

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

**Bispezifische Antikörper in der Immuntherapie der
Akuten Myeloischen Leukämie: Charakterisierung
eines TIM3/CD3-Konstrukts in Hinblick auf
Resistenzmechanismen**

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

vorgelegt von

Julia Stein

aus

München

2021



Mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Marion Subklewe

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Stefan Endres
Prof. Dr. Tobias Feuchtinger

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

Tag der mündlichen Prüfung: 15.07.2021

Meiner Familie
Ester, Werner, Carolin und Simon

Eidesstattliche Versicherung

Stein, Julia

Name, Vorname

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

*Bispezifische Antikörper in der Immuntherapie der Akuten Myeloischen Leukämie:
Charakterisierung eines TIM3/CD3-Konstrukts in Hinblick auf Resistenzmechanismen*

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

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

München, 18.07.2021

Ort, Datum

Julia Stein

Unterschrift Doktorandin

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	11
1.1. Die akute myeloische Leukämie	11
1.1.1. Entstehung, Verlauf und Prognose	11
1.1.2. Chemotherapie und allogene Stammzelltransplantation	11
1.2. Antikörper-basierte Tumorthherapie	13
1.2.1. Geeignete Zielstrukturen in der AML	14
1.2.2. Die Rolle von Antikörpern, NK- und T-Lymphozyten im menschlichen Immunsystem	15
1.3. TIM3 – Stand der Forschung	17
1.3.1. Die physiologische Rolle von TIM3	17
1.3.2. TIM3 als Zielantigen in der AML	19
1.3.3. TIM3/CD3 bispezifisches Antikörperkonstrukt	20
2. ZIELSETZUNG	23
3. MATERIAL UND METHODEN	25
3.1. Geräte	25
3.2. Verbrauchsmaterialien	25
3.3. Zellkultur	26
3.3.1. Materialien und Zelllinien	26
3.3.2. Zellkulturbedingungen, Zellzählung und Viabilitätsmessung	27
3.4. Materialgewinnung	27
3.4.1. Materialien und Kits	27
3.4.2. Isolation mononukleärer Zellen	28
3.4.3. Isolation von T-Zellen	28
3.4.4. Isolation von NK-Zellen	29
3.5. Durchflusszytometrie	29
3.5.1. Materialien und Antikörper	29
3.5.2. Durchflusszytometrie und Färbung	30
3.6. Zellstimulation	30
3.6.1. Materialien	30
3.6.2. Stimulation von T-Zellen mit CD3/CD28-Beads	31
3.6.3. Stimulation von NK-Zellen mit IL-15	31
3.7. Versuchsaufbau	31
3.7.1. TIM3-Expression auf AML-Zelllinien	31
3.7.2. Bestimmung des IC50-Werts	31

3.7.3.	Langzeitkultursystem mit primären AML-Zellen	32
3.7.4.	Auswertung der AML-Patientendaten	33
3.7.5.	CFSE-Färbung	34
3.7.6.	T-Cell Fratricide Assay	34
3.7.7.	Internalisierungs-Assay	35
4.	ERGEBNISSE	37
4.1.	Validierung von TIM3 als Zielantigen in der AML	37
4.2.	Etablierung eines Zellkultur Modellsystems	38
4.2.1.	TIM3-Expression auf AML-Zelllinien	38
4.2.2.	Zytotoxizität gegenüber AML-Zelllinien	40
4.3.	Langzeitkulturen mit primären AML-Zellen	42
4.3.1.	T-Zell-Aktivierung	42
4.3.2.	Zytotoxizität gegenüber primären AML-Zellen	44
4.3.3.	Expression des Zielantigens unter Langzeitkulturbedingungen	46
4.4.	Expression von TIM3 auf gesunden Zellen	48
4.4.1.	TIM3-Expression auf NK-Zellen und T-Lymphozyten	48
4.4.2.	Zytotoxizität gegenüber NK-Zellen und T-Lymphozyten	51
4.5.	Internalisierung von TIM3	55
4.5.1.	TIM3-Internalisierung durch NK-Zellen und T-Lymphozyten	55
4.5.2.	TIM3-Internalisierung durch primäre AML-Zellen	58
5.	DISKUSSION	59
6.	ZUSAMMENFASSUNG	67
7.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	69
8.	LITERATURVERZEICHNIS	71
9.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	77
10.	ANHANG	79
	Anhang A: Charakterisierung der Patienten mit Erstdiagnose	79
	Anhang B: Charakterisierung der Rezidivpatienten	84
	Anhang C: Messdaten Abbildung 15	84
	Anhang D: Messdaten Abbildung 16	85
11.	DANKSAGUNG	87

1. EINLEITUNG

1.1. Die akute myeloische Leukämie

1.1.1. Entstehung, Verlauf und Prognose

In Deutschland erkrankten im Jahr 2016 13.900 Menschen an einer malignen Erkrankung des blutbildenden und lymphatischen Systems, der Leukämie (1). Bei 23 % dieser Menschen wurde eine akute myeloische Leukämie (AML) diagnostiziert. Sie ist die häufigste Form unter den myeloischen Neoplasien und betrifft mit einem medianen Erkrankungsalter von 71 Jahren vorwiegend ältere Patienten, kann prinzipiell jedoch in allen Altersklassen auftreten (1).

Eine AML ist gekennzeichnet durch die Infiltration des Knochenmarks, des Blutes oder anderen Gewebes durch maligne, schnell wachsende, myeloische Vorläuferzellen (2). Die Diagnose erfolgt mittels zytomorphologischer und zytochemischer Untersuchungen aus Knochenmarksaspirat und peripheren Blutproben (3) und kann gemäß der WHO-Klassifikation von 2016 ab einem Blastenanteil von 20 % im peripheren Blut oder im Knochenmark gestellt werden (4,5).

Die Symptome einer akuten myeloische Leukämie lassen sich durch die Verdrängung des gesunden blutbildenden Systems der Patienten erklären (3). Müdigkeit und Erschöpfung sind Folge einer Abnahme der Erythrozyten. Durch eine Neutropenie können sich opportunistische Infektionen ausbreiten und eine Thrombozytopenie zieht eine verstärkte Blutungsneigung nach sich, die sich in Form von Petechien oder Schleimhautblutungen zeigen kann. Häufig treten die Symptome nur wenige Wochen vor Diagnosestellung auf. Bleibt die Erkrankung unbehandelt, so können die Betroffenen durch den raschen Verlauf innerhalb weniger Wochen an unbeherrschbaren Infektionen oder Blutungen sterben (3). Die Einteilung der AML kann nach zwei verschiedenen Schemata erfolgen. Die French-American-British-Klassifizierung (FAB-Klassifizierung) erfolgt anhand von morphologischen und zytochemischen Eigenschaften der leukämischen Zellen in acht Subtypen (M0-M7) (6). Weitaus verbreiteter ist jedoch die Einteilung nach der WHO Klassifikation von 2001, die im Jahr 2016 zuletzt aktualisiert wurde. Hierbei werden morphologische, zyto- und molekulargenetische Eigenarten verwendet, um die AML in vier Gruppen einzuteilen (4,5).

1.1.2. Chemotherapie und allogene Stammzelltransplantation

Die kurativ intendierte Standardtherapie der AML besteht aus 2 Komponenten: Induktion und Konsolidierung (3,5,7,8). Bei der Induktion wird mittels Hochdosis-Chemotherapie nach dem sogenannten „7+3-Schema“, in der Regel mit einer Kombination der beiden Zytostatika Daunorubicin und Cytarabin, versucht, eine komplette Remission (CR) zu erreichen. Diese ist gekennzeichnet durch normalisierte Blutwerte für neutrophile Granulozyten ($> 1000 /\mu\text{l}$)

und Thrombozyten ($> 100.000 /\mu\text{l}$) (3). Im Knochenmark dürfen nicht mehr als 5 % Blasten nachgewiesen werden und eine extramedulläre Manifestation (z.B. in Form von Hautinfiltraten) muss ausgeschlossen sein (3). Eine komplette Remission kann so bei ca. 60 % der Patienten erreicht werden (9). Die anschließende Postremissionstherapie („Konsolidierung“), die aus mehreren Zyklen Cytarabin-Therapie oder aus einer allogenen Stammzelltherapie bestehen kann, dient der Elimination von chemoresistenten, residuellen Zellen und soll somit ein Rezidiv der Erkrankung verhindern (3,5,7).

Trotz aggressiver Chemotherapie-Schemata, mit denen der Patient eine komplette Remission erreichen kann, kommt es im Verlauf häufig zu einem Erkrankungs-Rezidiv (3,8). Eine Stammzelltransplantation kann daher bei Hochrisiko-Patienten bereits in der ersten Remission indiziert sein (10,11). Bei der allogenen Transplantation werden hämatopoetische Stammzellen eines kompatiblen Spenders, dem zuvor myeloablatierten Patienten transplantiert. Diese Spender-Zellen sind dann im optimalen Fall in der Lage, das blutbildende System im Patienten neu aufzubauen (12). Die Kompatibilität bezieht sich hierbei auf Proteine, die im humanen Leukozyten-Antigen-System (HLA) zu finden sind. Diese HL-Antigene (auch als MHC-Moleküle bekannt) befinden sich auf der Zelloberfläche und können als „immunologische Identität“ bezeichnet werden. Je ähnlicher diese Merkmale bei zwei Menschen ausgeprägt sind (zum Beispiel bei Geschwistern), desto wahrscheinlicher ist der Erfolg einer Stammzelltransplantation (13). Man unterscheidet zwei Klassen von MHC-Molekülen (MHC-I und MHC-II), wobei sich die Moleküle in ihrer Gesamtstruktur ähneln, jedoch ein unterschiedliches Expressionsmuster im Körper aufweisen (14). MHC-I findet sich auf fast allen kernhaltigen Zellen im menschlichen Körper, wird von unterschiedlichen Zellen jedoch unterschiedlich stark exprimiert (14). MHC-II hingegen findet sich auf den sogenannten antigenpräsentierenden Zellen, also spezialisierten Zellen des Immunsystems, wie Makrophagen, Dendritischen Zellen und B-Lymphozyten (14).

Eine vollständige Heilung der Erkrankung und das antileukämisch beste Ergebnis ist bisher nur mittels Stammzelltransplantation möglich (5,15). Eine polnische Studie aus dem Jahr 2016 konnte zeigen, dass die leukämiefreie 5-Jahre-Überlebenswahrscheinlichkeit bei stammzelltransplantierten Patienten bei 86 % liegt (16).

Eine zentrale Komplikation nach Transplantation stellt die Graft-versus-Host-Disease (GvHD) dar (12,17). Hierbei erkennen die neu gebildeten Spender-T-Zellen spezielle Proteine (HLA) auf den Empfänger-Zellen des Patienten als Fremdmaterial an und initiieren eine Immunreaktion (17,18). Die GvHD kann sämtliche Regionen des Körpers betreffen und unterschiedlich stark ausgeprägt sein (12). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass Patienten, die nach der Transplantation eine GvHD entwickelt haben, seltener einen Rückfall der AML zu befürchten hatten (19). Zurückzuführen ist dieser „positive“ Effekt auf die transplantierten, gesunden Spender-T-Zellen (20,21), welche nicht nur Patientenzellen, sondern ebenfalls die residuellen AML-Zellen als körperfremd erkennen und abtöten können. Diesen bereits früh entdeckten Einfluss des Immunsystems bei der Bekämpfung von

Tumorzellen, den sogenannten Graft-versus-Leukemia (GvL)-Effekt, versucht man sich heute in der Immuntherapie mit körpereigenen Zellen zu Nutzen zu machen (15).

Kommt es nach Erreichen einer kompletten Remission zu einem Rückfall der Erkrankung, so sind die Mechanismen, die zu einer erneuten Proliferation der leukämischen Zellen führen noch nicht gänzlich verstanden. Eine anerkannte Theorie geht davon aus, dass pluripotente hämatologische Stammzellen (HSC) mutieren und dadurch eine neue Zellpopulation, sogenannte leukämische Stammzellen (LSC), entsteht (22). Diese Zellpopulation, die durch ihren CD34⁺/CD38⁻ Phänotyp charakterisiert ist, konnte aus AML-Patientenproben isoliert werden. Es zeigte sich, dass eine Transplantation dieser Zellpopulation in immundefizienten SCID-Mäusen eine Leukämie initiieren konnte (23). Bei anderen Zellpopulationen (CD34⁺/CD38⁺ und CD34⁻) konnte dies nicht beobachtet werden (23). Durch einen ruhenden Zellzyklus sind sie nur schwierig erreichbar für Zytostatika und können zu einem späteren Zeitpunkt erneut proliferieren (24). Im Widerspruch hierzu stehen neuere Versuche die nachweisen konnten, dass auch ausgereifte AML-Zellen unter Induktion bestimmter Signalwege in der Lage sind, die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und damit zur erneuten Proliferation der AML zurückzugewinnen (25). Ob sich eine Leukämie also in stochastischer oder hierarchischer Weise aus LSCs, oder eventuell sogar aus ausdifferenzierten Zellen entwickeln kann bleibt weiterhin zu klären. Zusammenfassend lässt sich ableiten, dass LSCs nicht in allen, jedoch in vielen Fällen eine wichtige Rolle zu spielen scheinen und somit einen geeigneten Angriffspunkt in der Rezidiv-Therapie darstellen.

1.2. Antikörper-basierte Tumorthherapie

Die Therapieansätze zur Behandlung von Tumoren waren viele Jahre auf den direkten Angriff von Tumorzellen ausgelegt. Konventionelle Zytostatika haben die Tumorthherapie revolutioniert und die Überlebenszeit der Patienten entscheidend verlängert (26). Ihre Wirkung ist jedoch nicht spezifisch auf die Tumorzellen begrenzt, so dass gravierende Nebenwirkungen die Folge sein können.

Die Idee, den Tumorzellen mit Hilfe des Immunsystems entgegenzuwirken wird jedoch bereits seit vielen Jahren diskutiert. Vesely et. al. beschreiben hierzu drei verschiedene Phasen, in denen das Immunsystem Einfluss auf das Tumorgeschehen nehmen kann: bei der Elimination erkennt das Immunsystem die malignen Zellen und zerstört diese, noch bevor der Tumor klinisch erkennbar wird (27). In der Stabilisierungsphase werden die „ruhenden“ Tumorzellen kontrolliert und Wachstum verhindert, der Patient ist klinisch gesund. Durch *Immunoediting*, das heißt dem gezielten Umgehen der Immunantwort durch den Tumor, kann es zur „Fluchtphase“ mit unkontrolliertem Wachstum kommen (27).

Ziel der Antikörpertherapie ist die Rekrutierung von körpereigenen Immunzellen, entweder über monoklonale Antikörper, die an Moleküle auf der Tumoroberfläche binden und über ihr konstantes Fc-Fragment natürliche Killerzellen (NK-Zellen) rekrutieren, oder über bispezifische Antikörper mit Bindungen an Tumor- und körpereigenen

Oberflächenmolekülen (zum Beispiel CD3 zur Rekrutierung von T-Zellen), zur Elimination der Tumorzellen.

Bereits 1995 konnten Kufer et. al. einen Antikörper generieren, der gleichzeitig an körpereigenen Immunzellen, sowie an Tumorzellen binden und so das Immunsystem beim Erkennen der fremden Zellen unterstützen kann (28). Das bispezifische Konstrukt bestand aus einem anti-CD3 Fragment zur T-Zell-Rekrutierung und einem anti-17-1A Fragment, welches gegen das 17-1A Antigen gerichtet ist, das auf der Zelloberfläche bei Kolorektalkarzinomen gefunden werden kann. Die Autoren konnten zeigen, dass die körpereigenen T-Zellen durch den bispezifischen Antikörper zu den Tumorzellen rekrutiert wurden und nach anschließender Aktivierung eine spezifische Lyse der Tumorzellen bewirken konnten (28).

Fast 20 Jahre später, im Dezember 2014, wurde das erste bispezifische, T-Zell-rekrutierende Antikörperkonstrukt Blinatumomab von der *US Food and Drug Association* (FDA) für die Behandlung der B-Vorläufer akuten lymphatischen Leukämie zugelassen (29).

Da das Immunsystem jedoch nicht nur positiven Einfluss auf das Tumorgeschehen nehmen kann, sondern auch durch das *Immunediting* zur „Fluchtphase“ der Tumorzellen beitragen kann (30), ist die Auswahl einer geeigneten Zielstruktur von großer Bedeutung. Auch die erheblichen Nebenwirkungen, die durch falsch gewählte Zielstrukturen auftreten können, sind zu berücksichtigen.

1.2.1. Geeignete Zielstrukturen in der AML

Die Voraussetzung für eine adäquate Antikörper-basierte Tumorthherapie ist die Auswahl eines geeigneten Zielantigens, sowie der optimale Zeitpunkt des Therapiestarts. Bei der Behandlung der AML kann die Immuntherapie beispielsweise nach der Induktionstherapie erfolgen. Zu diesem Zeitpunkt ist ein Großteil der Tumorzellen bereits abgetötet worden und es verbleiben lediglich die Zellen im Stammzell-Kompartiment. Das verwendete Zielantigen sollte ausschließlich auf den Tumorzellen, insbesondere den residuellen Stammzellen exprimiert werden, um den größtmöglichen Anti-Tumoreffekt bei kleinstmöglichen Nebenwirkungen zu erzielen.

Steven Rosenberg, der als Begründer der Immuntherapie gilt, unterteilt mögliche Zielstrukturen in „*self antigens*“ und „*non-self antigens*“ (31). *Self antigens* sind Strukturen, die sowohl auf Tumorzellen als auch auf dem, den Tumorzellen zu Grunde liegenden, gesunden Gewebe zu finden sind. Diese Antigene kann man nochmals in drei Subkategorien unterscheiden: Keimbahn-Antigene, welche hauptsächlich in der fetalen Entwicklung exprimiert werden, Differenzierungs-Antigene, welche vor allem in adultem Gewebe zu finden sind und Antigene, die auf Tumorzellen deutlich verstärkt exprimiert werden (31). In jedem Fall besteht jedoch das Risiko, dass auch gesundes Gewebe durch eine gerichtete Therapie Schaden nimmt. Als *non-self antigens* werden Antigene definiert, die erst bei der Tumorgenese entstehen und somit nicht auf gesunden Zellen exprimiert werden. Die Identifizierung solcher Neo-Epitope ist zeitaufwendig und kann mit Hilfe von

Genomsequenzierung und reaktiven T-Zellen erfolgen (31). Die Überschneidung der Antigenexpression der *self antigens* auf Tumorzellen und gesundem Gewebe können bei zielgerichteter Therapie zu unerwünschten Arzneimittelwirkungen führen. Eine potentiell lebensbedrohliche Nebenwirkung ist das sogenannte *cytokine-release-syndrome* (CRS) (32). Durch massive Freisetzung von Zytokinen entwickelt sich eine überschießende Entzündungsreaktion mit Fieber, Schüttelfrost, Hypotonie und Tachykardie. Durch kapilläre Leckage mit generalisierter Ödembildung, insbesondere der Ausbildung eines akuten Lungenödems sind die Patienten vital gefährdet (32).

In den letzten Jahren konnten immer mehr Zielstrukturen entdeckt werden, die für eine Antikörpertherapie in Frage kommen würden. Bekannte Oberflächenmarker, deren Expression auf leukämischen Stammzellen im Vergleich zu hämatopoetischen Stammzellen sehr stark ist, sind unter anderem CLL-1, CSF1-R, CD32, CD33, CD47, CD96, CD99, CD123 und CD366 (TIM3) (33,34).

Einige dieser Marker (CLL-1, TIM3, CD123 und CD47) können sogar zur spezifischen Unterscheidung zwischen LSCs und HSCs verwendet werden. Pelosi et. al. beschreiben nach einem Vergleich von elf verschiedenen Zielstrukturen CD33 und CD123 als besonders vielversprechend (35). Sowohl das CD33/CD3 bispezifische Antikörperkonstrukt AMG 330, als auch Flotetuzumab, ein CD123/CD3 bispezifisches Antikörperkonstrukt, befinden sich aktuell in klinischen Phase-1- oder 2-Studien (36,37). Die gewählten Zielstrukturen sind jedoch nicht ausschließlich auf LSCs zu finden, sondern können auch auf der Oberfläche von gesunden hämatopoetischen Stammzellen nachgewiesen werden, was bei einer Therapie unter Umständen zu Nebenwirkungen im blutbildenden System des Patienten führen könnte (35).

Die Vor- und Nachteile von TIM3 als Zielantigen werden in Kapitel 1.3.2 erläutert.

1.2.2. Die Rolle von Antikörpern, NK- und T-Lymphozyten im menschlichen Immunsystem

Viele bispezifische Antikörper wirken durch Rekrutierung von NK-Zellen oder T-Lymphozyten. Aus diesem Grund soll im folgenden Abschnitt kurz auf ihre physiologische Rolle im Immunsystem eingegangen werden. Anschließend wird die Bildung und Funktionsweise von Antikörpern charakterisiert.

