

**Medizinische Universitätsklinik und
Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin II
(Schwerpunkt: Onkologie, Hämatologie, klinische Immunologie,
Rheumatologie und Pulmologie)**

**Die Blockade der RANK-RANKL Interaktion durch
Denosumab bei der Immunüberwachung
der Akuten Myeloischen Leukämie
durch Natürliche Killerzellen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Malinovska, Alexandra

2017

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. R. Salih
2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Stevanovic

Tag der Disputation: 22.12.2016

Meiner Schwester Lili

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Immunsystem und dessen Bestandteile	1
1.2	Das angeborene Immunsystem	2
1.2.1	Mechanische Barrieren	2
1.2.2	Induzierbare Mechanismen	2
1.2.2.1	Phagozytäres System	3
1.2.2.2	Antigen-präsentierende Zellen	4
1.3	Das adaptive Immunsystem	4
1.3.1	B-Zellen	5
1.3.2	T-Zellen	6
1.3.3	Immunologisches Gedächtnis	6
1.4	Natürliche Killer Zellen	7
1.5	Die Rolle von NK Zellen bei der Tumor- Immunüberwachung	9
1.6	Akute myeloische Leukämie	10
1.7	Tumornekrosefaktor (TNF) und TNF-Rezeptor Superfamilie (TNF/TNFR SFPs)	13
1.7.1	<i>Receptor activator of NF-κB</i> (RANK)	13
1.7.1.1	RANK im Knochenmetabolismus	14
1.7.1.2	RANK im hämatopoetischen System	15
1.8	Zielsetzung	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Material	17
2.1.1	Geräte	17
2.1.2	Verbrauchsmaterial	18
2.1.3	Chemikalien, Medien und Puffer	19
2.1.4	Antikörper und Zytokine	20
2.1.5	Zelllinien	21
2.2	Methoden	21
2.2.1	Zellkultur	21
2.2.2	Isolierung von <i>peripheral blood mononuclear cells</i> (PBMCs)	23
2.2.3	Gewinnung von Patienten Primärmaterial	23
2.2.4	<i>Magnetic cell separation</i> (MACS)	23
2.2.4.1	NK-Zellen	24
2.2.4.2	Monozyten	24
2.2.5	Durchflusszytometrie	24
2.2.6	Konjugierung von Antikörpern mit Biotin	25
2.2.7	CD107a-Assay	26
2.2.8	BATDA-Europium-Cytotoxizitätsassay	26
2.2.9	Kokultur zur Gewinnung von Überständen	27

2.2.10	Generieren von Überständen nach RANK- <i>receptor activator of NF-κB ligand</i> (RANKL) Interaktion auf akute myeloische Leukämie (AML) Primärmaterial	27
2.2.11	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA)	28
2.2.11.1	Interferon- γ -ELISA	28
2.2.11.2	IL-10-ELISA	29
2.2.11.3	IL-8-ELISA	29
2.2.11.4	IL-6-ELISA	29
2.2.11.5	TNF-ELISA	29
3	Ergebnisse	30
3.1	Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) zeigen RANK Expression auf ihrer Oberfläche	30
3.2	AML Blasten exprimieren RANKL	32
3.3	RANKL-Transfizierte Mauszelllinien als Modell für AML-Blasten	34
3.4	Denosumab kann die RANK/RANKL Interaktion blockieren	34
3.4.1	Detektion von RANKL Oberflächen Expression durch Denosumab	36
3.4.2	Denosumab blockiert RANK-Fc Bindung	38
3.4.2.1	Zelllinien	38
3.4.2.2	AML-Primärmaterial	40
3.5	Denosumab kann die NK-Zell-Zytotoxizität steigern	40
3.5.1	RANK-RANKL Interaktion inhibiert NK-Zellen	40
3.5.1.1	BADTA-Europium Cytotoxicity-Assay	40
3.5.1.2	Interferon- γ -Produktion	41
3.5.2	Blockade des RANK-RANKL Systems durch Denosumab führt zu Steigerung der NK-Zell Aktivität	42
3.5.2.1	BADTA-Europium Cytotoxicity-Assay	42
3.5.2.1.1	Zelllinien	42
3.5.2.1.2	AML-Primärmaterial	44
3.5.2.2	Interferon- γ -Produktion	44
3.5.2.2.1	Zelllinien	45
3.5.2.2.2	AML-Primärmaterial	45
3.6	RANKL ⁺ AML-Blasten verringern NK-Zell-Aktivität durch Ausschüttung von Zytokinen	47
3.6.1	RANK-RANKL Interaktion moduliert Sekretion immunmodulatorischer Zytokine durch RANKL ⁺ AML-Blasten	47
3.6.2	Sezernierte Zytokine verringern die NK-Zell-Zytotoxizität	47
3.6.3	Sezernierte Zytokine verringern die NK-Zell-Degranulierung	49
4	Diskussion	52
4.1	RANK Expression auf NK-Zellen	52
4.2	RANKL auf AML Blasten	53

4.3	Denosumab kann die NK-Zell Aktivität wiederherstellen	55
4.3.1	Modellzelllinien	55
4.3.2	AML Primärmaterial	56
4.4	Bidirektionale Signale von RANKL	58
5	Zusammenfassung	60
6	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	77
7	Danksagung	78

Abbildungsverzeichnis

3.1	NK-Zellen zeigen RANK Expression auf ihrer Oberfläche	31
3.2	AML Blasten exprimieren RANKL	33
3.3	Transfizierte Mauszelllinien sind ein valides Modell für AML-Blasten	35
3.4	Denosumab bindet an RANKL	37
3.5	Denosumab blockiert die RANK-Fc-Ig Bindung	39
3.6	RANK-RANKL Interaktion inhibiert NK-Zellen	41
3.7	Blockade des RANK-RANKL Systems durch Denosumab führt zu Steigerung der NK-Zell Lyse	43
3.8	Blockade des RANK-RANKL Systems durch Denosumab führt zu Steigerung der NK-Zell Interferon- γ Produktion	46
3.9	RANKL ⁺ AML-Blasten schütten Zytokine aus	48
3.10	RANKL ⁺ AML-Blasten verringern NK-Zell-Aktivität durch Ausschüt- tung von Zytokinen	50
3.11	RANKL ⁺ AML-Blasten verringern NK-Zell-Aktivität durch Ausschüt- tung von Zytokinen	51

Tabellenverzeichnis

2.1	Verwendete Geräte	17
2.3	Verwendete Verbrauchsmaterialien	18
2.5	Verwendete Chemikalien, Medien und Puffer	19
2.7	Verwendete Antikörper und Zytokine	20
2.9	Verwendete Zelllinien	21
2.11	Verwendete Medien in der Zellkultur	22
2.13	Verwendete Zellmengen in der Zellkultur	22
2.15	Antikörper, Isotypkontrollen und sekundäre Antikörper bei <i>fluorescence activated cell sorting</i> (FACS)	25

Abkürzungsverzeichnis

ADCC	<i>antibody dependent cellular cytotoxicity</i>
AML	akute myeloische Leukämie
APCs	<i>antigen-presenting cells</i>
B-Zellen	B-Lymphozyten
BCR	<i>B-cell antigen receptor</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
DC	<i>dendritic cells</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FAB	<i>french-american-british</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
fsc	<i>forward scatter</i>
GITRL	<i>glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein ligand</i>
GVHD	<i>Graft-versus-Host-Disease</i>
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
Igs	Immunglobuline
IL	Interleukin
KIRs	<i>killer cell immunoglobulin-like receptors</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LTs	Lymphotoxine
MACS	<i>magnetic cell separation</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MPO	Myeloperoxidase
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NKD2A	<i>natural killer group 2 member A</i>
OPG	Osteoprotegerin
P/S	Penicillin/Streptomycin
p38 MAPK	<i>p38 mitogen-activated protein kinase</i>
PAMPs	<i>pathogen associated molecular patterns</i>
PBMCs	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
PRPs	<i>pattern recognition receptors</i>
RANK	<i>receptor activator of NF-κB</i>
RANKL	<i>receptor activator of NF-κB ligand</i>

RT-PCR	Reverse Transkriptase Kettenreaktion (reverse <i>polymerase-chain reaction</i>)	Polymerase- <i>transkription</i>
SFI	Spezifischer Fluoreszenz Index	
ssc	<i>side scatter</i>	
T-Zellen	T-Lymphozyten	
TCR	<i>T-cell antigen receptor</i>	
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>	
TNF/TNFR SFP	<i>TNF/TNF receptor superfamily proteins</i>	
UPN	<i>unique personal number</i>	

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem und dessen Bestandteile

Das Immunsystem umfasst alle Komponenten der menschlichen Abwehr, welche körperfremde Eindringlinge sowie entartete körpereigene Zellen erkennen und zerstören. Die Vielzahl von Abwehrmechanismen kann in zwei Systeme unterteilt werden: In das angeborene Immunsystem und das adaptive Immunsystem. Viele Infektionen können erfolgreich vom angeborenen System bekämpft werden. Übersteigt jedoch die Infektion dieses Maß, aktiviert das angeborene System das adaptive System, welches nach erfolgreichem Überstehen der Infektion, die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnis induziert.

Beide Systeme bestehen jeweils aus einer zellulären und nicht-zellulären Komponente. Erstere umfasst die weißen Blutzellen, auch Leukozyten genannt, welche essentiell für die Immunantwort sind. Sie stammen wie auch die roten Blutkörperchen (Erythrozyten) und Blutplättchen (Thrombozyten) von einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle des Knochenmarks ab. Diese hämatopoetische Stammzelle kann sich in zwei Vorläufertypen für die Leukozyten differenzieren, welche die beiden Arten von Leukozyten bestimmt. Man unterscheidet dabei zwischen der myeloischen und der lymphatischen Reihe. Aus Ersterer stammen Granulozyten, Makrophagen, Mastzellen und Dendritische Zellen (*dendritic cells* (DC)); aus Letzterer entstehen B-Lymphozyten (B-Zellen), T-Lymphozyten (T-Zellen) und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Die NK-Zellen bilden zusammen mit den Zellen der myeloischen Reihe den zellulären Anteil des angeborenen Immunsystems, die B-Zellen und T-Zellen bilden das zelluläre Element des adaptiven Immunsystems. Die Leukozyten werden bei der Immunantwort durch die nicht-zellulären, sogenannte humorale Bestandteile unterstützt. Für das angeborene Immunsystem sind dies Zytokine, Lysozym und das Komplementsystem. Für das adaptive Immunsystem sind dies Zytokine und Antikörper [1].

1.2 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem bildet die erste Verteidigungslinie der menschlichen Abwehr. Es ist in allen Wirbeltieren von Geburt an vorhanden und reagiert innerhalb von Minuten. Dabei kann man zwischen zwei Abwehrmechanismen unterscheiden; zum einen die mechanische Barrieren, die dauerhaft bestehen, und zum anderen die Zellabwehr, die induzierbar ist.

1.2.1 Mechanische Barrieren

Den Hauptbestandteil der dauerhaften Mechanismen bilden die Epithelien aller Grenzflächen des menschlichen Körpers. Diese dienen als erste mechanische Barriere für Fremdkörper zur Außenwelt. Beispiele hierfür ist das Lungenepithel, die gastrointestinale Mukosa und die Haut. Bestimmte Gewebezellen sezernieren zudem beständig antimikrobielle Enzyme in Körpersekrete, wie zum Beispiel das Enzym Lysozym, welches im Tränensekret oder im Speichel zu finden ist. Aufgrund ihrer bestimmten Beschaffenheit und ihrer abgegrenzten Lokalisation richtet sich hierbei die Abwehr nur gegen körperfremde nicht aber gegen körpereigene Zellen [1].

1.2.2 Induzierbare Mechanismen

Kann ein Pathogen die epitheliale Barriere durchbrechen, muss dieses zuerst als fremd erkannt werden, damit es anschließend eliminiert werden kann. In den meisten Fällen wird dieser Eindringling sofort von induzierbaren Mechanismen des angeboren Immunsystems erkannt: Im Gegensatz zu den mechanischen Barrieren, die dauerhaft bestehen, brauchen die induzierbaren Mechanismen eine gewisse Zielstruktur zur Aktivierung. Das Hauptziel der angeborenen Immunantwort sind sogenannte *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs). Diese haben alle eine Gemeinsamkeit: PAMPs werden nur von mikrobiologischen pathogenen Organismen gebildet, nicht von körpereigenen Zellen. Dies sind zum Beispiel Peptidoglycan und Lipopolysaccharide (LPS), die nur von Bakterien produziert werden und nicht von Eukaryoten. PAMPs werden durch *pattern recognition receptors* (PRPs) auf der Oberfläche der myeloischen Zellen als fremd er-

kannt. Ein Beispiel hierfür ist der (*cluster of differentiation* (CD)) CD14-Rezeptor, welcher auf körpereigenen Monozyten und Makrophagen exprimiert wird und spezifisch LPS auf der Bakterienoberfläche erkennt.

Werden die Eindringlinge anhand ihrer PAMPs erkannt, können sie von den Zellen des phagozytären System eliminiert werden. Zu diesem System werden funktionell die Monozyten, die Makrophagen, die neutrophilen Granulozyten und die Dendritischen Zellen zusammengefasst [1]. Die Rolle der NK-Zelle wird im späteren Verlauf noch ausführlicher erläutert (siehe Kapitel 1.4).

1.2.2.1 Phagozytäres System

Zur Elimination von Eindringlingen stehen dem Phagozytären System zwei verschiedene Mechanismen zur Verfügung: Zum einen die Zerstörung der Eindringlinge durch Ausschüttung von Enzymen, beispielsweise Lysozym durch monozytäre Zellen und Neutrophile. Zum anderen die komplette Aufnahme (Phagozytose) durch die Abwehrzelle.

Die erste Gruppe von phagozytischen Zellen sind die Neutrophilen, auch neutrophile Granulozyten genannt. Sie werden neben den eosinophilen und basophilen Granulozyten zu der Klasse der Granulozyten gezählt. Die Aufgabe der eosinophilen und basophilen Granulozyten ist bisher nur unzureichend geklärt. Granulozyten leben nur wenige Tage und sind somit viel kurzlebiger als Makrophagen. Die neutrophilen Granulozyten sind zahlenmäßig die häufigsten und mit ihrer Funktion als phagozytierende Zellen auch die wichtigsten Zellen des angeborenen Immunsystems. Erbliche oder erworbene Defizite der neutrophilen Funktion führen zu überwältigenden Infektionen, die unbehandelt zum Tode führen können.

Die zweite Gruppe von Zellen, welche fähig zur Phagozytose ist, sind die Makrophagen. Makrophagen sind langlebige Zellen, die sich gewebespezifisch aus Monozyten, welche im Blut zirkulieren und in Gewebe einwandern, differenzieren. Dabei werden nicht nur fremde Erreger eliminiert, sondern auch tote Zellen und Zellfragmente werden aus dem Körper abgeräumt. Darüber hinaus helfen sie, die Entzündungsreaktion zu aktivieren. Sie sezernieren Signalproteine, um andere Immunzellen, vor allem Granulozyten, zu rekrutieren. Dabei spielt IL-10

eine wichtige Rolle, welches autokrin die Sekretion weiterer Faktoren auslösen kann.

Als dritte zum Phagozytären System gehörende Zellen sind die DC zu nennen. Ihren Namen haben die DCs von ihren fingerartigen Ausläufern, welche Dendriten von Neuronen ähneln. Nach der Aufnahme von Pathogenen beseitigen DCs diese nicht, sondern präsentieren Teile dieser Pathogene, die Antigene genannt werden, auf ihrer Oberfläche. Die Fähigkeit, Antigene auf ihrer Oberfläche zu präsentieren, haben neben den DCs die Makrophagen, sodass beide zu den *antigen-presenting cells* (APCs) des angeborenen Immunsystems gezählt werden. Diese Antigene können dann von Lymphozyten erkannt werden. Somit bilden die APCs die Verbindung zwischen angeborenem und adaptiven Immunsystem [1].

1.2.2.2 Antigen-präsentierende Zellen

Zu den Antigen-präsentierende Zellen gehören die Makrophagen, Dendritische Zellen und B-Zellen (siehe Kapitel 1.3.1). Die Präsentation der Antigene erfolgt über sogenannte MHC-Moleküle auf der Oberfläche der Zellen. Unter den MHC-Molekülen unterscheidet man zwei verschiedene Klassen: MHC Klasse I werden von allen kerntragenden Zellen exprimiert, wohingegen MHC Klasse II nur auf der Oberfläche von APCs zu finden sind.

MHC Moleküle sind Glykoproteine, die von dem großen Cluster der Gene, die als *major histocompatibility complex* bekannt sind, kodiert werden. MHC Peptide sind sehr polymorph: jeder Typ von MHC-Molekülen liegt in vielen verschiedenen Versionen innerhalb der Population vor. Die meisten Menschen sind heterozygot für MHC Moleküle und exprimieren zwei verschiedene Formen jedes MHC Typs. Bei Menschen wird das *major histocompatibility complex* (MHC) System auch als *human leukocyte antigen* (HLA) System bezeichnet [1].

1.3 Das adaptive Immunsystem

Das angeborene Immunsystem bietet einen weitreichenden Schutz gegenüber einer großen Anzahl von Bakterien. Jedoch können sich einige Pathogene der

Erkennung und vollständigen Elimination durch das angeborene Immunsystem entziehen. Bei einer Infektion mit solchen Pathogenen können die Zellen des adaptiven Immunsystems die Progression dieser Infektion verhindern. Jedoch reagiert das adaptive Immunsystem im Vergleich zum angeborenen Immunsystem mit einer Zeitverzögerung von vier bis sieben Tagen. Diese Verzögerung entsteht, da die Lymphozyten nach der Aktivierung durch Kontakt mit den Pathogenen sich erst ausdifferenzieren und nochmals teilen, bevor eine erfolgreiche Immunabwehr stattfinden kann. Zu den Zellen des adaptiven Immunsystems zählen zwei verschiedene Lymphozytentypen: Die B-Zellen und die T-Zellen[1].

1.3.1 B-Zellen

Die B-Zellen erkennen im Körper vorhandene Antigene über B-Zell Antigen Rezeptoren (*B-cell antigen receptor* (BCR)), auch Immunglobuline (Igs) genannt. Nach Aufnahme des Antigens durch die B-Zelle, wird dieses an MHC-Klasse II Rezeptoren auf der Oberfläche präsentiert. Durch diese Funktion vervollständigen die B-Zellen die Gruppe der *antigen-presenting cells* (APCs). Des Weiteren können sie sich nach Aktivierung in eine Plasmazelle differenzieren, welche Antikörper, die der löslichen Form des BCR der B-Zelle entspricht, sezerniert.

Um die vielen verschiedenen Pathogene zu erkennen, hat das adaptive Immunsystem Mechanismen, um eine enorme Vielfalt an Immunglobulinen herzustellen. Jede B-Zelle produziert ein Immunglobulin von anderer Spezifität, welches die Zelle als zahlreiche Kopien auf ihrer Oberfläche trägt. Ein Immunglobulin besteht aus zwei Regionen, einer konstanten (C-Region) und einer variablen (V-Region). Während es bei dem BCR nur eine Variante der konstanten Region gibt, die in der Zellmembran verankert ist, gibt bei den löslichen Immunglobulinen fünf verschiedene Formen. Die konstante Region bestimmt die Funktion des Antikörpers, sobald ein Antigen gebunden ist. Die variable Region bedingt die Antigen-spezifität des Antikörpers und bindet mit zwei *antigen-binding-sites* an das Antigen. Die variable Region des Immunglobulin wird von verschiedenen Gensegmenten (V-, D-, J- Gensegment) kodiert, die in unterschiedlichen Varianten im Genom vorhanden sind und während der somatischen Rekombination in verschiedener Zusammensetzung arrangiert werden. Bei der Verknüpfung selbst entsteht zusätzlich eine Varianz, da zwischen den Segmenten noch Insertionen und/oder

auch Deletionen stattfinden. Zudem liefern somatische Hypermutationen in der V-Region eine größere Vielfalt [1].

1.3.2 T-Zellen

Im Gegensatz zu B-Zellen können T-Zellen Antigene nicht direkt erkennen. Stattdessen binden sie Peptidfragmente von Antigenen, die von APCs auf MHC Molekülen präsentiert werden, über den T-Zell-Antigen Rezeptor (*T-cell antigen receptor* (TCR)). Die Interaktion zwischen MHC Molekülen und dem TCR wird durch einen Co-Rezeptor unterstützt. Anhand diesem kann man zwei verschiedene Arten von T-Zellen unterscheiden. Die zytotoxische CD8⁺-T-Zelle erkennt MHC-Klasse I, die CD4⁺-T-Helfer-Zelle erkennt ihre Antigene über MHC-Klasse II. Voraussetzung für die Aktivierung der T-Zellen ist die Bindung eines Antigen an den richtigen TCR auf der Oberfläche einer T-Zelle, sowie eines costimulatorisches Signal an den Co-Rezeptor. Nach der Aktivierung, proliferieren die T-Zellen (klonale Selektion). Zytotoxische T-Zellen können auch durch andere infizierte oder entartete Körperzellen über die Bindung eines MHC-Klasse II aktiviert werden.

Aktivierte zytotoxische T-Zellen erkennen nun die infizierten Zellen und induzieren den Zelltod, indem sie calciumabhängig spezielle zytotoxische Granula freisetzen. Diese enthalten die Effektorproteine Perforin und Granzym. An der Zielmembran bilden Perforin und Granzym mit dem Proteoglykan Serglycin multimer Komplexe, durch die Granzym in das Zytosol gebracht wird. Dort induziert es durch die Aktivierung von Caspasen Apoptose. Aktivierte T-Helfer Zellen aktivieren über Signaltransmission Antigen-tragende B-Zellen, welche sich daraufhin zu Plasmazellen entwickeln (siehe Kapitel 1.3.1).

Zu der Gruppe der T-Zellen gehört eine dritte Art, die sogenannten regulatorische T-Zellen, welche die Aktivität der anderen Lymphozyten supprimiert, um das Immunsystem zu kontrollieren [1].

1.3.3 Immunologisches Gedächtnis

Während der Immunantwort werden einige B- und T-Zellen zu Gedächtniszellen, die die Langzeitimmunität eines Organismus sichern. Dieses immunologi-

sche Gedächtnis ermöglicht bei einer Reinfektion mit dem gleichem Pathogen eine schnellere und wirksamere Reaktion [2].

1.4 Natürliche Killer Zellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) wurden erstmals 1975 als Population bestimmter lymphozytärer Zellen beschrieben. Sie entstammen der hämatopoetischen Stammzelle aus dem Knochenmark und zirkulieren im Blut, dabei machen sie 5-10 % der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) aus. Auf ihrer Oberfläche exprimieren sie zwar viele lymphozytäre Marker, haben jedoch im Gegensatz zu den B- und T-Zellen keine antigenspezifischen Oberflächenrezeptoren und werden deshalb allgemein zum angeborenen Immunsystem gezählt. Im Menschen werden NK-Zellen als $CD3^{-}$, $CD56^{+}$ definiert. Einzelne Subpopulationen können aufgrund des Expressionslevel von $CD56$ differenziert werden. Den Hauptanteil einer NK-Zell-Population machen $CD56^{dim}$ NK-Zellen aus, die $CD56$ nur schwach auf ihrer Oberfläche exprimieren. In ihrer Funktion sind sie vor allem zytotoxisch. Der Mechanismus entspricht hierbei dem der zytotoxischen T-Zellen des adaptiven Immunsystems. Der Rest der NK-Zellen (10%) mit hoher $CD56$ -Expression ($CD56^{bright}$) nimmt bevorzugt immunregulatorische Funktionen wie Zytokinproduktion wahr [3].

NK-Zellen werden anhand ihrer Fähigkeit, gewisse lymphoide Tumorzelllinien *in vitro* ohne vorangegangene Immunisierung oder Aktivierung abzutöten, identifiziert [4, 5]. Karre *et al.* zeigten, dass die NK Zellaktivität vom Expressionslevel der MHC-Klasse I Proteine abhängig ist: Tumorzellen, welche ein höheres MHC-Klasse I Level aufzeigten, wurden schlechter von NK-Zellen erkannt. Sie beschrieben die sogenannte *missing self*- Hypothese, welche besagt, dass NK-Zellen diejenigen Zellen attackieren, die MHC-Klasse I auf ihrer Oberfläche herunter regulieren [6]. Dieser Prozess ist bei zellulären Transformationen oder bei Virusinfektionen häufig zu beobachten [7]. NK-Zellen erkennen das Fehlen des MHC-Komplexes im Menschen durch *killer cell immunoglobulin-like receptors* (KIRs) und $CD94/NKG2A$ (*natural killer group 2 member A* (NKD2A)) Heterodimere [8–11]. Diese MHC-Klasse I Rezeptoren gehören zu einer großen Familie

von inhibierenden Rezeptoren, die ihr Signal durch intrazytoplasmatische *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs* (ITIMs) weiterleiten [12].

