of antigen persistence and dose for CD4+ T-cell exhaustion and recovery. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010; 107(47): 20453–8.
87. Khan N, Hislop A, Gudgeon N, Cobbold M, Khanna R, Nayak L, et al. Herpesvirus-specific CD8 T cell immunity in old age: cytomegalovirus impairs the response to a coresident EBV infection. *J Immunol.* 2004; 173(12): 7481–7489.
88. Sylwester AW, Mitchell BL, Edgar JB, Taormina C, Pelte C, Ruchti F, et al. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med.* 2005; 202(5): 673–685.
89. The hallmarks of CMV-specific CD8 T-cell differentiation. Van den Berg SPH, Pardieck IN, Lanfermeijer J, Sauce D, Klenerman P, van Baarle D, Arens R. *Med Microbiol Immunol.* 2019; 208(3-4): 365-373.

90. Legat A, Speiser DE, Pircher H, Zehn D, Fuertes Marraco SA. Inhibitory receptor expression depends more dominantly on differentiation and activation than “exhaustion” of human CD8 T cells. *Front Immunol.* 2013; 4: 455.
91. Brusa D, Serra S, Coscia M, Rossi D, D’Arena G, Laurenti L, et al. The PD-1/PD-L1 axis contributes to T-cell dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica.* 2013; 98(6): 953–63.
92. Te Raa GD, Pascutti MF, García-Vallejo JJ, Reinen E, Remmerswaal EB, Ten Berge IJ, et al. CMV-specific CD8+ T cell function is not impaired in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2013; 123(5): 717–24.
93. Fredly H, Reikvam H, Gjertsen BT, Bruserud O. Disease-stabilizing treatment with all-trans retinoic acid and valproic acid in acute myeloid leukemia: serum hsp70 and hsp90 levels and serum cytokine profiles are determined by the disease, patient age, and anti-leukemic treatment. *Am J Hematol.* 2012; 87(4): 368–76.
94. Lion E, Willemen Y, Berneman ZN, Van Tendeloo VF, Smits EL. Natural killer cell immune escape in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2012; 26(9): 2019–26.

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich den nachstehenden Personen meinen besonderen Dank entgegenbringen, ohne deren Unterstützung die Anfertigung dieser Promotionsschrift niemals zustande gekommen wäre.

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter, Prof. Dr. med. Marion Subklewe, für die Betreuung der Arbeit in diesem spannenden Projekt, ohne deren freundliche Hilfe und mannigfache Ideengebung der Verlauf dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre, und ohne deren fortgesetzte Unterstützung sie nie abgeschlossen worden wäre.

Ich danke außerdem Dr. med. Felix Lichtenegger und Dr. Frauke Schnorfeil für die hilfsbereite praktische und wissenschaftlichen Betreuung.

Ferner danke ich Dr. Rika Draenert, für die freundliche Bereitstellung der Proben von HIV-positiven Patienten.

Desweiteren möchte ich mich bei Frau Renate Voit, Frau Anne Trefzer und Frau Anetta Marcinek für die mehrfache Durchsicht, kritische Betrachtung und differenzierten Anmerkungen bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt außerdem meinen Eltern, die mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglichten, sowie meinem Ehemann, ohne deren unermüdliche Motivation diese Arbeit nicht fertiggestellt worden wäre, und denen ich diese Arbeit widme.



## Affidavit



### Eidesstattliche Versicherung

—  
Bian, Katharina \_\_\_\_\_

Name, Vorname

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

T-Zellen von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie zeigen keinen Anhalt für Erschöpfung

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.

Hannover, den 03.08.2024

Katharina Bian

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

## Publikationsliste

08/2015 Schnorfeil FM, Lichtenegger FS, Emmerig K, Schlueter M, Neitz JS, Draenert R, Hiddemann W, Subklewe T cells are functionally not impaired in AML: increased PD-1 expression is only seen at time of relapse and correlates with a shift towards the memory T cell compartment. *M. J Hematol Oncol.* 2015 Jul 30;8:93. doi: 10.1186/s13045-015-0189-2. PMID: 26219463

03/2013 K. Emmerig et al., Pseudo-Exhaustion of CD8+ T cells in AML, Cellular Therapy Poster Präsentation, Erlangen, Deutschland