Das menschliche Immunsystem setzt sich aus zwei Komponenten zusammen: dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem. Die beiden Bestandteile sind nicht strikt voneinander getrennt und agieren stets gemeinsam. Prinzipiell erfüllen sie vier wichtige Funktionen im Körper (14):

Die erste Aufgabe ist, körperfremde Antigene, Pathogene und maligne Zellen als solche zu erkennen. Auf zellulärer Ebene sind hierfür die Leukozyten zuständig: die Granulozyten, NK-Zellen und Makrophagen, als Teil des angeborenen Immunsystems, sowie die B- und T-Lymphozyten, die dem erworbenen Immunsystems zugeordnet werden (14,38).

Die fremden Zellen müssen dann in einem zweiten Schritt zerstört werden. Auch hier spielen Leukozyten auf zellulärer-, sowie von Plasmazellen gebildete Antikörper und das Komplementsystem auf humoraler Ebene eine entscheidende Rolle (14,38).

Die Immunregulation als dritte Komponente hat zur Aufgabe, die Immunreaktion des Körpers lediglich auf die pathogenen oder malignen Zellen zu beschränken, ohne sich selbst zu schaden (14,38).

Das immunologische Gedächtnis ist die vierte Funktion des Immunsystems. Es sorgt dafür, dass bei erneutem Ko

ntakt mit den körperfremden Zellen die Immunantwort schneller und effizienter ausfällt. Es wird von differenzierten T- und B-Zellen gebildet (14,38).

Das angeborene Immunsystem, zu dem auch die NK-Zellen zählen, kann sich im Gegensatz zum erworbenen Immunsystem nicht anpassen. Es stellt die erste Barriere gegen körperfremde Zellen und Pathogene dar. Natürliche Killerzellen auf der zellulären Seite des Systems sind in der Lage, pathogene Zellen direkt abzutöten. Sie entwickeln sich aus lymphatischen Zellen im Knochenmark und zirkulieren im Blutkreislauf. Sie erkennen fremde Zellen nicht über Antigene, sondern über spezifische Rezeptoren und können die Apoptose dieser Zellen induzieren. Die humoralen Bestandteile, wie Interleukine (IL), zirkulieren im Blut und erfüllen eine Botenstofffunktion, indem sie die Aktivität von NK-Zellen verstärken können (14).

Das erworbene oder adaptive Immunsystem kann sich individuell auf Krankheitserreger oder pathogene Zellen einstellen. Mit Hilfe einer Vielzahl von hochspezifischen Rezeptoren können Erreger erkannt- und abgetötet werden. Es gibt zwei Zellarten, die über diese Rezeptoren verfügen: B- und T-Lymphozyten.

B-Zellen erkennen mit ihrem spezifischen Rezeptor, dem B-Zell-Rezeptor, gelöste Antigene. Sie proliferieren und differenzieren sich reaktiv zu Plasmazellen, die Antikörperproteine sezernieren, welche dieselbe Spezifität wie der B-Zell-Rezeptor besitzen (14). Sie binden also dasselbe Antigen und vermitteln dadurch z.B. dessen Phagozytose oder die Aktivierung des Komplementsystems (14,38).

T-Zellen stammen von lymphatischen Vorläuferzellen im Knochenmark ab. Sie reifen im Thymus und zirkulieren anschließend durch lymphatisches Gewebe und Organe (14). Man unterscheidet mehrere Arten von T-Lymphozyten, die sich vor allem durch ihren T-Zell-Rezeptor-Typ, sowie der Expression von Markermolekülen an der Zelloberfläche unterscheiden (14). Die zwei wichtigen Hauptgruppen sind die CD4-tragenden T-Helferzellen und die CD8-tragenden zytotoxischen T-Zellen. Im Gegensatz zu den B-Lymphozyten sind sie nicht in der Lage, native Antigene zu erkennen, sondern brauchen die Präsentation von Antigen-Fragmenten durch antigenpräsentierte Zellen (z.B. Makrophagen, B-Lymphozyten oder Dendritische Zellen) (14). Hierfür müssen spezialisierte Proteine, sogenannte MHC-Moleküle, kleine Peptidmoleküle an die Zelloberfläche transportieren. Die Antigenerkennung wird dann über den T-Zell-Rezeptor (TCR) vermittelt (14). Für die vollständige T-Zell-Differenzierung werden jedoch, nach dem sogenannten „3-Signale-Modell“, weitere

stimulierende Faktoren benötigt: sogenannte kostimulatorische Signale an der T-Zelloberfläche (z.B. CD28) und gelöste zirkulierende Entzündungsmediatoren wie Zytokine (z.B. IL-12) (39–41). Nach Aktivierung proliferiert und differenziert die naive T-Zelle in die verschiedenen Effektorzellen, die in entzündetes Gewebe migrieren können (14,38). Die Hauptfunktion der CD4⁺ T-Helferzellen ist die Aktivierung weiterer Effektorzellen des Immunsystems. Sie produzieren z.B. Zytokine, die in Zusammenspiel mit antigenpräsentierenden Zellen zu einer Aktivierung der CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen führt. Die CD8⁺ T-Zellen hingegen haben eine direkte zytotoxische Wirkung. Sie setzen spezielle Granula frei, die unter anderem Granzyme und Perforin beinhalten. Diese aktivieren in der Zielzelle spezielle Enzyme, sogenannte Caspasen, die letztendlich zu einem programmierten Zelltod, der Apoptose, führen (14,38).

Antikörper sind Glykoproteine, die zur Fraktion der Gammaglobuline gehören. Sie werden auch als Immunglobuline (Ig) bezeichnet. Beim Menschen kann man fünf Antikörperklassen unterscheiden: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM (14,38). Allen Antikörpern ist eine gemeinsame Grundstruktur gleich: sie bestehen aus zwei identischen schweren- und leichten Polypeptidketten. Diese Ketten sind in einer Y-Form über Disulfidbrücken miteinander verbunden und besitzen jeweils einen konstanten Anteil (Fc-Teil) und einen variablen Anteil. Der konstante Anteil bestimmt die Zugehörigkeit zu einer der fünf Antikörperklassen. Die variable Domäne bildet die Antigenbindungsstelle. Durch somatische Rekombination der variablen Segmente wird hier die Bildung einer großen Anzahl verschiedener Bindungsstellen ermöglicht (14).

1.3. TIM3 – Stand der Forschung

Der in dieser Arbeit untersuchte bispezifische, T-Zell-rekrutierende Antikörper verwendet als Zielstruktur seitens der leukämischen Zellen das Molekül *T cell immunoglobulin mucin 3* (TIM3). Im folgenden Abschnitt soll auf die physiologische Rolle, sowie Aspekte zur Nutzung als Zielantigen näher eingegangen werden.

1.3.1. Die physiologische Rolle von TIM3

Das Oberflächenmolekül TIM3 wurde erstmals 2002 auf Interferon-gamma (IFN γ)-produzierenden CD4⁺ T-Helfer und CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen beschrieben (42). Es lässt sich jedoch auch auf anderen Zellen des Immunsystems, wie den Monozyten und Makrophagen, Dendritischen Zellen, Mastzellen und NK-Zellen, finden (35,42).

Nachfolgende Abbildung 1 zeigt schematisch den Aufbau des Proteins auf der Zelloberfläche.

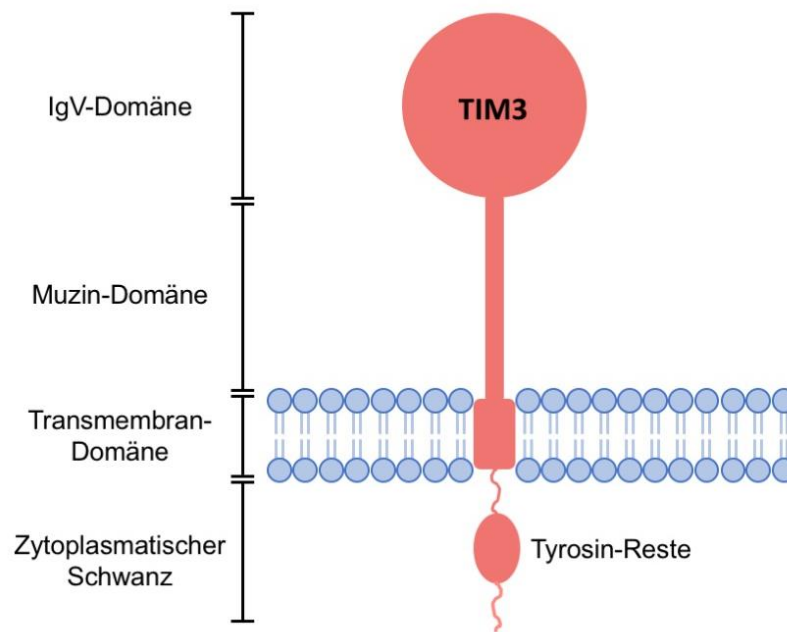


Abbildung 1: Schematische Darstellung des TIM3-Transmembranproteins auf der Zelloberfläche
 Das Transmembranprotein, welches aus 302 Aminosäureresten besteht, gliedert sich in eine N-terminale extrazelluläre Domäne (inklusive variabler Immunglobulin-Domäne (IgV) und Muzin-Domäne), eine Transmembran-Domäne und einem zyttoplasmatischen Anteil mit sechs Tyrosin-Resten (43,44).

TIM3 ist ein Glykoprotein mit einer N-terminalen, variablen Immunglobulin-Domäne, einer Muzin-Domäne, einer Transmembran-Domäne und einem zyttoplasmatischen Anteil mit sechs Tyrosin-Resten (43,44).

Der natürliche Ligand von TIM3 ist das C-Typ Lectin Galectin-9 (Gal-9). Weitere bekannte Liganden sind das *Carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1* (Ceacam1), *high-mobility group box 1* (HMGB1) und *Phosphatidylserin* (PtdSer) (43–45). Die Bindung von Gal-9 an TIM3 führt zu einer Phosphorylierung der Tyrosin-Reste im zyttoplasmatischen Teil des Moleküls (46). Die physiologische Rolle der sich anschließenden Signalkaskade konnte noch nicht abschließend geklärt werden und ist weiterhin Gegenstand einer intensiven Forschung. In der Literatur finden sich hierzu viele, teils kontroverse Angaben. (47–51).

Eine viel beschriebene Folge der Gal-9-Bindung an TIM3 auf T-Lymphozyten ist deren Funktionsverlust in Form einer verminderten Zytokinausschüttung, sowie der Einleitung des programmierten Zelltods (48,49,51,52). Dieser Mechanismus spielt offensichtlich bei der negativen Regulierung von T-Zellen bei Autoimmunprozessen eine wichtige Rolle (48,49). Die Induktion der Apoptose bei autoimmunen T-Zellen ist für den Körper überlebenswichtig, um eine überschießende Immunantwort des Körpers oder eine Reaktion auf körpereigene Zellen zu kontrollieren (53). Als Bestätigung konnte bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen, wie Multipler Sklerose, Rheumatoider Arthritis oder Psoriasis, eine verminderte TIM3-Expression auf T-Zellen nachgewiesen werden (45). Tumorzellen können sich diesen Effekt zu Nutze machen und können durch die herabgesetzte T-Zell-Antwort die Immunkontrolle des Körpers umgehen.

In Versuchen mit Tiermodellen und humanen Zellen konnte gezeigt werden, dass CD8⁺ T-Zellen in Folge einer chronischen Virusinfektion oder einer Krebserkrankung sukzessiv ihre zytotoxische Funktion verlieren (45,53). Diese Zellpopulation wird *exhausted T-cells (Tex)*, also „erschöpfte“ bzw. dysfunktionale T-Zellen genannt, wobei die Population heterogen ist (52,53). Es existieren verschiedene Stufen der Erschöpfung mit nur teilweise- oder gänzlich aufgehobenen Zytotoxizität und fließende Übergänge. Sie ist generell charakterisiert durch den Verlust der Effektorfunktion, der Proliferationsfähigkeit, einen gestörten Zellstoffwechsel, der veränderten Expression von Transkriptionsfaktoren und der Überexpression spezieller Oberflächenmarker, sogenannter inhibitorischer Checkpointmoleküle (53). TIM3 konnte neben anderen Molekülen (PD1, LAG3 oder CTLA4) als einer dieser inhibitorischen Checkpoints identifiziert werden (45,52–54). TIM3 markiert dabei unter allen dysfunktionalen T-Zellen, die am schlimmsten betroffene Subgruppe (45). So konnte gezeigt werden, dass CD8⁺ Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TILs) bei Mäusen mit Kolonkarzinom zum Großteil aus TIM3⁺, dysfunktionale T-Zellen bestehen (48). Durch Aktivierung von TIM3 auf den T-Zellen kommt es zur verminderten Zytokinausschüttung und die T-Zellen sind nicht mehr in der Lage, das Tumorwachstum zu verhindern (48).

Es zeigt sich, dass die Anzahl der TIM3⁺ T-Zellen hierbei auch mit der Krankheitsschwere korrelieren kann und generell mit einer schlechteren Prognose und einer niedrigeren Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert ist (54).

Die Entstehung der dysfunktionalen T-Zellen ist bisher schlecht verstanden; Vermutlich spielen die konstante Antigen-Präsentation bei chronischen Infekten oder Krebserkrankungen in Kombination mit weiteren kostimulatorischen Signalen, wie dem Vorhandensein verschiedener Zytokinen, sowie einer verminderten CD4⁺ T-Helfer-Zellzahl eine wichtige Rolle (53).

Der Funktionsverlust der T-Zellen ist jedoch, anders als zunächst vermutet, nicht endgültig. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten durch Blockade von Checkpointmolekülen die T-Zellfunktion, zumindest zeitweise, wiederherstellen (53,55). Auch für die Blockade von TIM3 konnte eine Wiederaufnahme der T-Zell-Funktion nachgewiesen werden (56–58).

Konträr zu der Entdeckung von TIM3 als inhibitorisches Checkpointmolekül konnte eine andere Arbeitsgruppe zeigen, dass sich bei Zugabe von Gal-9 im Tumor-Mausmodell eine deutlich vermehrte Produktion von IFN γ durch TIM3⁺ CD8⁺ T-Zellen messen lässt (47). Diese Zytokinausschüttung führte im Modell zu einem erhöhten Antitumoreffekt (47). Gleiche Effekte konnten ebenfalls für NK-Zellen gezeigt werden: nach Stimulation mit TIM3 konnte eine erhöhte IFN γ -Produktion gemessen werden (50).

1.3.2. TIM3 als Zielantigen in der AML

Abgesehen von der physiologischen Expression von TIM3 auf Zellen des Immunsystems wird auch eine erhöhte TIM3-Expression auf leukämischen Zellen beobachtet (34,59). Das Transmembranprotein konnte auf AML-Zellen in allen FAB Untertypen (mit Ausnahme der M3-AML) nachgewiesen werden (59). In Bezug auf die Verwendung als mögliche Zielstruktur

der Immuntherapie ist hervorzuheben, dass TIM3 nicht nur von AML-Zellen, sondern ebenfalls von leukämischen Stammzellen exprimiert wird, jedoch nicht von gesunden hämatopoetischen Stammzellen (34,60).

Kikushige et al. postulieren TIM3 als geeignetes Zielantigen vor allem wegen dieser fehlenden Expression auf gesunden HSCs und anderen myeloiden- oder lymphoiden Vorläuferzellen, sodass bei einer gezielten Therapie davon ausgegangen werden kann, dem gesunden hämatopoetischen System des Patienten nicht zu schaden (33). Im Mausmodell konnte dies für monoklonale TIM3-Antikörper bereits gezeigt werden (59). Es stellt sich die Frage, inwiefern diese TIM3-Expression in der Entwicklung und Aufrechterhaltung der AML von Bedeutung ist.

Erste Ergebnisse weisen außerdem darauf hin, dass TIM3 in Zusammenspiel mit seinem natürlichen Liganden Gal-9 einen wichtigen Einfluss auf die Entwicklung der AML aus myeloischen Vorerkrankungen, wie der chronisch myeloischen Leukämie (CML) oder der refraktären Zytopenie mit multilineärer Dysplasie (RCMDS), nimmt (46). Durch Bindung von Gal-9 kommt es zur Phosphorylierung der zytoplasmatischen Tyrosin-Reste. Die darauffolgende Induktion von NF- κ B und β -Catenin Signalwegen führt möglicherweise zu einer klonalen Vermehrung der TIM3⁺ Stammzellen und damit zu einem Fortschreiten der Erkrankung (46). Gestützt wird diese Hypothese durch Versuche die zeigen konnten, dass mit fortschreitender Erkrankung der Anteil an TIM3⁺ Zellen signifikant ansteigt (46). Hinsichtlich dieser Erkenntnisse könnte eine gezielte Abtötung der TIM3⁺ Zellen die Entwicklung einer AML verzögern oder gar verhindern.

1.3.3. TIM3/CD3 bispezifisches Antikörperkonstrukt

Das in dieser Arbeit untersuchte Antikörperkonstrukt der Firma Hoffmann-La Roche AG ist ein bispezifischer IgG1-basierter humaner Antikörper aus der Klasse der T-Zell-rekrutierenden Antikörper (61,62). Er bindet sowohl an das Zielantigen TIM3 auf der Tumorzelle, als auch an CD3 im T-Zellrezeptorkomplex und rekrutiert auf diese Weise T-Zellen unabhängig von ihrer eigentlichen Spezifität. Der Antikörper wird im Folgendem als *T-Cell Bispecific*, kurz TCB, bezeichnet.

Nachstehende Abbildung 2 zeigt schematisch den Aufbau des Antikörperkonstrukts sowie dessen Bindung an TIM3.

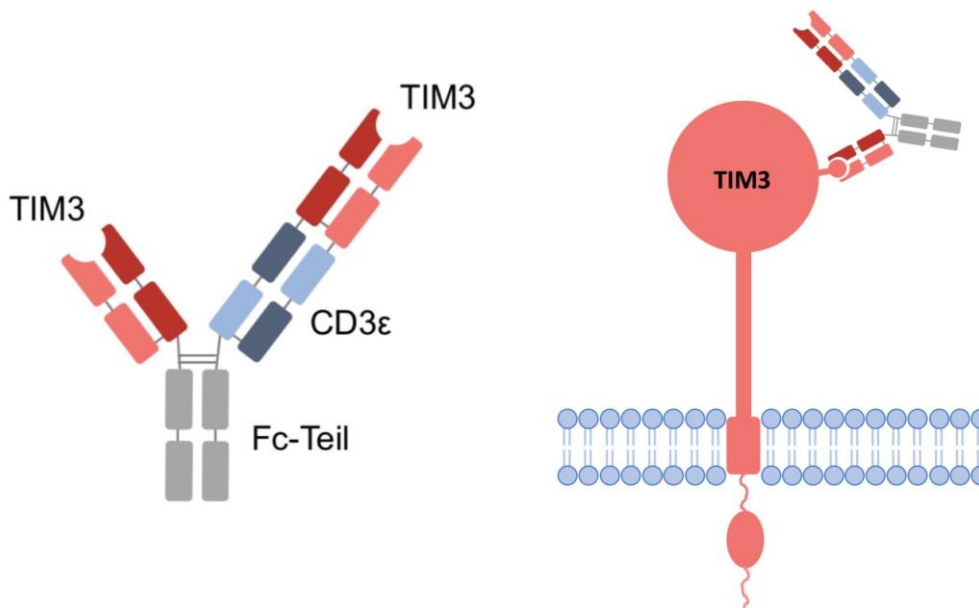


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Antikörperkonstrukts und Bindung an TIM3 auf der Zelloberfläche

Der bispezifische IgG Antikörper besitzt eine trivalente (2+1) Geometrie: Der variable Teil besteht aus drei Fab-Fragmenten mit zwei Bindungsstellen für das Tumorantigen TIM3 und einer eingebetteten T-Zell-CD3ε-Bindungsstelle. Durch Beibehalten des stillen Fc-Teils kann eine längere Halbwertszeit erreicht werden und die Aktivierung angeborener Immunzellen reduziert werden.

Der bispezifische Antikörper ist in einer trivalenten 2+1 Geometrie aufgebaut: er besitzt im variablen Teil zwei TIM3-Bindungsstellen (rot) und eine Bindungsstelle für CD3ε (im Nachfolgenden nur CD3 genannt) des T-Zell-Rezeptorkomplex (blau) (61,62).

Um die richtige Paarung der schweren und leichten Ketten der drei Antigen-bindenden—Arme (Fab) und des konstanten (Fc)-Teils des Antikörpers zu erreichen, kommen zwei verschiedene Technologien zum Einsatz. Durch die Herstellung mittels *Knobs-into-Holes* (KiH) Technologie, bei der eine durch gezielten Austausch von Aminosäuren in die Proteinstruktur der schweren Kette eingebrachte molekulare Erhöhung (engl. *Knob*) in ein Loch (engl. *Hole*) der anderen schweren Kette greift, und somit die korrekte Paarung des Fc-Teils (grau) gewährleistet wird, werden die schweren Ketten richtig gepaart (61,62). Zur richtigen Paarung der leichten Ketten wird ein als *CrossMAb* bekanntes Verfahren, das *Immunoglobulin domain crossover*, verwendet. Hierbei werden die konstanten Domänen des Fab-Arms, also die molekulare Verbindung zwischen schwerer und leichter Kette, ausgetauscht, sodass eine Interaktion nur noch an der gewünschten Stelle stattfinden kann (61,62). Somit fallen bei diesem Schritt, keine Nebenprodukte an. Durch das Beibehalten des stillen Fc-Teils hat der Antikörper eine längere Halbwertszeit (HWZ) im Vergleich zu Konstrukten, bei denen auf den Fc-Teil verzichtet wurde (61,62). Gleichzeitig reduziert die verwendete P329G-LALA-Mutation das Risiko von Fcγ-Rezeptor-vermittelten Reaktionen mit neutrophilen Granulozyten, Monozyten, Makrophagen oder NK-Zellen (61,62). Die Struktur des Antikörpers geht mit einer hohen Affinität für TIM3 auf den AML-Zellen einher (61,62). Sie gewährleistet, dass die T-Zelle nur bei gleichzeitiger Bindung von TIM3 und CD3

EINLEITUNG

aktiviert wird, was zu einer spezifischen Abtötung der Zellen führen kann (61,62). Hierbei sind die Spezifität oder der Differenzierungsstatus der T-Zelle nicht von Bedeutung (61,62).