Allerdings musste die *missing self*-Hypothese erweitert werden. Es konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen ihre Zielzellen eliminieren, auch wenn die Bindung an den MHC-Klasse I Rezeptor besteht, und zwar wenn aktivierende NK-Zell Rezeptoren stimuliert werden [13–15]. Daher kann die Bindung von MHC-Klasse I an dessen Rezeptor nicht als einzig terminierendes Signal gesehen werden. NK-Zellen sind ausgestattet mit einer großen Anzahl von Rezeptoren, die die NK-Zell Reaktivität entweder stimulieren (aktivierende Rezeptoren) oder dämpfen können (inhibierende Rezeptoren) [12, 16]. Die Liganden für diese Rezeptoren können löslich sein, oder an der Zelloberfläche der Zielzellen gebunden sein [17]. Die Entscheidung, ob eine Zelle attackiert wird oder nicht, wird bestimmt von der Balance von aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren. Daraus ergibt sich, dass eine NK-Zelle eine Zielzelle nicht zerstört, wenn eine starke Hemmung durch hemmende Rezeptoren, wie beispielsweise MHC-Klasse I Rezeptoren, erfolgt. Außerdem zerstört die NK-Zelle eine Zielzelle nicht, wenn keine Stimulation der aktivierenden Rezeptoren erfolgt. Ein Beispiel für Letzteres ist die fehlende Zerstörung von Erythrozyten durch NK-Zellen. Erythrozyten exprimieren kein MHC-Klasse I auf ihrer Oberfläche, jedoch auch keine NK-Zell aktivierenden Liganden [15].

Ein Beispiel für eine aktivierende Wirkung auf die NK-Zell Aktivität ist die Wechselwirkung des Fc Fragments von Antikörpern mit NK-Zellen. CD56^{dim} NK-Zellen exprimieren den Fc-Rezeptor CD16, über welchen sie die Fähigkeit zur Antikörpervermittelten Zellyse (*antibody dependent cellular cytotoxicity* (ADCC)) erlangen. NK-Zellen können dadurch auch Zellen, deren Oberfläche durch Antikörper umhüllt ist, eliminieren. Der Antikörper wird dabei durch den Fc- γ R1IIIA (CD16) auf der NK-Zell Oberfläche erkannt [17], woraufhin zytotoxische Granula freigesetzt wird [3, 18].

Eine weitere wichtige Funktion von NK Zellen ist die Freisetzung von Zytokinen, vor allem Interferon- γ . NK-Zellen exprimieren konstitutiv Interferon- γ Transkripte, die bei Aktivierung direkt in die Zytokinsynthese eingehen und somit sehr schnell zu einer Sezernierung führen [19]. Interferone haben in mehrfacher Hinsicht großen Einfluss auf die Immunüberwachung. Sie aktivieren NK-Zellen, welche Zellen mit niedriger MHC-Klasse I Expression angreifen. Zusätzlich regulie-

ren Interferone bei nicht infizierten Zellen die MHC Klasse I Expression hoch und bieten daher einen Schutz vor der NK-Zell-Lyse. Darüber hinaus fördern Interferone auch die Freisetzung anderer Zytokine durch NK-Zellen. Des Weiteren führt Interferonfreigabe zur Aktivierung zusätzlicher NK-Zellen und weiterer Zellen insbesondere des adaptiven Immunsystems.

1.5 Die Rolle von NK Zellen bei der Tumor-Immunüberwachung

Schon früh konnte gezeigt werden, dass Leukämien die Expression von MHC (im Menschen *human leukocyte antigen* (HLA)) Klasse I Molekülen auf ihrer Oberfläche herunter regulieren, um den zytotoxischen T-Zellen zu entkommen [20]. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass nicht alle HLA Klasse I Subtypen davon betroffen sind, sondern in manchen Fällen die Expression erhalten bleibt, sodass die Leukämiezellen auch der NK Zell Überwachung entgehen [21]. NK-Zellen spielen auch eine Rolle in der Immunüberwachung von spontanen Tumoren. Studien zeigen, dass Tumoren der NK-Zell Kontrolle entkommen, indem sie NK-Zell Liganden, die aktivierend auf NK-Zellen wirken, von ihrer Oberfläche als lösliche Liganden abwerfen. Dieses Phänomen korreliert mit einer schlechten Prognose beim Melanom und Prostata Karzinom [22].

Als weiteren Mechanismus zur Umgehung der Immunüberwachung durch NK-Zellen, können Malignome die NK-Zell Aktivität negativ beeinflussen. Es konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen nicht selbst maligne entartet waren, sondern durch ihre maligne Mikroumwelt in ihrer zytolytischen Aktivität beeinflusst werden [23]. Eine 11-Jahre umfassende prospektive Kohortenstudie konnte zeigen, dass eine niedrige NK-Zell Lyse Aktivität mit einem höherem Carcinom Risiko assoziiert ist [24]. Lowdell *et al.* beobachteten eine *leukaemia cytotoxicity activity*, die durch NK-Zellen vermittelt wurde. Das Fehlen von *leukaemia cytotoxicity activity* ging mit einem höheren Rückfallrate innerhalb von zwei Jahren einher [25].

Im Gegensatz dazu konnte eine höhere Aktivität der NK-Zellen mit einer größeren Wahrscheinlichkeit für eine Remission [25] und rückfallfreien Patientenüberleben [26] korreliert werden. Der positiven Effekt der NK-Zell Überwachung kann bei

der Therapie einer Leukämie genutzt werden. Patienten mit chemoresistenten Leukämien ohne passenden Spender, konnte eine HLA-differente Transplantation ohne schwere *Graft-versus-Host-Disease* (GVHD) durch die Transplantation vieler Stammzellen nach starker Depletion der T-Zellen ermöglicht werden [27–30]. Der Graft reagiert dabei mit einer schnellen und vermehrten Bildung von NK-Zellen [27]. HLA-Klasse I Moleküle inhibieren über *killer cell immunoglobulin-like receptors* (KIRs)-Rezeptoren NK-Zellen (siehe Kapitel 1.4). Fehlen diese KIRs-Rezeptoren, so wird die Reaktivität von NK-Zellen getriggert [31–33]. In der haplo-typ-differenten Stammzelltransplantation führt dies zu der sogenannten *graft-versus-leukemia reaction*. Dabei führen Unterschiede der KIRs Epitope zwischen Empfänger und Spender dazu, dass die NK-Zellen des Spenders die Leukämiezellen des Empfängers lysieren. Dabei konnte keine GVHD beobachtet werden [34], die Patienten wurden sogar durch eine Donor-versus-Empfänger NK-Zell Alloreaktion gegen eine GVHD geschützt. Diese NK-Zell Alloreaktivität verhinderte auch eine Abstoßung des Transplantates und ein Leukämie rezidiv [35–37]. Die Patienten hatten sowohl eine längere Lebenserwartung, sowie eine längere krankheitsfreie Lebenszeit [38–40]. Gewiss geht die NK-Zell Reaktivität über die Erkennung der HLA-Klasse I spezifischen KIRs-Rezeptoren hinaus. So wird die Interaktion von NK-Zellen und leukämischen Blasten von der Balance der Vielzahl von aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren beherrscht [41, 42].

1.6 Akute myeloische Leukämie

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Immunüberwachung der akuten myeloischen Leukämie (AML) durch NK-Zellen. Akute Leukämien werden definiert als „maligne klonale Neoplasie der hämatopoetischen Zellen“ [43]. Hierbei proliferieren unreife Vorläuferzellen der Leukozyten, sogenannte Blasten, autonom und werden ins periphere Blut ausgeschwemmt.

Bei der AML handelt es sich bei diesen unreifen Vorläuferzellen um Zellen aus der myeloischen Reihe. Die Inzidenz in Europa liegt bei jährlich drei Neuerkrankungen je 100 000 Menschen, Männer sind dabei häufiger betroffen als Frauen [44, 45]. Man unterscheidet zwischen der *de-novo*-AML, die ohne jegliche hämatopoetischen Vorerkrankung entsteht, und einer sekundären AML, die sich auf Grund-

lage einer Störung der Hämatopoese, wie beispielsweise einer aplastischen Anämie oder einer myelodysplastischen Erkrankung, entwickelt. Die Entstehung einer AML kann mit exogenen physikalischen Noxen (ionisierender Strahlung), sowie mit chemischen Noxen (Benzole, Zytostatika) in Verbindung gebracht werden. Auch genetische Faktoren und Abberationen wie zum Beispiel die Trisomie 21 kann mit der Entstehung einer Leukämie assoziiert werden.

Die Entstehung einer Leukämie ist ein mehrstufiger Prozess, bei dem eine transformierte leukämische Stammzelle durch vielzählige Mutationen entsteht. Das *two hit model* besagt, dass dabei mindestens zwei Klassen von Mutationen in verschiedenen Signalwegen stattfinden müssen. Klasse I Mutationen führen zu einem gesteigertem Wachstum und/oder zu einem Überlebensvorteil gegenüber nicht betroffenen Zellen der Hämatopoese. Durch Klasse II Mutationen verliert die betroffene Zelle die Fähigkeit sich normal zu differenzieren und die Zellapoptose der betroffenen Zelle wird blockiert. Beide Mutationen gemeinsam führen zu dem Vollbild einer akuten Leukämie, bei dem die undifferenzierten, mutierten Zellen einen Proliferationsvorteil gegenüber gesunden Zellen besitzen [46, 47]. Dadurch kann eine kleine Anzahl von Leukämienstammzellen eine massive klonale Expansion durchführen und führt zur Verdrängung der normalen Hämatopoese im Knochenmark [48].

Klinisch äußert sich die AML in Allgemeinsymptomen wie Müdigkeit, Fieber und Nachtschweiß, sowie in Symptomen infolge der Verdrängung der normalen Hämatopoese und der damit verbundenen Panzytopenie. Durch die verminderten Erythrozytenproduktion kommt es zu Beschwerden einer Anämie wie Blässe, Dyspnoe und Müdigkeit, infolge der Thrombozytopenie zu Blutungen und auf Grund der Granulozytopenie zu einer Anfälligkeit für Infekte [43].

Diese klinisch sehr vielfältige Erscheinung wird von einer heterogenen Gruppe der akuten leukämischen Leukämien verursacht. Um diese Gruppe einzuteilen wurde deshalb 1976 die *french-american-british* (FAB) Klassifikation eingeführt. Diese teilte die AML anhand morphologischer und zytochemische Gesichtspunkte in die Klassen M0 bis M7 ein. Mithilfe dieser Subtypen erfolgte die Therapiewahl und die Prognoseabschätzung [49]. Jedoch wurde die FAB Klassifikation im Jahr 2001 durch die WHO-Klassifikation ersetzt. Diese neue Klassifikation enthält weitere Parameter, welche sich als klinisch und biologisch relevant erwiesen. Somit bezieht sie nicht nur morphologische und zytochemische Kriterien ein, son-

dern auch die Immunphänotypisierung der Blasten, zytogenetische Abberationen und die medizinische Vorgeschichte des Patienten [50].

Nach den WHO-Kriterien soll zur Diagnosestellung der Blastenanteil im Differentialblutbild und/oder im Knochenmark ermittelt werden. Darüber hinaus soll die Zugehörigkeit der Blasten zur myeloischen Reihe bewiesen werden. Dies erfolgt zytochemisch über die Reaktion der Myeloperoxidase (MPO) oder über eine Immunphänotypisierung. Hierzu müssen auf der Oberfläche der Blasen die myeloischen Marker CD13, CD33, CD117 detektiert werden [51, 52].

Nach der Diagnosestellung soll frühzeitig eine Einleitung der Therapie erfolgen. Begonnen wird mit einer Induktionstherapie, um eine komplette Remission zu erhalten. Darunter versteht man eine komplette Elimination der malignen Zellen und eine Wiederherstellung der normalen Hämatopoese. Die Standardtherapie hierbei besteht aus einer Kombination eines Antrazyklins und dem Zytostatikum Cytarabin. Zur Erhalt der kompletten Remission folgt eine Konsolidierungstherapie. Diese kann als intensive Chemotherapie oder Stammzelltransplantation durchgeführt werden. Die Wahl der Therapie ist vom Risikoprofil der AML, sowie des Alters und Allgemeinzustandes des Patienten abhängig. Bei Niedrigrisikopatienten genügt eine Chemotherapie, welche eine Hochdosisgabe von Cytarabin beinhaltet. Bei Hochrisikopatienten mit ausreichendem Allgemeinzustand wird eine frühzeitige allogene Stammzelltransplantation angeraten. Als Spender kommen HLA-identische Familien- oder Fremdspender in Betracht. Sind diese nicht vorhanden können haploidente Transplantate erwogen werden. Bei diesen konnte eine *graft-versus-leukemia reaction* beobachtet werden, welche auf die Alloreaktivität von NK-Zellen zurückgeführt werden konnte (siehe Kapitel 1.5). Insgesamt kann bei 70% der Patienten eine komplette Remission erreicht werden, das weitere Überleben hängt von dem Risikoprofil der AML sowie der Therapie ab. Das 5-Jahres-Überleben beträgt ohne Stammzelltransplantation insgesamt 45%; bei Hoch- und Mittelrisikopatienten ohne Stammzelltransplantation sogar nur 20%. Mit Stammzelltransplantation verbessert sich das 5-Jahres-Überleben für die Gesamtgruppe auf 52% und für Hoch- und Mittelrisikopatienten auf 31% [53]. Die Prognose der AML ist verbesserungsbedürftig, weshalb die Aufklärung relevanter Mechanismen in der Tumorgenese sowie die Entwicklung neuer Therapiekonzepte notwendig sind.

1.7 Tumornekrosefaktor (TNF) und TNF-Rezeptor Superfamilie (TNF/TNFR SFPs)

Frühere Arbeiten konnten einen Zusammenhang zwischen der Überwachung von Leukämien durch NK-Zellen und bestimmten Oberflächenproteinen, den sogenannten *TNF/TNF receptor superfamily proteins* (TNF/TNFR SFPs), belegen [54, 55].

Beginn der 1970er Jahre wurden Lymphotoxine (LTs) und Tumornekrosefaktor (TNF) als Produkte von Lymphozyten und Makrophagen bei der Lyse gewisser Zelltypen, vor allem bei Tumorzellen, identifiziert [56]. Detaillierte Analysen von $LT\alpha$ und *tumor necrosis factor* (TNF) ergaben ein hohes Maß an Ähnlichkeit, weshalb sie als eine Genfamilie zusammengefasst wurden [57–60]. Durch *large-sequencing* Studien wurde die Genfamilie durch viele verwandte Proteine erweitert und als TNF/TNFR SFP zusammengefasst [61–64].

Die Rezeptoren und Liganden dieser Superfamilie haben einzigartige strukturelle Attribute, die sie direkt mit Signalwegen für Zellproliferation, Überleben und Differenzierung koppeln [60]. Die meisten TNF/TNFR SFPs sind im Immunsystem exprimiert, wo ihre schnelle und starke Signalfähigkeiten sehr wichtig für die Koordination von Proliferation und Abwehrfunktion von reaktiven Zellen ist [60].

Die TNF/TNFR SFP spielen bei vielen Erkrankungen eine maßgebliche Rolle [65–67]. Bei Erkrankungen mit verstärkter Immunreaktionen wie beispielsweise der Rheumatoiden Arthritis oder chronischen Darmerkrankungen können überschießende Reaktionen kontrolliert werden, wenn TNF durch Pharmakologika blockiert wird [68, 69]. Deshalb stehen TNF/TNFR SFP nun im Mittelpunkt der Forschung zur *targeted therapies* wie zum Beispiel Arteriosklerose, Osteoporose, Autoimmunerkrankungen, allografte Abstoßung und Krebs [60].

1.7.1 *Receptor activator of NF- κ B* (RANK)

Receptor activator of NF- κ B (RANK) und sein Ligand RANKL gehören den TNF/TNFR SFP an und wurden ursprünglich auf dendritischen Zellen identifiziert [70].

RANK/RANKL haben Einfluss auf das Immunsystem und den Knochenmetabolismus. Mäusen, die RANK oder RANKL defizient sind, fehlen alle peripheren und mesenterialen sekundäre Lymphknoten und sie haben schwere Osteopetrose (gesteigerte Knochendichte) bei fehlenden Osteoklasten [71–73].

1.7.1.1 RANK im Knochenmetabolismus

Das Skelettsystem beruht auf einem Gleichgewicht von Knochenauf- und -abbau. Die für den Umbau verantwortlichen Zellen sind die knochenbildenden Osteoblasten und die knochenresorbierenden Osteoklasten. Erstere stammen von mesenchymalen Stammzellen ab, letztere von den gleichen hämatopoetischen Vorläuferzellen wie Blutmonozyten [74, 75].

Stoffe wie Vitamin D3, Parathormon und proinflammatorische Zytokine wie IL-1 und TNF, induzieren Expression von RANKL auf Stromazellen und Osteoblasten. RANKL ist ein Zytokin, welches essentiell für die Formation, Funktion, und Überleben von Osteoklasten ist. RANKL vermittelt über RANK die Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten aus monozytären Vorläuferzellen [76]. Das Fehlen des RANK-RANKL Systems inhibiert Osteoklasten und verdeutlicht die große Bedeutung dieses Systems im normalen Leben und Differenzierung der Osteoklasten [71, 72, 77].

Osteoprotegerin (OPG), ein löslicher RANKL *decoy* Rezeptor wird von Stromazellen und Osteoblasten gebildet [78, 79]. Durch die Bindung von OPG an RANKL, steht RANKL nicht mehr für die Differenzierung der Osteoklasten zur Verfügung und blockiert daher die Knochenresorption [78, 80]. Östrogen induziert OPG, welches die protektive Wirkung von Östrogen auf den Knochen erklären würde. Postmenopausal, ist die Östrogen- und somit auch die OPG Bildung vermindert und geht daher mit einer erhöhten Verfügbarkeit von RANKL, einer vermehrten Osteoklastenaktivität und letztlich mit einer Osteoporose einher.

Neben Osteoporose konnten auch weitere Erkrankungen mit erhöhter Knochenresorption wie beispielsweise das Multiple Myelom, Knochenmetastasen bei Prostata Karzinom und Brustkrebs, Knochenschmerzen bei Knochenmetastasen, Rheumatoide Arthritis, Psoriasis Arthritis, Morbus Paget sowie Riesenzelltumoren mit RANKL-*signaling* verknüpft werden [81, 82]. Bei Patienten mit Multiplem

Myelom konnte gezeigt werden, dass RANKL auf Stromazellen des Knochenmarks überexprimiert ist [83].

Wegen ihrer entscheidenden Rolle bei primären oder sekundären Erkrankungen des Knochenstoffwechsel, wird nun versucht durch Beeinflussung des RANK-RANKL Systems neue Therapieansätze zu erschließen [84, 85]. Besonders hervorzuheben ist hierbei der im Jahr 2010 für den deutschen Markt zugelassene Antikörper Denosumab (Prolia ®) [81]. Dieser bindet hochaffin an RANKL und verhindert die Bindung von RANKL an RANK von Osteoklasten und deren Differenzierung. Er wird erfolgreich bei der Prävention von Frakturen von postmenopausalen Frauen mit Osteoporose eingesetzt und hat sich als gut verträglich und nebenwirkungsarm gezeigt [86]. Das Einsatzgebiet von Denosumab konnte daher effektiv ausgeweitet werden: Die Behandlung mit Denosumab konnte bei der Prävention und Therapie von Frakturen durch Knochenmetastasen vielversprechende Ergebnisse erzielen [87, 88].

1.7.1.2 RANK im hämatopoetischen System

Es konnte gezeigt werden, dass RANK und RANKL die Interaktion zwischen DC und T-Zellen reguliert [70, 89]. Jüngste Erkenntnisse legen nahe, dass diese Interaktion eine erhebliche Rolle bei der Entstehung und Verbreitung von malignen Erkrankungen trägt, zum Beispiel bei der Entstehung und Metastasierung von Brustkrebs [90, 91].

Auch andere Zellen des peripheren Blut und des Knochenmarks wurden von Atkins *et al.* auf Expression von RANK untersucht. Die Studie zeigte RANK-Expression auf CD14⁺ Monozyten, CD19⁺ B Zellen, Glycophorin A⁺ Erythrozytenvorläufern und CD56⁺/CD3⁻ NK-Zellen im peripheren Blut sowie im Knochenmark. Auch kleinere Population von CD34⁺ hämatopoetischen Vorläufern und CD3⁺ T Zellen zeigten RANK Expression [92]. Allerdings wird die Expression von RANK auf NK-Zellen kontrovers diskutiert [93].

1.8 Zielsetzung

Die Lösung der kontroversen Diskussion, ob RANK tatsächlich auf der Oberfläche von NK-Zellen exprimiert ist, ist essentiell, da andere TNF/TNFR SFP bei der Immunüberwachung von Leukämien durch NK-Zellen eine große Rolle spielen [54, 55]. Dies ist im besonderen von Interesse, da eine Expression von RANKL auf malignen Zellen der chronisch lymphatischen Leukämie gefunden wurde [94]. Daher besteht die erste Aufgabe dieser Arbeit im Nachweis der RANK Expression auf NK-Zellen.

Im weiteren soll untersucht werden, ob RANKL auf der Oberfläche von Blasten anderer Leukämien, hier im speziellen der AML, exprimiert wird. Dies wurde bisher noch nicht untersucht. Im Falle einer funktionellen Relevanz einer RANK-RANKL Interaktion, würde das RANK-RANKL System ein mögliches Ziel für neue Therapieansätze der AML bieten. Um die RANK-RANKL Interaktion zu blockieren, wird in dieser Arbeit Denosumab (Prolia®) verwendet. Denosumab bietet den Vorteil ein zugelassener, klinisch erprobter Antikörper zu sein [81, 86–88]. Dies würde die bisherigen Therapiemöglichkeiten der AML erweitern, um möglichst bei allen Patienten eine Remission mit geringem Rezidivrisiko zu erhalten.

Die Immunüberwachung der AML durch NK-Zellen wurde bisher am bestem in der allogenen haplo-identen Stammzelltransplantation nachgewiesen (siehe Kapitel 1.5). Um die Situation einer allogenen Stammzelltransplantation zu imitieren, werden wir als Effektoren für die funktionellen Ergebnisse *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) von gesunden Spendern verwenden. Als Ziellzellen werden zunächst Zellen von Zelllinien verwendet. Dabei wird die NK-Zell-Aktivität gegen leertransfizierte bzw. parietale Zellen mit der Aktivität gegen transfizierte Zellen verglichen. Da jedoch interspezies-spezifische Unterschiede in der NK-Zell-Reaktion gezeigt werden konnten [55, 95], wird die NK-Zell-Zytotoxizität auch gegen AML-Blasten bestimmt.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 2.1: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Brutschrank	Heracell von Heraeus, Hanau, Deutschland
Durchlichtmikroskop	Axiovert 25 von Zeiss, Jena, Deutschland
ELISA-Reader E-Max	Molecular Cevices, Ismanung, Deutschland
FACS Cytomics FC500	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Feinwaage Mettler	Sartorius, Göttingen, Deutschland
MACS Separator Magnet	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MicroBeta Counter 1450 Plus	Perkin Elmer Wallac, Turku, Finnland
Multikanalpipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Multilabel Counter Victor 1420	Perkin Elmer Wallac, Turku, Finnland
Multisteller	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
pH-Meter	Mettler-Toled, Greifensee, Schweiz
Pipetteboy comfort	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sterilbank Herasafe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Tischwaage BL 150S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Tisch-Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland Heraeus, Hanau, Deutschland
Vortexer	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Wasserbad	Köttermann, München, Deutschland
Zentrifuge	Heraeus, Hanau, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2.3: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Combi-Tips	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Cryoröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland Nunc, Roskilde, Dänemark
Einmalpipetten	Corning Inc., Corning, NY, USA
Einmalspritzen	Braun, Wertheim, Deutschland
FACS-Röhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
MACS Säulen (LS)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße	Biozym Scientific, Hess. Oldendorf, Deutschland
Platten für ELISA (96 well)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA Nunc, Roskilde, Dänemark
Platten für FACS (96 well)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen	VWR, Darmstadt, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5; 1,5; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Transwell (Platten und Einsätze)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Vakuum-Filtrations- system (steril)	Millipore, Billerica, MA, USA
Zellkulturflaschen	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellkulturplatten (6, 12, 24, 48, 96 well)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA Corning Inc., Corning, NY, USA
Zentrifugenröhrchen (15 ml; 50 ml)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

2.1.3 Chemikalien, Medien und Puffer

Tabelle 2.5: Verwendete Chemikalien, Medien und Puffer

Chemikalien	Hersteller
aTaq DNA-Polymerase	Promega, Madison, WI, USA
Agar	Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Lonza, Rockland, ME, USA
Ampicillin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
BATDA reagent	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
BD OptEIAM	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Assay Diluent	
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Carbonat-Bicarbonat-Puffer	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
EDTA Solution	Cambrex, Rockland, ME, USA
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Europium Solution	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>) (FCS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Ficoll-Lösung	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
L-Glutamin	Lonza, Verviers, Belgien
Luria Broth (LB) Base	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Medium DMEM	Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Medium IMDM	Lonza, Verviers, Belgien
Medium RPMI 1640	Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natrium Pyruvate Solution	Lonza, Verviers, Belgien
NEAA Solution	Lonza, Verviers, Belgien
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Chemikalien	Hersteller
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Lonza, Verviers, Belgien
<i>phosphate buffered saline</i> (PBS)	PAA, Pasching, Österreich
<i>phosphate substrate</i> (P4744)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
TMB MicroWell Peroxidase Substrate	KPL, Gaithersburg, MD, USA
Triton X-100	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypan Blue Stain 0,4 %	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-EDTA Solution	Lonza, Verviers, Belgien
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

2.1.4 Antikörper und Zytokine

Tabelle 2.7: Verwendete Antikörper und Zytokine

Antikörper / Zytokin	Hersteller
Denosumab (Prolia ®)	Amgen, Thousand Oaks, CA, USA
ELISA Interferon- γ mAb (M700A, M701B)	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
goat-anti-mouse-PE	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
goat-anti-mouse-IgM-HRP	SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA
Humanes IgG (hIgG)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
IL-2, IL-6, IL-10, IL-15	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
mouse anti-human-IgG1-PE	SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA
mouse IgG1	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
mouse IgG2b	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
mouse IgM	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
Panitumumab (Vectibix ®)	Amgen, Thousand Oaks, CA, USA
Poly-HRP-Streptavidin	Fitzgerald Industries Int., Acton, MA, USA
RANKL (rekombinant)	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
RANKL mAb	Prof. M. Azuma, Universität Tokio, Japan

Antikörper / Zytokin	Hersteller
(clone MIH23; mIgM)	
RANKL mAb	Prof. M. Azuma, Universität Tokio, Japan
(clone MIH24; mIgG2b)	
RANK mAb	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
(clone 80704, Lot. EDV01)	

Direkt-markierte FACS-Antikörper und die zugehörigen Isotyp-Kontrollen wurden von BD Pharmingen (San Diego, CA, USA) oder Biolegend (San Diego, CA, USA) bezogen.

2.1.5 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien und Hersteller können aus nachfolgender Tabelle entnommen werden:

Tabelle 2.9: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Hersteller
HL-60	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
RPMI 8226	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
RPMI 8866	Universität Tübingen, Deutschland
L cells	Prof. M. Azuma, Universität Tokio, Japan
L-RANKL	Prof. M. Azuma, Universität Tokio, Japan
P815	Prof. M. Azuma, Universität Tokio, Japan
P815-RANKL	Prof. M. Azuma, Universität Tokio, Japan

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle Zellen wurden bei 37 °Celsius, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit, 5 %CO₂ kultiviert. Nach zwei bis drei Tagen wurden die Zellen in entsprechender Zellzahl in neues, geeignetes Zellkultur- Medium umgesetzt. Suspensionszelllinien wurden zum Ausschluss toter Zellen mit Trypanblau gefärbt, in einer Neubauer-

Zählkammer gezählt und mit entsprechender Zellzahl eingestellt. Alternativ wurde eine notwendige Menge nach Split-Schema entnommen (siehe unten) und zentrifugiert (1500 rpm, 5 Minuten). Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet mit frischem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt und bei 37 °Celsius, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit, 5%CO₂ inkubiert. Bei adhärennten Zellen wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen mit 10 ml PBS gespült. Daraufhin wurden die Zellen mit 3 ml EDTA-Trypsin für 5 Minuten bei 37 °Celsius vom Flaschenboden abgelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Medium gestoppt und die Zellen abzentrifugiert (1500 rpm, 5 Minuten). Das Zellpellet wurde in frisches Medium aufgenommen und nach entsprechendem Split-Schema in entsprechender Anzahl in Zellkulturflaschen überführt. Aus nachfolgenden Tabellen kann man entsprechende Daten für jede Zelllinie entnehmen:

Tabelle 2.11: Verwendete Medien in der Zellkultur

Zelllinie	Medium
Lcells par Lcells RANKL	DMEM + 10 % FCS + 1 % P/S
P815 par P815 RANKL	RPMI 1640 + 10 % FCS + 1 % P/S + 2 mM L-Glu
HL-60	RPMI 1640 + 10 % FCS + 1 % P/S

Tabelle 2.13: Verwendete Zellmengen in der Zellkultur

Zelllinie	Zellzahl/ml Medium	Split
Lcells par Lcells RANKL	2·10 ⁶ /10 ml	1:3
P815 par P815 RANKL	1·10 ⁶ /20 ml	1:10
HL-60	1·10 ⁷ /20 ml	1: 3

2.2.2 Isolierung von PBMCs

Zur Isolation von peripheren mononuklearen Blutzellen (PBMCs) wurde entweder das Vollblut von freiwilligen, gesunden Spendern, welches mit Heparin versetzt wurde, oder von der Blutbank des Universitätsklinikum Tübingen zur Verfügung gestellte Buffy Coats oder aufgearbeitete Leukapheresen verwendet. Die Blutbestandteile wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Das Blut wurde 1:3 mit PBS verdünnt und jeweils 35 ml verdünntes Blut wurden auf 15 ml Ficoll-Lösung aufgetragen. Diese wurden zur Trennung mit 2000 rpm 18 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Die Ficoll-Lösung besteht aus vernetzten Kohlenstoffpolymeren und besitzt eine bestimmte Dichte. Aufgrund der unterschiedlichen Dichte der Blutbestandteile bilden sich drei Phasen: Die oberste beinhaltet das Serum und Thrombozyten. Granulozyten und Erythrozyten hingegen sinken aufgrund ihrer großen Dichte auf den Boden des Falcons und bilden das Sediment in der Ficoll-Lösung. Durch die niedrigere Dichte der Lymphozyten und Monozyten bilden sie die Interphase zwischen Plasma und Ficoll-Lösung. Diese Interphase wurde abgehoben und anschließend dreimal mit 50 ml PBS gewaschen und bei 1500 rpm 5 Minuten zentrifugiert. Um die Thrombozyten vollständig zu entfernen erfolgte ein weiterer Waschschriff mit 40 ml PBS und Zentrifugation (10 Minuten 800 rpm). Die Zellzahl der verbliebenen Zellen wurde bestimmt und die Zellen entweder mit $8 \cdot 10^6$ Zellen je ml in PBMC-Medium (RPMI + 10% Fetales Kälberserum (*fetal calf serum*) (FCS) + 1% P/S) in Kultur genommen oder in Einfriermedium (70% RPMI Medium + 20% FCS + 10% DMSO) bei -80°Celsius eingefroren und später in Stickstoff bei ca. -160°Celsius gelagert.

2.2.3 Gewinnung von Patienten Primärmaterial

Patienten wurde zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, noch vor Beginn der Therapie bei Einverständnis des Patienten Blut entnommen und mit Heparin versetzt. Die Isolierung der PBMCs erfolgte direkt nach der Abnahme wie im vorherigen Abschnitt beschrieben.

2.2.4 *Magnetic cell separation* (MACS)

Zur Isolation einer bestimmten Zelllinie aus einer frisch isolierten PBMCs Zellpopulation wurde die *magnetic cell separation* (MACS) verwendet. Dabei werden

alle anderen Zellen ausser die Zellen, welche isoliert werden sollen, über ihre spezifischen Oberflächenmoleküle mit Biotin markiert. Der sekundäre anti-Biotin Antikörper ist mit Magnet-Kügelchen gekoppelt. Die so markierten Zellen werden in der MACS-Säule in einem Magnetfeld zurückgehalten. Die zu isolierenden Zellen werden nicht zurückgehalten und durchlaufen die Säule.

2.2.4.1 NK-Zellen

Mit NK Cell Isolation Kit human Order no. 130-092-657 von Miltenyi Biotec. Durchführung nach Anleitung des Herstellers.

2.2.4.2 Monozyten

Mit Monocyte Isolation Kit II human Order No. 130-091-153 von Miltenyi Biotec. Durchführung nach Anleitung des Herstellers.

2.2.5 Durchflusszytometrie

Die Analyse der Oberflächenexpression der Zielzellen wurde mittels FACS mit dem Gerät FACS Cytomics FC500 durchgeführt.

In der Messung werden die Zellen einzeln durch einen Laserstrahl geführt. Durch die Ablenkung dieses Strahles kann die Größe und die Granularität einer Zelle bestimmt werden. Dabei hängt das *forward scatter* (fsc) von der Größe der Zelle und das *side scatter* (ssc) von der Granularität. Um weitere Informationen über das Expressionsmuster zu ermitteln, können die Zellen mit Antikörpern angefärbt werden. Die verwendeten Antikörper richten sich gegen bestimmte Zielstrukturen auf der Zelloberfläche einer Zelle und können entweder selbst an einen fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt sein oder um das Signal zu verstärken mit einem sekundären Antikörper, welcher fluoresziert, detektiert werden. Sobald ein Fluoreszenzfarbstoff mit dem Laser bestrahlt wird, emittiert dieser Licht mit einer gewissen Wellenlänge, welches mittels eines Detektor erfasst wird. Für jede Fluoreszenzfarbe ergibt sich ein spezielles Muster.

Hierzu wurden die zu untersuchenden Zellen zuerst in FACS-Puffer (PBS + 1 % FCS + 0,01 % NaN₃) mit 10 µg/ml humanen IgG (hIgG) aufgenommen und eine Stunde bei 4 °C inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blocken. Auch die Verdünnung aller Antikörper erfolgte in FACS-Puffer mit 10 µg/ml hIgG. Als

nächster Schritt wurden die Zellen in eine 96-well-Platte aufgeteilt, sodass ca. $0,5\text{--}2 \cdot 10^6$ Zellen in jedem Well waren; abzentrifugiert und mit $50 \mu\text{l}$ eines direkt flourophor-gekoppelten oder nicht gekoppelten Antikörper inkubiert (45 Minuten bei 4°C). Nicht gekoppelte Antikörper wurden daraufhin mit $50 \mu\text{l}$ eines passenden, 1:100 bzw. 1:200 verdünnten sekundären Antikörper (siehe Tabelle) detektiert (Inkubation 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln). Als letzter Schritt wurde gegebenenfalls eine Inkubation von 20 Minuten bei 4°C im Dunkeln mit $50 \mu\text{l}$ eines direkt flourophor-gekoppelten Selektionsantikörpern durchgeführt. Die dabei verwendeten Antikörper wurden 1:25 in FACS-Puffer+ hIgG verdünnt. Zwischen den Inkubationsschritten wurde jeweils zweimal mit FACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert (2000 rpm, 2 Minuten) und der Überstand verworfen. Am Ende wurden die Zellen in $300 \mu\text{l}$ 1 % PFA-PBS aufgenommen bis zur Messung im Dunkeln bei 4°C gelagert. Die erhobenen Daten wurden mittels „FlowJo 7.6“ Software ausgewertet. Wurde ein Antikörper mit seiner passenden Isotypkontrolle verglichen, wurde der Spezifische Fluoreszenz Index (SFI) berechnet. Dieser setzt sich zusammen aus dem Median der Signalstärke des Zielmoleküls (*Median des Antikörpers*) und der Isotypkontrolle (*Median der Isotypkontrolle*).

$$SFI = \frac{\text{Median des Antikörpers}}{\text{Median der Isotypkontrolle}} \quad (\text{i})$$

Tabelle 2.15: Antikörper, Isotypkontrollen und sekundäre Antikörper bei FACS

Antikörper	Isotypkontrolle	sekundärer Antikörper
Denosumab	Panitumumab	mouse-anti-human-IgG1-PE
Biotin-Denosumab	Biotin-Panitumumab	Streptavidin-PE
MIH24	mouse IgG2b	goat-anti-mouse-PE
MIH23	mouse IgM	goat-anti-mouse-PE

2.2.6 Konjugierung von Antikörpern mit Biotin

Die Markierung eines Antikörpers mit Biotin erlaubt seine spezifische Detektion. Biotin bindet an freie, primäre Aminogruppen des Zielmoleküls. Die hohe Affinität von Streptavidin zu Biotin wird genutzt, um das Zielmolekül zu detektieren. Hierzu wird Streptavidin flourophor-markiert und dessen Emissionen mittels FACS

detektiert (siehe Kapitel 2.2.5). Konjugation von Denosumab und Panitumumab als Isotypkontrolle erfolgte nach Anleitung des Herstellers (*Lightning-Link™ Biotin Conjugation Kit (707-0010)* von Innova Bioscience).

2.2.7 CD107a-Assay

Die Bestimmung von CD107a auf der Oberfläche von NK-Zellen kann als Surrogatmarker für deren Degranulation genutzt werden. Die Zielzellen wurden in einer 24-well Platte mit PBMCs und den Überständen 3 Stunden bei 37 °Celsius inkubiert. Danach wurden die Zellen mit direkt-markierten FACS-Antikörpern (CD107a-PeCy5, CD56 FITC und CD3 Pe) und entsprechenden Isotyp Kontrollen gefärbt (siehe Kapitel 2.2.5).

2.2.8 BATDA-Europium-Cytotoxizitätsassay

Das Prinzip des BATDA-Europium-Assays beruht darauf, dass BATDA in die Zielzellen aufgenommen wird und dort durch Acteylsterasen zu TDA abgebaut wird. Nur wenn die Integrität der Zellmembran gestört ist, kann TDA aus der Zelle gelangen und mit der Europium-Lösung einen stabilen Chelatkomplex bilden. Das Fluoreszenzsignal korreliert direkt mit der Anzahl der lysierten Zellen und kann mit einem Multilabel Counter Victor 1420 detektiert werden.

Zur Aufnahme von BATDA wurden $2 \cdot 10^6$ Zellen der Zielzellen in 2 ml aufgenommen, mit 4 μ l BADTA versetzt und für eine Stunde bei 37 °Celsius, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂ inkubiert. Um BATDA Reste zu entfernen, wurden die Zellen nach dieser Stunde fünfmal mit 10 ml warmen Waschmedium (RPMI + 10 % FCS + 1 % P/S) gewaschen und jeweils 7 Minuten mit 300 g zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen auf $5 \cdot 10^4$ Zellen/ml eingestellt und für eine Stunde unbehandelt belassen oder mit den Antikörpern und den jeweiligen Isotypen behandelt. Nach der Behandlung wurden die Zellen mit jeweils 100 μ l pro well (entspricht $5 \cdot 10^3$ Zellen/well) in 96-well-Platten pipettiert. Die Effektoren wurden mit jeweils 100 μ l pro well in verschiedenen Effektor-Target-Ratios hinzugegeben. Um die spontane Rate an Lyse von der spezifischen Lyse durch die NK-Zellen zu unterscheiden, wurden die Zielzellen in einem Ansatz nur mit 100 μ l Medium inkubiert ($Wert_{spontan}$). Die Bestimmung der maximal möglichen Freisetzung (entsprechend 100 % Lyse) wurde durch die Hinzugabe von 100 μ l 1 % Triton X ermittelt

($Wert_{maximal}$). Jeder Ansatz wurde als Triplet angelegt. Die Platten wurden für zwei Stunden bei 37 °Celsius, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂ inkubiert. Daraufhin wurde die 96-well-Platte für 5 Minuten bei 200 g zentrifugiert, 20 µl Überstände in Rundbodenplatten überpipettiert und jeweils 200 µl Europium-Lösung hinzugefügt. Bis zur Messung innerhalb der nächsten zwei Stunden wurde die Platte im Dunkeln belassen. Nun lässt sich die spezifische Lyse wie folgt berechnen:

$$Lyse = \frac{Wert_{probe} - Wert_{spontan}}{Wert_{maximal} - Wert_{spontan}} \cdot 100\% \quad (ii)$$

Zur Bestimmung der Signifikanz wurde der *Student's t-test* verwendet.

2.2.9 Kokultur zur Gewinnung von Überständen

Neben der direkten Zytotoxizität ist eine der Hauptaufgaben der NK-Zellen die Produktion von Zytokinen wie Interferon- γ . Somit kann die Freisetzung von Interferon- γ als Maß für die NK-Zellreaktivität gesehen werden.

Zur Gewinnung von Überständen wurden die Zielzellen auf $0,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt in 250 µl und eine Stunde mit den entsprechenden Antikörpern oder deren Isotyp Kontrollen bzw Medium bei 37 °Celsius, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂ inkubiert. Daraufhin wurden die Effektoren mit der Ratio von 1:10 bzw. 1:5 bzw. 1:1 hinzugegeben und bei 37 °Celsius, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂ inkubiert. Nach 24 Stunden wurde der Überstand abgenommen und Zellrückstände bei 2000 rpm 5 Minuten abzentrifugiert. Der nun mit Sicherheit zellfreie Überstand wurde bei -80 °Celsius bis zur Zytokinmessung mittels ELISA aufbewahrt.

2.2.10 Generieren von Überständen nach RANK-RANKL Interaktion auf AML Primärmaterial

Mitglieder der TNF/TNFR SFP senden bidirektionale Signale auch in die Liganden tragende Zelle. Zur Analyse der Wirkung von RANKL auf Blasten der AML nach Interaktion mit RANK wurden PBMCs von Patienten auf den immobilisierten RANK-Fc Fusionsproteinen inkubiert. Hierzu wurden in einer 24-well Platte Fu-

sionsprotein RANK-Fc WT und die entsprechende Isotypkontrolle mit $10/\mu\text{g/ml}$ über Nacht bei 4°Celsius inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden PBMCs der Patienten ($4 \cdot 10^6$ Zellen /well) in der 24-well Platte inkubiert. Nach 6 Stunden für die Analyse der TNF Menge bzw. nach 24 Stunden für die funktionellen Experimente und die Analyse der Interleukinmenge wurden die Zellen abzentrifugiert (2.000 rpm , 2 Minuten), der Überstand abgenommen und eingefroren.

2.2.11 ELISA

Der ELISA ist ein quantitativer Immunoassay, indem verschiedene Moleküle durch spezifische Antigen-bindende Antikörper (Sandwich-ELISA) detektiert werden können. Wie der Name besagt, ist dabei der erste Antikörper in einer festen Phase adsorbiert. Wird nun das Antigen hinzugegeben, kann Waschen als Trennmethode um freies Antigen und gebunden Antigen zu separieren genutzt werden. Anschließend wird ein zweiter Antikörper zur Detektion hinzugegeben, sodass sich ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex bildet. Um die Antigen-Konzentration berechnen zu können, wird der sekundäre Antikörper an ein Enzym gekoppelt, welches ein Substrat umsetzen kann. Das Substrat ist chromogen, seine Umsetzung führt zu einem Farbumschlag, welche erfasst und umgerechnet werden kann. Meist ist der zweite Antikörper Biotin-markiert, so dass Streptavidin-*horseradish peroxidase* (HRP) hinzugegeben wird, alternativ kann ein HRP-gekoppelter tertiärer Antikörper hinzugefügt werden. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde der *Student's t-test* verwendet.

2.2.11.1 Interferon- γ -ELISA

Eine Costar-Platte wurde mit 3 ng/ml *coating* Antikörper (verdünnt in Bovines Serum Albumin (BSA)-PBS) und über Nacht bei 4°Celsius inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Platte dreimal mit ELISA-Waschpuffer ($1\% \text{ PBS} + 0,5\% \text{ Tween } 20$) gewaschen und mit $1\% \text{ BSA-PBS}$ eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt, um unspezifische Bindungsstellen zu besetzen. Daran folgten drei weitere Waschschritte. Die Proben wurden aufgetaut und eine Standardreihe wurde angefertigt. Die Proben wurden in Tripletts mit je $50\mu\text{l}$ pro ml aufgetragen; die Standardreihe beginnend mit 3 ng in Dupplets. Nach der Inkubationszeit von 90 Minuten bei Raumtemperatur wurde der sekundäre Antikörper mit einer Konzentration von $1\mu\text{g/ml}$ im Volumen von $50\mu\text{l}$ hinzugefügt und für

weitere 90 Minuten inkubiert. Um ungebundene Antikörper zu entfernen folgten nun fünf weitere Waschschriffe, der Überstand wurde abgesaugt und 100 µl/well Streptavidin-HRP (Verdünnung 1:80000 in BSA-PBS) für 30 Minuten hinzugegeben. Nach weiteren sechs Waschschriffen, wurde 100 µl/well Substratlösung zugegeben. Schließlich wurde die Reaktion nach etwa 15 Minuten durch Zugabe von 100 µl/well 1 M H₃PO₄ angehalten und bei 45 nm ausgelesen.

2.2.11.2 IL-10-ELISA

Mit *Interleukin 10 matched pair for ELISA Cat.No:21339108* von ImmunoTools nach Anleitung des Herstellers. Dabei wurde der Coating Antikörper mit 1:1500 verdünnt, der Blocking Puffer mit 1% BSA-PBS angesetzt. Die Standardreihe wurde mit 2 ng/ml begonnen und in 1:3 titriert. Der sekundäre biotinylierte Antikörper wurde mit 1:5000 angesetzt. Poly-HRP Streptavidin wurde mit 1:30000 verdünnt verwendet.

2.2.11.3 IL-8-ELISA

Mit *BD OptEIA™ Set Human Il-8 Catalog Nummer 555244, former Catalog No. 2565KI* nach Anleitung des Herstellers. Die Standardreihe wurde mit 3 ng/ml begonnen und 1:3 titriert.

2.2.11.4 IL-6-ELISA

Mit *BD OptEIA™ Set Human IL-6 Catalog Nummer 555220, former Catalog No. 2645KI* nach Anleitung des Herstellers. Die Standardreihe wurde hierbei mit 3 ng/ml begonnen.

2.2.11.5 TNF-ELISA

Mit *BD OptEIA™ Human TNF ELISA Set Cat. No. 555212, former Catalog No. 2637KI* nach Anleitung des Herstellers. Die Standardreihe wurde hierbei mit 3 ng/ml begonnen und 1:3 titriert. Der *detektion antibody* wurde 1:500 verdünnt.

3. Ergebnisse

3.1 Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) zeigen RANK Expression auf ihrer Oberfläche

Um die Kontroverse über die Expression von RANK auf NK-Zellen zu klären, wurde die Expression mittels Durchflusszytometrie untersucht. Hierzu wurden frisch isolierte *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) kultiviert und zu verschiedenen Zeitpunkten mittels *fluorescence activated cell sorting* (FACS) analysiert. Die NK-Zellen wurden innerhalb der PBMCs Zellmasse als CD56⁺ und CD3⁻ selektiert. Man kann erkennen, dass frische NK-Zellen am Anfang so gut wie kein RANK exprimierten. Im Laufe der Kultivierung nahm die RANK Expression zu und erreichte ein Expressionsmaximum nach 72 Stunden (Abbildung 3.1 A oben, B). Dies zeigt, dass RANK unter bestimmten Bedingungen auf der Oberfläche von NK-Zellen exprimiert wird.

Um heraus zu finden, wodurch die Expression auf der NK-Zelloberfläche moduliert werden kann, inkubierten wir die PBMCs mit verschiedenen immunmodulierenden Interleukinen. Einzig durch die Zugabe von 10 ng pro ml IL-10 konnte die Expression zusätzlich gesteigert werden (Abbildung 3.1 A unten, B).

Da PBMCs kontinuierlich verschiedene Interleukine sezernieren und somit die NK-Zellen innerhalb der PBMCs beeinflusst werden können, untersuchten wir als nächstes das Expressionmuster von RANK auf *magnetic cell separation* (MACS)-isolierten NK-Zellen. Hierbei werden mithilfe von Antikörpern die NK-Zellen aus den PBMCs isoliert. Dabei konnte selbst nach einer Inkubation von 72 Stunden kaum RANK-Expression auf den NK-Zellen gefunden werden. Überraschenderweise führte auch der Zusatz von IL-10 nicht zu einer RANK-Expression (Abbildung 3.1 C links). Das deutet darauf hin, dass IL-10 allein nicht für die Expression von RANK auf NK-Zellen verantwortlich sein kann.