2. ZIELSETZUNG

Ein neues immuntherapeutisches Konzept in der Therapie der akuten myeloischen Leukämie sind sogenannte bi- oder multispezifische Antikörper, die an ein Tumorantigen auf Tumorzellen binden und T-Zellen durch simultane Bindung an CD3 im T-Zell-Rezeptorkomplex zur Eliminierung der Tumorzellen rekrutieren können.

In dieser Arbeit wird ein neuartiges Konstrukt aus dieser Klasse von Antikörpern im Kontext der akuten myeloischen Leukämie evaluiert. Der Fokus liegt hierbei auf präklinischen Wirksamkeitsstudien wodurch insbesondere der Wirkmechanismus durch Bindung an das Oberflächenmolekül TIM3 und anschließende Rekrutierung von T Zellen untersucht wird. Die T-Zellen sollen in Folge aktiviert werden und eine zielgerichtete Immunantwort gegen die AML-Zellen hervorrufen. Ziel dieser Immunantwort ist eine gerichtete Lyse der Tumorzellen, ohne Schäden an den gesunden hämatopoetischen Zellen des Patienten zu nehmen.

Ein Problem der Immuntherapie sind die bisher noch unzureichend verstandenen Wirkmechanismen und Wechselwirkungen zwischen den Krebszellen und dem Immunsystem. Durch die eventuelle Entwicklung von kompensatorischen Resistenzmechanismen, kann es zu geringen Ansprechraten auf immuntherapeutische Interventionen kommen (63,64). Das Ansprechen auf einzelne Therapien ist damit schwer vorhersehbar (65).

Auf Basis von Voruntersuchungen mit AML-Zelllinien, primären AML-Zellen aus Patientenblut bzw. Knochenmark und im Zellkultur-Modellsystem, soll die Wirkung und der Einfluss von Resistenzmechanismen auf die zytotoxische Wirkung untersucht und besser verstanden werden. Zusätzlich soll der Einfluss auf gesunde Zellen des hämatopoetischen Systems untersucht werden.

3. MATERIAL UND METHODEN

Im Folgenden sind alle Materialien und Lösungen, die für die Versuche verwendet wurden, unter Angabe des Herstellers alphabetisch aufgelistet.

3.1. Geräte

Produkt	Hersteller
CO2 Inkubator (C170)	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank (-80 °C)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Gefriertruhe (-150 °C)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Kühlschrank (2-8 °C)	Liebherr, Bulle, Schweiz
Kolbenhubpipetten (Research plus)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Laminar Flow Werkbank (Safe 2020/HeraSafe)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Mikroskop (DMIL)	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
PipettBoy acu	Integra Biosciences, Ferndwald, Deutschland
Stickstofftank (-196 °C)	Messer Industriegase GmbH, Bad Soden, Deutschland
Vortex Mischer (Reax top)	Heidolph Instruments GmbH&Co.KG, Schwabach, Deutschland
Wasserbad (VWB 12)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Zellzählgerät (Countess™)	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Zentrifuge (Centrifuge 5920R)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge (Rotina 420R)	Hettich Lab Technology, Tuttlingen, Deutschland

3.2. Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Countess™ cell counting chamber slides	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Cryogenic Vials 1,8 ml	Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland
Handschuhe	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Pasteurpipetten	VWR, Radnor, PA, USA
Pipettenspitzen 0,5-20/2-200/50-1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Polypropylen-Zentrifugenröhrchen 15 ml	Falcon™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Polypropylen-Zentrifugenröhrchen 50 ml (CentriStar™)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA

Produkt	Hersteller
Polystyrene-round-bottom-tube 5 ml	Falcon™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Safe-Lock Tubes 1,5/2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Serologische Pipetten 5/10/25 ml	Corning, New York City, NY, USA
Tissue Culture Plate, 12/24/48 Well	Falcon™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Tissue Culture Plate, 96 Well, U Bottom	Falcon™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zellkulturflaschen 75 ml	Falcon™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

3.3. Zellkultur

3.3.1. Materialien und Zelllinien

Produkt	Hersteller/Zusammensetzung
2- Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Alpha MEM Eagle	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
BiT 9500 Serum Substitution	StemCell™ Technologies, Vancouver, BC, Canada
Blastenmedium	Alpha MEM + 12,5 % Horse Serum (hitzeinaktiviert) + 12,5 % FBS (hitzeinaktiviert) + 1 % Pen/Strep/L-Glutamin + 1 % HEPES
CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester)	BioLegend, San Diego, CA, USA
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
DPBS (Dulbecco's Phosphat buffered saline)	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
EDTA 0,5 M pH 8.0 (Ethylendiamintetraacetat)	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
FBS (Fetal Bovine Serum)	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Formaldehyd Lösung 37 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
HEPES Buffer Solution (1 M) (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Horse Serum	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Human IL-3 (0,1 mg/ml in PBS + 0,1 % BSA)	Peptotech, Rocky Hill, NJ, USA
MACS BSA Stock Solution (10 % Bovine Serum Albumin)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Pen Strep Glutamine (100X) (Penicillin, Streptomycin, Glutamine)	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
R10 Zellmedium	RPMI 1640 + 1 % HEPES + 1 % Pen/Strep/L-Glutamin + 10 % FBS (hitzeinaktiviert)
R20 Zellmedium	RPMI 1640 + 1 % HEPES + 1 % Pen/Strep/L-Glutamin + 20 % FBS (hitzeinaktiviert)

Produkt	Hersteller/Zusammensetzung
Recombinant human G-CSF (0,1 mg/ml in PBS + 0,1 % BSA)	Peptotech, Rocky Hill, NJ, USA
RPMI 1640	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
TPO (0,1 mg/ml in PBS + 0,1 % BSA)	Peptotech, Rocky Hill, NJ, USA
Trypanblau	Life Technologies, New York City, NY, USA
Trypsin 0,05 %	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Wasser, steril	Gene Center, München, Deutschland
Zytokinmedium	Blastenmedium + 20 ng/ml IL-3, TPO, GCSF, 2-Mercaptoethanol

Zelllinie	Hersteller
HL-60 (human, AML)	Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland
KASUMI-3 (human, AML)	
MOLM-13 (human, AML)	
MS-5 (murin, Stroma Zellen)	

3.3.2. Zellkulturbedingungen, Zellzählung und Viabilitätsmessung

Alle angegebenen Arbeitsschritte erfolgten zur Vermeidung bakterieller Kontaminationen an einer *Laminar Air Flow* Werkbank unter sterilen Bedingungen.

Alle verwendeten Zelllinien wurden in 75 ml Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Als Nährmedium wurde R10-Medium (MOLM-13 und HL-60), R20-Medium (KASUMI-3) oder Blastenmedium (MS-5) verwendet. Alle drei Tage wurden die Zellen mit Hilfe des Lichtmikroskops und eines Zellzählers auf Wachstum und Viabilität überprüft. Hierzu wurden 20 µl Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau versetzt. Durch Abnahme von Zellen und Volumenersatz durch das entsprechende Medium, wurde eine konstante Konzentration gewährleistet.

Die adhärente Zelllinie MS-5 musste vor der Entnahme von Zellen mit Trypsin behandelt werden, um eine Ablösung der Zellen vom Flaschenboden zu erreichen.

3.4. Materialgewinnung

3.4.1. Materialien und Kits

Produkt	Hersteller
Butterfly (Safety-Multifly-Kanüle 21G)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Dreiwegehahn	Uno Plast As, Hundestedt, Dänemark
Easy Sep Human CD3 positive Selection Kit II	StemCell™ Technologies, Vancouver, BC, Canada
Ficoll-Separationslösung (Biocoll)	Biochrom, Berlin, Deutschland

Produkt	Hersteller
Heparin (Heparin-Natrium-25000-ratiopharm)	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Human NK Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Human Pan T Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Kanülen (Perfusion 50 ml Syringe)	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Nadel (Mikrolance™ 3, 25G)	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Spritze (Injekt-F, 1 ml)	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

3.4.2. Isolation mononukleärer Zellen

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) von gesunden Probanden wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Die Blutentnahme erfolgte mit einer 21G Butterfly Kanüle aus einer peripheren Vene. 50 ml Falcon Röhrchen zum Sammeln des Blutes wurden vor der Blutentnahme mit 0,16 ml Heparin beschichtet, um eine Agglutination des Blutes zu verhindern.

Peripheres Blut und Knochenmarksblut von Patienten der Medizinischen Klinik III des Klinikums der Universität München wurde im Rahmen der Routineuntersuchungen gewonnen und zur zytogenetischen Untersuchung im angeschlossenen Labor für Leukämiediagnostik untersucht. Überschüssiges Material wurde auf Basis eines Ethikvotums und mit Zustimmung der Patienten analog den Spenden der gesunden Probanden verarbeitet und kryokonserviert.

Nach Blutentnahme wurde das Probandenblut im Verhältnis 1:2 mit PBS verdünnt. Anschließend konnte die Blutverdünnung auf eine Ficoll-Trennlösung aufgeschichtet werden und 30 Minuten mit 880 relativer Zentrifugalbeschleunigung (RCF) zentrifugiert werden.

Der Leukozytenring oberhalb der Ficoll-Schicht wurde mit Hilfe einer Pasteur-Pipette abgenommen und in einem 10-minütigen Zentrifugationsschritt bei 1800 RCF mit PBS aufgereinigt.

Die so gewonnenen Spender-PBMCs wurden nun direkt weiterverwendet oder für den späteren Gebrauch in FCS mit 10 % DMSO kryokonserviert.

Das aus Knochenmark gewonnene Blut wurde im Verhältnis 1:3 mit PBS verdünnt. Die weiteren Verarbeitungsschritte erfolgten analog der Verarbeitung des peripheren Blutes.

3.4.3. Isolation von T-Zellen

Die Isolation gesunder T-Zellen aus PBMCs wurde mittels magnetischer Separation durchgeführt. Hierbei wurden sowohl positive als auch negative Separationstechniken angewandt.

Bei der positiven Selektion mit dem EasySep™ Kit wurden die Spender-PBMCs mit einem Tetramer-Antikörperkomplex behandelt, der das Oberflächenmolekül CD3 auf den T-Zellen erkennt. Durch die Zugabe von magnetischen Beads, die den zuvor hinzugegebenen Antikörperkomplex gebunden haben, und anschließender Inkubation der Probe in einer Magnetkammer verblieben nur die markierten CD3-positiven T-Zellen. Überschüssige Zellen, die

nicht magnetisch gekennzeichnet wurden, konnten verworfen oder zur Weiterverwendung benutzt werden.

Um T-Zellen zu selektieren, die nicht vorher magnetisch markiert wurden, wurde eine negative Selektion mit Hilfe des Pan-T-Cell-Kits vorgenommen werden. Hierbei wurden die Spender-PBMCs mit einem Antikörper-Cocktail behandelt, der die Oberflächenmoleküle aller Zellen, mit Ausnahme der T-Zellen, erkennen- und binden konnte. Anschließend wurden die gebundenen Zellen mit Beads magnetisch gekennzeichnet. Die T-Zellen konnten dann mit Hilfe einer magnetischen Säule, die die gekennzeichneten Zellen gebunden hatte, aufgereinigt werden.

3.4.4. Isolation von NK-Zellen

Die Aufreinigung der NK-Zellen erfolgte mittels negativer, magnetischer Selektion, analog der negativen T-Zell-Selektion (Vgl. Kapitel 3.4.3) mit einem entsprechendem Antikörper-Cocktail.

3.5. Durchflusszytometrie

3.5.1. Materialien und Antikörper

Produkt	Hersteller/Zusammensetzung
FACS-Gerät (BD LRS II)	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
FACS-Fixationspuffer	FACS-Puffer + 2 % Formaldehyd
FACS-Puffer	DPBS + 0,5 % BSA + 2 mM EDTA
Human FcR Blocking Reagent	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland
LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Software (FlowJo 10.1)	FlowJo LCC, Ashland, OR, USA

Antikörper gegen	Konjugierter Fluoreszenzfarbstoff	Klon	Hersteller
Armenian Hamster IgG isotype	APC/Cy7	HTK888	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD2	APC	RPA-2.10	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD3	APC	UCHT1	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD4	APC/Cy7	RPA-T4	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
CD8a	PerCP/Cy5.5	RPA-T8	eBioscience, San Diego, CA, USA
CD16	Alexa Fluor 647	B73.1	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD29	APC/Cy7	HMB1-1	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD33	PE/Cy7	WM-53	eBioscience, San Diego, CA, USA
CD56	FITC	HCD56	BioLegend, San Diego, CA, USA

Antikörper gegen	Konjugierter Fluoreszenzfarbstoff	Klon	Hersteller
CD69	FITC	FN50	BioLegend, San Diego, CA, USA
Human IgG Fc	Alexa Fluor 647	HP6017	BioLegend, San Diego, CA, USA
IgG1, mouse κ isotype	BV	MOPC-21	BioLegend, San Diego, CA, USA
IgG1, mouse κ isotype	FITC	P3.E.2.8.1	eBioscience, San Diego, CA, USA
IgG2A, rat isotype	PE	LHK1216011 (Lot)	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
PD1 (CD279)	BV	EH12.2H7	BioLegend, San Diego, CA, USA
TIM3 (CD366)	PE	YGR0714011 (Lot)	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA

3.5.2. Durchflusszytometrie und Färbung

Die Durchflusszytometrie (FACS) ist eine Methode, um Fluoreszenz-markierte Zellen zu analysieren. Die Zellsuspension wird mittels einer Mikrokanalküvette in einem sehr dünnen Strahl geleitet. Jede Zelle wird einzeln an einem Laser vorbeitransportiert. Der Laser detektiert die verschiedenen Fluoreszenzsignale. Jede einzelne Zelle kann so nach Granularität (im *Side-Scatter*, SSC), nach Größe (im *Forward-Scatter*; FSC) oder gemessener Fluoreszenzintensität sichtbar gemacht werden.

Die Auswertung der Durchflusszytometrie-Analyse erfolgte mit Hilfe der FlowJow Software.

Zur Analyse mittels fluoreszierenden Farbstoffes wurden die Zellen zunächst mit einem FcR-Blockierungsreagenz für 10 Minuten bei 4 °C behandelt, um eine unspezifische Antikörperbindung an den Fc-Rezeptor und somit eine Verfälschung der Ergebnisse zu verhindern. Mit Hilfe einer LIVE/DEAD™ Färbung, die zu einem spezifischen Anfärben toter Zellen führt, konnten diese bei der Auswertung der Ergebnisse ausgeschlossen werden. Die Antikörperfärbungen mit dem konjugierten Farbstoff wurde nach Herstelleranweisung für 15 Minuten bei 4 °C durchgeführt. Zwischen den Färbeschritten wurden die Zellen mit FACS-Puffer gereinigt. Die gefärbten Zellen wurden mit Hilfe von Formaldehyd fixiert und bis zum Messzeitpunkt im Kühlschrank aufbewahrt.

3.6. Zellstimulation

3.6.1. Materialien

Produkt	Hersteller
Dynabeads CD3/CD28 CTS™	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Human IL-15 (in PBS + 0,1 % BSA)	Peptotech, Rocky Hill, NJ, USA

3.6.2. Stimulation von T-Zellen mit CD3/CD28-Beads

Um die Aktivität der T-Zellen zu steigern und eine Hochregulation von Oberflächenmarkern, insbesondere TIM3, zu provozieren, wurden T-Zellen mit Hilfe von magnetischen Beads stimuliert. Hierfür wurden die T-Zellen in einer Konzentration von 1×10^6 /ml in einer 24-Well Platte mit R10-Medium ausgesät und mit CD3/CD28 Beads in einem *Effector- to target-cell ratio* (E:T Ratio, wobei E = T-Zellen und T = AML-Zellen) von 2:1 behandelt. Die Aktivierung erfolgte über Nacht im Inkubationsschrank. Vor Verwendung der aktivierten T-Zellen wurden die magnetischen Beads mit einer Magnet-Kammer aus der Zellsuspension entfernt.

3.6.3. Stimulation von NK-Zellen mit IL-15

Um die TIM3-Expression auf NK-Zellen zu verstärken, wurden diese über Nacht mit Interleukin-15 stimuliert. Hierfür wurden 1×10^6 NK-Zellen /ml in R10-Medium mit 1 ng/ml IL-15 in einer 24-Well Platte ausgesät und über Nacht inkubiert. Vor Verwendung der aktivierten NK-Zellen, wurde das Interleukin durch mehrmaliges Waschen mit R10-Medium entfernt.

3.7. Versuchsaufbau

3.7.1. TIM3-Expression auf AML-Zelllinien

Die AML-Zelllinien KASUMI-3, HL60 und MOLM-13 wurden mit einem konjugierten TIM3-Antikörper oder einem passenden Isotyp-Antikörper angefärbt und mittels Durchflusszytometrie auf ihre TIM3-Oberflächenexpression überprüft (vgl. Kapitel 3.5.2). Hierfür wurde die *Median Fluorescence Intensity* (im Folgenden MFI genannt) für den TIM3-Farbstoff ermittelt und mit Hilfe der MFI des Isotyp-Farbstoffes die MFI-Ratio mit folgender Formel berechnet:

$$MFI\text{-Ratio}\ TIM3 = \frac{MFI\ TIM3}{MFI\ TIM3_{Isotyp}}$$

Für die MFI-Ratio wurde ein Cut-off-Wert definiert: MFI-Ratios $\geq 1,5$ wurden als positive Antigenexpression gewertet (66).

3.7.2. Bestimmung des IC50-Werts

Um den IC50-Wert des TIM3-TCBs zu bestimmen, wurde ein Zytotoxizitäts-Assay mit drei humanen AML-Zelllinien durchgeführt, die zuvor auf ihre TIM3-Expression mittels Durchflusszytometrie überprüft wurden. Hierfür wurden zunächst gesunde Spender-PBMCs aufgetaut und die T-Zellen mittels positiver Selektion isoliert. In einer 96-Well U-Bottom Kulturplatte wurden $2,4 \times 10^6$ T-Zellen und 6×10^5 Zellen der entsprechenden Zelllinie in 200 μ l R10-Medium ausgesät (E:T Ratio = 4:1). Der TIM3-Antikörper wurde in sieben Konzentrationen (10^{-7} M – 10^{-13} M) hinzugegeben. Als Negativkontrolle diente ein Well ohne Antikörper, als Positivkontrolle wurde

ein bekannter CD33-TCB verwendet. Die Zellen wurden über 48 Stunden inkubiert. Vor der Durchflusszytometrie wurden die Zellen mit einem Fluorochrom-konjugierten Antikörper gegen CD2 (zur Abgrenzung der T-Zellen) und einem Fluorochrom-konjugierten Antikörper gegen CD33 (zur Abgrenzung der Blasten) angefärbt. Die spezifische Lyse durch den Antikörper wurde nach der Durchflusszytometrie mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$\text{Spezifische Lyse} = 100 - \left(\frac{\% \text{Blasten mit TCB}}{\% \text{Blasten ohne TCB}} * 100 \right)$$

3.7.3. Langzeitkultursystem mit primären AML-Zellen

Für das Langzeitkultursystem (im Folgenden LZK genannt) wurden MS-5-Stroma-Zellen in Blastenmedium für fünf Minuten bei 550 RCF zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in einer Bestrahlungsanlage mit 60 Gy bestrahlt, erneut zentrifugiert und mit Hilfe eines Zellzählers auf ihre Viabilität überprüft. Mit einer Konzentration von 5×10^4 /ml wurden die Zellen in einer 48-Well Platte (je 500 μ l) ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Primäre AML-Zellen wurden in zweifachem Zytokinmedium mit einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/Well auf die MS-5 aufgeschichtet (je 500 μ l). Um eine optimale Regeneration der AML-Zellen zu erreichen, wurden diese für 3 Tage auf den MS-5 Feeder-Zellen inkubiert.

An Tag 3 der Langzeitkultur wurden T-Zellen aus PBMCs isoliert. Vorsichtig wurden 500 μ l von der 48-Well Platte abgenommen und verworfen. Das Volumen wurde mit T-Zellen ($2,5 \times 10^5$ in zweifachem Zytokinmedium) ersetzt. Anschließend wurden die TCBs in einer Konzentration von 1×10^{-8} M hinzugegeben.