Allerdings ist bekannt, dass IL-10 die Sekretion immunmodulatorischer Substanzen durch die in den PBMCs enthaltenen Monozyten beeinflussen kann. Wurden daher den isolierten NK-Zellen MACS-isolierte autologe Monozyten hinzugefügt, konnte die RANK-Expression wiederhergestellt werden (Abbildung 3.1 C rechts). Um auszuschließen, dass direkte Zell-Zell-Interaktion für diesen Effekt verant-

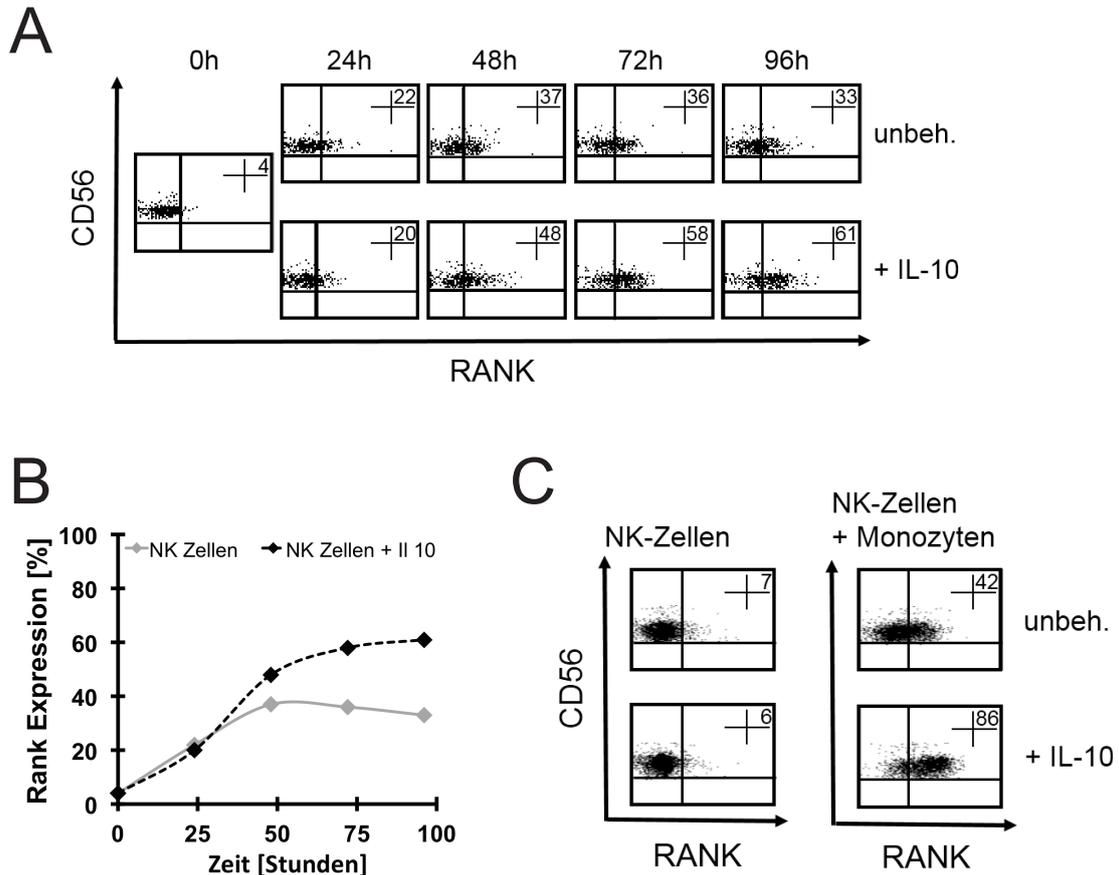


Abbildung 3.1: NK-Zellen zeigen RANK Expression auf ihrer Oberfläche.

(A) FACS Analyse der RANK Expression von NK-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 24, 48, 72, 96 Stunden). NK-Zellen wurden als CD56⁺ und CD3⁻ selektiert. RANK Expression wurde mit RANK Antikörper von R&D Systems detektiert. Oben: NK-Zellen enthaltende PBMCs wurden in PBMC Medium kultiviert. Unten: NK-Zellen enthaltende PBMCs mit 10 ng/ml IL-10 behandelt. Man erkennt den Anstieg der RANK Expression über die Zeit. Zugabe von IL-10 erhöht RANK Expression. (B) Quantitative Analyse von A. Unbehandelte NK-Zellen (grau) im Vergleich zu mit IL-10 behandelten NK-Zellen (schwarz). Dargestellt wird der prozentuale Anteil der RANK⁺ NK-Zellen (x-Achse) über die Zeit (y-Achse). (C) FACS Analyse der RANK Expression von NK-Zellen nach 72 Stunden (NK-Zellen selektiert wie in A). Vergleich der NK-Zellen in Monokultur links und Ko-Kultur mit Monozyten (rechts), unbehandelt (oben) und nach Zugabe von IL-10 (unten). Isolierte NK-Zellen weisen keine RANK Expression auf, wohingegen die Kultivierung mit Monozyten eine RANK Expression auslöst. IL-10 Behandlung von isolierten NK-Zellen induziert keine RANK Expression, jedoch steigert sich die RANK Expression nach IL-10 Behandlung, wenn NK-Zellen mit Monozyten kultiviert wurden.

wortlich ist, wiederholten wir obigen Versuch, indem wir die isolierten NK-Zellen und die isolierten Monozyten getrennt von einer Membran in einer Kulturplatte inkubierten (Transwell). So konnte die Expression lediglich durch sezernierte Substanzen beider Zellarten im Medium moduliert werden, ein direkter Zell-Zell-Kontakt ist durch die Membran nicht möglich. Auch in diesem Versuchsaufbau wurde die RANK-Expression auf NK-Zellen induziert (Daten nicht abgebildet). In beiden Versuchsaufbauten steigerte die Zugabe von IL-10 in Anwesenheit der Monozyten die RANK-Expression auf der NK-Zelloberfläche (Abbildung 3.1 C rechts). Daraus können wir schließen, dass von Monozyten sezernierte Substanzen die Expression von RANK auf NK-Zellen induzieren.

3.2 AML Blasten exprimieren RANKL

RANKL Expression konnte auf malignen Zellen diverser Erkrankungen, darunter auch die chronisch lymphatische Leukämie, gefunden werden. Daher ist es von besonderem Interesse, ob RANKL Expression ebenfalls auf der Oberfläche von Blasten der akuten myeloischen Leukämie (AML) zu finden ist. Um dies zu untersuchen, selektierten wir aus PBMCs von AML Patienten in der FACS-Analyse Blasten als CD33⁺/CD34⁺ Zellen. Abbildung 3.2 A zeigt Primärmaterial von sechs verschiedenen AML-Patienten (*unique personal number* (UPN) 1-6). Man erkennt, dass UPN1 bis UPN4 eine deutliche Expression von RANKL auf der Oberfläche der AML Blasten zeigten. UPN5 sowie UPN6 hingegen waren RANKL-negativ (RANKL⁻). Um dieses Ergebnis auf RNA Ebene zu verifizieren, wurde von B. Schmiedel eine Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (*reverse transkription polymerase-chain reaction*) (RT-PCR) mit diesem Primärmaterial durchgeführt. Diese bestätigte die FACS-Analyse und zeigte Expression von RANKL RNA bei UPN1 bis UPN4 (Abbildung 3.2 B). Auch das PCR-Ergebnis von UPN5 bestätigte die FACS-Analyse. UPN6 hingegen war bei der Oberflächenanalyse negativ, zeigte jedoch RANKL-Expression auf RNA-Ebene. Eine Expression auf RNA Ebene kann aber häufiger detektiert werden als auf der Zelloberfläche.

Die RANKL Expression könnte von dem Differenzierungsstadium der AML Blasten abhängen. Dies konnte bei anderen TNF Familienmitgliedern beispielsweise bei *glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein ligand* (GITRL) gezeigt

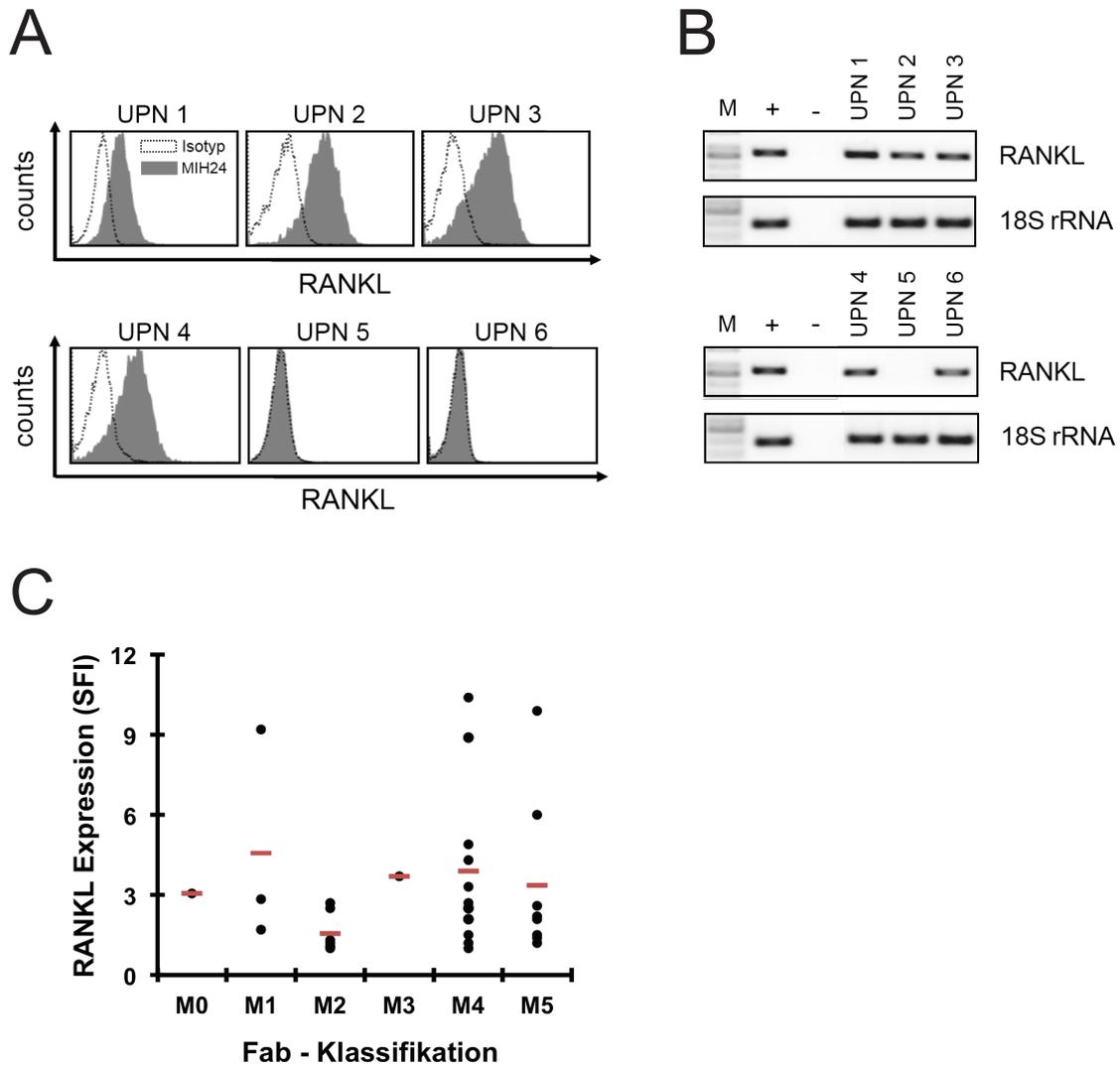


Abbildung 3.2: AML Blasten exprimieren RANKL.

(A) FACS Analyse der RANKL Expression auf Blastenoberfläche sechs verschiedener AML Patienten (UPN1-UPN-6). AML Blasten wurden als CD33⁺ und CD34⁺ selektiert. Man erkennt bei UPN1-UPN4 eine deutliche Singalverschiebung bei Detektion der RANKL Expression (grau). UPN5 und UPN6 hingegen zeigten keine RANKL Expression. (B) PCR-Analyse der mRNA Expression von RANKL von in A gezeigten Patienten UPN1 - UPN6. Negatives Resultat der RANKL mRNA Expression bei UPN5, sowie die positive RANKL mRNA Expression bei UPN1-4 bestätigen die FACS Analyse von A. UPN6 zeigt im Gegensatz zur FACS Analyse eine positive RANKL Expression. (C) RANKL Expression als SFI maligner Zellen aller untersuchten AML Patienten (n=31) (Selektion wie A). Patienten sind aufgeteilt nach ihrer Fab-Klassifikation. Der Median ist wird als roter Strich dargestellt. Es ist keine Korrelation zwischen Fab-Klassifikation und RANKL Expression erkennbar.

werden. Um einen möglichen Zusammenhang von RANKL Expression zum Differenzierungsstadium zu untersuchen, analysierten wir Oberflächenexpression verschiedener Patienten in Abhängigkeit ihrer FAB-Klassifikation. Wir sehen im Falle von RANKL allerdings keine eindeutige Korrelation (Abbildung 3.2 C).

3.3 RANKL-Transfizierte Mauszelllinien als Modell für AML-Blasten

Um die Rolle von RANK bei der Immunüberwachung von NK-Zellen zu untersuchen, wird ein Modell benötigt, in welchem sowohl RANKL⁺ als auch RANKL⁻ Zielzellen verfügbar sind. Hierzu wurden von Prof. M. Azuma, Universität Tokio, zwei murine Zelllinien (Lcells, P815) stabil mit humanem RANKL transfiziert, um RANKL Expression auf der Oberfläche der Zellen zu induzieren. Diese dienten als RANKL⁺ Zielzellen. Die parentalen, nicht transfizierten Zelllinien dienten als Negativkontrolle. Mit den beiden anti-RANKL Antikörpern MIH23 und MIH24, führten wir FACS Analysen der Zelllinien durch, um die RANKL Expression zu verifizieren. Man erkennt, dass die parentalen Lcells weder mit MIH23 Färbung noch mit MIH24 Färbung eine RANKL Expression aufwiesen (Abbildung 3.3 A oben). Dagegen erkennt man, dass die RANKL-transfizierten Lcells mit den beiden anti-RANKL-Antikörper eine deutlich RANKL Expression auf ihrer Oberfläche aufwiesen (Abbildung 3.3 A unten). Die Analyse der Zelllinie P815 erzielte ähnliche Ergebnisse, wobei hier MIH24 eine höheres Hintergrundsignal zeigte (Abbildung 3.3 B). Dies kann auf die Struktur des Antikörpers zurückgeführt werden, wodurch dieser unspezifisch an P815 binden kann. Durch Blockade unspezifischer Bindungsstellen kann die Bindung an RANK gefördert werden. Dennoch zeigt sich, dass die verwendeten Zelllinien Lcells und P815 insgesamt ein valides Modell für RANKL exprimierende AML Blasten sind.

3.4 Denosumab kann die RANK/RANKL Interaktion blockieren

Denosumab ist ein klinisch eingesetzter humaner RANKL-Antikörper. Im folgenden soll untersucht werden, ob Denosumab benutzt werden kann um RANK-RANKL-Interaktion zu blockieren. Vor Durchführung funktioneller Analysen muss-

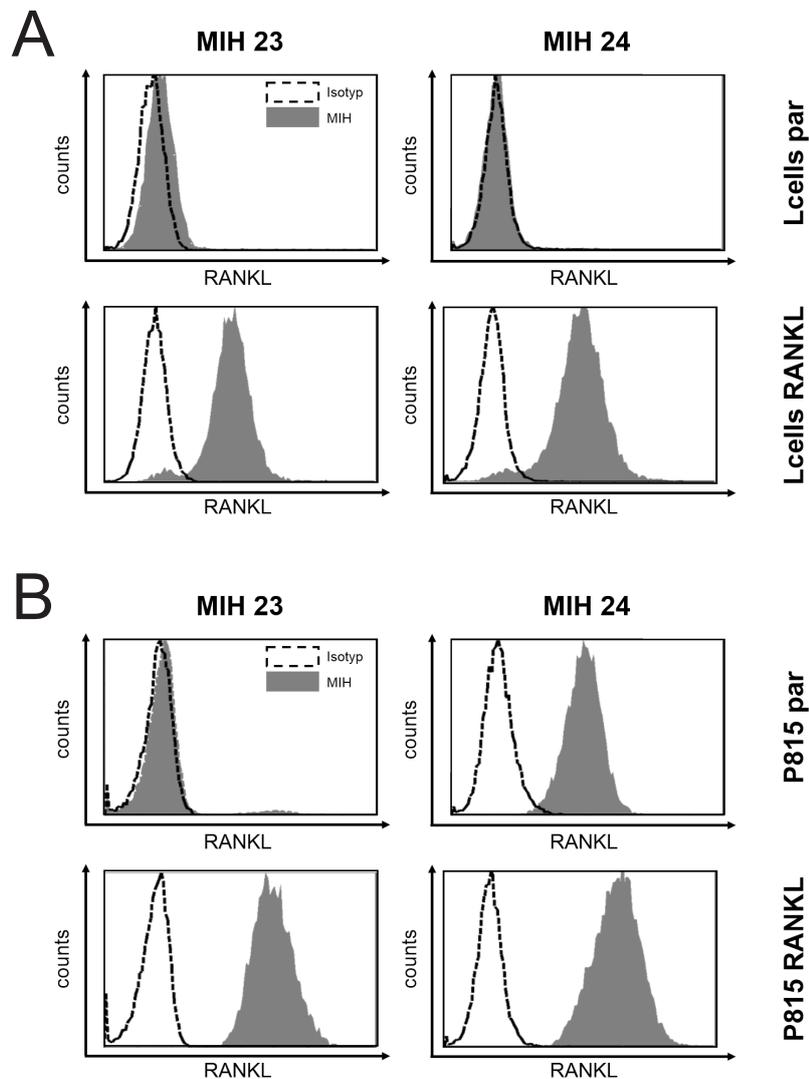


Abbildung 3.3: Transfizierte Mauszelllinien sind ein valides Modell für AML-Blasten.

(A) FACS Analyse der RANKL Expression auf der Oberfläche der Modelzelllinie L cells. Oben: parentale RANKL⁻ Zellen; unten: transfizierte RANKL⁺ Zellen. Deutliche Signalverschiebung bei den transfizierten Zellen bei der Färbung mittels MIH24 (rechts) und MIH23 (links) zeigt RANKL Expression. (B) FACS Analyse der RANKL Expression auf Modelzelllinie P815. Vergleichbares Ergebnis wie A, wobei die Isotypkontrolle von MIH23 bei der Modelzelllinie P815 ein höheres Hintergrundsignal zeigt.

te zunächst die Bindung von Denosumab an die Zielzellen untersucht werden.

3.4.1 Detektion von RANKL Oberflächen Expression durch Denosumab

Um die Bindung des Antikörpers Denosumab an RANKL, welches auf der Zelloberfläche exprimiert wird, zu charakterisieren, wurden zunächst Analysen mit den Modellzellen durchgeführt. Diese Untersuchung wurden für beide Zelllinien mit vergleichbarem Ergebnis durchgeführt - in Abbildung 3.4 werden nur die Ergebnisse für Lcells abgebildet.

Zunächst wollten wir feststellen, ob Denosumab spezifisch an die transfizierten Zellen bindet. Dazu wurde eine FACS-Analyse mit den Transfektanten und den Kontrollzellen durchgeführt, bei der die Bindung von Denosumab durch einen sekundären anti-humanen Antikörper dargestellt wurde. Um unspezifische Antikörperbindung von spezifischer unterscheiden zu können, verwendeten wir in unseren FACS-Analysen einen Antikörper der selben IgG-Klasse als Isotyp-Kontrolle. In Fall von Denosumab eignet sich Panitumumab, bei welchem weder eine Bindung an die Kontrollzellen noch an die transfizierten Zellen mittels FACS-Analyse gezeigt werden konnte. Man sieht eine eindeutige Bindung von Denosumab an die RANKL-transfizierten Zellen, jedoch nicht an die RANKL⁻ Zellen (Abbildung 3.4 A).

Analog zu der FACS-Analyse der Modellzelllinien, untersuchten wir die Bindung von Denosumab an PBMC-Primärmaterial von AML-Patienten. Allerdings beobachteten wir mit dem hier verwendeten sekundären anti-human Antikörper ein Signal, auch ohne vorhergehende Inkubation mit einem Primärantikörper (Daten nicht abgebildet). Deshalb vermuteten wir, dass dieser sekundäre Antikörper unspezifisch an die humanen Zellen gebunden hat.

Um das Detektionslimit des sekundären Antikörpers anzuheben, wurde Denosumab sowie die passende Isotyp-Kontrolle mit Biotin konjugiert und die Bindung durch einen Streptavidin-Antikörper sichtbar gemacht. Zuerst wurde die Bindung des Biotin-konjugierten Denosumab an die Modellzelllinien getestet: Mit dem Biotin-konjugiertem Denosumab erkennt man die Bindung von Denosumab

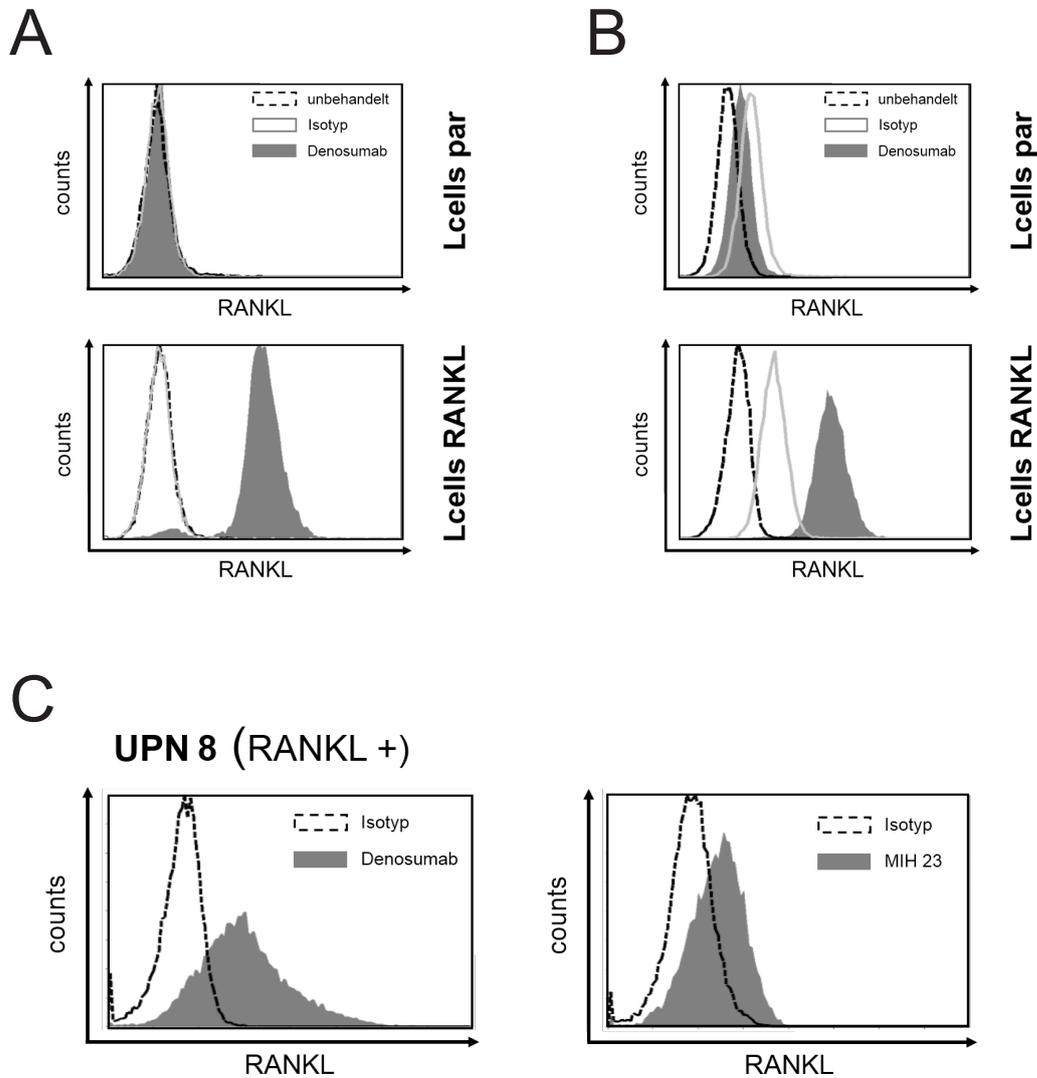


Abbildung 3.4: Denosumab bindet an RANKL auf Zielzellen.

(A) FACS Analyse der Bindung von Denosuman an RANKL⁺ Lcells. Vergleich von parentalen RANKL⁻ Zellen (oben) und RANKL⁺ Zellen (unten) nach Inkubation von Denosumab (dunkelgrau, flächig) oder Isotypkontrolle (hellgrau, gestrichelt). Transfizierte Zellen zeigen eine Signalverschiebung bei Denosumab Behandlung, parentale Zellen zeigen keine Denosumab Bindung. (B) FACS Analyse der Modelzelllinie Lcells wie in A mit Biotin-gekoppeltem Denosumab und Biotin-gekoppelter Isotypkontrolle Panitumumab. Ergebnis vergleichbar zu A, wobei biotin-gekoppelte Isotypkontrolle (hellgrau) ein leichtes Hintergrundsignal bei parentalen und transfizierten Zellen zeigt. (C) FACS Analyse der Bindung von RANKL Antikörper an AML Blasten. AML Blasten wurden als CD33⁺ und CD34⁺ selektiert. Vergleich der Bindung von Biotin-gekoppeltem Denosumab (links) und MIH23 (rechts) an RANKL⁺ Blasten von Beispielpatient UPN8. Denosumab sowie MIH 23 zeigen eine Signalverschiebung, die passenden Isotypkontrollen nicht.

spezifisch an die transfizierten Zellen bei negativer Isotyp-Kontrolle und keine Bindung an die RANKL⁻ Kontrollzellen (Abbildung 3.4 B).

Im nächsten Schritt wurde die Analyse an PBMC-Primärmaterial von AML-Patienten mit dem Streptavidin-konjugiertem Denosumab wiederholt: Die Analyse mittels des Biotin-konjugierten Denosumab in Kombination mit dem sekundären Streptavidin-Antikörper zeigte eine eindeutige Bindung an die AML-Zellen im Vergleich zur Biotin-konjugierten Isotyp Kontrolle (Abbildung 3.4 C).

3.4.2 Denosumab blockiert RANK-Fc Bindung

Um zu untersuchen, ob Denosumab die RANK-RANKL Interaktion blockieren kann, musste ausgeschlossen werden, dass Denosumab an ein Epitop von RANKL bindet, welches nicht an der RANK-RANKL Interaktion beteiligt ist. Dies kann mit Hilfe von RANK-Fusionsproteinen untersucht werden. Bei den RANK-Fusionsproteinen wird das Fc-Fragment eines humanen Antikörpers mit RANK gekoppelt. Hierdurch kann das RANK-Fusionsprotein wiederum an RANKL binden. Denosumab würde nun mit dem RANK-Fusionsprotein um die Bindung an RANKL konkurrieren. Verhindert Denosumab die Bindung des RANK-Fc-Fusionproteins, so inhibiert es die RANK-RANKL Interaktion.

3.4.2.1 Zelllinien

Zunächst wurde dies mit Modellzelllinien untersucht, indem RANKL⁺ transfizierte Zellen mit Denosumab behandelt wurden. Als Kontrolle wurden transfizierte Zellen unbehandelt gelassen oder mit Panitumumab als Isotypkontrolle behandelt. Danach wurden die Zellen mit dem RANK-Fc-Fusionsprotein sowie dessen passender Isotypkontrolle gefärbt und diese mit einem sekundären Antikörper detektiert, der spezifisch nur die IgG1 Struktur des RANK Fc erkennt. Dabei wurde mittels FACS-Analyse ausgeschlossen, dass der Sekundärantikörper an Denosumab bindet (Daten nicht abgebildet). Man kann erkennen, dass durch die Behandlung mit Denosumab die anschließende Bindung des RANK-Fc-Fusionsproteins deutlich reduziert wurde (Abbildung 3.5 A). Dies zeigt, dass Denosumab die RANK-RANKL Interaktion verhindern kann.

Bei Durchführung dieses Versuches mit RANKL⁻ Zellen konnte weder RANK-Fc-Fusion Bindung, noch eine Blockade beobachtet werden (Abbildung 3.5 B).

In simultanen Versuchen wurde untersucht, ob auch die anti-RANKL-Antikörper MIH23 und MIH24 die RANK-RANKL Interaktion blockieren können. Auch bei diesen konnte die Blockade der RANK-RANKL Interaktion bei RANKL⁺ Zellen gezeigt werden (Abbildung 3.5 C, D). Dies bedeutet, dass neben Denosumab alle in dieser Arbeit verwendeten anti-RANKL-Antikörper die Fähigkeit besitzen RANK-RANKL Interaktion zu blockieren.

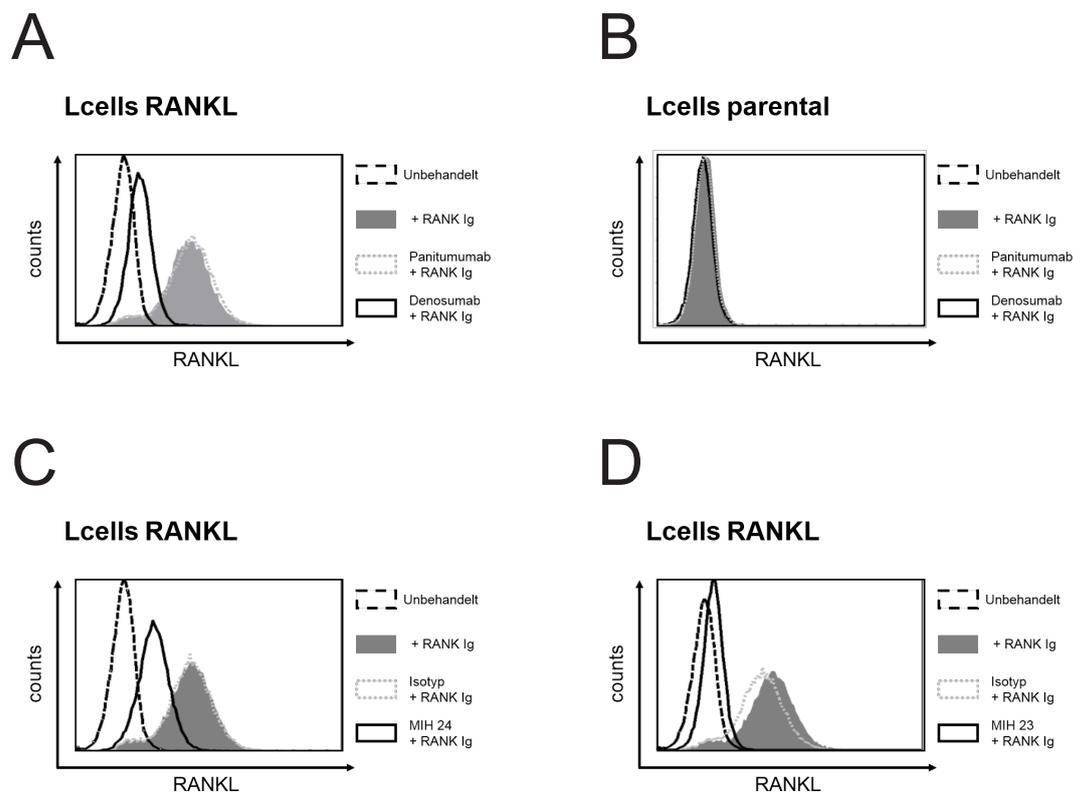


Abbildung 3.5: Denosumab blockiert die RANK-Fc Bindung.

(A) FACS Analyse der Bindung von RANK-Fc an transfizierte RANKL⁺ L cells bei der Behandlung mit Denosumab. Bindung des RANK-Fc-Ig (dunkelgrau, gefüllt) führt zu einer Signalverstärkung im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (schwarz, gestrichelt). Vorbehandlung mit der Isotypkontrolle Panitumumab (hellgrau, gepunktet) zeigt keine Veränderung. Denosumab Behandlung (schwarz) führt zu Minderung des RANK-Fc Signals. (B) FACS Analyse der Bindung von RANK-Fc an parentale RANKL⁻ L cells bei der Behandlung mit Denosumab wie in A. Keine Änderung des Signals bei Bindung des RANK-Fc. (C) FACS Analyse der Bindung von RANK-Fc an transfizierte RANKL⁺ L cells bei der Behandlung mit MIH24. Vergleichbares Ergebnis wie in A. (D) FACS Analyse der Bindung von RANK-Fc an transfizierte RANKL⁺ L cells bei der Behandlung mit MIH23. Vergleichbares Ergebnis wie in A.

3.4.2.2 AML-Primärmaterial

Als nächstes versuchten wir die obige Blockade mit Primärmaterial von an AML erkrankten Patienten durchzuführen. Allerdings scheiterte dies jedoch bereits daran, eine Bindung des RANK-Fc-Fusionsproteins an den AML Blasten zu detektieren. Da in der FACS-Analyse kein Bindungspeak des Fusionsproteins zu erkennen war, kann keine Aussage über die Fähigkeit der verwendeten Antikörper die RANK-RANKL Interaktion zu blockieren, gemacht werden.

3.5 Denosumab kann die NK-Zell-Zytotoxizität steigern

Nachdem eine erfolgreiche Blockade der RANK-RANKL Interaktion durch Denosumab bei den Modellzelllinien gezeigt wurde, wurde als nächstes untersucht, ob die RANK-RANKL-Interaktion Auswirkungen auf die NK-Zell-Funktionalität hat.

Da für die Regulation der RANK-Expression von NK-Zellen die Anwesenheit von Monozyten benötigt wird (siehe Kapitel 3.2), wurden in allen funktionellen Versuchen PBMCs, die RANK⁺ NK-Zellen beeinhalteten, als Effektoren verwendet.

3.5.1 RANK-RANKL Interaktion inhibiert NK-Zellen

Die nachfolgenden Versuche wurden mit beiden Modellzelllinien durchgeführt, abgebildet sind hier die Daten, welche mit der Zelllinie P815 erhoben wurden.

3.5.1.1 BADTA-Europium Cytotoxicity-Assay

Eine Hauptaufgabe der NK-Zellen ist die Lyse körperfremder Zellen (siehe Kapitel 1.4). Eine Möglichkeit die Lysefähigkeit gegenüber Zielzellen darzustellen, ist der BADTA-Europium *cytotoxicity assay*. Dabei nehmen die Zielzellen BADTA auf und setzen dieses um. Sobald diese lysiert werden, wird das Produkt frei, welches dann mittels Fluoreszenzsignal gemessen werden kann. Werden die gleichen Effektoren in einem Ansatz verwendet, kann die Lyse verschiede-

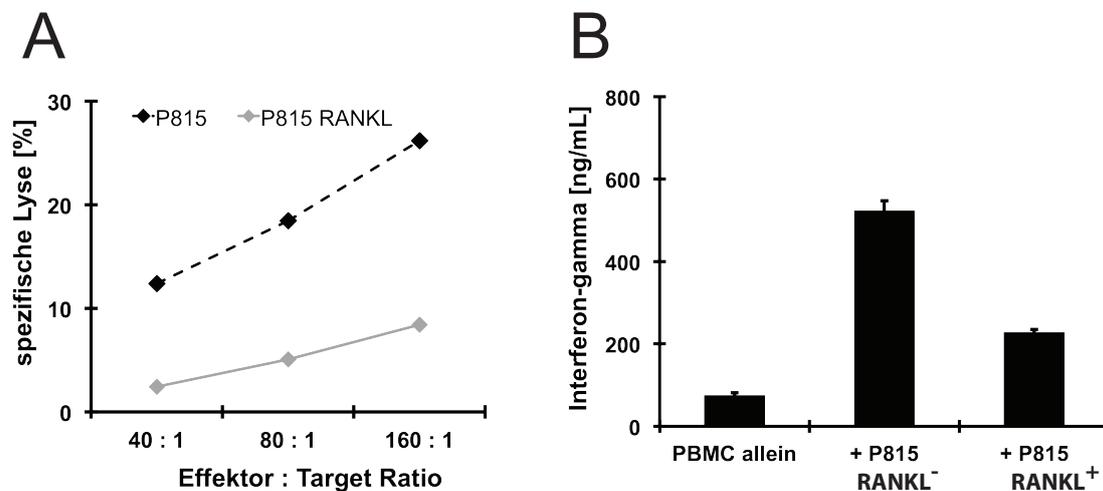


Abbildung 3.6: RANK-RANKL Interaktion inhibiert NK-Zellen.

(A) Vergleich der spezifischen Lyse parentaler RANKL⁻ P815 (schwarz, gestrichelt) sowie transfizierter RANKL⁺ P815 (grau, durchgehend) durch RANK⁺ NK-Zellen. Spezifische Lyse wurde bestimmt durch 2 Stunden BADTA-Europium *cytotoxicity assay*. Effektoren und Zielzellen wurden in verschiedenen Relationen verwendet. Lyse von transfizierten Zellen ist geringer als Lyse parentaler Zellen. (B) Analyse der Interferon- γ -Konzentration in Überständen von Kokultivierung von RANK⁺ NK-Zellen alleine (links), mit parentalen RANKL⁻ P815 (mitte) sowie transfizierten RANKL⁺ P815 (rechts). Überstände wurden nach 24 Stunden abgenommen und Interferon- γ Menge mittels ELISA gemessen. Interferon- γ Menge in der Kokultur mit transfizierten Zellen ist geringer als Kokultur mit parentalen Zellen. Alle verwendeten PBMCs wurden 72 Stunden kultiviert um RANK Expression auf NK-Zellen zu induzieren.

ner Zielzellen miteinander verglichen werden. Es wurden verschiedene Effektor-Target-Relationen verwendet, wobei bei steigender Effektorenzahl, die Lyserate anstieg. Die Analyse zeigt eindeutig, dass bei den gleichen RANK⁺ Effektoren die Lyserate der RANKL-transfizierten Zellen wesentlich geringer war als die der RANKL⁻ Kontrollzellen (Abbildung 3.6 A). Dies zeigt, dass die RANK-RANKL Interaktion negative Auswirkungen auf die Lyserate durch NK-Zellen und somit auf die NK-Zell-Funktionalität hat.

3.5.1.2 Interferon- γ -Produktion

Neben der spezifischen Lyse ist die Produktion von Zytokinen ein weiterer wichtiger Anteil an der NK-Zell-vermittelten Immunabwehr (siehe Kapitel 1.4). Als Surrogat der NK-Zell-Aktivität kann das immunstimulierende Interferon- γ in Überständen von Kokulturen der NK-Zellen mit Zielzellen gemessen werden. Wir konnten beobachten, dass in Kokultivierung mit RANKL⁺ Zellen RANK⁺ NK-

Zellen wesentlich weniger Interferon- γ produzierten als NK-Zellen, welche mit RANKL⁻ Zellen kokultiviert wurden (Abbildung 3.6 B). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die RANK-RANKL Interaktion die Sekretion immunmodulatorischer Substanzen und somit ebenfalls die NK-Zell-vermittelte Abwehr hemmen kann.

3.5.2 Blockade des RANK-RANKL Systems durch Denosumab führt zu Steigerung der NK-Zell Aktivität

Die beiden oben aufgeführten funktionellen Tests zeigten, dass RANK-RANKL Interaktion zu einer Hemmung der NK-Zell-Aktivität führt. Wir konnten zudem zeigen, dass Denosumab die Fähigkeit hat, diese Interaktion zu blockieren. Daher wollten wir die gleichen funktionellen Tests verwenden, um zu ergründen, ob eine Blockade der RANK-RANKL Interaktion die NK-Zellaktivität wiederherstellen kann.

3.5.2.1 BADTA-Europium Cytotoxicity-Assay

3.5.2.1.1 Zelllinien

Um den Effekt von Denosumab auf die Lyseaktivität der NK-Zellen zu testen, wurden die Zielzellen zunächst mit 10 μ g Denosumab vorbehandelt. Wir beobachteten, dass die Behandlung von RANKL-Transfektanten mit der Isotypkontrolle keine Veränderung der Lyse im Vergleich zu den unbehandelten RANKL-transfizierten Zellen zeigte. Hingegen führte Behandlung mit Denosumab zu einer Steigerung der Lyserate, welche vergleichbar war mit der Lyserate von RANKL-negativen Kontrollzellen (Abbildung 3.7 A). Dies bedeutet, dass Behandlung mit Denosumab die NK-Zell-Aktivität wiederherstellen kann. Jedoch ließ sich dieses Ergebnis nicht in allen Wiederholungen des Experiments mit NK-Zellen von verschiedenen Spendern zu erreichen.

Um einen Verdünnungseffekt im experimentellen Ansatz auszuschließen, wurde die verwendete Menge von Denosumab im Ansatz erhöht. Um die optimale Konzentration von Denosumab zu ermitteln, wurden zusätzlich Versuche mit gleichbleibender Effektor-Target-Ratio unter Titration der Denosumab-Konzentration durchgeführt. Dabei beobachten wir bei den RANKL-transfizierten Zellen

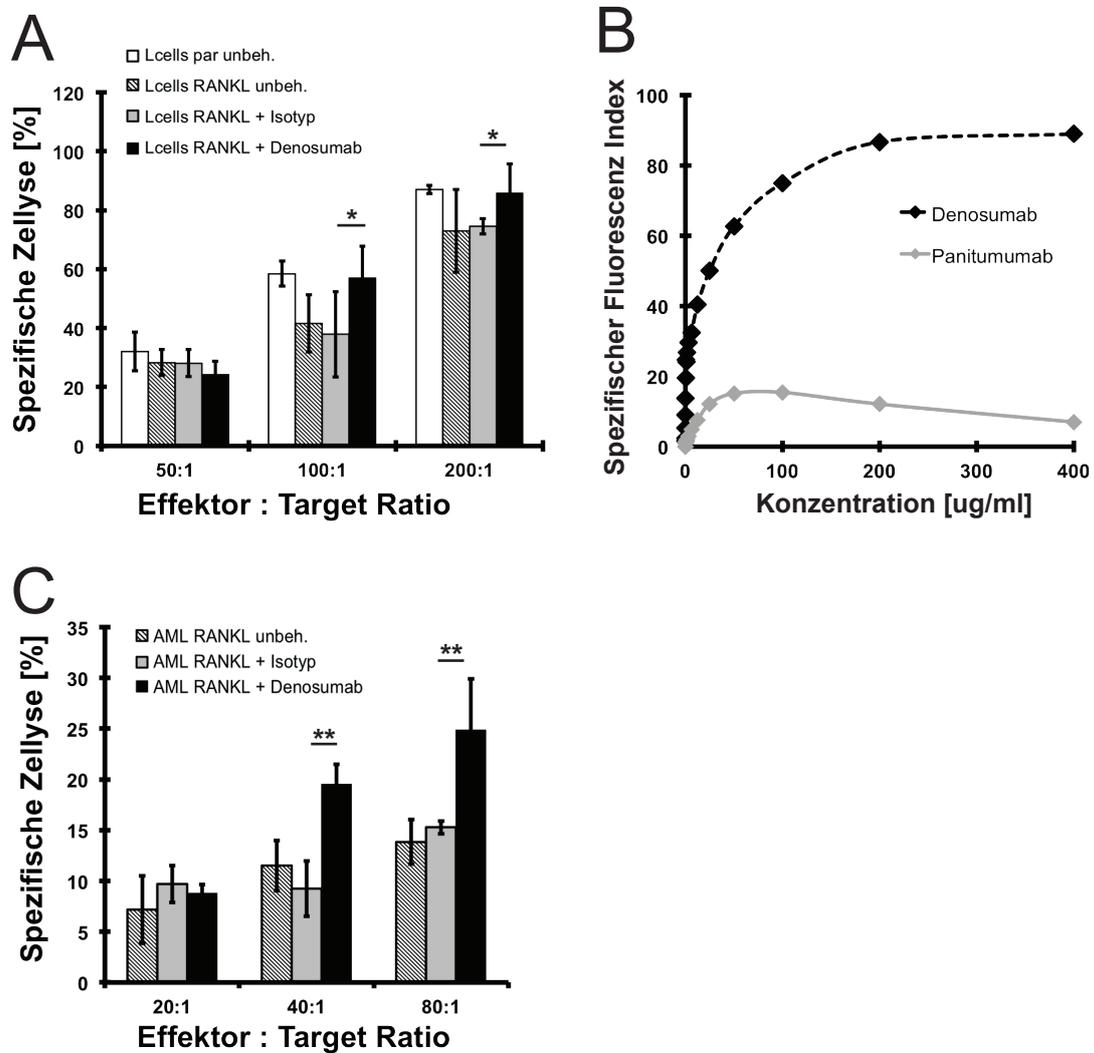


Abbildung 3.7: Blockade des RANK-RANKL Systems durch Denosumab führt zu Steigerung der NK-Zell Lyse.

(A) Spezifische Lyse von Lcells durch RANK⁺ NK-Zellen im BADTA-Europium *cytotoxicity assay*. Vergleich von unbehandelten parentaler RANKL⁻ (weiß) oder RANKL⁺ Lcells (gestrichelt) mit behandelten (Isotyp grau, Denosumab schwarz) + Lcells. Dargestellt sind verschiedene Effektor-Zielzell-Relationen. ($p < 0.5$ *, $p < 0.01$ **) (B) Bindung von Denosumab (schwarz) und Panitumumab (grau) in verschiedenen Konzentrationen an RANKL⁺ Zellen. Bindung wird bestimmt durch Messung des Spezifischen Fluoreszenz Index (C) Spezifische Lyse der Blasten von RANKL⁺ Patienten durch RANK⁺ NK-Zellen im BADTA-Europium *cytotoxicity assay*. Vergleich von unbehandeltem (gestrichelt) und behandeltem (Isotyp grau, Denosumab schwarz) Primärmaterial in verschiedenen Effektor-Zielzell-Relationen.

einen Anstieg der Lyserate mit steigender Denosumab-Konzentration (Abbildung 3.7 B). Die Behandlung der RANKL-transfizierten Zellen mit der Isotypkontrolle zeigte dabei keinen Effekt auf die Lyserate. Die parentalen Zellen blieben weitgehend unbeeinflusst von der Behandlung mit Denosumab (Daten nicht abgebildet).

Da die Lyserate von der Denosumabkonzentration abhängig war, wurden die nächsten Versuchsansätze mit höheren Denosumabkonzentration durchgeführt. Dabei überstieg die Endkonzentration von Denosumab allerdings nie 10 μ l/ml, damit ein klinischer Einsatz von Denosumab noch weiter gewährleistet werden kann, ohne dass die erhöhte Konzentration des Antikörpers toxische Nebenwirkungen hervorruft. Jedoch zeigten sich auch hier keine konstanten Ergebnisse mit Proben verschiedener Spender (Daten nicht abgebildet).

Zusammenfassend stellen wir fest, dass der Zytotoxizitätsassay nicht genügend optimiert werden und somit keine konsistenten Ergebnisse liefern konnte.

3.5.2.1.2 AML-Primärmaterial

Gemäß dem Vorgehen bei den Zellen des Modellsystems war auch bei den Untersuchung des Primärmaterials der nächste Schritt die Eruierung der Blockade in funktionellen Versuchen. Da während der Experimente mit den murinen Zelllinien der Verdacht aufkam, dass die Konzentration der Vorbehandlung entscheidend ist, beschlossen wir bei diesen Versuchen sofort mit höheren Denosumab Konzentrationen zu beginnen. Auch hier konnten wir in einigen Fällen beobachten, dass die Behandlung von RANKL⁺ Primärmaterial mit Denosumab zu einer erhöhten Lyserate im Vergleich zu den unbehandelten Zellen führte (Abbildung 3.7 C). Die Behandlung mit der Isotypkontrolle zeigte keine Steigung der Lyserate. Allerdings konnten auch hier wie in der Versuchsreihe mit der Zelllinie keine konstanten Ergebnisse erhalten werden.

3.5.2.2 Interferon- γ -Produktion

Da der BADTA-Europium Cytotoxicity-Assay keine konstanten Ergebnisse liefern konnte, versuchten wir die Wirkung von Denosumab auf die NK-Zell-Aktivität in einem anderen Verfahren zu testen. Dazu untersuchten wir wie oben die Zytokin-Ausschüttung von NK-Zellen-Zellen bei Kokultivierung mit RANKL⁺ Zellen nach

Behandlung mit Denosumab, um das Maß der Aktivierung der NK-Zellen zu erkennen.

3.5.2.2.1 Zelllinien

Die RANKL⁺-transfizierten Zellen sowie RANKL⁻ Kontrollzellen wurden für 24 Stunden mit 10 µg Denosumab behandelt. Wir konnten beobachten, dass nach Behandlung der RANKL⁺-Zellen mit Denosumab, die Interferon-γ Produktion von NK-Zellen beinahe auf das Level der NK-Zellen, die mit Kontrollzellen kultiviert wurden, stieg (Abbildung 3.8 A). Die Behandlung der RANKL⁺ Zellen mit der Isotypkontrolle hingegen zeigte keinen solchen Effekt (Daten nicht abgebildet). Auch bei der Cokultivierung von NK-Zellen mit Kontrollzellen zeigte sich der Interferon-γ-Spiegel bei beiden Behandlungen unverändert (Abbildung 3.8 A). Dies zeigt, dass die Behandlung mit Denosumab zu einer Wiederherstellung der Zytokinproduktion bei NK-Zellen führen kann. Der hier durchgeführte Versuch zeigte die Wiederherstellung der NK-Zell-Aktivität verlässlicher als der BADTA-Europium Cytotoxicity-Assay.

3.5.2.2.2 AML-Primärmaterial

Die isolierten RANKL⁺ PBMC von Patienten wurden analog zu dem Ansatz mit der Zelllinie für 24 Stunden mit 10 µg Denosumab behandelt. Die Behandlung mit Denosumab führte zu einem Anstieg der Interferon-γ-Produktion im Vergleich zur Kokultur mit unbehandelten Zellen (Abbildung 3.8 B links). Die Behandlung der Isotypkontrolle zeigte keine Änderung des Interferon-γ-Gehalts im Überstand. In der Durchführung mit RANKL⁻ PBMCs von AML-Patienten zeigte weder die Behandlung mit der Isotypkontrolle noch die mit Denosumab Unterschiede in der Interferon-γ-Produktion der Zellen (Abbildung 3.8 B rechts). Dies zeigt, dass die Behandlung mit Denosumab bei RANKL⁺ PBMCs eines Patienten zu einer Steigerung der Interferon-γ-Produktion führt.