In einem dreitägigen Rhythmus wurde in allen Wells die Hälfte des Mediums erneuert. Hierfür wurden 500 μ l abgenommen und verworfen. Es ist davon auszugehen, dass die Zytokine innerhalb von 3 Tagen aufgebraucht wurden. Aus diesem Grund erfolgte der Volumenersatz mit zweifacher Zytokinkonzentration. Für die Antikörper wurde hingegen nur die Menge aus 500 μ l ersetzt, da diese nicht verbraucht wurden.

An den jeweiligen Messtagen wurde die Zellsuspension in ein Falcon übertragen, gezählt und gefärbt auf: CD33 (zur Abgrenzung der AML-Zellen), CD2 (zur Abgrenzung der T-Zellen), CD69 (als T-Zell Aktivierungsmarker), TIM3 und PD1 (zur Verlaufskontrolle auf den AML-Zellen, sowie als Aktivierungsmarker für T-Zellen), murines CD29 (zum Ausschluss von MS-5 Verunreinigung der Probe). Die spezifische Lyse durch den TCB wurde mit Hilfe der in Kapitel 3.7.2 erläuterten Formel berechnet.

Abbildung 3 zeigt beispielhaft das Vorgehen bei der Auswertung der Durchflusszytometriedaten.

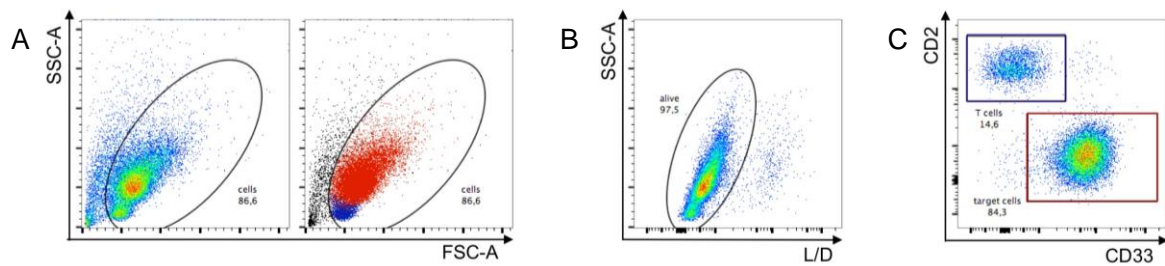


Abbildung 3: Gating-Strategie I

Exemplarische Darstellung der Gating-Strategie bei der Auswertung der Langzeitkultur. **A:** (1) Die Eingrenzung der gemessenen Zellpopulation erfolgt zunächst mittels Forward-Scatter (FSC) und Sideward-Scatter (SSC) nach Granularität und Größe, um nur vollständig erhaltene Zellen und keine Zellpartikel zu berücksichtigen. (2) blau: CD2⁺ T-Zellen, rot: CD33⁺ AML-Zellen **B:** Mit einem hinzugefügten LIVE/DEADTM-Farbstoff können in einem zweiten Schritt tote Zellen gefiltert werden. **C:** Die Fluorochrom-konjugierten Farbstoffe gegen CD2 und CD33 können in einem letzten Schritt die CD2⁺ T-Zellpopulation (blau) und CD33⁺ AML-Zellpopulation (rot) sichtbar machen.

Zunächst wurden mit Hilfe des Forward-/Sideward-Scatters die Zellpopulationen eingegrenzt und Zellpartikel ausgeschlossen. Durch die unterschiedliche Granularität und Größe der Zellen, ließ sich hier schon grob Zellpopulationen voneinander unterscheiden (rot vs. blau). Mit Hilfe des Aquastain LIVE/DEADTM-Farbstoffes wurden in einem zweiten Schritt alle messbar toten Zellen aus der Population entfernt. Mit Hilfe der Fluoreszenzmarkierung der Oberflächenmarker CD33 und CD2 konnte zwischen leukämischen Zellen und T-Zellen unterschieden werden.

3.7.4. Auswertung der AML-Patientendaten

Zur Auswertung der Patientenproben (vgl. Kapitel 4.1) wurden die Durchflusszytometriedaten aus dem Labor für Leukämiediagnostik des Klinikum Großhaderns verwendet. Die Daten wurden zunächst analog zu Abbildung 3A ausgewertet. Anschließend wurde die MFI-Ratio für TIM3 mit Hilfe der in Kapitel 3.7.1 erläuterten Formel berechnet.

Nachstehende Abbildung 4 zeigt beispielhaft das Vorgehen bei der Datenauswertung.

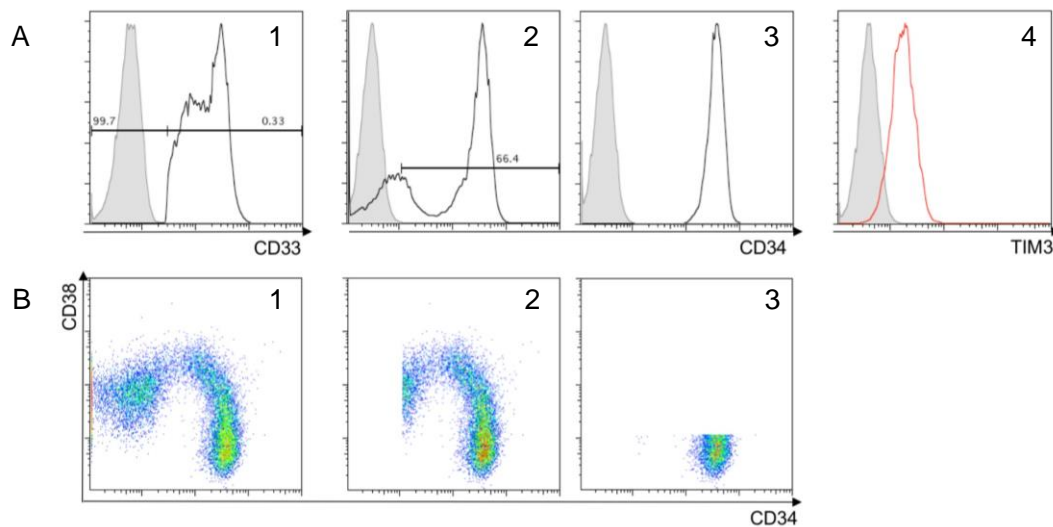


Abbildung 4: Gating-Strategie II

Exemplarische Darstellung der Gating-Strategie bei der Auswertung der AML-Patientendaten. Der erste Schritt erfolgt analog zu Abbildung 3A und ist hier nicht dargestellt. **A:** Die CD33⁺ AML-Zellen werden aus der Zellpopulation gefiltert (1). Hieraus kann direkt die TIM3-MFI-Ratio ermittelt werden (4) oder die CD34⁺/CD38⁻ Zellpopulation gefiltert werden (2 und 3); **B:** Aus der CD33⁺ Zellpopulation aus Abbildung A1 (in B1 als Dotplot dargestellt) wird zunächst die CD34⁻ Population entfernt (2), anschließend wird die CD38⁺ Population entfernt, so dass eine CD34⁺/CD38⁻ Zellpopulation sichtbar wird (3).

Die Zellen wurden mit Hilfe der Isotypfärbung in CD33-positive und -negative Zellen aufgeteilt. Von den CD33-positiven Zellen wurde die MFI für TIM3 ermittelt und mit Hilfe der MFI des Isotyps die MFI-Ratio berechnet.

Zur Identifizierung leukämischer Stammzellen wurden die CD33⁺-Zellen zusätzlich anhand der Expression von CD34 und CD38 aufgeteilt, um die CD34⁺/CD38⁻-Fraktion zu ermitteln.

3.7.5. CFSE-Färbung

Um zwei T-Zell-Populationen bei der Durchflusszytometrie unterscheiden zu können, wurde eine CFSE-Färbung (Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester) verwendet. Hierzu wurde eine 4 ml Zellsuspension (1x10⁶ Zellen /ml) mit warmen DPBS + 0,1 % BSA hergestellt und nach Zugabe von 0,5 µl CFSE bei 37 °C für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde auf 0 °C gekühltes R10 Zellmedium im 5-fachen Überschuss zugegeben und für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für fünf Minuten bei 550 RCF bei 4 °C wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 30 ml R10-Medium resuspendiert. Dieser Zentrifugationsschritt wurde insgesamt dreimal wiederholt.

3.7.6. T-Cell Fratricide Assay

Die Auswirkung des TIM3-TCBs auf gesunde T-Zellen wurde in einem 48 Stunden Zytotoxizitäts-Assay untersucht. T-Zellen wurden aus PBMCs isoliert und mit CD3/CD28-Beads über Nacht bei 37 °C stimuliert. Naive T-Zellen des gleichen Spenders wurden mit CFSE gefärbt, um sie in der Durchflusszytometrie von den stimulierten T-Zellen unterscheiden zu können. Die Zellen wurden

in verschiedenen E:T Ratios mit 10^{-7} M TIM3-TCB und ohne TCB in einer 96-Well U-Bottom Kulturplatte für 24 und 48 Stunden inkubiert. Die Färbung erfolgte mit CD4-, CD8- und TIM3-konjugierten Färbeantikörpern.

3.7.7. Internalisierungs-Assay

Um eine mögliche Internalisierung von TIM3 durch die AML-Zellen nachzuweisen, wurde ein spezieller Internalisierungs-Assay verwendet. Zur besseren Verständlichkeit ist nachfolgend das Protokoll als Zeitachse visualisiert.

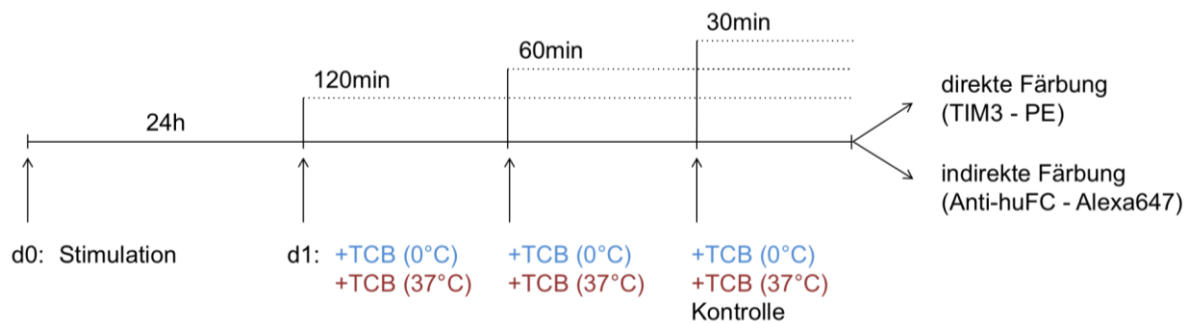


Abbildung 5: Zeitachse Internalisierungsprotokoll

Darstellung des zeitlichen Versuchsablaufs. Der Versuch wird mit Spender-T- und NK-Zellen durchgeführt, die nach einer 24-stündigen Stimulation für zwei Stunden, eine Stunde oder 30 Minuten mit 10^{-7} M TIM3-TCB inkubiert werden. Jeder Versuch wird doppelt angesetzt, wobei ein Ansatz auf Eis (0 °C) und ein Ansatz im Wasserbad (37 °C) inkubiert wird. Mit einem Fluoreszenz-gekoppeltem Antikörper wird TIM3 an der Zelloberfläche (direkt) und der TIM3-TCB über seinen Fc-Teil (indirekt) angefärbt.

NK-Zellen und T-Zellen von gesunden Spendern wurden vor dem Versuch über Nacht stimuliert. AML-Zellen wurden aufgetaut und sofort verwendet. Die Zellen wurden in 5 ml Tubes für 120, 60 und 30 Minuten mit 10^{-7} M TIM3-TCB entweder im 37 °C Wasserbad oder auf Eis (um die Internalisierung zu verhindern) inkubiert. Ein Kontrollröhrchen zur Messung der Hintergrundfluoreszenz wurde ohne Zugabe des TCBs inkubiert. Die Färbung erfolgte sowohl direkt mit einem TIM3-konjugierten Färbeantikörper, als auch indirekt mit einem sekundären Antikörper, der den Fc-Teil des TCBs bindet.

Die Internalisierung wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Internalisierung (\%)} = (MFI\ 0\ ^\circ\text{C} - MFI\text{background}) - \frac{(MFI\ 37\ ^\circ\text{C} - MFI\text{background})}{(MFI\ 0\ ^\circ\text{C} - MFI\text{background})}$$

4. ERGEBNISSE

4.1. Validierung von TIM3 als Zielantigen in der AML

Um TIM3 als geeignetes Zielantigen zu validieren, wurden Blut- und Knochenmarksproben von AML-Patienten der Medizinischen Klinik und Poliklinik III des Klinikums der Universität München hinsichtlich ihrer Oberflächenexpression von TIM3 untersucht. Insgesamt konnten 173 Patientenproben gewonnen und analysiert werden, davon 156 von Patienten mit einer Erstdiagnose (ED) und 17 Patienten mit einem Rezidiv (Rez) der AML. Abbildung 6 zeigt die Expression von TIM3 als MFI-Ratio auf den CD33⁺-Bulk-Zellen sowie den zugehörigen CD34⁺/CD38⁻-leukämischen Stammzellen der Patienten mit ED.

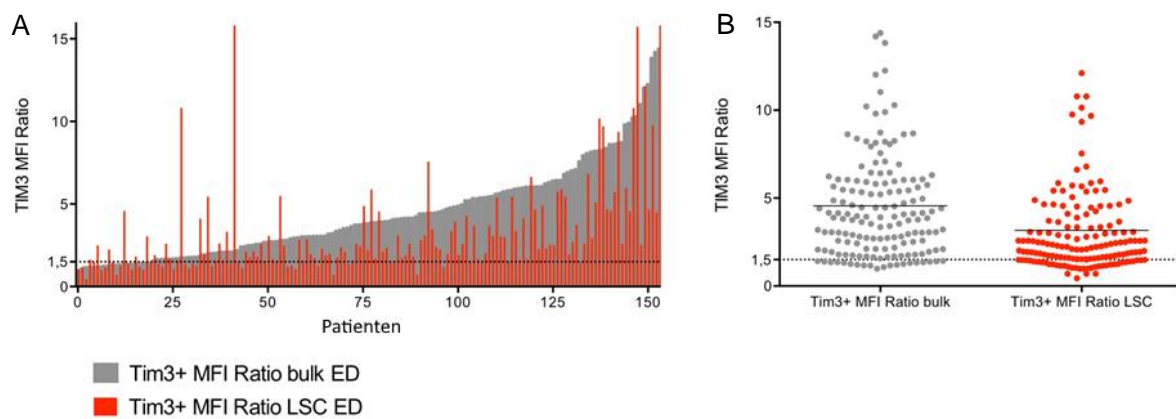


Abbildung 6: TIM3-Expression Patientenproben AML Erstdiagnose (ED)

A: Vergleich der TIM3-MFI-Ratio von CD33⁺ Bulk Zellen (grau; aufsteigend sortiert) mit den dazugehörigen CD34⁺/CD38⁻ LSCs (rot); **B:** Vergleich der TIM3-MFI-Ratio Mittelwerte (durchgezogene Linie) zwischen Bulk Zellen (grau, Mittelwert: 4,56) und LSCs (rot, Mittelwert: 3,17); die Markierung bei 1,5 repräsentiert den Wert, ab dem die Expression als positiv gewertet wurde; n=156

Die Auswertung der Proben ergab, dass die überwiegende Mehrheit der Patienten leukämische Zellen im Blut oder im Knochenmark hatten, die auf ihrer Oberfläche das Molekül TIM3 tragen (TIM3-MFI-Ratio $\geq 1,5$). Insgesamt war dies bei 136/156 (87 %) Patienten in der CD33⁺ Zellpopulation nachweisbar. Bei 118/156 (76 %) Patienten konnten ebenfalls TIM3⁺ Zellen im leukämischen CD34⁺/CD38⁻-Stammzellkompartiment gefunden werden. Von den 20 Proben, in denen in der CD33⁺ Zellpopulation keine TIM3⁺ Zellen nachgewiesen werden konnten, waren in sechs Proben jedoch TIM3⁺ leukämische Stammzellen nachweisbar. Somit waren in der Summe 142/156 (91 %) der Proben in mindestens einer der untersuchten Zellpopulationen positiv für das Zielantigen getestet. Aus Abbildung 6B wird ersichtlich, dass die TIM3-Expression auf den Bulk-Zellen mit einem MFI-Ratio Mittelwert von 4,56 höher war, als auf den LSCs, die einen Mittelwert von 3,17 aufwiesen. Insgesamt konnte also festgestellt werden, dass bei einer großen Mehrheit der AML-Patienten leukämische Zellen mit einer deutlichen TIM3-Oberflächenexpression zu finden waren.

Die nachfolgende Abbildung 7 zeigt die Ergebnisse der 17 ausgewerteten Proben von Patienten mit einem AML-Rezidiv.

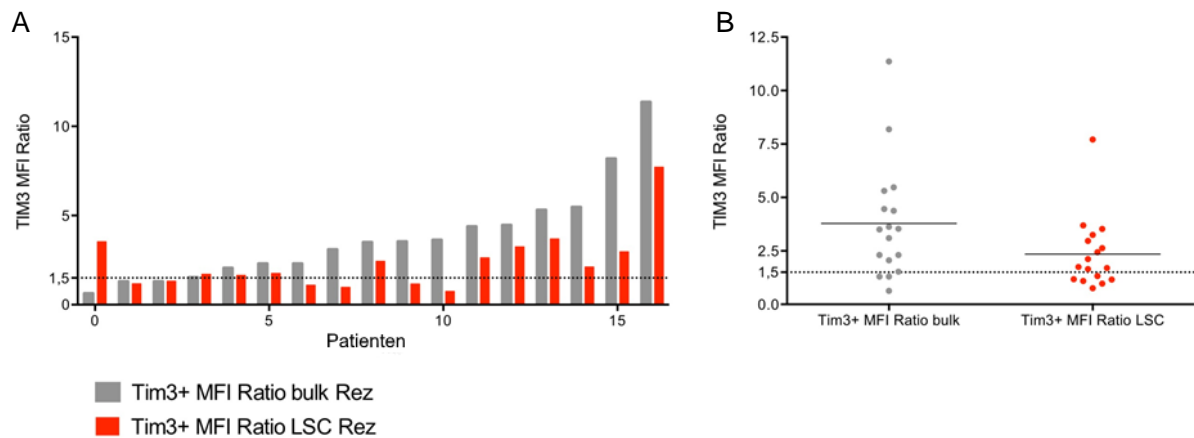


Abbildung 7: TIM3-MFI-Ratio Patientenproben AML Rezidiv (Rez)

A: Vergleich der TIM3-MFI-Ratio von CD33⁺ Bulk Zellen (grau; aufsteigend sortiert) mit den dazugehörigen CD34⁺/CD38⁻ LSCs des gleichen Patienten (rot); **B:** Vergleich der TIM3-MFI-Ratio Mittelwerte (durchgezogene Linie) zwischen Bulk Zellen (grau, Mittelwert: 3,79) und LSCs (rot, Mittelwert: 2,35); die Markierung bei 1,5 repräsentiert den Wert, ab dem die Expression als positiv gewertet wurde; n=17

Es zeigte sich, dass auch auf der Oberfläche von leukämischen Zellen der Rezidivpatienten TIM3 nachgewiesen werden konnte. In insgesamt 15/17 (88 %) Proben konnten TIM3⁺-Bulk-Zellen und/oder LSCs nachgewiesen werden (14/17 (82 %) bei CD33⁺-Zellen, 11/17 (65 %) bei CD34⁺/CD38⁻-Zellen). Die mittlere Expressionsrate von TIM3 war mit 3,79 für die Bulk-Zellen und 2,35 für die LSCs auch hier im CD33⁺-Zellkompartiment etwas höher ausgeprägt.

4.2. Etablierung eines Zellkultur Modellsystems

Dem zu charakterisierenden TCB liegt ein bispezifisches Konstrukt zu Grunde. Er besitzt zwei Antigen-Kontaktstellen, die über einen Fc-Teil miteinander verbunden sind. Mit Hilfe einer Bindung an das T-Zell-Oberflächenmolekül CD3, sowie an das Oberflächenmolekül TIM3 auf Seiten der leukämischen Zellen, fungiert er als eine Art Adapter zwischen den körpereigenen Immunzellen und den pathologischen Krebszellen.

Um die Effektivität des TCBs, leukämische Zellen im Körper zu eliminieren, zu testen, wurden zwei verschiedene *in vitro* Verfahren angewendet. In einem ersten Schritt wurden humane AML-Zelllinien und allogene, gesunde Spender-T-Zellen verwendet. In einem zweiten Schritt wurde der TCB dann direkt an primären AML-Patientenproben getestet. Auch hierfür wurden allogene Spender-T-Zellen verwendet.

4.2.1. TIM3-Expression auf AML-Zelllinien

An Stelle von primären Patientenproben wurden zunächst AML-Zelllinien für eine erste Zytotoxizitätskontrolle verwendet. Dieses Vorgehen wurde gewählt, da Patientenmaterial nicht in unbegrenztem Ausmaß zur Verfügung stand und zunächst die erfahrungsgemäß große Variabilität

zwischen den Patientenproben nicht berücksichtigt werden musste. Die Zelllinien hatten allesamt als Ursprung humane AML-Zellen.