Zusammenfassend stellen wir fest, dass in der Analyse der Interferon-γ-Produktion konsistente Ergebnisse zu produzieren waren. Dies lässt vermuten, dass die Blockade der RANK-RANKL-Interaktion durch Denosumab eine stärkere Auswirkung auf die Zytokinproduktion und -ausschüttung als auf die Zytotoxizität hat.

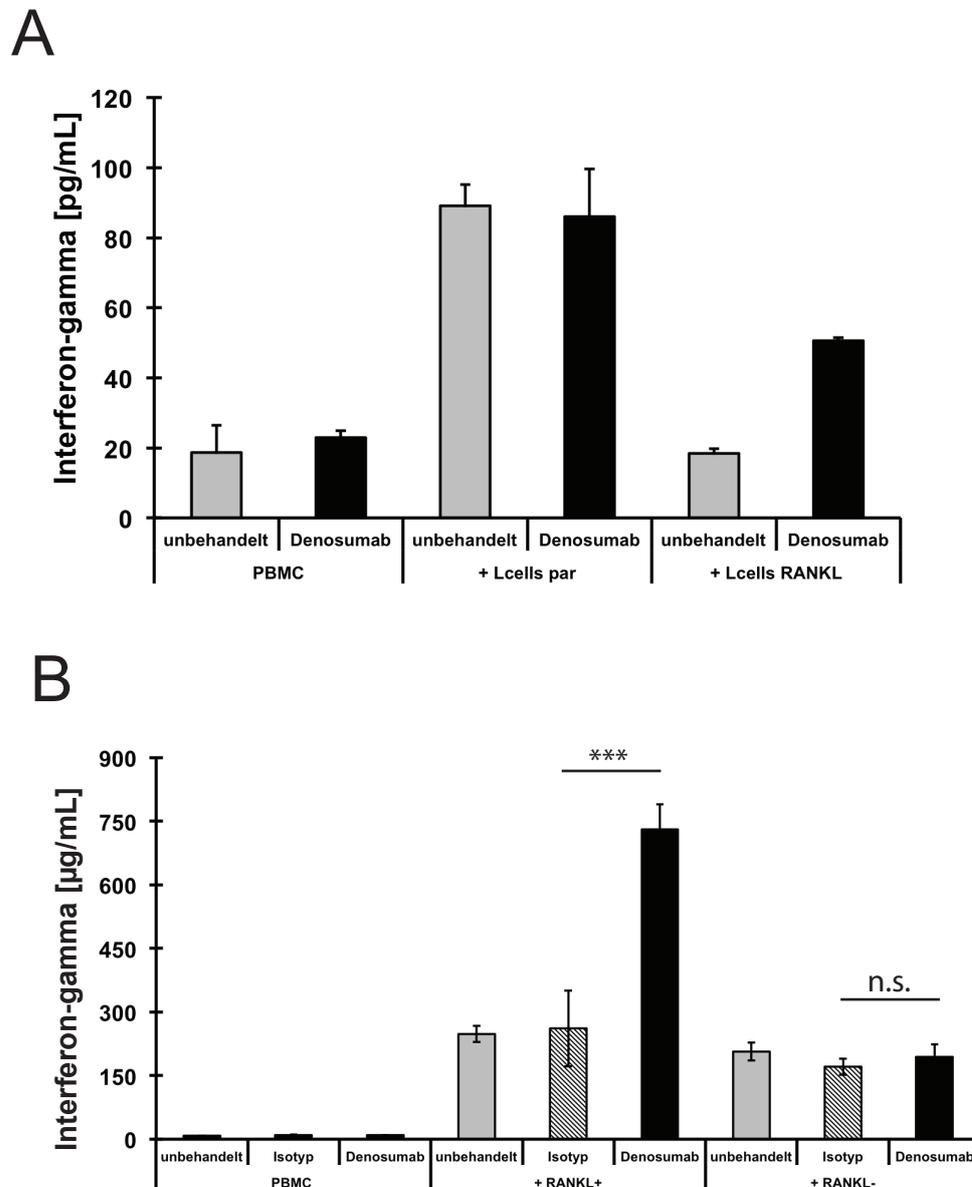


Abbildung 3.8: Blockade des RANK-RANKL Systems durch Denosumab führt zu Steigerung der NK-Zell Interferon- γ Produktion.

(A) Interferon-gamma Produktion von NK-Zellen in Überständen nach 24 Stunden Kokultivierung alleine (links), mit parentalen RANKL⁻ Lcells (mitte) sowie transfizierten RANKL⁺ Lcells (rechts). Interferon-gamma Menge wurde nach 24 Stunden mittels ELISA bestimmt. Vergleich von unbehandelten Zellen (grau) und Behandlung mit Denosumab (schwarz). Behandlung mit der Isotypkontrolle nicht gezeigt. Denosumab Behandlung führt bei Kokultur mit transfizierten Zellen zu Steigerung der Interferon-gamma Produktion. (B) Interferon-gamma Produktion von NK-Zellen wie in A. Kokultivierung der NK-Zellen alleine (links), mit RANKL⁺ AML PBMCs (mitte) sowie RANKL⁻ AML PBMCs (rechts). Vergleich von unbehandelt Zellen (grau) und Behandlung mit Isotyp (gestrichelt), sowie mit Denosumab (schwarz). Denosumab Behandlung führt bei Kokultur mit RANKL⁺ AML PBMC zur signifikanten Steigerung der Interferon-gamma Produktion.

(n.s.= nicht signifikant, $p < 0.5$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.05$ ***) Alle verwendeten PBMCs wurden 72 Stunden kultiviert um RANK Expression auf NK-Zellen zu induzieren.

3.6 RANKL⁺ AML-Blasten verringern NK-Zell-Aktivität durch Ausschüttung von Zytokinen

3.6.1 RANK-RANKL Interaktion moduliert Sekretion immunmodulatorischer Zytokine durch RANKL⁺ AML-Blasten

Die Expression von RANKL auf AML-Blasten kann nicht nur Einfluss auf die NK-Zellen haben, sondern auch die Blasten selbst. Es ist bekannt, dass verschiedene TNF-Familienmitglieder Signale in beide Richtungen weiterleiten können, also auch in die Liganden-exprimierende Zelle. Daher untersuchten wir die Sekretion von immunmodulatorischen Zytokinen durch AML-Blasten nach RANK-RANKL Interaktion. Dafür wurden RANKL⁺ Blasten von AML-Patienten auf immobilisierten RANK-Fusionsproteinen, oder PBS und IgG1 als Kontrolle, kultiviert und die Überstände mittels ELISA untersucht. Dies zeigte, dass RANKL-Signaling zu einer Steigerung der IL-6, IL-8, IL-10 und TNF Produktion von Leukämiezellen führt (Abbildung 3.9). Wurde dieser Ansatz mit RANKL⁻ Blasten von AML-Patienten wiederholt, konnte keine Zytokinausschüttung gemessen werden (Abbildung 3.9). Jedoch zeigten Zellen aus verschiedenen Patienten unterschiedliche Freisetzungsmuster. Dies zeigt, dass RANK-RANK Interaktion die Sekretion von immunmodulatorischen Zytokinen durch RANKL⁺ AML-Blasten moduliert.

3.6.2 Sezernierte Zytokine verringern die NK-Zell-Zytotoxizität

Um zu überprüfen, ob die Ausschüttung dieser immunmodulatorischen Zytokine Einfluss auf die NK-Zell vermittelte Immunabwehr haben, verwendeten wir die Überstände aus obigem Versuch zur Behandlung von NK-Zellen im Zytotoxizitätsassay gegen RANKL⁻ Zielzellen (HL-60). Die Überstände von RANKL⁺ AML-Blasten verringerten die Zytotoxizität der NK-Zellen (Abbildung 3.10 A).

Im Gegensatz dazu zeigten die Überstände von RANKL⁻ AML-PBMC bei der Behandlung von NK-Zellen keine Veränderung der spezifischen Lyse (Abbildung

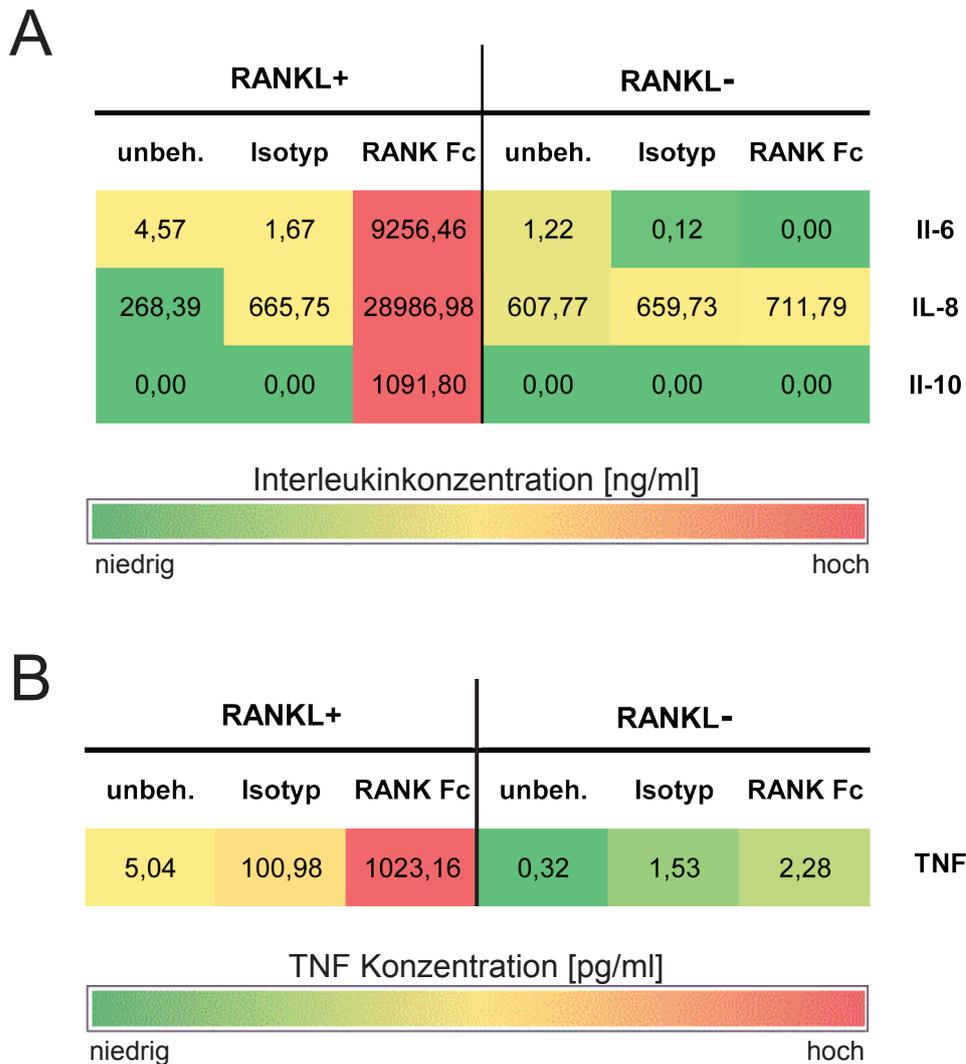


Abbildung 3.9: RANKL⁺ stimuliert die Freisetzung von Zytokinen durch AML-Blasten.

(A) Kultivierung von PBMCs von AML Patienten alleine (links), mit humanen IgG1 als Isotypkontrolle (mitte) oder mit immobilisiertem RANK-Fc-Fusionsprotein (rechts). Bestimmung der Interleukinkonzentration (IL-6, IL-8, IL-10) mittels ELISA. Vergleich von RANKL⁺ PBMCs eines AML Patienten (links) mit RANKL⁻ PBMCs (rechts). Kultivierung RANKL⁺ Blasten auf RANK-Fc-Fusionsprotein induziert Ausschüttung aller drei getesteten Interleukine. (B) Kultivierung der Zellen wie A. Bestimmung der TNF-Konzentration mittels ELISA. Kultivierung RANKL⁺ Blasten auf RANK-Fc-Fusionsprotein induziert TNF-Ausschüttung.

3.10 B). Dies zeigt, dass RANKL die Ausschüttung von Zytokinen durch AML-Blasten bedingt, welche die NK-Zellaktivität hemmen.

3.6.3 Sezernierte Zytokine verringern die NK-Zell-Degranulierung

Ein Äquivalent zur Beurteilung der NK-Zell-Aktivität ist die Messung der Degranulierung von NK-Zellen, da diese ihre Zielzellen hauptsächlich durch Ausschüttung von Enzymen wie Perforin und Granzym lysieren. Deshalb analysierten wir, ob die Überstände aus 3.6.1 ebenfalls Auswirkungen auf die Degranulierung von NK-Zellen hatten. NK-Zellen wurden mit den Überständen von RANKL⁺ AML-Blasten behandelt und mit HL-60 kokultiviert. Anschließend wurden diese NK-Zellen mittels FACS-Analyse auf den Oberflächmarker CD107a untersucht. Dieser ist ein surrogativer Marker für die Degranulierung von NK-Zellen und somit deren Immunantwort. In der Analyse erkennt man, dass isolierte NK-Zellen kaum CD107a auf ihrer Oberfläche aufwiesen. Wurden NK-Zellen mit HL-60 kultiviert, beobachteten wir einen Anstieg des Signals (Abbildung 3.11 A). Nach Behandlung mit den Überständen von RANKL⁺ Blasten, zeigte sich eine Reduktion der CD107a Expression (Abbildung 3.11 B). Überstände von RANKL⁻ AML-Blasten hingegen bewirkten keine Veränderungen der Oberflächenexpression von CD107a (Abbildung 3.11 C). Dies zeigt, dass die sezernierten Zytokine ebenfalls Auswirkung auf die Degranulierung der NK-Zellen und somit der NK-Zell-Aktivität haben.

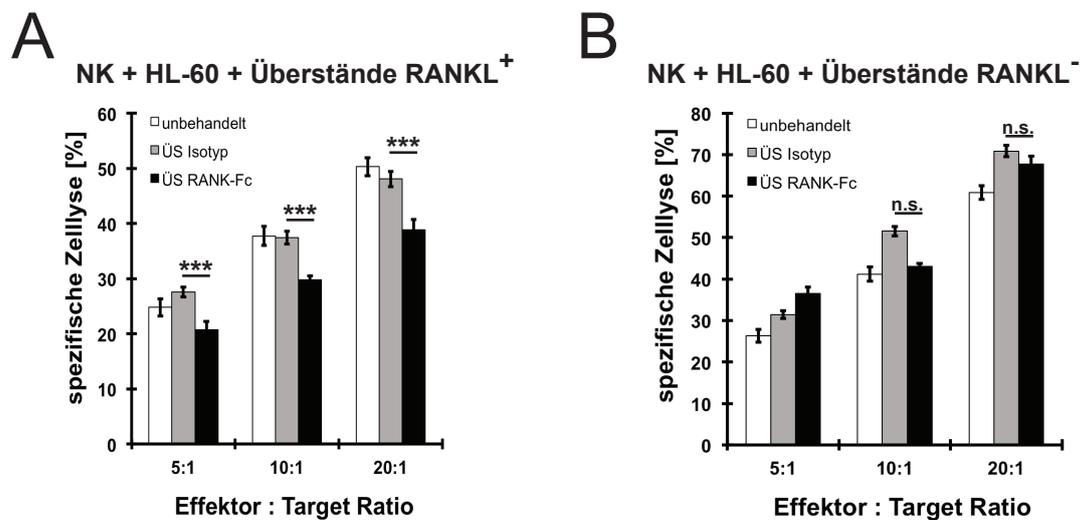


Abbildung 3.10: RANKL⁺ AML-Blasten verringern die Lyse von Zielzellen durch NK-Zellen durch Ausschüttung von Zytokinen.

Kultivierung von PBMCs von primären AML Zellen mit humanen IgG1 als Isotypkontrolle (Isotyp), mit immobilisiertem RANK-Fc-Fusionsprotein (RANK-Fc) und Gewinnung der Überstände (ÜS). ÜS wurden mit PBMCs von gesunden Spendern als Effektoren und Zelllinie HL-60 kultiviert. **(A)** Spezifische Lyse von HL-60 durch NK-Zellen nach Behandlung mit Überständen (ÜS) von RANKL⁺ AML PBMCs. Vergleich von PBMCs nach Kokultivierung mit Isotypkontrolle (grau), RANK-Fc Fusionsprotein (schwarz) und unbehandelten Zellen (weiss). Signifikante Senkung der spezifischen Lyse von HL-60 durch NK-Zellen bei Behandlung mit ÜS nach Kultivierung mit immobilisiertem RANK-Fc-Fusionsprotein. (n.s.= nicht signifikant, $p < 0,1$ *, $p < 0,05$ **, $p < 0,001$ ***) **(B)** Analyse der spezifischen Lyse von HL-60 durch NK-Zellen bei Verwendung von Überständen von RANKL⁻ AML Zellen. PBMCs behandelt wie in A. Keine signifikanten Unterschiede der spezifischen Lyse von HL-60 durch NK-Zellen bei Verwendung der verschiedenen Überstände.

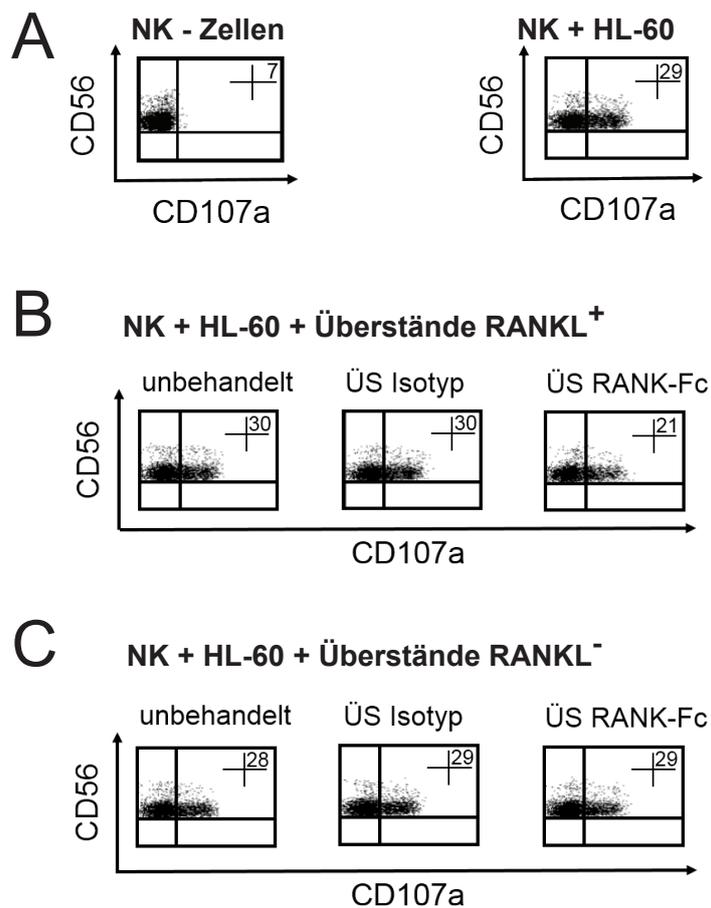


Abbildung 3.11: RANKL⁺ AML-Blasten verringern NK-Zell-Degranulierung durch Ausschüttung von Zytokinen.

(A) FACS Analyse der CD107a Expression als Marker der Degranulierung von NK-Zellen. NK-Zellen wurden als CD56⁺ und CD3⁻ selektiert. Vergleich von NK-Zellen in Monokultur (links) oder in Kokultur mit HL-60 (rechts). Kultivierung von NK-Zellen mit HL-60 steigert die Expression von CD107a. (B, C) FACS Bestimmung der Degranulierung von NK-Zellen in Kokultur mit HL-60 bei Verwendung von Überständen von RANKL⁺ (B) oder ⁻ (C) AML Zellen. PBMCs behandelt wie in A. Einzig die Behandlung mit Überständen von RANKL⁺ PBMCs behandelt mit RANK-Fc Fusionsproteinen führt zu einer Senkung der Degranulierung.

4. Diskussion

4.1 RANK Expression auf NK-Zellen

Es herrschte bisher Unklarheit darüber, ob NK-Zellen RANK auf ihrer Oberfläche exprimieren. Während Atkins *et al.* eine RANK Expression auf NK-Zellen zeigen konnten [92], war dies in früheren Arbeiten [93] nicht möglich. Wir konnten zeigen, dass RANK unter bestimmten Bedingungen auf der Oberfläche von NK-Zellen exprimiert wird. Eine Grundvoraussetzung für RANK Expression auf NK-Zellen ist dabei die Anwesenheit von Monozyten über die Zeit der Kultivierung. Wir konnten weiterhin zeigen, dass die Dauer der Kultivierung entscheidend ist und RANK Expression mit der Zeit zunimmt. Während Shalhoub *et al.* zwar keine Expression auf NK-Zellen finden konnten, beobachteten sie jedoch ebenfalls eine Zunahme der RANK Expression bei PBMCs auf RNA-Ebene über die Zeit der Kultivierung [93]. Das ist konsistent mit unseren Daten. Diese Beobachtung könnte auch eine Erklärung für die zuvor unterschiedlichen Ergebnisse liefern. Denn überraschenderweise wurden die Analysen der Oberflächenexpression in der Arbeit von Shalhoub *et al.* jedoch nur zu einem, vermutlich frühem, Zeitpunkt untersucht [93]. Dies könnte erklären, wieso hierbei keine RANK Expression auf NK-Zellen gefunden werden konnte. Atkins *et al.* hingegen findet in seinen Analysen RANK Expression auf NK-Zellen, jedoch ist der Zeitpunkt der Analysen nicht klar definiert [92]. Wir konnten neu zeigen, dass der Zeitpunkt der Analyse wichtig ist, weshalb die beiden Studien nicht direkt miteinander verglichen werden können und somit die unterschiedlichen Ergebnisse erklärt werden können.

Dieser Anstieg deutet auf eine Regulierung der RANK Expression über die Zeit hin. Weiterhin wird diese Annahme einer Regulation der RANK Expression auf NK-Zellen im peripheren Blut durch folgende Beobachtung gestützt: Atkins *et al.* fanden, dass der Anteil der RANK exprimierenden NK-Zellen im peripheren Blut und im Knochenmark gleicher Spender nicht korrelierten. Dies deuteten sie als Hinweis für eine Regulation der RANK Expression [92]. Diese Regulation könnte mögliche Unterschiede in den Expressionslevel erklären.

Wir konnten beobachten, dass die RANK Expression auf NK-Zellen weiterhin durch Zugabe von IL-10 gesteigert werden kann. Dabei führte nur die Zugabe von IL-10 zur Gesamtmenge der PBMCs zu einer Steigerung der RANK Ex-

pression auf NK-Zellen, nicht jedoch bei isolierten NK-Zellen. Wir konnten des weiteren zeigen, dass der Anstieg der RANK Expression durch IL-10 die Anwesenheit von Monozyten benötigt. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass nicht eine direkte Zell-Zell-Interaktion hierfür verantwortlich ist, da die RANK Expression auch in Versuchen mit einem Transwell erfolgreich gesteigert werden konnte. Dies deutet daraufhin, dass IL-10 indirekt über Monozyten die RANK Expression auf NK-Zellen reguliert. Diese Hypothese ist ebenfalls von anderen aufgestellt worden. Es konnte früh gezeigt werden, dass die Wirkung von IL-10 auf NK-Zellen und auf T-Zellen nicht direkt stattfinden, sondern indirekt über die Regulation der Monozytenfunktion [96]. Diese Regulation geschieht über die Alteration verschiedener Mechanismen wie beispielsweise der Monokine Synthese [96]. Bei NK-Zellen konnte die immunsupprimierende Wirkung von IL-10 durch eine solche Regulation der Monozytenfunktion erklärt werden. So konnte gezeigt werden, dass IL-10 die Interferon- γ von NK-Zellen hemmt. Dies geschieht durch die Hemmung der IL-12-Synthese von Monozyten. IL-12, auch *natural killer cell stimulatory factor* genannt, fördert die Interferon-Produktion der NK-Zellen und somit auch die NK-Zell-Funktion [97]. In Annahme, dass hierbei IL-10 zu einer Reduktion der NK-Zell-Funktion führt, könnte spekuliert werden, dass auch durch IL-10 induzierte RANK Expression zu einer Reduktion der NK-Zell-Funktion führt.

Welcher Mechanismus zur Steigerung der RANK Expression führt, muss in zukünftigen Arbeiten untersucht werden.