Nach ausführlicher Datenbankrecherche wurden drei verschiedene Zelllinien für die Versuche ausgewählt (KASUMI-3, HL-60, MOLM-13) und hinsichtlich ihrer TIM3-Expression untersucht.

In Abbildung 8 sind repräsentative Durchflusszytometrie-Plots für die verwendeten Zelllinien aufgeführt.

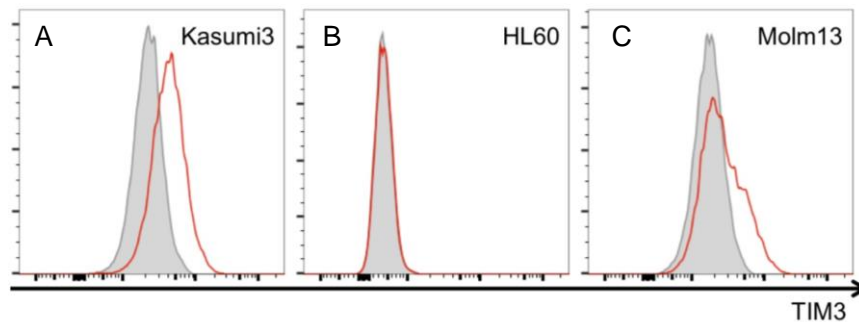


Abbildung 8: TIM3-MFI-Ratio der verwendeten Zelllinien

Exemplarische Darstellung der Auswertung der Durchflusszytometrie zur Berechnung der TIM3-MFI-Ratio auf KASUMI-3-, HL-60- und MOLM-13-Zellen. In Grau ist die IgG1-Isotypfärbung dargestellt, in Rot die dazugehörige TIM3-Färbung.

A: KASUMI-3 (MFI-Ratio: 1,88); **B:** HL-60 (MFI-Ratio: 1,03); **C:** MOLM-13 (MFI-Ratio: 1,38)

In Abbildung 8A kann man erkennen, dass sich die Fluoreszenz der KASUMI-3-Zellen bezüglich des gefärbten Oberflächenmoleküls TIM3 deutlich von der des Isotyps abgehoben hat. Mit Hilfe der in Kapitel 3.7.4 aufgeführten Formel ließ sich eine TIM3 MFI-Ratio von 1,88 berechnen. Es konnte also eine gesteigerte Oberflächenexpression gemessen werden. Für die HL-60-Zellen in Abschnitt B war dies nicht der Fall, die gemessenen Fluoreszenzen von Isotyp- und TIM3-Farbstoff waren deckungsgleich. Die MFI-Ratio betrug hier 1,03. Es konnte also kein TIM3 auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Bildabschnitt C zeigt die Fluoreszenz der MOLM-13-Zelllinie. Auch hier fand sich ein Unterschied in der Isotyp- und TIM3-Fluoreszenz. Die berechnete MFI-Ratio betrug 1,38 und lag somit unter dem Grenzwert von 1,5. Auf der gezeigten MOLM-13-Probe konnte also keine Oberflächenexpression von TIM3 nachgewiesen werden.

Die nachfolgende Abbildung zeigt zusammenfassend die MFI-Ratio von TIM3 auf den drei verwendeten Zelllinien.

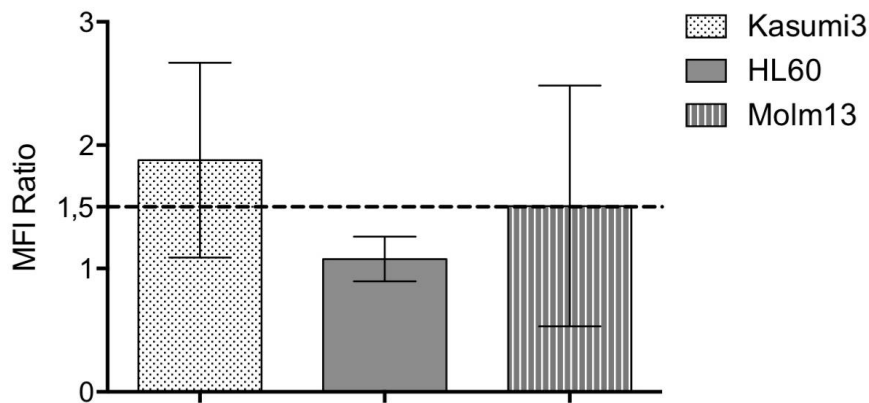


Abbildung 9: Zusammenfassung TIM3-MFI-Ratio der verwendeten Zelllinien

Die Abbildung zeigt den Mittelwert der gemessenen MFI-Ratio inklusive der Standardabweichung ($mean \pm SD$). Für die KASUMI-3-Zellen wurde in 10 Versuchen ($n=10$) die TIM3-Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie gemessen. Für die HL-60- und MOLM-13-Zellen wurde in 8 Versuchen ($n=8$) die TIM3-Expression gemessen. KASUMI-3: $\bar{\varnothing}$ MFI-Ratio=1,88; HL-60: $\bar{\varnothing}$ MFI-Ratio=1,1; MOLM-13: $\bar{\varnothing}$ MFI-Ratio=1,5

Die Abbildung zeigt als Balkendiagramm dargestellt den Mittelwert der MFI-Ratio Messung inklusive der Standardabweichung ($mean \pm SD$) der gemessenen KASUMI-3-, HL-60- und MOLM-13-Proben.

Bei den Zellen der humanen HL-60-Zelllinie (dunkelgrau), die als TIM3⁻ Kontrollzellen ausgewählt wurden, konnte kein TIM3 auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Der Mittelwert der MFI-Ratio für TIM3 lag hier bei 1,1 ($n=8$) und somit unter dem benötigten Grenzwert von 1,5. Der TCB konnte somit nicht an ihre Oberfläche binden, die Verwendung der Zelllinie als Negativkontrolle konnte erfolgen.

Anhand des linken Balkens (hellgrau) lässt sich erkennen, dass die zur Testung verwendeten Zellen der Zelllinie KASUMI-3 im Vergleich zu den HL-60 Zellen das Zielantigen konstitutiv auf ihrer Oberfläche exprimierten. Der Mittelwert der MFI-Ratio lag bei 1,88 ($n=10$) und somit höher, als der Wert der HL-60-Kontrollgruppe. TIM3 konnte also auf der Oberfläche der KASUMI-3-Zellen nachgewiesen werden. Die Zellen wurden daher zur *in vitro* Simulation der Wirkungsweise des TCBs verwendet. Es ist jedoch zu bemerken, dass die Oberflächenexpression zwar vorhanden, jedoch im Vergleich mit ausgewerteten AML-Patientendaten deutlich schwächer ausfiel.

Die ebenfalls getesteten Zellen der MOLM-13-Zelllinie wiesen ein ambivalentes Expressionsmuster auf. Die Werte der einzelnen Proben variierten hier stark zwischen fehlender und vorhandener TIM3-Expression. Der Mittelwert der MFI-Ratio lag bei 1,5 ($n=8$). Eine eindeutige Zuordnung der MOLM-13-Zellen als TIM3⁺ oder TIM3⁻ Zelllinie konnte nicht getroffen werden.

4.2.2. Zytotoxizität gegenüber AML-Zelllinien

Um die Wirksamkeit des TCBs *in vitro* an Zelllinien zu testen, wurden T-Zellen und die Zelllinien KASUMI-3, HL-60 und MOLM-13 zusammen mit dem Antikörper über 48 Stunden inkubiert. Es wurde ein E:T Ratio von 1:4 gewählt. Der TIM3-Antikörper wurde in verschiedenen

Konzentrationen hinzugegeben, um die Antikörper-vermittelte Zytotoxizität in Abhängigkeit der Dosis bestimmen zu können. Abbildung 10 zeigt dabei zusammenfassend die spezifische Lyse [A], sowie die Auswertung der einzelnen Zelllinien [B, C, D].

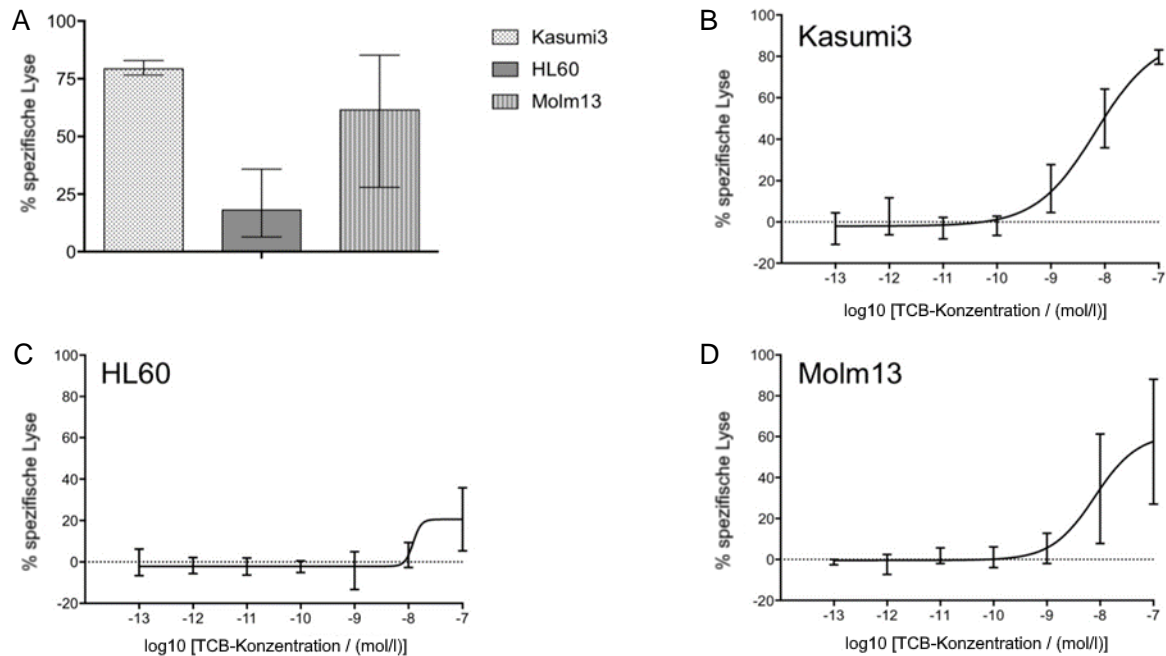


Abbildung 10: Antikörper-vermittelte spezifische Lyse von AML-Zelllinien in Kokulturen mit T-Zellen von gesunden Spendern

A: Zusammenfassung der spezifischen Lyse nach 48 Stunden mit 10^{-7} mol/l TIM3-TCB ($n=5$). Die Abbildung zeigt den Mittelwert der berechneten spezifischen Zellyse inklusive der Standardabweichung ($mean \pm SD$). Folgende Mittelwerte wurden berechnet: KASUMI-3: 79,7 %, HL-60: 20,6 %, MOLM-13: 57,6 %; **B:** Dosisabhängige Antikörper-vermittelte Zellyse von KASUMI-3-Zellen ($n=5$); **C:** Dosisabhängige Antikörper-vermittelte Zellyse von HL-60-Zellen ($n=5$); **D:** Dosisabhängige Antikörper-vermittelte Zellyse von MOLM-13-Zellen ($n=5$)

Die Abbildung A zeigt als Balkendiagramm dargestellt den Mittelwert der spezifischen Lyse inklusive der Standardabweichung ($mean \pm SD$) der gemessenen KASUMI-3-, HL-60- und MOLM-13-Proben bei einer Antikörperkonzentration von 10^{-7} M. In der Mitte des Diagramms ist die spezifische Lyse der HL-60-Negativkontrolle dargestellt. Diese war erwartungsgemäß sehr schwach ausgeprägt. Mit einem Durchschnittswert von 20,6 % war keine spezifische Effektivität des Antikörpers zu erkennen. Im Vergleich hierzu fiel die Antikörper-vermittelte spezifische Lyse der TIM3⁺ KASUMI-3-Zellen höher aus. Es zeigte sich ein Durchschnittswert von 79,7 %. Die geringe Standardabweichung war ein Beleg für die Konsistenz der Ergebnisse. In fünf Versuchen lag die spezifische Lyse der Zellen nie unter 75 %. Die Zellyse der MOLM-13-Zellen wies analog der variablen TIM3 Messung (siehe Abbildung 9) hohe Schwankungen mit einem Mittelwert von 57,6 % auf.

In den Bildabschnitten B bis C kann man die Antikörper-Konzentrationskurve der einzelnen Zelllinien sehen. Bei den KASUMI-3-Zellen fing das Wirkspektrum des Antikörpers bei ca. 10^{-10} mol/l an, stieg rasch an und erreichte sein Plateau bei 10^{-7} mol/l. Die HL-60 Zellen wurden bis zu einer Antikörperkonzentration von 10^{-8} mol/l nicht Antikörper-vermittelt lysiert. Erst ab sehr hohen Konzentrationen zeigte sich eine gering ausgeprägte Lyse der Zellen. MOLM-13-Zellen zeigten

einen ähnlichen Kurvenverlauf wie die KASUMI-3-Zellen, wiesen allerdings eine hohe Variabilität zwischen den einzelnen Versuchen auf.

4.3. Langzeitkulturen mit primären AML-Zellen

In Kapitel 4.2.2 konnte bereits gezeigt werden, dass der TIM3-TCB in der Lage war, humane AML-Zellen, die TIM3 auf ihrer Oberfläche tragen, mit Hilfe rekrutierter Spender-T-Zellen zu lysieren. In einem nächsten Schritt wurde der Antikörper nun an primären leukämischen Zellen von AML-Patienten getestet, um die Wirkungsweise genauer und realitätsnaher charakterisieren zu können. Hierfür wurden TIM3⁺ periphere Blut- und Knochenmarksblutproben in einem etablierten Langzeitzellkultursystem kultiviert und anschließend mit gesunden T-Zellen und dem TIM3-TCB über 14 Tage inkubiert. Als Positivkontrolle wurde zusätzlich ein bekannter CD33-TCB verwendet, der an Stelle von TIM3 das Oberflächenmolekül CD33 bindet, welches sich ebenfalls auf der Oberfläche von AML-Zellen befindet (35). Als Referenz zur Berechnung der spezifischen Lyse diente ein dem TIM3-TCB strukturgleiches Modell, welches nur an CD3 auf der Oberfläche der T-Zellen binden kann, jedoch keine Bindungsstelle für TIM3 besitzt (im Folgenden cTCB genannt). So sollte gezeigt werden, dass nicht eine alleinige CD3-Bindung ausreichend ist, um eine T-Zell-Rekrutierung und anschließende Lyse der leukämischen Zellen zu erreichen. Die Durchflusszytometrie erfolgte an 5 Zeitpunkten mit einem Abstand von 3-4 Tagen zwischen den Messungen (Tag 0, Tag 3, Tag 6, Tag 10, Tag 13).

4.3.1. T-Zell-Aktivierung

Zunächst wurde überprüft, ob der TIM3-TCB in Anwesenheit von primären AML-Zellen zu der gewünschten Rekrutierung und Aktivierung der Spender-T-Zellen führte. Da das Antikörperkonstrukt so konzipiert wurde, dass eine Aktivierung nur bei gleichzeitiger TIM3- und CD3-Bindung stattfinden kann, sollte bei alleiniger CD3-Bindung keine T-Zell-Reaktion zu beobachten sein. Hierfür wurden Langzeitkulturen mit primären AML-Zellen und Spender-T-Zellen über drei Tage mit jeweils 10⁻⁸ M Antikörper (cTCB, TIM3-TCB und CD33-TCB) inkubiert. Für die Durchflusszytometrie wurde CD69, sowie PD1(67) und TIM3 auf den T-Zellen angefärbt und die MFI-Ratio bestimmt.

Abbildung 11 zeigt repräsentativ die Expression von CD69 auf den T-Zellen der drei Versuchsansätze, jeweils am dritten Tag der Langzeitkultur.

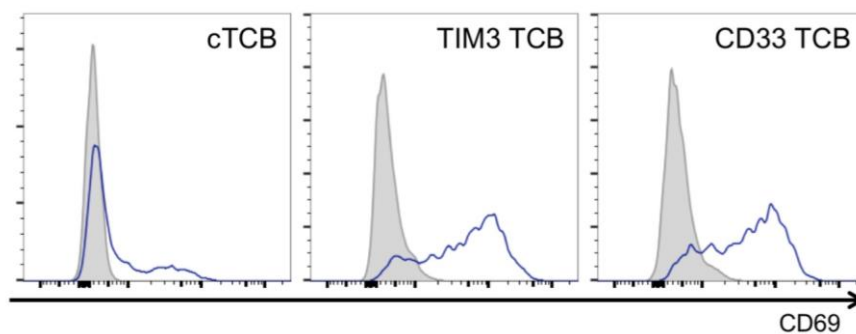


Abbildung 11: CD69-Expression auf gesunden Spender-T-Zellen in Kokultur mit primären AML-Zellen und Antikörper-Zusatz (cTCB, TIM3-TCB und CD33-TCB)

Die CD69-Expression auf Spender-T-Zellen als Ausdruck einer T-Zell-Aktivierung wurde am dritten Tag der Langzeitkultur gemessen. In grau ist die IgG1-Isotypfärbung dargestellt, in blau die dazugehörige CD69-Färbung. Die drei verwendeten Antikörper wurden in einer Konzentration von 10^{-8} M hinzugegeben. Für die gezeigten Proben konnte folgende MFI-Ratio gemessen werden: cTCB: 1,9; TIM3-TCB: 18,7; CD33-TCB: 11,8

Es lässt sich erkennen, dass sowohl im TIM3-TCB, als auch im CD33-TCB Ansatz ein deutlicher Anstieg der Expression von CD69 sichtbar wurde. Die MFI-Ratio betrug für den TIM3-TCB 18,7 und für den CD33-TCB 11,8. Dies entsprach einer vermehrten Expression des angefärbten Moleküls und somit einer T-Zell-Aktivierung. Die verwendete Kontrolle, die lediglich eine CD3 Bindungsstelle besitzt, zeigte mit einer MFI-Ratio von 1,9 erwartungsgemäß eine sehr geringe CD69-Expression und damit einhergehend nur eine schwach ausgeprägte T-Zell-Aktivierung.

Die nachfolgende Abbildung 12 zeigt die zusammengefassten Ergebnisse der T-Zell-Aktivierung in den drei Versuchsansätzen. Dargestellt ist der Mittelwert der MFI-Ratio mit zugehöriger Standardabweichung ($mean \pm SD$).

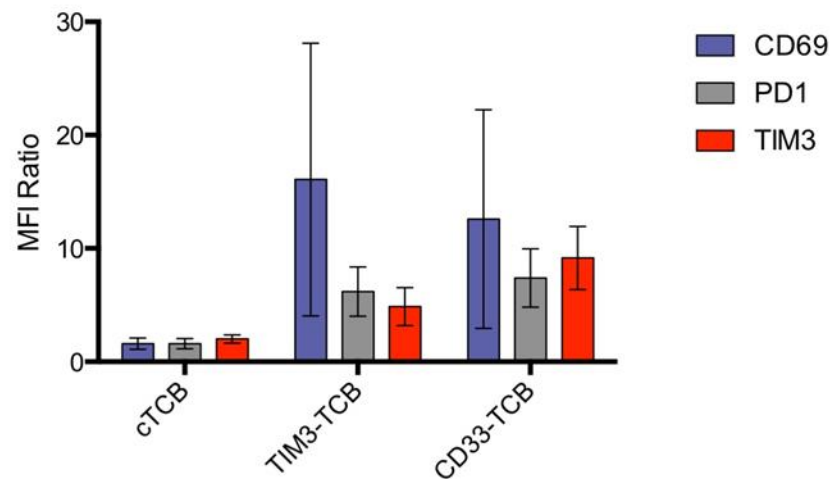


Abbildung 12: Zusammenfassung der CD69-, PD1- und TIM3-Expression auf gesunden Spender-T-Zellen

Darstellung des Mittelwerts der berechneten MFI-Ratio inklusive der Standardabweichung (mean \pm SD)

Die Expression der Oberflächenmarker wurde am dritten Tag der Langzeitkultur auf den Spender-T-Zellen mittels Durchflusszytometrie-Analyse gemessen. Die drei verwendeten Antikörper wurden in einer Konzentration von 10^{-8} M hinzugegeben.

Für die gezeigten Proben konnten folgende Mittelwerte der MFI-Ratio gemessen werden (n=9):

cTCB: CD69: 1,6; PD1: 1,6; TIM3: 2,0

TIM3-TCB: CD69: 16,1; PD1: 6,2; TIM3: 4,9

CD33-TCB: CD69: 12,6; PD1: 7,4; TIM3: 9,2

Abbildung 12 zeigt als Balkendiagramm dargestellt den Mittelwert der MFI-Ratio für CD69, PD1 und TIM3, gemessen auf den Spender-T-Zellen nach dreitägiger Inkubation. Verglichen wurde die Expression in Versuchen mit dem TIM3-TCB, einem CD33-TCB und einem Kontrollantikörper. Es zeigte sich, dass die Expression der gemessenen Aktivitätsmarker bei der Verwendung des Kontrollantikörpers in allen Versuchsansätzen nur sehr gering ausgeprägt war, es ließ sich also keine gesteigerte T-Zell-Aktivierung provozieren. Im Vergleich hierzu konnten die T-Zellen in Versuchen mit dem TIM3- und dem CD33-Antikörper höhere MFI-Ratios und damit eine höhere Aktivität der Spender-T-Zellen aufweisen.