4.2 RANKL auf AML Blasten

Der Ligand von RANK (RANKL) konnte auf der Zelloberfläche von Blasten der chronisch lymphatischen Leukämie gefunden werden [94]. Darüber hinaus ist bekannt, dass eine RANK-RANKL Interaktion Auswirkung auf die Entstehung und Verbreitung von Malignomen hat [90, 91]. Da wir zeigen konnten, dass NK-Zellen RANK Expression auf ihrer Oberfläche besitzen, ist nun von besonderem Interesse ob der Ligand RANKL ebenfalls auf Blasten der AML zu finden ist. Dies ist insofern wichtig, da gezeigt werden konnte, dass NK-Zellen eine große Rolle bei der Immunüberwachung von Leukämien spielen [21, 25]. Wir konnten ein Patientenkollektiv finden, welches Expression von RANKL auf der Blastenoberlä-

che zeigte. Darüber hinaus konnten wir das Vorhandensein von RANKL auf RNA Ebene bestätigen.

Interessanterweise fanden sich Patienten, bei denen RANKL Expression auf RNA Ebene gefunden wurden, jedoch kein RANKL auf der Zelloberfläche detektiert werden konnte. Obwohl es sich bei den untersuchten Proben um Material mit nahezu ausschließlich Blasten handelte, kann jedoch die Expression auf RNA Ebene verfälscht worden sein, durch andere nicht maligne Zellen, die physiologisch RANKL exprimieren, wie beispielsweise T-Zellen [70, 89, 98]. Eine andere Erklärung für das Vorliegen von mRNA ohne Oberflächenexpression ist die Freisetzung von löslichem RANKL. Das Vorliegen von löslichem RANKL konnte bei T-Zellen in der Interaktion mit DC gefunden werden [99]. Solch lösliches RANKL entsteht aufgrund von alternativem *splicing* oder *shedding*. Es konnte gezeigt werden, dass aus dem RANKL Gen durch alternatives *splicing* drei Isoformen von RANKL entstehen. Eine dieser Formen hat keine Transmembrandomäne und wird daher als lösliches Produkt angesehen [100]. Lösliches RANKL kann auch entstehen, indem RANKL von der Oberfläche abgeworfen wird. Dieser Vorgang wird auch *shedding* genannt. Für RANKL konnte *shedding* bei T-Zellen beobachtet werden [101]. Man konnte früh zeigen, dass Zellen Mitglieder der *TNF/TNF receptor superfamily proteinss*(TNF/TNFR SFPs) mit Hilfe von Metalloproteinasen von der Oberfläche abwerfen, um der Immunantwort zu entkommen [102]. Diesen Mechanismus machen sich auch Leukämiezellen beispielsweise beim *TNF/TNF receptor superfamily proteinss*(TNF/TNFR SFPs) Mitglied CD40 [103] oder CD137L [55, 104] zu Nutze. Das Vorliegen von löslichem RANKL könnte daher eine Form der Regulation darstellen, welche maligne Zellen als *immune escape* Mechanismen nutzen und die Diskrepanz zwischen RNA und Expression erklären.

Die Untersuchung zu löslichem RANKL soll im Rahmen einer anderen Arbeit weiter geführt werden. Dabei sollen die AML Blasten auf das Vorliegen der alternativen *splicing* RNA untersucht werden. Darüber hinaus ist ein Ziel der Vergleich der Spiegel von löslichem RANKL im Serum von AML Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden. Können hierbei Unterschiede gefunden werden, so kann dies darauf hin deuten, dass lösliches RANKL Einfluss auf die Krankheit hat. Bei der primären Osteoarthritis konnten erhöhte Spiegel von löslichem RANKL gefunden werden. Die Höhe der Spiegel konnten hierbei mit der Krankheitsschwere

korreliert werden [105]. Im Falle von löslichem RANKL bei AML Patienten muss ebenfalls untersucht werden, ob Serumlevel und Krankheitsschwere miteinander korrelieren.

Über eine Prädiktion, welche AML Zellen RANKL aufweisen, konnten wir bisher keine Aussage machen, da wir keine Assoziation mit FAB-Klassifikation oder WHO-Klassifikation ausmachen konnten.

4.3 Denosumab kann die NK-Zell Aktivität wiederherstellen

Wir konnten zeigen, dass Denosumab spezifisch an RANKL⁺ AML Blasten bindet. Darüber hinaus konnten wir beweisen, dass Denosumab die Fähigkeit besitzt RANK-RANKL Interaktion zu blockieren. Dies ist sehr interessant, da wir zeigen konnten, dass RANK-RANKL Interaktion die NK-Zell-Cytotoxizität und Zytokinproduktion und somit die NK-ZellenNK-Zell-Aktivität hemmt.

4.3.1 Modellzelllinien

Die Behandlung mit Denosumab führte in unseren funktionellen Experimenten mit den Modellzelllinien Lcells und P815 zu einer Steigerung der spezifischen Lyse sowie der Zytokinproduktion. Diese Wiederherstellung der NK-Zell-Aktivität konnte jedoch nicht in allen Wiederholungen des Versuches mit verschiedenen NK-Zellen erreicht werden.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass Verdünnungseffekte in den durchgeführten Versuchen zu einer geringeren Konzentration von Denosumab unterhalb der Sättigung führt. In unseren Experimenten mit verschiedenen Konzentrationen von Denosumab sahen wir eine normale Sättigung des Antikörpers. Höhere Konzentrationen von Denosumab wurden nicht verwendet, um eine klinische Einsatzfähigkeit ohne toxische Nebenwirkungen zu gewährleisten.

Eine Erklärung könnte man in den verschiedenen Effektoren finden. Bei jedem neuen Ansatz wurden andere NK-Zellen verwendet. Unter den verschiedenen Spendern konnten unterschiedliche Menge an RANK mittels FACS detektiert werden. Inwiefern eine unterschiedliche Menge an RANK in Zusammenhang mit der

gesamten NK-Zell Funktion steht, bleibt in zukünftigen Arbeiten zu erarbeiten. Insgesamt fehlt ein eindeutiger Hinweis auf die Ursache der fehlenden Reproduktivität.

4.3.2 AML Primärmaterial

In funktionellen Ergebnissen mit Primärmaterial von AML Patienten zeigten wir, dass die spezifische Lyse und die Zytokinproduktion durch die Behandlung mit Denosumab verbessert werden konnte und somit Denosumab die NK-Zell-Aktivität wieder herstellen kann. Jedoch konnten auch hier nicht bei allen Wiederholungen mit unterschiedlichen NK-Zellen von verschiedenen Spendern dieser Effekt beobachtet werden. Eine Ursache dafür kann vielleicht im experimentellen Ansatz gefunden werden.

In diesem Aufbau sollte eine allogene Stammzelltransplantation imitiert werden, indem in funktionellen Experimenten NK-Zellen von gesunden Spendern als Effektoren und Primärmaterial von AML Patienten als Zielzellen genutzt wurden. Bei der Transplantation werden allerdings haplo-differente Spender ausgesucht um einen *graft-versus-leukemia* Effekt zu erzielen. Dabei werden nach der *missing-self*-Hypothese die Leukämiezellen des Empfängers durch die NK-Zellen des Spenders auf Grund des *HLA-mismatch* als fremd erkannt und lysiert. In unserem Experiment bestand eine zufällige Zuteilung von AML Patienten und NK-Zellen, daher war ein *HLA-mismatch* nicht mit Sicherheit gegeben. Um dieses zu erzeugen und diese mögliche Fehlerquelle auszuschließen, wollten wir Patienten- und Spenderpaare ausmachen, bei denen die NK-Zellen des Spenders eine Lyse der Patientenzellen bewirken. Die Zusammenstellung sollte nicht anhand von Typisierung von HLA Merkmalen erfolgen, wie es bei der Transplantation stattfindet, sondern funktionell anhand von Vorversuchen im BADTA-Zytotoxizitätsassay. Diese Zusammenstellung stellte sich als schwieriges Unterfangen dar, da im Vergleich zur Suche bei Transplantation nur eine geringe Menge an Spendern zu Verfügung stand. Bei den wenigen gefundenen Paaren, bei der gesunde NK-Zellen die Patientenzellen suffizient attackierten, konnte der Denosumab Effekt leider auch nicht konsistent reproduziert werden.

Jedoch ist die NK-Zell-Aktivität nicht nur vom *HLA-mismatch* abhängig. Die *induced-self*-Hypothese besagt, dass die NK-Zell-Aktivität von einer Balance aus

inhibierenden und aktivierenden Signalen abhängig ist. Eine Ursache für die fehlende NK-Zell-Aktivität könnten weitere inhibierende Signale von Patientenblasten sein. Beispiele für weitere inhibierende Rezeptoren, welche bei NK-Zellen gefunden werden konnten und durch Interaktion mit Liganden auf AML Blasten die NK-Zell-Aktivität negativ beeinflussen, sind unter anderem CD94/NKG2A [106] und CD137 [55]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Balance aller Signale wichtiger sind, als ein einziges Signal [13–15]. Somit kann angenommen werden, dass eine Ursache für die fehlende Lyse von AML Zellen durch NK-Zellen in manchen Wiederholungen unseres Experiment, daher rührt, dass übrige inhibierende Signale auf AML Blasten überwogen haben, auch wenn Denosumab die RANK-RANKL Interaktion blockiert hat.

Da die NK-Zellen für die Vorversuche und diejenigen für die Denosumab Blockade zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen werden, kann es auch sein, dass sich selbst NK-Zellen vom selben Spender unterscheiden. Wir konnten beobachten, dass die RANK Expression auf NK-Zellen in den verschiedenen Blutentnahmen, selbst vom selben Spender großen Schwankungen unterlagen. Dies lässt vermuten, dass die RANK Expression auf NK-Zellen einer so starken Regulation unterliegt, dass keine passenden Paare gefunden werden können. Dies würde mit unseren Experimenten, die eine Regulation der RANK Expression auf NK-Zellen nahe legen, übereinstimmen. Somit konnte dieses funktionelle *matching* zu keiner deutlichen Verbesserung des experimentellen Aufbaus führen.

Die dargestellten Gründe für die inkonsistenten Ergebnisse schmälern die klinische Einsatzfähigkeit von Denosumab bei AML Patienten. Deshalb bleibt zu eruieren, in welchen Fällen die Blockade der RANK-RANKL klinisch relevant ist. Momentan ist es nicht vorhersehbar, welcher Patient einen positiven Effekt von Denosumab zu erwarten hat.

Wir konnten jedoch beobachten, dass die Denosumab Blockade häufiger zu einer Wiederherstellung der Interferon-Produktion führen konnte, als zu einer Wiederherstellung der NK-Zell-Zytotoxizität. Deshalb vermuteten wir, dass die RANK-RANKL Interaktion einen stärkeren Einfluss auf die Zytokinproduktion nimmt. Innerhalb einer NK-Zell Population nehmen verschiedene NK-Zellen unterschiedliche Aufgaben wahr: NK-Zellen mit hoher CD56-Expression werden als CD56^{bright}

bezeichnet und sind hauptsächlich für die Zytokinproduktion verantwortlich [3]. In zukünftigen Arbeiten, könnte untersucht werden, ob RANK Expression, diejenigen NK-Zellen stärker betrifft, die die Zytokinproduktion als Aufgabe übernehmen.

4.4 Bidirektionale Signale von RANKL

Wir untersuchten als nächstes, ob die RANK-RANKL Interaktion eine mögliche Auswirkung auf RANKL⁺ Blasten hat. Dies ist von besonderem Interesse, da zahlreiche Mitglieder der TNF/TNFR SFP bidirektionale Signale vermitteln [107]. Ein Beispiel für bidirektionale Signalwirkung ist die Wirkung von CD40L auf der Oberfläche von T-Zellen. Bindet CD40 an seinen Liganden CD40L sendet dieser Signale in die T-Zelle, welche eine Produktion von IL-4 auslösen [108, 109]. Für RANKL konnte *reverse signaling* bei T-Zellen gefunden werden [110]. RANKL, welches auf T-Zellen exprimiert ist, löst über den *p38 mitogen-activated protein kinase* (p38 MAPK) eine Steigerung der Interferon- γ Produktion aus. Interagiert RANK mit RANKL bleibt die Aktivierung der p38 MAPK aus, welches eine Senkung der Interferon- γ Ausschüttung zur Folge hat.

Wir konnten beobachten, dass RANK-RANKL Interaktion über RANKL-*Signaling* zu einer Zytokinproduktion in RANKL⁺ Blasten der AML führte. Wir konnten nicht nur die Ausschüttung eines einzigen Zytokins beobachten, sondern eine Freisetzung unterschiedlicher Zytokine. Darunter fanden wir IL-6, IL-8, IL-10 und TNF. Wir beobachteten, dass verschiedene Patienten nicht das gleiche Freisetzungsmuster der Zytokine zeigten. Jedoch zeigte immer sich eine Erhöhung mindestens eines Zytokins.

Wie diese unterschiedliche Freisetzungsmuster zu Stande kommen, könnte durch den Mechanismus der Signalübertragung in die Blasten erklärbar sein. Jedoch konnte der genaue Mechanismus der Signalübertragung eines Liganden in die Zelle bisher nicht bei allen Mitgliedern der TNF/TNFR SFP ausreichend geklärt werden [111]. Es konnte bisher nur gezeigt werden, dass das zurückgeleitete Signal von RANKL in die T-Zellen über den p38 MAPK Signalweg die Interferon- γ Produktion induziert [110]. In zukünftigen Experimenten könnte der Mechanismus des *reverse signaling* bei RANKL⁺ AML Blasten näher untersucht werden.

Es konnte gezeigt werden, dass veränderte Zytokinausschüttung eine wichtige Rolle in der Tumorgenese spielt [112, 113]. Beispielsweise konnten TNF und IL-8 in signifikant höheren Leveln im Serum von AML Patienten gefunden werden verglichen mit gesunden Probanden. Diese erhöhten Zytokinspiegel konnten in Zusammenhang mit einer schlechteren Prognose gebracht werden [114, 115]. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass RANK-RANKL Interaktion bei der chronisch lymphatischen Leukämie zu einer vermehrten Freisetzung von IL-8 führte. Dieses wiederum verringerte die spontane Apoptose der malignen Zellen. Dies deutet darauf hin, dass die vermehrte Ausschüttung von IL-8 über RANK-RANKL Interaktion zur Pathogenese der chronisch lymphatischen Leukämie beisteuert. Wir konnten zeigen, dass RANK-RANKL Interaktion zu einer erhöhten Freisetzung von Zytokinen führt. Somit liefern unsere Ergebnisse Hinweise darauf, dass das RANK-RANKL System auch in die Pathogenese der AML involviert sein könnte.

Da die niedrigere NK-Zell Aktivität mit der Entstehung und Verbreitung von Malignomen in Verbindung gebracht werden konnte [23–25], war von besonderem Interesse, inwiefern die in den Überständen enthaltenden Zytokine in die NK-Zell Aktivität eingreifen. Wir konnten feststellen, dass die Überstände von RANKL⁺ AML-Blasten die Zytotoxizität der NK-Zellen gegenüber anderen Zellen hemmen. Zusätzlich konnten wir zeigen, dass die sezernierten Zytokine Einfluss auf die Degranulierung von NK-Zellen haben. Dies zeigt, dass die Zytokine in den Überständen von RANKL⁺ Patienten PBMCs die NK-Zell Aktivität hemmen. Dies stützt weiterhin unsere Hypothese, dass das RANK-RANKL System eine Rolle in der Pathogenese der AML spielen könnte.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Denosumab RANK-RANKL Interaktion blockieren kann. In zukünftigen Experimenten kann die Blockade der RANK-RANKL Interaktion bei der Zytokinausschüttung nach RANKL-*signaling* erprobt werden. Dadurch konnte die Einsatzfähigkeit von Denosumab, welche momentan als eingeschränkt zu beurteilen ist, erweitert werden.

5. Zusammenfassung

NK-Zellen sind ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Sie erkennen körperfremde und entartete körpereigene Zellen anhand von Oberflächenproteinen und können diese zerstören. Die erfolgreiche Elimination der Zielzelle ist abhängig von der Balance aktivierender und inhibierender Signale. Diese Signale werden durch die Oberflächenproteine der Zielzellen und der passenden Rezeptoren auf den NK-Zellen bestimmt. Solche Oberflächenproteine sind beispielsweise die Mitglieder der *TNF/TNF receptor superfamily proteinss* (TNF/TNFR SFPs). Ein Beispiel dafür ist der für die Osteohomöostase essentielle Rezeptor RANK und sein Ligand RANKL.

RANK konnte auf verschiedenen Zellen des Immunsystems gefunden werden. Es wurde vermutet, dass RANK auf NK-Zellen exprimiert wird. Entsprechend könnte die RANK-RANKL Interaktion Einfluss auf die Immunüberwachung durch NK-Zellen haben. Diese Hypothese wird durch zwei wichtige Beobachtungen gestützt: Zum einen konnte gezeigt werden, dass das RANK-RANKL System Einfluss auf die Entstehung und Verbreitung von Malignomen nimmt. Zum anderen wurde RANKL auf der Oberfläche von Blasten der chronisch lymphatischen Leukämie gefunden werden. Daher sollte die Expression von RANKL auf anderen Zellen leukämischer Erkrankungen untersucht werden. Von besonderem Interesse ist die AML, da dort die beschränkten therapeutischen Möglichkeiten erweitert werden müssen.

Ziel dieser Arbeit war die Expression von RANK auf NK-Zellen zu überprüfen und eine Expression von RANKL auf AML Blasten zu testen. Darüber hinaus sollte der Einfluss der RANK-RANKL Interaktion auf die Funktion der NK-Zellen während der Immunüberwachung der AML untersucht werden. Im Falle einer funktionellen Relevanz, kann diese Interaktion für therapeutische Zwecke beeinflusst werden. Hierfür wurde in dieser Arbeit der klinisch erprobte RANKL-Antikörper Denosumab verwendet.

Wir konnten zeigen, dass NK-Zellen RANK auf ihrer Oberfläche exprimieren können. Für die Expression ist allerdings die Anwesenheit von Monozyten notwendig. Außerdem fanden wir unter den AML Patienten, ein Patientenkollektiv mit RANKL⁺ Blasten. Wir konnten zeigen, dass die Interaktion von RANK-RANKL Einfluss auf die NK-Zellen und auf RANKL⁺ Blasten hat.

Bei NK-Zellen führt Interaktion von RANK-RANKL zur Reduktion der NK-Zell spezifischen Lyse und Interferon-gamma Produktion. Somit stellt das RANK-RANKL System ein inhibierendes Signal für die Immunüberwachung durch NK-Zellen dar. Eine Blockade der RANK-RANKL Interaktion ist somit ein potentes Ziel für die therapeutische Behandlung. Wir konnten zeigen, dass der Antikörper Denosumab spezifisch an RANKL bindet und die RANK-RANKL Interaktion behindern kann. Behandlung mit Denosumab konnte zu einer Wiederherstellung der NK-Zell spezifischen Lyse und der Interferon gamma Produktion führen. Jedoch konnte dieser Effekt nicht mit allen NK-Zell Spendern erreicht werden.

Bei RANKL⁺ AML-Blasten konnten wir zeigen, dass eine RANK-RANKL Interaktion zu einer Sekretion von immunmodulatorischen Zytokinen führt. Diese so geschaffene Microumwelt führt wiederum zur Reduktion der der NK-Zell Zytotoxizität und Degranulierung der NK-Zellen und somit zur verminderten der NK-Zell-Aktivität. Damit konnte in dieser Arbeit eine wichtige Rolle des RANK-RANKL Molekularsystems sowohl bei der AML als auch bei NK-Zellen belegt werden.

Literaturverzeichnis

- [1] Charles Janeway. *Immunobiology*. The Immune System In Health And Disease. Harcourt Health Sciences, 2005.
- [2] R M Zinkernagel. On immunological memory. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 355(1395):369–71, March 2000.
- [3] M A Cooper, T A Fehniger, and M A Caligiuri. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in immunology*, 22(11):633–40, November 2001.
- [4] R B Herberman, M E Nunn, and D H Lavrin. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 16(2):216–29, August 1975.
- [5] R Kiessling, E Klein, H Pross, and H Wigzell. "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *European journal of immunology*, 5(2):117–21, February 1975.
- [6] K Kärre, H G Ljunggren, G Piontek, and R Kiessling. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature*, 319(6055):675–8, January 1986.
- [7] H G Ljunggren and K Kärre. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunology today*, 11(7):237–44, July 1990.
- [8] F M Karlhofer, R K Ribaldo, and W M Yokoyama. MHC class I allo-antigen specificity of Ly-49+ IL-2-activated natural killer cells. *Nature*, 358(6381):66–70, July 1992.
- [9] A Moretta, C Bottino, M Vitale, D Pende, R Biassoni, M C Mingari, and L Moretta. Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annual review of immunology*, 14:619–48, January 1996.
- [10] A Moretta and L Moretta. HLA class I specific inhibitory receptors. *Current opinion in immunology*, 9(5):694–701, October 1997.
- [11] N M Valiante, K Lienert, H G Shilling, B J Smits, and P Parham. Killer

- cell receptors: keeping pace with MHC class I evolution. *Immunological reviews*, 155:155–64, February 1997.
- [12] Eric Vivier, Jacques A Nunès, and Frédéric Vély. Natural killer cell signaling pathways. *Science (New York, N.Y.)*, 306(5701):1517–9, November 2004.
- [13] a Cerwenka, J L Baron, and L L Lanier. Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(20):11521–6, September 2001.
- [14] A Diefenbach, E R Jensen, A M Jamieson, and D H Raulet. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature*, 413(6852):165–71, September 2001.
- [15] Lewis L Lanier. NK cell recognition. *Annual review of immunology*, 23:225–74, January 2005.
- [16] Yanan T Bryceson, Michael E March, Hans-Gustaf Ljunggren, and Eric O Long. Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunological reviews*, 214:73–91, December 2006.
- [17] Eric Vivier, David H Raulet, Alessandro Moretta, Michael A Caligiuri, Laurence Zitvogel, Lewis L Lanier, Wayne M Yokoyama, and Sophie Ugolini. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science (New York, N.Y.)*, 331(6013):44–9, January 2011.
- [18] L L Lanier. NK cell receptors. *Annual review of immunology*, 16:359–93, January 1998.
- [19] Daniel B Stetson, Markus Mohrs, R Lee Reinhardt, Jody L Baron, Zhi-En Wang, Laurent Gapin, Mitchell Kronenberg, and Richard M Locksley. Constitutive cytokine mRNAs mark natural killer (NK) and NK T cells poised for rapid effector function. *The Journal of experimental medicine*, 198(7):1069–76, October 2003.
- [20] W L Elkins, A Pickard, and G R Pierson. Deficient expression of class-I HLA in some cases of acute leukemia. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, 18(2):91–100, January 1984.

- [21] Christian Demanet, Arend Mulder, Veronique Deneys, Maria J Worsham, Piet Maes, Frans H Claas, and Soldano Ferrone. Down-regulation of HLA-A and HLA-Bw6, but not HLA-Bw4, allospecificities in leukemic cells: an escape mechanism from CTL and NK attack? *Blood*, 103(8):3122–30, April 2004.
- [22] Magali Terme, Evelyn Ullrich, Nicolas F Delahaye, Nathalie Chaput, and Laurence Zitvogel. Natural killer cell-directed therapies: moving from unexpected results to successful strategies. *Nature immunology*, 9(5):486–94, May 2008.
- [23] B a Pierson and J S Miller. CD56+bright and CD56+dim natural killer cells in patients with chronic myelogenous leukemia progressively decrease in number, respond less to stimuli that recruit clonogenic natural killer cells, and exhibit decreased proliferation on a per cell basis. *Blood*, 88(6):2279–87, September 1996.
- [24] Kazue Imai, Satoru Matsuyama, Satoshi Miyake, Kenji Suga, and Kei Nakachi. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *The Lancet*, 356(9244):1795–1799, November 2000.
- [25] Mark W Lowdell, Rose Craston, David Samuel, Marion E Wood, Elena O'Neill, Vaskar Saha, and H Grant Prentice. Evidence that continued remission in patients treated for acute leukaemia is dependent upon autologous natural killer cells. *British journal of haematology*, 117(4):821–7, June 2002.
- [26] F Tajima, T Kawatani, A Endo, and H Kawasaki. Natural killer cell activity and cytokine production as prognostic factors in adult acute leukemia. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 10(3):478–82, March 1996.
- [27] F Aversa, A Tabilio, A Terenzi, A Velardi, F Falzetti, C Giannoni, R Iacucci, T Zei, M P Martelli, and C Gambelunghe. Successful engraftment of T-cell-depleted haploidentical "three-loci incompatible transplants in leukemia patients by addition of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells to bone marrow inoculum. *Blood*, 84(11):3948–55, December 1994.