Die höchsten Werte ließen sich hierbei bei beiden Antikörpern für den Oberflächenmarker CD69 messen. Im Mittel betrug die CD69 MFI-Ratio für den TIM3-TCB 16,1 und für den CD33-TCB 12,6. Die PD1- und TIM3-Expression auf den T-Zellen fiel in den Versuchsansätzen mit dem CD33-Antikörper leicht höher aus, als in den TIM3-Ansätzen.

4.3.2. Zytotoxizität gegenüber primären AML-Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der TIM3-TCB in der Lage war, in Anwesenheit von Spender-T-Zellen und primären AML-Zellen, die T-Zellen zu rekrutieren und aktivieren, sollte nun untersucht werden, ob die Aktivierung zu einer suffizienten Lyse der AML-Zellen führen konnte. Der nachstehende Dot-Plot zeigt den Verlauf einer repräsentativen Langzeitkultur mit T-Zellen und primären AML-Zellen über 13 Tage. Verwendet wurden ein TIM3-TCB, ein CD33-TCB als Positivkontrolle und ein cTCB (vgl. Erklärung in Kapitel 4.3) mit einer Konzentration von 10^{-8} M. Die Durchflusszytometrie erfolgte an Tag 3, 6, 10 und 13 zur Berechnung der spezifischen Lyse.

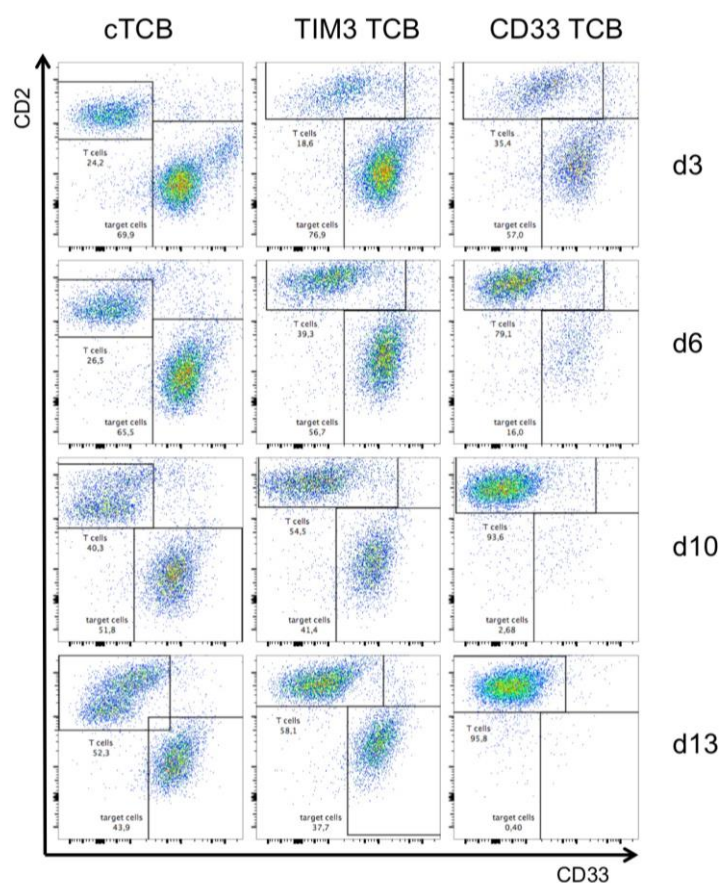


Abbildung 13: Langzeitkultur mit AML-Blasen, Spender-T-Zellen und Antikörperzusatz

Exemplarisch werden hier die Ergebnisse einer Langzeitkultur mit Spender-T-Zellen, AML-Zellen und 10^{-8} M Antikörperzusatz dargestellt. Zu vier Messzeitpunkten (d3, d6, d10, d13) wird der prozentuale Anteil der $CD2^+$ T-Zell- und $CD33^+$ AML-Zellpopulation gemessen. Im Vergleich zum cTCB wird dann die spezifische Zelllyse der AML-Zellen berechnet.

Spezifische Lyse (%) TIM3-TCB: d3: 0,0; d6: 13,4; d10: 20,1; d13: 14,1

Spezifische Lyse (%) CD33-TCB: d3: 18,5; d6: 75,5; d10: 94,8; d13: 99,1

In der ersten Spalte von Abbildung 13 sieht man den Kulturverlauf im Versuch mit dem cTCB ($CD2^+$ T-Zellen auf der y-Achse und $CD33^+$ AML-Zellen auf der x-Achse). Bei Betrachtung des prozentualen Anteils der AML-Zellpopulation ließ sich eine nur geringe Dezimierung der Zellzahl feststellen. Eine spezifische Lyse der Zellen fand jedoch nicht statt.

Auf den Durchflusszytometrie-Plots der Positivkontrolle mit dem CD33-TCB erkennt man, dass die AML-Zellpopulation bereits bei der ersten Zellmessung nach drei Tagen deutlich schwächer ausgeprägt war, als im Kontrollversuch. Im weiteren Kulturverlauf von 13 Tagen wurde die Zellzahl dann auf annähernd 0 % dezimiert. Die spezifische Lyse durch die rekrutierten T-Zellen betrug hier über 99 %.

Betrachtet man die Populationsgröße und somit die Anzahl der AML-Zellen im Versuch mit dem TIM3-TCB, so zeigte sich auch hier eine geringe Verkleinerung der AML-Zellpopulation. Vergleicht man dies jedoch mit dem cTCB, ließ sich nur eine sehr geringe spezifische Lyse berechnen. Diese lag mit ihrem Maximum an Tag 10 bei 20,1 %.

In Abbildung 14 sind zusammenfassend die Mittelwerte der berechneten spezifischen Lyse inklusive Standardabweichung ($mean \pm SD$) des TIM3- und CD33-TCBs in allen Versuchen aufgezeichnet.

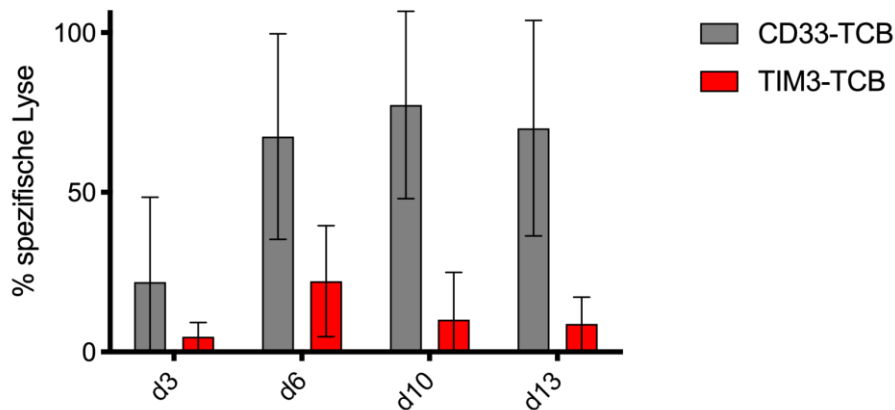


Abbildung 14: Zusammenfassung der T-Zell-vermittelten spezifischen Lyse von AML-Zellen mit TIM3-TCB und CD33-TCB

Darstellung des Mittelwertes der berechneten spezifischen Zellyse inklusive der Standardabweichung ($mean \pm SD$). In sechs Versuchsansätzen ($n=6$) wurde die T-Zell-vermittelte spezifische Lyse der AML-Zellen durch den TIM3-TCB und CD33-TCB im Vergleich zum cTCB berechnet.

Spezifische Lyse (%) TIM3-TCB: d3: 4,73; d6: 22,18; d10: 10,15; d13: 8,78

Spezifische Lyse (%) CD33-TCB: d3: 21,86; d6: 67,45; d10: 77,35; d13: 70,07

Bei Betrachtung der Auswertung der Versuche, in denen der CD33-Antikörper verwendet wurde (grau), konnte man eine deutliche Lyse der AML-Zellen feststellen. Diese stieg bis Tag 10 auf im Mittel 77 % an und sank bei der letzten Messung auf 70 % ab. Im Vergleich hierzu zeigte sich bei Verwendung des TIM3-TCBs (rot) eine deutlich schwächer ausgeprägte Zellyse. Hier lag das erreichte Maximum bereits an Tag sechs. Mit 22,18 % betrug es jedoch nur ca. $\frac{1}{4}$ der Zellyse, die mit den TIM3⁺ KASUMI-3-Zellen erzielt werden konnte. Bis zur letzten Messung an Tag 13 fiel die spezifische Lyse zudem auf einen Wert von 9 % deutlich ab.

Es wurde erkennbar, dass der TIM3-TCB zwar in der Lage war, gesunde Spender-T-Zellen in Anwesenheit von TIM3 zu aktivieren und ebenso TIM3⁺ AML-Zelllinien durch T-Zell-Rekrutierung zu lysieren. Das spezifische Abtöten von TIM3⁺ AML-Zellen aus Primärmaterial konnte jedoch nicht beobachtet werden. Daher war es nun nötig in einem nächsten Schritt zu klären, welcher Mechanismus dieser fehlenden Lyse von Primärmaterial zu Grunde lag.

4.3.3. Expression des Zielantigens unter Langzeitkulturbedingungen

In Kapitel 4.2.2 konnte gezeigt werden, dass die TIM3-TCB vermittelte Lyse direkt abhängig von der TIM3-Expression auf den Zielzellen war. In Bezug auf die primären AML-Zellen, die durch den TIM3-TCB nicht lysiert werden konnten, könnte eine Ursache in der fehlenden Expression von TIM3 auf den verwendeten Zellen liegen. Initial zeigten die primären Zellen fast ausschließlich hohe TIM3-Expressionsmuster (vgl. Abbildung 6). Es sollte also untersucht werden, in wie weit sich die Expression über den Zeitverlauf der Langzeitkultur verändert. Abbildung 15 zeigt repräsentativ drei

Langzeitkulturen, bei denen die TIM3 MFI-Ratio auf den CD33⁺ AML-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen wurde. Tag -3 stellt hierbei den Zeitpunkt direkt nach dem Auftauen der Zellen dar und Tag 0 die Zugabe des jeweiligen TCBs und der Spender-T-Zellen.

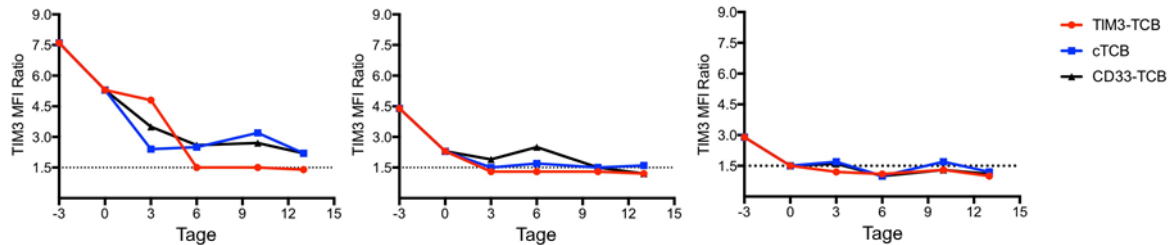


Abbildung 15: TIM3-Expression auf CD33⁺ AML-Zellen in der Langzeitkultur I

Exemplarische Darstellung der TIM3-Oberflächenexpression auf AML-Zellen in drei Kokulturen mit Spender-T-Zellen und 10^{-8} M Antikörperzusatz. Die Messung der MFI-Ratio erfolgte an Tag -3, 0, 3, 6, 10 und 13. (die zugehörigen Messdaten sind Anhang C: Messdaten Abbildung 15 zu entnehmen)

Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass die Expression von TIM3 direkt nach dem Auftauen des Primärmaterials (Tag -3) deutlich vorhanden war. Die MFI-Ratios betragen 7,6 in der ersten Kultur, 4,4 in der zweiten Kultur und 2,9 in der dritten Kultur. Der sich hieraus ergebende Durchschnittswert von 5,0 lag sogar etwas höher als der Durchschnittswert im getesteten Patientenkollektiv (vgl. Kapitel 4.1). Bereits vor der Zugabe des jeweiligen TCBs erkannte man jedoch schon innerhalb der ersten drei Tage einen deutlichen Abfall der MFI-Ratio um 30 % (Kultur 1) bzw. 48 % (Kultur 2 und 3). An Tag 13 der Langzeitkultur lagen fast alle gemessenen Proben unterhalb der MFI-Ratio Grenze von 1,5.

Um den Einfluss des verwendeten Zellmediums besser verstehen zu können, wurde der Versuch wiederholt und an Stelle des herkömmlichen Mediums ein Medium verwendet, welches einen Serumersatz enthält. Abbildung 16 zeigt den Vergleich zwischen den Langzeitkulturen mit Serum-Medium und dem serumfreien Medium (im Folgenden als BiT bezeichnet).

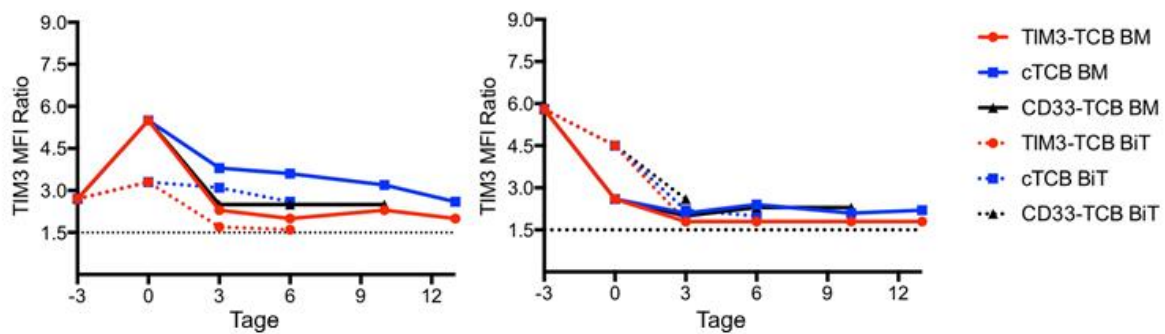


Abbildung 16: TIM3-Expression auf CD33⁺ AML-Zellen in der Langzeitkultur II
 Exemplarische Darstellung der TIM3-Oberflächenexpression auf AML-Zellen in zwei Kokulturen mit Spender-T-Zellen und 10⁻⁸ M Antikörperzusatz, jeweils in Serum-Medium (durchgezogene Linie) und serumfreiem Medium (gestrichelte Linie). Die Messung der MFI-Ratio erfolgte an Tag -3, 0, 3, 6, 10 und 13. (die zugehörigen Messdaten sind Anhang D: Messdaten Abbildung 16 zu entnehmen)

Der Vergleich zwischen den zwei Medien zeigte, dass die Verwendung von BiT-Medium keinen Vorteil in der TIM3-Expression auf den AML-Zellen brachte. Die gemessenen Ausgangswerte für TIM3 lagen auch hier mit einer MFI-Ratio von 2,7 und 5,8 in einem Bereich, in dem ein gutes Ansprechen auf den Antikörper zu erwarten gewesen wäre. In der ersten Kultur konnte zudem ein Anstieg auf 5,5 nach drei Tagen beobachtet werden. Doch auch unter Verwendung des BiT-Mediums kam es anschließend zu einem deutlichen Expressionsabfall bis unter den Grenzwert von 1,5. Das BiT-Medium führte in einigen Fällen sogar zu einem Absterben der AML-Zellen vor Ende der Messreihe, so dass eine TIM3-Expression während der letzten Messung an Tag 9 und 13 nicht mehr auswertbar war. Auf Grund dieser Tatsache wurde auf die weitere Verwendung des serumfreien Mediums verzichtet.

4.4. Expression von TIM3 auf gesunden Zellen

4.4.1. TIM3-Expression auf NK-Zellen und T-Lymphozyten

Nachdem gezeigt werden konnte, dass TIM3 auf den AML-Zellen und den leukämischen Stammzellen exprimiert wurde, sollte in einem nächsten Schritt die Expression auf relevanten, gesunden hämatologischen Zellen untersucht werden.

Zunächst wurden die NK-Zellen aus gesundem Spendermaterial auf das Vorhandensein von TIM3 auf der Zelloberfläche untersucht. Wie in Kapitel 1.2.2 schon ausführlich erklärt wurde, spielen NK-Zellen in der Immunabwehr des Menschen eine wichtige Rolle. Das TIM3-Antikörperkonstrukt sollte also optimaler Weise diese Funktion nicht beeinträchtigen.

In nachfolgender Abbildung 17 sieht man die TIM3-Expression von nativen NK-Zellen, sowie NK-Zellen des gleichen Spenders nach 12-stündiger Stimulation mit Interleukin-15 (IL15), im Histogramm.

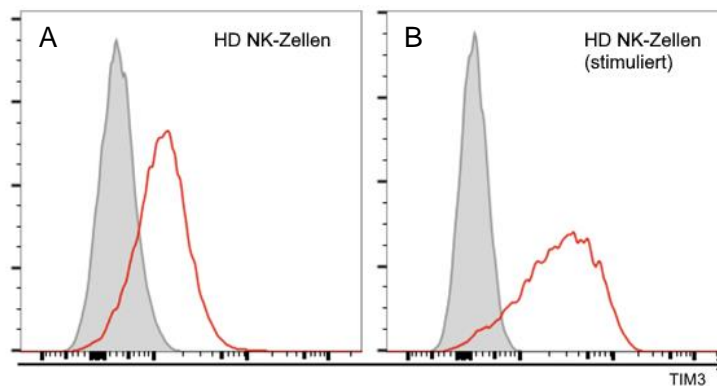


Abbildung 17: Gesunde Spender-NK-Zellen vor und nach 12-stündiger Stimulation mit IL15

Das Histogramm zeigt die TIM3-Oberflächenexpression von gesunden NK-Zellen des gleichen Spenders. In Grau ist die IgG1-Isotypfärbung dargestellt, in Rot die dazugehörige TIM3-Färbung. **A:** Die Spender-NK-Zellen wurden ohne vorherige Stimulation mit einem Fluorochrom-konjugierten Antikörper gegen TIM3 angefärbt und mittels Durchflusszytometrie-Analyse die MFI-Ratio berechnet: NK-Zelle nativ: 4,0; **B:** NK-Zelle nach 12-stündiger IL15-Stimulation: 16,1

Es zeigte sich, dass gesunde NK-Zellen schon im nativen Zustand eine deutliche Expression von TIM3 aufweisen. Die MFI-Ratio betrug hier 4,0 und lag somit deutlich über dem Grenzwert von 1,5. TIM3 konnte also auf der Oberfläche der Zellen detektiert werden. Dies war für alle sieben getesteten Spender der Fall. Nach zusätzlicher Stimulation der NK-Zellen mit IL15, konnte eine Zunahme der Expression beobachtet werden. Die gemessene MFI-Ratio für TIM3 betrug 16,1 und somit das Vierfache des Ausgangswertes.

In einem zweiten Schritt wurden T-Lymphozyten aus gesundem Spendermaterial ebenfalls auf das Vorhandensein von TIM3 auf der Zelloberfläche untersucht.

Abbildung 18A zeigt CFSE-gefärbte, native T-Zellen sowie stimulierte T-Zellen des gleichen Spenders. In Grafik B wurden die nativen Zellen in ihre CD4⁺ und CD8⁺ Populationen unterteilt. Anschließend wurden diese Populationen hinsichtlich ihrer TIM3-Expression untersucht (Grafik C und D).

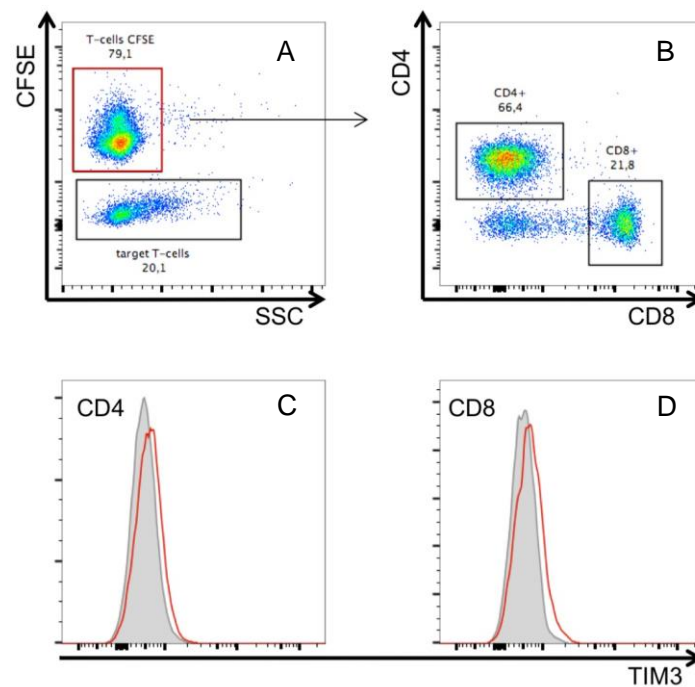


Abbildung 18: TIM3-Expression auf nativen Spender-T-Zellen

Native Spender-T-Zellen wurden mit einem Tracer-Fluoreszenzfarbstoff (CFSE) markiert, um sie bei der Durchflusszytometrie-Analyse von stimulierten T-Zellen des gleichen Spenders (vgl. Abbildung 19) abgrenzen zu können. Mit Hilfe von Antikörpern gegen CD4 und CD8, kann die TIM3-Oberflächenexpression auf den T-Zell-Subpopulationen gemessen werden. In Grau ist die IgG1-Isotypfärbung dargestellt, in Rot die dazugehörige TIM3-Färbung.