- [28] F Aversa, A Tabilio, A Velardi, I Cunningham, A Terenzi, F Falzetti, L Ruggeri, G Barbabietola, C Aristei, P Latini, Y Reisner, and M F Martelli. Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *The New England journal of medicine*, 339(17):1186–93, October 1998.
- [29] Y Reisner and M F Martelli. Stem cell escalation enables HLA-disparate haematopoietic transplants in leukaemia patients. *Immunology today*, 20(8):343–7, August 1999.
- [30] Massimo F Martelli, Franco Aversa, Ester Bachar-Lustig, Andrea Velardi, Shlomit Reich-Zelicher, Antonio Tabilio, Hilit Gur, and Yair Reisner. Transplants across human leukocyte antigen barriers. *Seminars in hematology*, 39(1):48–56, January 2002.
- [31] E Ciccone, D Pende, O Viale, C Di Donato, G Tripodi, A M Orengo, J Guardiola, A Moretta, and L Moretta. Evidence of a natural killer (NK) cell repertoire for (allo) antigen recognition: definition of five distinct NK-determined allospecificities in humans. *The Journal of experimental medicine*, 175(3):709–18, March 1992.
- [32] E Ciccone, D Pende, O Viale, A Than, C Di Donato, A M Orengo, R Biassoni, S Verdiani, A Amoroso, and A Moretta. Involvement of HLA class I alleles in natural killer (NK) cell-specific functions: expression of HLA-Cw3 confers selective protection from lysis by alloreactive NK clones displaying a defined specificity (specificity 2). *The Journal of experimental medicine*, 176(4):963–71, October 1992.
- [33] G Bellone, N M Valiante, O Viale, E Ciccone, L Moretta, and G Trinchieri. Regulation of hematopoiesis in vitro by alloreactive natural killer cell clones. *The Journal of experimental medicine*, 177(4):1117–25, April 1993.
- [34] L Ruggeri, M Capanni, M Casucci, I Volpi, a Tosti, K Perruccio, E Urbani, R S Negrin, M F Martelli, and a Velardi. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 94(1):333–9, July 1999.
- [35] Loredana Ruggeri, Marusca Capanni, Elena Urbani, Katia Perruccio, Warren D Shlomchik, Antonella Tosti, Sabrina Posati, Daniela Rogaia, Fran-

- cesco Frassoni, Franco Aversa, Massimo F Martelli, and Andrea Velardi. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5562):2097–100, March 2002.
- [36] Peter Parham and Karina L McQueen. Alloreactive killer cells: hindrance and help for haematopoietic transplants. *Nature reviews. Immunology*, 3(2):108–22, February 2003.
- [37] Daniela Pende, Stefania Marcenaro, Michela Falco, Stefania Martini, Maria Ester Bernardo, Daniela Montagna, Elisa Romeo, Céline Cognet, Miryam Martinetti, Rita Maccario, Maria Cristina Mingari, Eric Vivier, Lorenzo Moretta, Franco Locatelli, and Alessandro Moretta. Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity. *Blood*, 113(13):3119–29, March 2009.
- [38] Sebastian Giebel, Franco Locatelli, Teresa Lamparelli, Andrea Velardi, Stella Davies, Guido Frumento, Rita Maccario, Federico Bonetti, Jerzy Wojnar, Miryam Martinetti, Francesco Frassoni, Giovanna Giorgiani, Andrea Bacigalupo, and Jerzy Holowiecki. Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood*, 102(3):814–9, August 2003.
- [39] Dietrich W Beelen, Hellmut D Ottinger, Stanislav Ferencik, Ahmet H Elmaagacli, Rudolf Peceny, Rudolf Trenschel, and Hans Grosse-Wilde. Genotypic inhibitory killer immunoglobulin-like receptor ligand incompatibility enhances the long-term antileukemic effect of unmodified allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with myeloid leukemias. *Blood*, 105(6):2594–600, March 2005.
- [40] Hans-Gustaf Ljunggren and Karl-Johan Malmberg. Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nature reviews. Immunology*, 7(5):329–39, May 2007.
- [41] Lorenzo Moretta and Alessandro Moretta. Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *The EMBO journal*, 23(2):255–9, January 2004.

- [42] Lewis L Lanier. NK cell recognition. *Annual review of immunology*, 23:225–74, January 2005.
- [43] Gerd Herold. Innere Medizin 2014 : eine vorlesungsorientierte Darstellung ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die ärztliche Prüfung ; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis, 2014.
- [44] Milena Sant, Claudia Allemani, Carmen Tereanu, Roberta De Angelis, Riccardo Capocaccia, Otto Visser, Rafael Marcos-Gragera, Marc Maynadié, Arianna Simonetti, Jean-Michel Lutz, and Franco Berrino. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood*, 116(19):3724–34, November 2010.
- [45] GM Dores and SS Devesa. Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States, 2001-2007. . . ., 2012.
- [46] D.G. (2001) Gilliland. Ovid: Hematologic malignancies., 2001.
- [47] John T Reilly. Pathogenesis of acute myeloid leukaemia and inv(16)(p13;q22): a paradigm for understanding leukaemogenesis? *British journal of haematology*, 128(1):18–34, January 2005.
- [48] Gail J Roboz and Monica Guzman. Acute myeloid leukemia stem cells: seek and destroy. *Expert review of hematology*, 2(6):663–72, December 2009.
- [49] J. M. Bennett, D. Catovsky, Marie-Therese Daniel, G. Flandrin, D. A. G. Galton, H. R. Gralnick, and C. Sultan. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. *British Journal of Haematology*, 33(4):451–458, August 1976.
- [50] James W Vardiman, Nancy Lee Harris, and Richard D Brunning. Review article The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*, 100(7):2292–2302, 2002.
- [51] B J Bain, D Barnett, D Linch, E Matutes, and J T Reilly. Revised guideline on immunophenotyping in acute leukaemias and chronic lymphoproliferative disorders. *Clinical and laboratory haematology*, 24(1):1–13, February 2002.

- [52] R O Casasnovas, F K Slimane, R Garand, G C Faure, L Campos, V De-neys, M Bernier, A Falkenrodt, G Lecalvez, M Maynadié, and M C Béné. Immunological classification of acute myeloblastic leukemias: relevance to patient outcome. *Leukemia*, 17(3):515–27, March 2003.
- [53] John Koreth, Richard Schlenk, and KJ Kopecky. Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission: systematic review and meta-analysis of prospective clinical trials. *Jama*, 301(22):2349–2361, 2009.
- [54] Tina Baessler, Matthias Krusch, Benjamin Joachim Schmiedel, Mercedes Kloss, Katrin Miriam Baltz, Alexander Wacker, Helga Maria Schmetzer, and Helmut Rainer Salih. Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related protein ligand subverts immunosurveillance of acute myeloid leukemia in humans. *Cancer research*, 69(3):1037–45, February 2009.
- [55] Tina Baessler, Jean Enno Charton, Benjamin Joachim Schmiedel, Frank Grünebach, Matthias Krusch, Alexander Wacker, Hans-Georg Rammensee, and Helmut Rainer Salih. CD137 ligand mediates opposite effects in human and mouse NK cells and impairs NK-cell reactivity against human acute myeloid leukemia cells. *Blood*, 115(15):3058–69, April 2010.
- [56] EA Carswell and LJ Old. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the . . .*, 72(9):3666–3670, 1975.
- [57] P W Gray, B B Aggarwal, C V Benton, T S Bringman, W J Henzel, J A Jarrett, D W Leung, B Moffat, P Ng, and L P Svedersky. Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumour necrosis activity. *Nature*, 312(5996):721–4, 1984.
- [58] D Pennica, G E Nedwin, J S Hayflick, P H Seeburg, R Derynck, M A Palladino, W J Kohr, B B Aggarwal, and D V Goeddel. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature*, 312(5996):724–9, 1984.
- [59] B B Aggarwal, W J Kohr, P E Hass, B Moffat, S A Spencer, W J Henzel, T S Bringman, G E Nedwin, D V Goeddel, and R N Harkins. Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization. *The Journal of biological chemistry*, 260(4):2345–54, February 1985.

- [60] R M Locksley, N Killeen, and M J Lenardo. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 104(4):487–501, February 2001.
- [61] Craig A. Smith, Terry Farrah, and Raymond G. Goodwin. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: Activation, costimulation, and death. *Cell*, 76(6):959–962, March 1994.
- [62] A Ashkenazi and V M Dixit. Death receptors: signaling and modulation. *Science (New York, N.Y.)*, 281(5381):1305–8, August 1998.
- [63] D Wallach, E E Varfolomeev, N L Malinin, Y V Goltsev, a V Kovalenko, and M P Boldin. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annual review of immunology*, 17:331–67, January 1999.
- [64] H T Idriss and J H Naismith. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microscopy research and technique*, 50(3):184–95, August 2000.
- [65] M Pasparakis, L Alexopoulou, V Episkopou, and G Kollias. Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *The Journal of experimental medicine*, 184(4):1397–411, October 1996.
- [66] S E Straus, M Sneller, M J Lenardo, J M Puck, and W Strober. An inherited disorder of lymphocyte apoptosis: the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Annals of internal medicine*, 130(7):591–601, April 1999.
- [67] R M Siegel, F K Chan, H J Chun, and M J Lenardo. The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nature immunology*, 1(6):469–74, December 2000.
- [68] R N Maini and P C Taylor. Anti-cytokine therapy for rheumatoid arthritis. *Annual review of medicine*, 51:207–29, January 2000.
- [69] K A Papadakis and S R Targan. Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annual review of medicine*, 51:289–98, January 2000.

- [70] D M Anderson, E Maraskovsky, W L Billingsley, W C Dougall, M E Tometsko, E R Roux, M C Teepe, R F DuBose, D Cosman, and L Galibert. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*, 390(6656):175–9, November 1997.
- [71] Y Y Kong, H Yoshida, I Sarosi, H L Tan, E Timms, C Capparelli, S Morony, A J Oliveira-dos Santos, G Van, A Itie, W Khoo, A Wakeham, C R Dunstan, D L Lacey, T W Mak, W J Boyle, and J M Penninger. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*, 397(6717):315–23, January 1999.
- [72] N Kim, P R Odgren, D K Kim, S C Marks, and Y Choi. Diverse roles of the tumor necrosis factor family member TRANCE in skeletal physiology revealed by TRANCE deficiency and partial rescue by a lymphocyte-expressed TRANCE transgene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(20):10905–10, September 2000.
- [73] J Li, I Sarosi, X Q Yan, S Morony, C Capparelli, H L Tan, S McCabe, R Elliott, S Scully, G Van, S Kaufman, S C Juan, Y Sun, J Tarpley, L Martin, K Christensen, J McCabe, P Kostenuik, H Hsu, F Fletcher, C R Dunstan, D L Lacey, and W J Boyle. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(4):1566–71, February 2000.
- [74] S C Marks and S N Popoff. Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. *The American journal of anatomy*, 183(1):1–44, September 1988.
- [75] T Suda, N Takahashi, and T J Martin. Modulation of osteoclast differentiation. *Endocrine reviews*, 13(1):66–80, February 1992.
- [76] William J Boyle, W Scott Simonet, and David L Lacey. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423(6937):337–42, May 2003.
- [77] M Li and A A Beg. Induction of necrotic-like cell death by tumor necrosis factor alpha and caspase inhibitors: novel mechanism for killing virus-infected cells. *Journal of virology*, 74(16):7470–7, August 2000.

- [78] N Nakagawa, M Kinoshita, K Yamaguchi, N Shima, H Yasuda, K Yano, T Morinaga, and K Higashio. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochemical and biophysical research communications*, 253(2):395–400, December 1998.
- [79] W.S Simonet, D.L Lacey, C.R Dunstan, M Kelley, M.-S Chang, R Lüthy, H.Q Nguyen, S Wooden, L Bennett, and T Boone. Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density. *Cell*, 89(2):309–319, April 1997.
- [80] H Hsu, D L Lacey, C R Dunstan, I Solovyev, A Colombero, E Timms, H L Tan, G Elliott, M J Kelley, I Sarosi, L Wang, X Z Xia, R Elliott, L Chiu, T Black, S Scully, C Capparelli, S Morony, G Shimamoto, M B Bass, and W J Boyle. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(7):3540–5, March 1999.
- [81] Pirow J Bekker, Donna L Holloway, Amy S Rasmussen, Robyn Murphy, Steven W Martin, Philip T Leese, Gregory B Holmes, Colin R Dunstan, and Alex M DePaoli. A single-dose placebo-controlled study of AMG 162, a fully human monoclonal antibody to RANKL, in postmenopausal women. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 19(7):1059–66, July 2004.
- [82] D Holstead Jones, Tomoki Nakashima, Otto H Sanchez, Ivona Kozieradzki, Svetlana V Komarova, Ildiko Sarosi, Sean Morony, Evelyn Rubin, Renu Sarao, Carlo V Hojilla, Vukoslav Komnenovic, Young-Yun Kong, Martin Schreiber, S Jeffrey Dixon, Stephen M Sims, Rama Khokha, Teiji Wada, and Josef M Penninger. Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature*, 440(7084):692–6, March 2006.
- [83] Sophie Roux, Véronique Meignin, Jeanine Quillard, Geri Meduri, Anne Guiochon-Mantel, Jean-Paul Fermand, Edwin Milgrom, and Xavier Mariette. RANK (receptor activator of nuclear factor-kappaB) and RANKL expression in multiple myeloma. *British journal of haematology*, 117(1):86–92, April 2002.
- [84] L C Hofbauer, A Neubauer, and A E Heufelder. Receptor activator of

- nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin: potential implications for the pathogenesis and treatment of malignant bone diseases. *Cancer*, 92(3):460–70, August 2001.
- [85] G David Roodman and William C Dougall. RANK ligand as a therapeutic target for bone metastases and multiple myeloma. *Cancer treatment reviews*, 34(1):92–101, February 2008.
- [86] Steven R Cummings, Javier San Martin, Michael R McClung, Ethel S Siris, Richard Eastell, Ian R Reid, Pierre Delmas, Holly B Zoog, Matt Austin, Andrea Wang, Stepan Kutilek, Silvano Adami, Jose Zanchetta, Cesar Libanati, Suresh Siddhanti, and Claus Christiansen. Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *The New England journal of medicine*, 361(8):756–65, August 2009.
- [87] Edward M Schwarz and Christopher T Ritchlin. Clinical development of anti-RANKL therapy. *Arthritis research & therapy*, 9 Suppl 1:S7, January 2007.
- [88] Roger von Moos and Tomas Skacel. Denosumab: first data and ongoing studies on the prevention of bone metastases. *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progrès dans les recherches sur le cancer*, 192:187–96, January 2012.
- [89] B R Wong, R Josien, S Y Lee, B Sauter, H L Li, R M Steinman, and Y Choi. TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *The Journal of experimental medicine*, 186(12):2075–80, December 1997.
- [90] Wei Tan, Weizhou Zhang, Amy Strasner, Sergei Grivennikov, Jin Q Cheng, Robert M Hoffman, and Michael Karin. Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signalling. *Nature*, 470(7335):548–53, February 2011.
- [91] Marta Palafox, Irene Ferrer, Pasquale Pellegrini, Sergi Vila, Sara Hernandez-Ortega, Ander Urruticoechea, Fina Climent, Maria Teresa Soler, Purificación Muñoz, Francesc Viñals, Mark Tometsko, Dan Brantetter, William C Dougall, and Eva González-Suárez. RANK induces

- epithelial-mesenchymal transition and stemness in human mammary epithelial cells and promotes tumorigenesis and metastasis. *Cancer research*, 72(11):2879–88, June 2012.
- [92] GJ Atkins, Panagiota Kostakis, and Cristina Vincent. RANK expression as a cell surface marker of human osteoclast precursors in peripheral blood, bone marrow, and giant cell tumors of bone. *Journal of bone and*, 21(9), 2006.
- [93] V Shalhoub, G Elliott, L Chiu, R Manoukian, M Kelley, N Hawkins, E Davy, G Shimamoto, J Beck, S A Kaufman, G Van, S Scully, M Qi, M Grisanti, C Dunstan, W J Boyle, and D L Lacey. Characterization of osteoclast precursors in human blood. *British journal of haematology*, 111(2):501–12, November 2000.
- [94] Paola Secchiero, Federica Corallini, Elisa Barbarotto, Elisabetta Melloni, Maria Grazia di Iasio, Mario Tiribelli, and Giorgio Zauli. Role of the RANKL/RANK system in the induction of interleukin-8 (IL-8) in B chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells. *Journal of cellular physiology*, 207(1):158–64, April 2006.
- [95] Sandra Tuyaerts, Sonja Van Meirvenne, Aude Bonehill, Carlo Heirman, Jurgen Corthals, Herman Waldmann, Karine Breckpot, Kris Thielemans, and Joeri L Aerts. Expression of human GITRL on myeloid dendritic cells enhances their immunostimulatory function but does not abrogate the suppressive effect of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Journal of leukocyte biology*, 82(1):93–105, July 2007.
- [96] KW Moore. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of . . .*, 1:683–765, 2001.
- [97] A. D’Andrea. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma- production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *Journal of Experimental Medicine*, 178(3):1041–1048, September 1993.
- [98] D Drugarin, Malina Drugarin, Serban Negru, and Ramona Cioaca. RANKL/RANK/OPG molecular complex-control factors in bone remodeling. *TMJ*, pages 297–302, 2003.

- [99] Ann E Kearns, Sundeep Khosla, and Paul J Kostenuik. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocrine reviews*, 29(2):155–92, April 2008.
- [100] Tohru Ikeda, Michiyuki Kasai, Masanori Utsuyama, T I Immunology, and Developmental Science. Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor-KB ligand and their differential expression in bone and thymus. *Endocrinology*, 142(4):1419–1426, 2001.
- [101] L. Lum, B. R. Wong, R. Josien, J. D. Becherer, H. Erdjument-Bromage, J. Schlondorff, P. Tempst, Y. Choi, and C. P. Blobel. Evidence for a Role of a Tumor Necrosis Factor-(TNF-)-converting Enzyme-like Protease in Shedding of TRANCE, a TNF Family Member Involved in Osteoclastogenesis and Dendritic Cell Survival. *Journal of Biological Chemistry*, 274(19):13613–13618, May 1999.
- [102] M Tanaka, T Itai, M Adachi, and S Nagata. Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nature medicine*, 1998.
- [103] Ewa Jablonska, Beata Kiersnowska-Rogowska, Franciszek Rogowski, Adam Parfienczyk, Wioletta Puzewska, and Maria Bukin. TNF family molecules in the serum of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Leukemia & lymphoma*, 46(9):1307–12, September 2005.
- [104] H. R. Salih, H. M. Schmetzer, C. Burke, G. C. Starling, R. Dunn, R. Pelka-Fleischer, V. Nuessler, and P. a. Kiener. Soluble CD137 (4-1BB) Ligand Is Released Following Leukocyte Activation and Is Found in Sera of Patients with Hematological Malignancies. *The Journal of Immunology*, 167(7):4059–4066, October 2001.
- [105] Anastasia Pilichou, Ioannis Papassotiriou, Kelly Michalakakou, Smaragdi Fessatou, Emmanuel Fandridis, George Papachristou, and Evangelos Terpos. High levels of synovial fluid osteoprotegerin (OPG) and increased serum ratio of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) to OPG correlate with disease severity in patients with primary knee osteoarthritis. *Clinical biochemistry*, 41(9):746–9, June 2008.
- [106] Stephanie Nguyen, Nathalie Dhedin, Jean-Paul Vernant, Mathieu Kuentz,

- Ahmad Al Jijakli, Nathalie Rouas-Freiss, Edgardo D Carosella, Ali Boudifa, Patrice Debré, and Vincent Vieillard. NK-cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantations: immaturity of NK cells and inhibitory effect of NKG2A override GvL effect. *Blood*, 105(10):4135–42, May 2005.
- [107] Günther Eissner, Walter Kolch, and Peter Scheurich. Ligands working as receptors: reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system. *Cytokine & growth factor reviews*, 15(5):353–66, October 2004.
- [108] M H Blotta, J D Marshall, R H DeKruyff, and D T Umetsu. Cross-linking of the CD40 ligand on human CD4+ T lymphocytes generates a costimulatory signal that up-regulates IL-4 synthesis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 156(9):3133–40, May 1996.
- [109] AE Macaulay and RH DeKruyff. Antigen-specific B cells preferentially induce CD4+ T cells to produce IL-4. *The Journal of ...*, 1997.
- [110] N.-J. Chen, M.-W. Huang, and S.-L. Hsieh. Enhanced Secretion of IFN-gamma by Activated Th1 Cells Occurs Via Reverse Signaling Through TNF-Related Activation-Induced Cytokine. *The Journal of Immunology*, 166(1):270–276, January 2001.
- [111] M. Sun and P. J. Fink. A New Class of Reverse Signaling Costimulators Belongs to the TNF Family. *The Journal of Immunology*, 179(7):4307–4312, September 2007.
- [112] R a Van Etten. Aberrant cytokine signaling in leukemia. *Oncogene*, 26(47):6738–49, October 2007.
- [113] Glenn Dranoff. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature reviews. Cancer*, 4(1):11–22, January 2004.
- [114] Apostolia Maria Tsimberidou, Elihu Estey, Sijin Wen, Sherry Pierce, Hagop Kantarjian, Maher Albitar, and Razelle Kurzrock. The prognostic significance of cytokine levels in newly diagnosed acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndromes. *Cancer*, 113(7):1605–13, October 2008.

- [115] Steven M Kornblau, David McCue, Neera Singh, Wenjing Chen, Zeev Estrov, and Kevin R Coombes. Recurrent expression signatures of cytokines and chemokines are present and are independently prognostic in acute myelogenous leukemia and myelodysplasia. *Blood*, 116(20):4251–61, November 2010.

6. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen, Abteilung Innere Medizin II unter Betreuung von Professor Dr. H. R. Salih durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Professor Dr. H. R. Salih, Dr. B. Schmiedel und Dr. T. Nübling.

Nach Einarbeitung durch die Labormitglieder der AG Salih, wurden ausser die unten gelisteten Versuche, alle Experimente eigenständig von mir durchgeführt. Die Versuche dargestellt in Abbildung 3.1 C, Abbildung 3.2 C, 3.9, 3.10, 3.11 wurden in Zusammenarbeit mit Dr. B. Schmiedel durchgeführt. Die PCR-Analyse, dargestellt in Abbildung 3.2 B wurde durch Dr. B. Schmiedel durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

7. Danksagung

Zunächst möchte ich Prof. Dr. Helmut Salih danken, welcher mich in seiner Forschungsgruppe aufgenommen und mir die Möglichkeit gegeben hat, dieses spannende Forschungsgebiet zu erarbeiten. Darüber hinaus für die fachliche Betreuung und seinen lehrreiche Diskussionen.

Besonderen Dank an das Gradiertenkolleg 794 *Cellular mechanisms of immune-associated processes*, insbesondere an Prof. Dr. Rammensee und Prof. Dr. Frank, für die Unterstützung der experimentellen Phase. Desweiteren möchte ich meinen Kollegen aus der Arbeitsgruppe für die Einarbeitung und die gemeinsame Zusammenarbeit danken. Für die Bereitstellung von Antikörpern and Zelllinien geht mein Dank an Miyuki Azuma (Universität Tokio, Japan).

Mein Dank geht an alle meine Freunde für die Unterstützung.

Ich kann mich glücklich schätzen so gute Freunde zu haben, die für mich und diese Arbeit ihr Blut gespendet haben. In alphabetischer Reihenfolge ein großes Danke an Anna Schollbach, Astrid Hiller-Blin, Benjamin Butz, Claudia Frey, Jana Bauer, Jochen Hellwachs, Marie-Luise Schulz, Moritz Schollbach, Patricia Grimminger, Philip Nedela, Sebastian Kleinhans und unbekannter Weise an alle anonymen Blutspender.

Besonders hervorheben möchte ich ausserdem meine lieben Mitbewohner Anna Schollbach, Astrid Hiller-Blin und Daniel Mörike. Während der experimentellen Zeit wäre ich ohne Euch manche Abende sicher vor einem leeren Kühlschrank gestanden. Danke nicht nur für die kulinarische Verpflegung, sondern auch für die wunderbaren gemeinsamen Stunden.

Moritz Schollbach möchte ich danken, dass er mich in die Welt von Latex und somit in die Welt der Skripte eingeführt hat.

Ich danke meiner Mutter, welche mir beibrachte daran zu glauben, dass ich fliegen kann und meiner Schwester Lili, welche der Wind unter meinen Flügel ist.

Lili, danke dass Du jede Zeit für mich da warst: Vom Aussuchen der Arbeitsgruppe, durch alle Hochs und Tiefs der Experimente, beim Brüten über Problemen und Finden von Lösungen, mit all Deinen wertvollen Tipps zum Schreiben und vielem mehr. Ohne Dich wäre mir die Arbeit nicht so gut gelungen. Daher widme ich Dir diese Arbeit.

Mit Eurer unglaublich engagierten Unterstützung, kann ich jedes Ziel erreichen. Ich danke Euch Beiden aus tiefstem Herzen!