A: CFSE gefärbte, native T-Zellen (roter Kasten) und stimulierte T-Zellen des gleichen Spenders (schwarzer Kasten) im Durchflusszytometrie-Plot; **B:** native T-Zellen sortiert in CD4⁺ und CD8⁺ Population; **C:** TIM3-MFI der CD4⁺ T-Zellen (TIM3 MFI-Ratio 1,0); **D:** TIM3-MFI der CD8⁺ T-Zellen (TIM3 MFI-Ratio 1,1)

Die Durchflusszytometrie-Analyse der gesunden T-Zellen zeigte, dass im nativen Zustand keine erhöhte Expression für TIM3 nachgewiesen werden kann. Die MFI-Ratio in der CD4⁺ Population betrug 1,0, in der CD8⁺ Population 1,1. TIM3 befand sich somit nicht auf der Zelloberfläche dieser T-Zellen.

T-Zellen besitzen die Eigenschaft, unter Stimulation bestimmte Oberflächenmoleküle vermehrt zu präsentieren (14,68). Um herauszufinden, ob dieses Verhalten auch für das Zielantigen TIM3 zutrifft, wurden T-Zellen mit Hilfe von CD3/CD28-Beads über 12 Stunden stimuliert. Anschließend wurde analog zum vorherigen Experiment die Expression auf den CD4⁺ und CD8⁺ Zellen gemessen (siehe Abbildung 19).

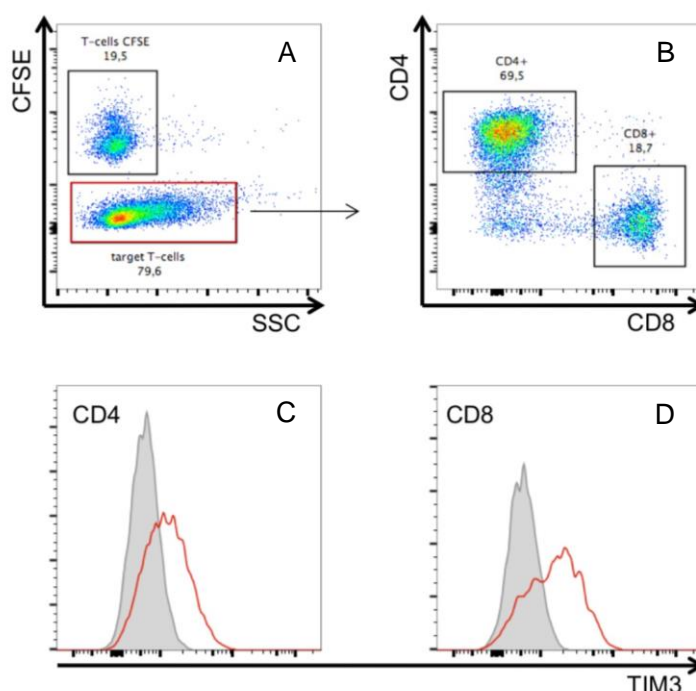


Abbildung 19: TIM3-Expression auf stimulierten T-Zellen

Spender-T-Zellen wurden über 12 Stunden mit CD3/CD28-Beads stimuliert und mittels Durchflusszytometrie-Analyse auf ihre TIM3-Oberflächenexpression untersucht. In Grau ist die IgG1-Isotypfärbung dargestellt, in Rot die dazugehörige TIM3-Färbung.

A: CFSE-gefärbte T-Zellen (schwarzer Kasten) und stimulierte T-Zellen (roter Kasten) im Durchflusszytometrie-Plot; **B:** stimulierte T-Zellen sortiert in CD4⁺ und CD8⁺ Population; **C:** TIM3-MFI der CD4⁺ T-Zellen (TIM3 MFI-Ratio 3,2); **D:** TIM3-MFI der CD8⁺ T-Zellen (TIM3 MFI-Ratio 5,1,)

Die stimulierten T-Zellen ließen sich in der Sideward-Scatter-Darstellung des Durchflusszytometrie-Plots durch ihre deutlich erhöhte Granularität gut von den unstimulierten T-Zellen abgrenzen. Im Vergleich zu Grafik C und D in Abbildung 18, erkennt man in Abbildung 19 eine deutlich erhöhte Expression von TIM3 in beiden Zellpopulationen. Die TIM3 MFI-Ratio war mit 3,2 in der CD4⁺ Population etwas niedriger als in der CD8⁺ Population. Hier betrug sie 5,2. Dies ließ auf eine vermehrte Präsenz des Antigens auf der Zelloberfläche schließen. Durch Stimulation der T-Zellen konnte also eine Antigenpräsentation auf der Zelloberfläche provoziert werden.

4.4.2. Zytotoxizität gegenüber NK-Zellen und T-Lymphozyten

Nachdem in Kapitel 4.4.1 bereits gezeigt werden konnte, dass sich TIM3 sowohl auf der Oberfläche von aktivierten T-Zellen und NK-Zellen befindet und in Kapitel 4.2.2 gezeigt wurde, dass TIM3⁺ Zelllinien Antikörper-vermittelt lysiert werden, stellte sich die Frage, welche Wirkung das Antikörperkonstrukt auf diese gesunden hämatopoetischen Zellen ausübt.

Für den Versuch wurden zunächst NK-Zellen von sieben gesunden Spendern isoliert und über 12 Stunden mit IL15 stimuliert, um eine erhöhte TIM3-Expression hervorzurufen. Anschließend wurden die Zellen mit autologen T-Zellen und 10⁻⁸ M TIM3-TCB über 24 und 48 Stunden inkubiert. Zur Kontrolle wurde der Versuche doppelt angesetzt, wobei in den zweiten Ansatz kein Antikörper

dazugegeben wurde. Der Versuch wurde mit zwei E:T Ratios (1:2 und 1:4) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels Durchflusszytometrie-Analyse.

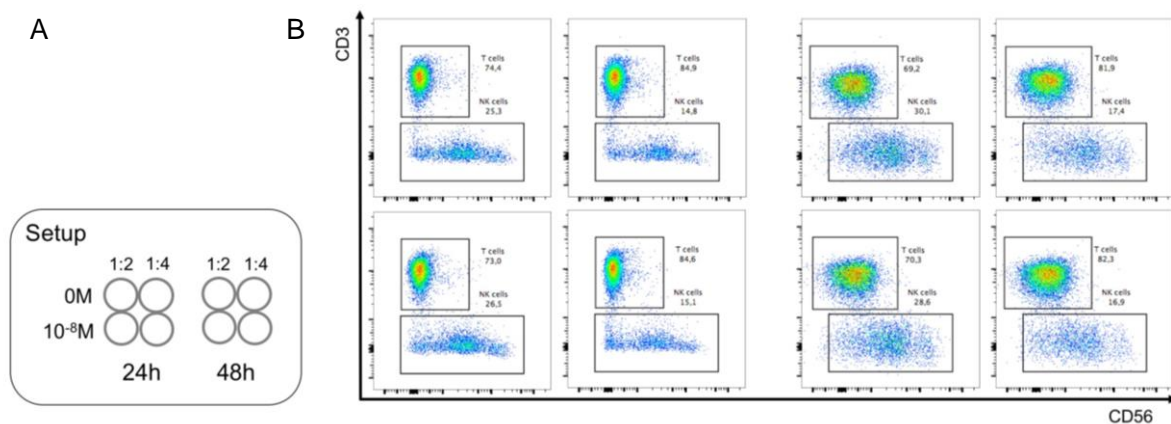


Abbildung 20: Stimulierte Spender-NK-Zellen in Kokultur mit autologen Spender-T-Zellen und TIM3-TCB
A: Pro Spender wurden acht Kokulturen mit unterschiedlichen E:T-Ratios (1:2 und 1:4), Antikörperzusatz (0 M und 10⁻⁸ M) und Inkubationszeit (24 und 48 Stunden) angesetzt. **B:** Exemplarische Abbildung der Durchflusszytometrie-Plots eines Spenders. Die Kokulturen wurden mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen CD3 und CD56 angefärbt, um den prozentualen Anteil der Spender-T- und Spender-NK-Zellpopulation zu bestimmen. Anschließend konnte die spezifische Zellyse der NK-Zellen berechnet werden (vgl. Abbildung 21).

Abbildung 20 zeigt repräsentativ die Durchflusszytometrie-Plots eines Versuches über 24 Stunden (linker Bildabschnitt) und 48 Stunden (rechter Bildabschnitt) jeweils ohne (obere Reihe) und mit (untere Reihe) 10⁻⁸ M TCB Zusatz. Vergleicht man die jeweils untereinanderliegenden Durchflusszytometrie-Plots so wird ersichtlich, dass der prozentuale Anteil der CD56⁺ NK-Zellen, sowie der CD3⁺ T-Zellen in allen Versuchsansätzen konstant blieb. Eine Zellyse ließ sich weder nach 24 Stunden, noch nach 48 Stunden nachweisen. Es zeigte sich somit, dass der TCB keine T-Zell vermittelte Lyse gegenüber stimulierten TIM3⁺ NK-Zellen ausgeübt hat. Diese Tatsache war unabhängig von der Inkubationsdauer und dem Verhältnis zwischen Effektor- und Zielzellen.

Abbildung 21 zeigt die Zusammenfassung der Versuchsreihe mit insgesamt sieben Spender-NK-Zellen. Nachdem im ersten Versuch kein Unterschied in der Versuchsdauer oder dem E:T Ratio festgestellt werden konnte, wurde für die folgenden Versuche ein Zeitraum von 48 Stunden und ein E:T Ratio von 1:4 festgelegt.

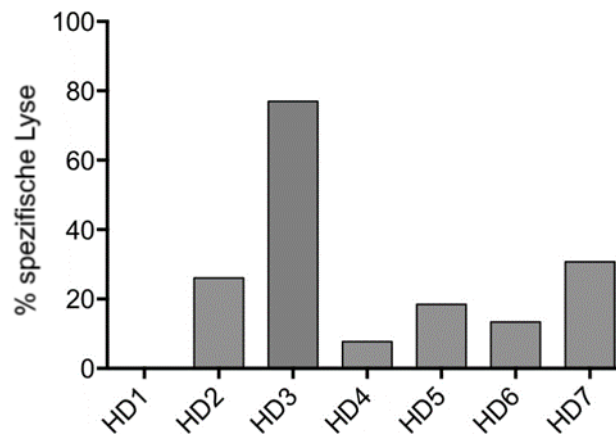


Abbildung 21: T-Zell-vermittelte spezifische Lyse von stimulierten NK-Zellen in Kokultur mit autologen Spender-T-Zellen und TIM3-TCB

Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung der spezifischen T-Zell-vermittelte NK-Zellyse durch TIM3-TCB von sieben gesunden Spendern (HD = healthy donor). Die Zellen wurden für 48 Stunden in einer E:T Ratio von 1:4 mit 10^{-8} M TIM3-TCB inkubiert. HD1: 0 %, HD2: 26 %, HD3: 77 %, HD4 :8 %, HD5: 18 %, HD6: 13 %, HD7:30 %

In Abbildung 21 ist die spezifische Lyse der NK-Zellen als Balkendiagramm dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Zellyse nur sehr gering ausgeprägt war. Der Mittelwert Messungen lag bei ca. 15 %.

Die mit fast 80 % sehr hohe spezifische Lyse der NK-Zellen des dritten Spenders konnte mit Hinblick auf die anderen Ergebnisse nicht erklärt werden und bedarf näherer Untersuchungen. Die gemessene TIM3 MFI-Ratio für diesen Spender lag mit 14,3 sogar etwas unterhalb des Durchschnittswerts von 15,0 für alle Spender.

In einem letzten Schritt soll die Frage geklärt werden, ob stimulierte T-Zellen einer T-Zell-vermittelten Lyse durch den TCB unterliegen können. Diese T-Zell-vermittelte T-Zell-Lyse wird auch als *T-cell fratricide* bezeichnet (69). T-Zellen binden normalerweise nur über den CD3-Arm an den TCB. Da sie jedoch im stimulierten Zustand ebenfalls TIM3 auf ihrer Oberfläche exprimieren (vgl. Abbildung 19) könnte es sein, dass der TCB sowohl an CD3, als auch an das TIM3 auf der T-Zell-Oberfläche bindet und die aktivierten T-Zellen sich so gegenseitig abtöten. Es wären dann insgesamt weniger T-Zellen vorhanden um die AML-Zellen zu lysieren und eine geringe bis ausbleibende spezifische Lyse wäre die Folge.

Um diese Theorie zu überprüfen, wurden T-Zellen (stimuliert und nativ) von gesunden Spendern in verschiedenen E:T Ratios mit 10^{-8} M TCB über 24 bzw. 48 Stunden inkubiert (vgl. Versuchsbeschreibung in Kapitel 3.7.6). Abbildung 22 zeigt diesen Versuchsaufbau und die Anordnung in der 96-Well Platte.

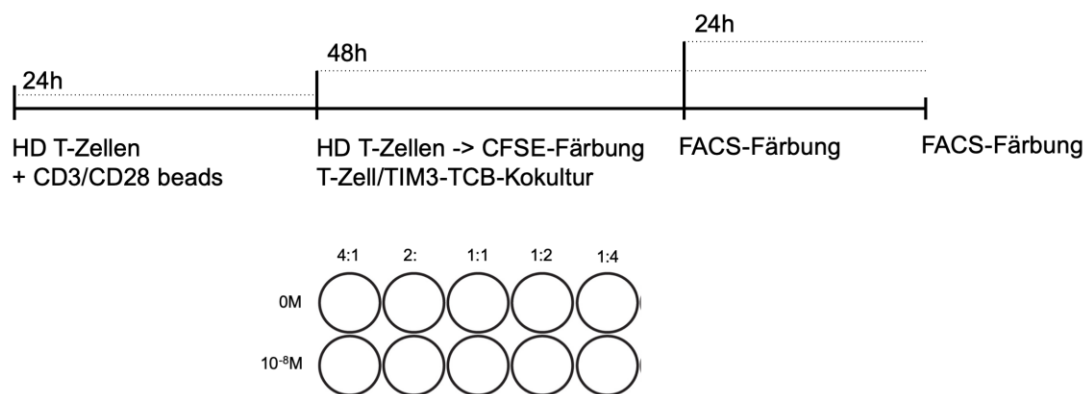


Abbildung 22: Versuchsaufbau T-cell fratricide

Gesunde Spender-T-Zellen wurden für 24 Stunden mit CD3/CD28-Beads stimuliert. Spender-T-Zellen des gleichen Spenders wurden nativ mit einem Tracer-Fluoreszenzfarbstoff markiert. Anschließend wurden beide T-Zell-Populationen in Kokultur mit 10⁻⁸ M TIM3-TCB über 24 oder 48 Stunden in fünf verschiedenen E:T Ratios inkubiert und mittels Durchflusszytometrie-Analyse die spezifische Zelllyse berechnet.

Abbildung 23 zeigt die Durchflusszytometrie-Auswertung des Fratricide-Versuchs über 24 Stunden. Die „target T-Zellen“ stellen hierbei die stimulierten, d.h. TIM3⁺ T-Zellen dar.

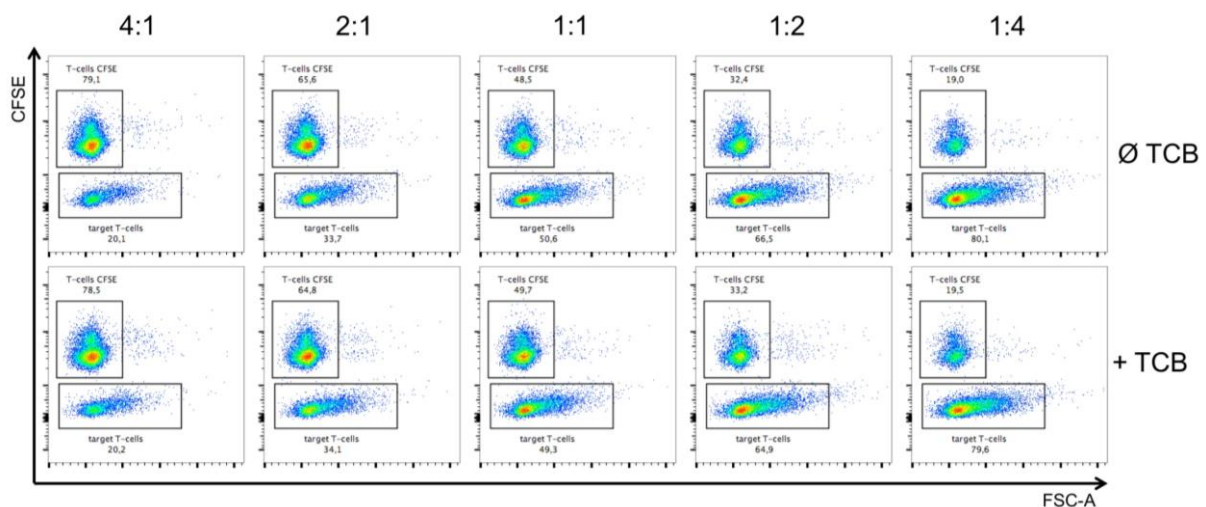


Abbildung 23: Stimulierte Spender-T-Zellen in Kokultur mit autologen, nativen T-Zellen und TIM3-TCB

Exemplarische Darstellung der Durchflusszytometrie-Plots einer Kokultur mit stimulierten Spender-T-Zellen (target T-cells) und nativen T-Zellen (T-cells CFSE) in verschiedenen E:T Ratios nach 24 Stunden Inkubationszeit. Obere Reihe: Kokultur mit 0 M TIM3-TCB, untere Reihe: Kokultur mit 10⁻⁸ M TIM3-TCB. Mit Hilfe der mittels Tracer-Farbstoff markierten nativen T-Zellen kann der prozentuale Anteil der zwei T-Zell-Populationen gemessen und die spezifische Zelllyse berechnet werden.

Im Durchflusszytometrie-Plot ließen sich die stimulierten T-Zellen unabhängig von der CFSE-Färbung gut von den nicht nativen T-Zellen durch deutlich erhöhte Granularität abgrenzen. Vergleich man die Versuchsansätze in denen der TIM3-TCB hinzugefügt wurde (untere Reihe), mit der Kontrolle ohne den Antikörper (obere Reihe), so konnte man keinen Unterschied in den einzelnen Populationen feststellen. Die Populationsgröße blieb konstant, es kam folglich zu keiner spezifischen Lyse der T-Zellen.

Abbildung 24 fasst grafisch die spezifische Lyse über 24 und 48 Stunden zusammen.

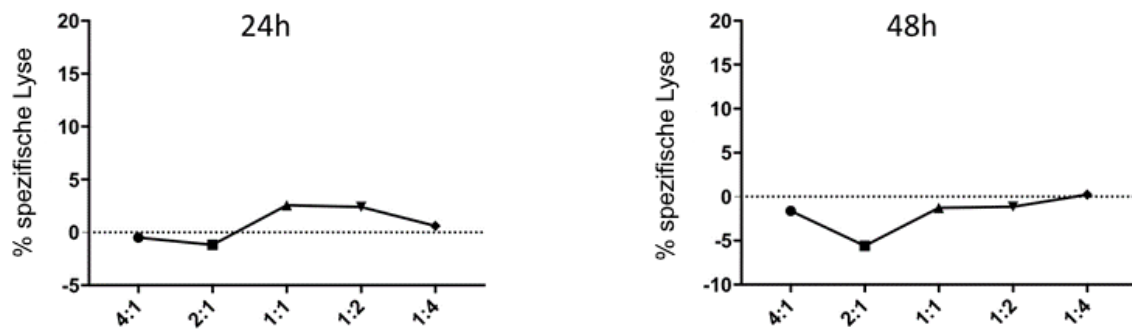


Abbildung 24: T-Zell-vermittelte spezifische Lyse von stimulierten T-Zellen in Kokultur mit autologen nativen T-Zellen und TIM3-TCB

Die Abbildung zeigt die spezifischen T-Zell-vermittelte T-Zellyse durch TIM3-TCB eines gesunden Spenders nach 24- und 48 Stunden Inkubationszeit. Für die Kokulturen wurde 10^{-8} M TIM3-TCB mit nativen- und stimulierten Spender-T-Zellen in verschiedenen E:T Ratios inkubiert. Die Auswertung der spezifischen Lyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

Die Zusammenfassung des *T-cell fratricide* Versuchs zeigte, dass die spezifische Lyse der T-Zellen unabhängig von der E:T-Ratio nicht einmal 5 % betrug. Auch bei einem verlängerter Inkubationszeitraum von 48 Stunden konnte keine Zellyse provoziert werden. Es konnte somit keine T-Zell-vermittelte Zytotoxizität gegenüber anderen T-Zellen provoziert werden.

4.5. Internalisierung von TIM3

Nachdem in Kapitel 4.3.3 gezeigt werden konnte, dass eine verminderte Expression des Zielantigens ursächlich für die fehlende Antikörperwirkung sein könnte, stellte sich die Frage, wodurch die sinkende TIM3-Expression auf den AML-Zellen verursacht wurde.

Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine Internalisierung des Antikörper-Rezeptor-Komplexes nach Antikörperkontakt. Dieses Phänomen konnte im Zusammenhang mit anderen Antikörpern bereits beobachtet werden (70).

4.5.1. TIM3-Internalisierung durch NK-Zellen und T-Lymphozyten

Für den ersten Internalisierungsversuch mit Spender-T-Zellen wurden diese über 24 Stunden stimuliert und anschließend mit 10^{-7} M TCB über 30 Minuten und 72 Stunden inkubiert. Anschließend wurde TIM3 auf der Oberfläche der Zellen angefärbt und mittels Durchflusszytometrie-Analyse ausgewertet. In Abbildung 25 erkennt man übereinandergelegt die MFI-Werte der T-Zellen mit TCB und ohne Antikörper Zusatz.

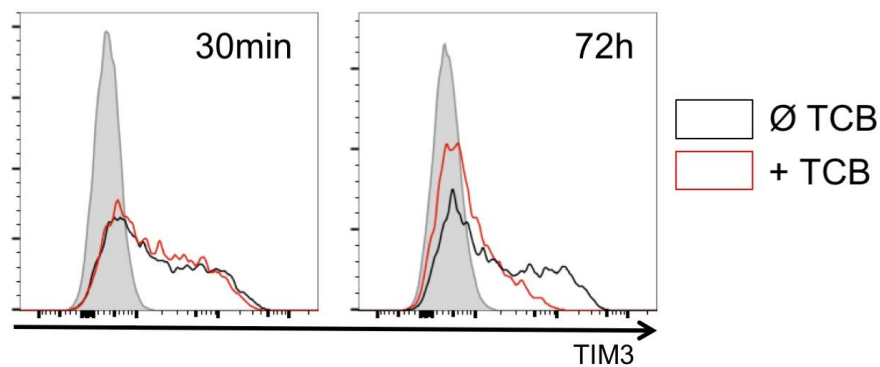


Abbildung 25: TIM3-Expression auf stimulierten Spender-T-Zellen nach Zugabe von TIM3-TCB
 Die Durchflusszytometrie-Plots zeigen die gemessene TIM3-MFI der stimulierten T-Zellen in Kokultur mit 10^{-7} M (rot) und 0 M (schwarz) TIM3-TCB über 30 Minuten und 72 Stunden. In grau ist die IgG1-Isotypfärbung dargestellt. TIM3 MFI-Ratio nach 30 Minuten: 3,7 (schwarz), 3,5 (rot) und nach 72 Stunden: 3,4 (schwarz), 1,7 (rot)

Im Versuchsansatz über 30 Minuten zeigte sich, dass die gemessene TIM3-Expression für beide Kulturen identisch war. Sie hob sich deutlich gegenüber dem Messwert des Isotyps ab. Es wurde also im gleichen Maß TIM3 auf der Oberfläche der T-Zellen exprimiert. Die TIM3 MFI-Ratio der T-Zellen in Kokultur mit 0 M TIM3-TCB betrug 3,7. In Kokultur mit 10^{-7} M TIM3-TCB 3,5. Bei der Kultivierung der T-Zellen über 72 Stunden mit dem TIM3-TCB im Vergleich zur Kontrolle ohne TCB konnte hingegen ein Unterschied in der Fluoreszenz beobachtet werden. Die T-Zellen in der TCB Kultur wiesen eine deutlich niedrigere MFI auf, was mit einem Abfall der TIM3-Expression auf der Zelloberfläche gleichgesetzt werden konnte.

Die gesunden Spender-NK-Zellen wurden für den Versuch ebenfalls vorstimuliert. Um zu überprüfen, ob ein Abfall der TIM3-Expression auf der Zelloberfläche auch hier zu sehen war, wurden die Zellen analog zum Versuch in Kapitel 4.5.1 über 30 Minuten und 24 Stunden mit dem TCB inkubiert und anschließend mit einem TIM3-Färbeantikörper angefärbt. Die Auswertung erfolgte mittels Durchflusszytometrie-Analyse. In Abbildung 26 erkennt man im Vergleich die MFI-Werte der TCB-Kultur und einer Kultur ohne Antikörperzusatz.

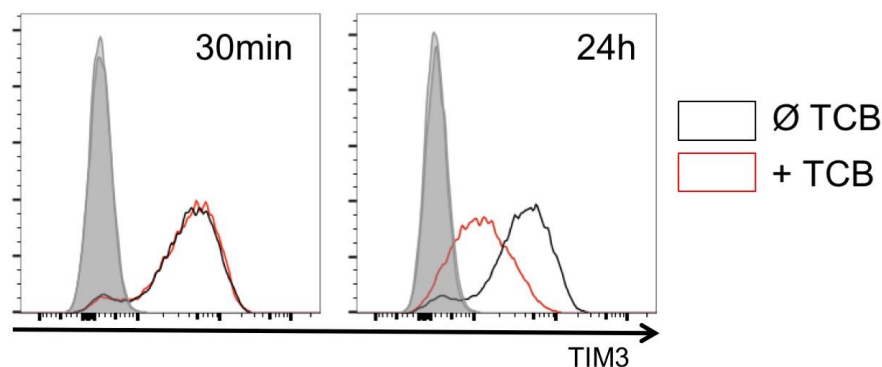


Abbildung 26: TIM3-Expression auf stimulierten NK-Zellen nach Zugabe von TIM3-TCB
 Die Durchflusszytometrie-Plots zeigen die gemessene TIM3-MFI der stimulierten NK-Zellen in Kokultur mit 10^{-7} M (rot) und 0 M (schwarz) TIM3-TCB über 30 Minuten und 24 Stunden. In grau ist die IgG1-Isotypfärbung dargestellt. TIM3 MFI-Ratio nach 30 Minuten: 18 (schwarz), 18,8 (rot) und nach 24 Stunden: 17 (schwarz), 5,3 (rot)

In Abbildung 26 konnte man nach 30 Minuten ein im Vergleich zum Isotyp deutlich erhöhtes Signal von TIM3 auf den NK-Zellen erkennen. Die Fluoreszenzintensität war jedoch sowohl mit, als auch ohne TCB-Zusatz nahezu identisch (MFI-Ratio 18 ohne TIM3-TCB und 18,8 mit 10^{-7} M TIM3-TCB). Nach 24 Stunden ließ sich hingegen ein Abfall der Fluoreszenzaktivität im Versuchsansatz mit dem TIM3-TCB erkennen (MFI-Ratio 5,3). Im Vergleich dazu blieb die TIM3-MFI auf den stimulierten NK-Zellen ohne Zugabe von TCB annähernd gleich (MFI-Ratio 17). Auch bei den NK-Zellen zeigte sich somit eine verminderte TIM3 Oberflächenexpression nach Zugabe des TCBs.

Da die bisher durchgeführten Versuche lediglich die Expression auf der Zelloberfläche, nicht jedoch im Zellinneren messen konnten, war der Abfall zwar ein Indiz, jedoch kein Beweis für eine spezifische Internalisierung des Rezeptors.

Um dieses Phänomen einer Internalisierung von TIM3 zuschreiben zu können, wurde ein Internalisierungsassay durchgeführt (vgl. Kapitel 3.7.7). Für den Versuch wurden stimulierte NK-Zellen verwendet, da diese in den Vorversuchen die stärkste TIM3-Expression aufweisen konnten. Für den Versuch wurden die Proben auf Eis und bei 37 °C mit 10^{-7} M TIM3-TCB inkubiert und zu drei Messzeitpunkten (15, 30 und 60 Minuten) analysiert. Es ist zu berücksichtigen, dass eine Internalisierung von Rezeptoren nur bei 37 °C, nicht jedoch bei 0 °C ungehindert stattfinden kann. Abbildung 27 zeigt hierbei zusammenfassend die gemessene TIM3 MFI-Ratio der NK-Zellen.

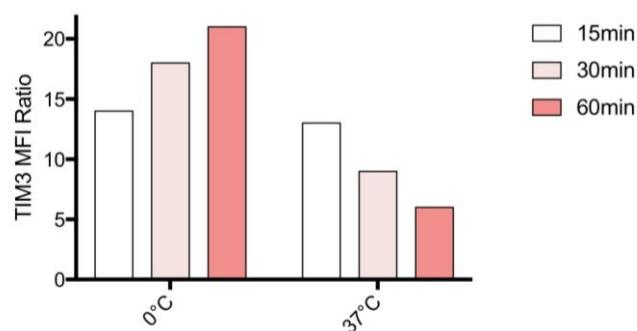


Abbildung 27: Internalisierungsassay mit stimulierten NK-Zellen

Dargestellt ist die berechnete TIM3 MFI-Ratio auf stimulierten NK-Zellen. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten (weiß), 30 Minuten (rosa) und 60 Minuten (rot) mit 10^{-7} M TIM3-TCB auf Eis (0 °C) und im 37 °C Wasserbad wurde die TIM3 MFI mittels Durchflusszytometrie bestimmt und die MFI-Ratio berechnet. Eine Internalisierung kann nur bei 37 °C erfolgen, weshalb aus der Differenz zur auf Eis gelagerten Probe die Internalisierung prozentual berechnet werden kann. 15 min: 7 %, 30 min: 52 %, 60 min: 76 %

Aus der Abbildung lässt sich erkennen, dass die MFI-Ratio für TIM3 auf den NK-Zellen über den Zeitraum von einer Stunde bei den auf Eis gelagerten Proben stetig zunahm. Im Vergleich hierzu fielen die gemessenen TIM3 MFI-Ratios für die bei 37 °C inkubierten Proben über den Zeitraum von einer Stunde ab, was mit einem Abfall der TIM3 Oberflächenexpression auf den NK-Zellen gleichzusetzen war. Um eine quantitative Aussage über den Internalisierungsprozess treffen zu können, wurde aus den gemessenen Werten mit Hilfe der Formel aus Kapitel 3.7.7 für jeden Messzeitpunkt prozentual die TIM3-Internalisierung berechnet. Hieraus ergab sich nach einer TCB Exposition von 60 Minuten eine TIM3 Internalisierung von 76 %.

Mit Hilfe des Internalisierungsassays ließ sich die Internalisierung von TIM3 in diesem Versuch mit NK-Zellen nachweisen. Der Versuch konnte also für den Nachweis der Internalisierung bei AML Primärmaterial verwendet werden.

4.5.2. TIM3-Internalisierung durch primäre AML-Zellen

Die Internalisierung von TIM3 auf primären AML-Zellen wurde analog zum Versuch in Kapitel 4.5.1 mit einem Internalisierungsassay nachgewiesen. Zusätzlich wurde noch ein vierter Messzeitpunkt nach 5 Minuten hinzugefügt. In Teil A von Abbildung 28 sind zusammenfassend die Messungen bei 0 °C und 37 °C gegenübergestellt. Teil B zeigt die Internalisierung in Prozent zu den einzelnen Messzeitpunkten. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der MFI-Ratio mit zugehöriger Standardabweichung (*mean ± SD*).

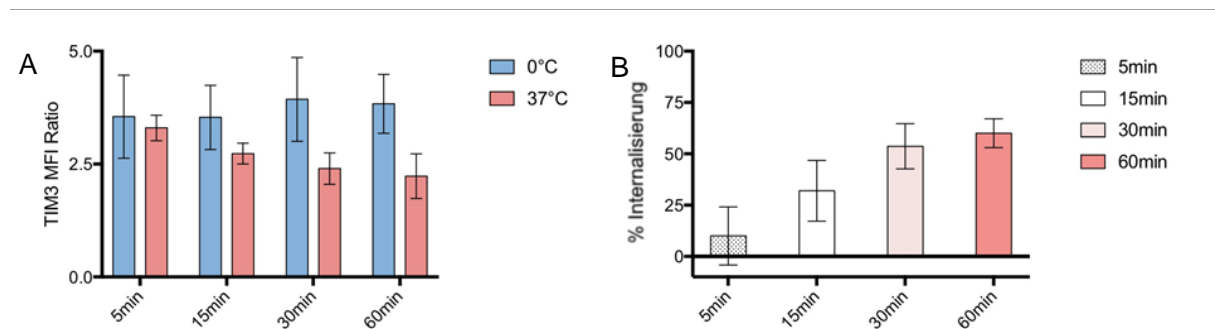


Abbildung 28: Internalisierungsassay mit AML Primärmaterial

A: Die Abbildung zeigt den Mittelwert der gemessenen TIM3-MFI Ratio inklusive der Standardabweichung (*mean ± SD*). Zusammenfassung der gemessenen TIM3 MFI-Ratio auf primären AML-Zellen nach 5-, 15-, 30- und 60 Minuten Inkubationszeit auf Eis (blau, 0 °C) und im 37 °C Wasserbad (rot). (*n=3*); **B:** Die Abbildung zeigt den Mittelwert der berechneten prozentualen Internalisierung von TIM3 inklusive der Standardabweichung (*mean ± SD*). 5min: 10 %, 15 min: 32 %, 30 min: 54 %, 60 min: 60 % (*n=3*)

Der Internalisierungsversuch mit AML Primärmaterial zeigte in allen Messreihen einen konstanten Abfall der TIM3-MFI-Ratio bei 37 °C über den Zeitverlauf von 60 Minuten, was mit einem Abfall von TIM3 auf der Zelloberfläche gleichzusetzen war. Die MFI-Ratio fiel jedoch nicht unter den Grenzwert von 1,5. Bei 0 °C zeigte sich zu allen Zeitpunkten eine konstante MFI-Ratio, die TIM3 Oberflächenexpression änderte sich hier also nicht. Hieraus ließ sich ein Internalisierungsprozess von TIM3 durch die AML-Zellen ableiten. Teil B der Grafik zeigt die berechnete Internalisierung von TIM3 auf primären AML-Zellen zu den verschiedenen Messzeitpunkten. Es zeigte sich eine fortschreitende Internalisierung von TIM3, die nach 60 Minuten TCB Exposition einen Durchschnittswert von 60 % erreichte.

5. DISKUSSION

Das Oberflächenmolekül TIM3 ist seit seiner Identifizierung im Jahr 2002 in den Forschungsfokus vieler Arbeitsgruppen gerückt. Auch wenn die physiologische Funktion bis heute nicht abschließend geklärt werden konnte (42–44,46,47), so macht seine Expression auf leukämischen Stammzellen (34,60) und seine Funktion als inhibitorisches Checkpointmolekül (45,52–54) TIM3 zu einem interessanten Ziel für die gezielte Antikörpertherapie in der AML.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 173 Patientenproben (davon 156 mit Erstdiagnose einer AML und 17 Patienten mit einem AML-Rezidiv) aus dem Klinikum Großhadern auf ihre TIM3-Oberflächenexpression getestet. Bei 142/156 (91 %) der Erstdiagnosepatienten war TIM3 auf der Zelloberfläche der CD34⁺/CD38⁻ leukämische Stammzellen und/oder CD33⁺ Bulk-Zellen zu finden (vgl. Abbildung 6). Bei Patienten im Rezidiv waren es 15/17 (88 %; vgl. Abbildung 7).

Aus diesen Ergebnissen ließ sich ableiten, dass ein Großteil der Patienten mit einer Erstdiagnose der AML, sowie Patienten im Rezidivfall das Zielantigen TIM3 in ausreichender Menge auf leukämischen Zellen exprimierten, um dieses als Angriffspunkt für eine Immuntherapie nutzen zu können. Die Interpretation der Daten steht im Einklang mit Untersuchungen von Kikushige et. al., die bei 29/34 (85 %) getesteten AML-Patientenproben TIM3⁺ LSCs finden konnten (59).

Im Hinblick auf Untersuchungen, die bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom und follikulärem B-Zell-Lymphom eine Korrelation zwischen der TIM3-Expression auf T-Zellen und dem Krankheitsverlauf feststellen konnten (71,72), wäre eine retrospektive Untersuchung des Patientenkollektivs im Hinblick auf den klinischen Krankheitsverlauf in Verbindung mit der TIM3-Expression anzustreben. Bei einer entsprechenden Korrelation könnte TIM3 als prognostischer Marker zu Therapiebeginn implementiert werden.

Bei viruspezifischen T-Zellen konnte nicht nur der Zusammenhang zwischen erhöhter TIM3-Expression und hoher Viruslast festgestellt werden, sondern auch der Expressionsrückgang nach antiviraler Therapie (73,74). Übertragen auf Patienten mit einer AML könnte die TIM3-Expression zur Verlaufskontrolle oder als Therapieüberwachung eingesetzt werden. Auch hier sollten die TIM3-Daten aus dem Patientenkollektiv im Hinblick auf den Zusammenhang mit der Therapie und der Rezidivrate analysiert werden.

Die mittlere TIM3 MFI-Ratio der CD33⁺ Bulk-Zellen war sowohl bei Patienten mit einer Erstdiagnose (4,56), als auch bei Rezidiv Patienten (3,79) etwas stärker ausgeprägt als auf den CD34⁺/CD38⁻ LSCs (ED: 3,17; Rez: 2,35; vgl. Abbildung 6 und Abbildung 7).

Da der verwendete Antikörper so konstruiert wurde, dass er bereits bei sehr geringer Präsenz des Zielantigens seine Wirkung entfaltet, sollte jedoch auch bei einem vergleichsweise geringen Mittelwert von 2,35 mit einem Ansprechen gerechnet werden können (75,76). Durch die hohe Probenanzahl validiert, stellt TIM3 daher im getesteten Patientenkollektiv ein potenzielles Ziel zur spezifischen Lyse von AML-Zellen dar.

In einem nächsten Schritt sollte die Untersuchung von hämatopoetischen Stammzellen gesunder Patienten angestrebt werden, um die in der Literatur vorbeschriebene fehlende TIM3-Expression

(46) auf diesen Zellen zu verifizieren und somit eventuell auftretende Nebenwirkungen, die bei einer gezielten Abtötung von gesunden Zellen der Hämatopoese auftreten könnten, besser abschätzen zu können. Auch ein Vergleich von T-Zellen gesunder Spender und AML-Patienten könnte wichtige Hinweise auf die TIM3-Expression und den damit verbundenen Funktionsverlust im Sinne einer „Erschöpfung“ dieser Zellen durch den Tumor liefern.

Der charakterisierte bispezifische Antikörper konnte bei Versuchen mit AML-Zelllinien durch Rekrutierung und Aktivierung von gesunden Spender-T-Zellen bei einer Konzentration von 10^{-7} M zu fast 80 % Lyse der TIM3⁺ Zelllinie KASUMI-3 führen (vgl. Abbildung 10). Das Wirkspektrum des Antikörpers fing bei ca. 10^{-10} M an und erreichte sein Plateau bei 10^{-7} mol/l.

Eine Anwendung des Antikörpers im mittleren Wirkspektrum sollte in der klinischen Anwendung angestrebt werden.

Es zeigte sich weiterhin, dass die spezifische Lyse der TIM3⁺ KASUMI-3-Zellen signifikant höher ausfiel, als die Lyse der TIM3⁻ HL-60-Zelllinie (vgl. Abbildung 10). Dieser Versuch zeigte, dass die Expression des Oberflächenmoleküls bei der Effektivität des Antikörperkonstrukts eine entscheidende Rolle spielt. Zellen, die TIM3 nicht auf ihrer Oberfläche präsentieren, nahmen also durch eine TCB-Exposition keinen Schaden. Anders formuliert muss bei einer Anwendung des Antikörpers insbesondere auf die gesunden Zellen geachtet werden, die physiologischer Weise oder nach Stimulation, TIM3 auf Ihrer Oberfläche exprimieren. Dies ist insbesondere im Hinblick auf ein mögliches Nebenwirkungsspektrum zu beachten, da es möglicherweise zu einer Lyse und dem damit verbundenen Funktionsverlust kommen kann.

Die Beobachtung spiegelte sich auch in der großen Abweichung der spezifischen Lyse der MOLM-13-Zellen wider. Sie korrelierte mit der ambivalenten Expression des Zielantigens auf den Zellen (vgl. Abbildung 10).

Die unterschiedliche TIM3-Expression, die auf den MOLM-13-Zellen gemessen wurde, ist möglicherweise zellzyklusabhängig oder anderen, äußeren Faktoren zuzuschreiben. Weitere Versuche dahingehend, z.B. eine simultane Analyse der Oberflächenmarker und des Zellzyklus, sollten angestrebt werden.

Im Zusammenhang mit der Antikörper-vermittelten Zytotoxizität sollte ein möglicher Einfluss des TCBs als sogenannter Checkpoint-Inhibitor nicht außer Acht gelassen werden. Checkpoint-Inhibitoren versuchen, durch Blockade der inhibitorischen Checkpoints, beziehungsweise Stimulation der aktivierenden Checkpoints, die Tumorabwehr zu aktivieren, beziehungsweise die Tumorprogression zu verhindern. Prominente Vertreter, wie der monoklonale Anti-PD1-Antikörper Nivolumab oder der monoklonale Anti-CTLA4-Antikörper Ipilimumab, werden bereits erfolgreich in der Therapie verschiedener Tumoren eingesetzt (77–81). Auch TIM3 fungiert als inhibitorisches Checkpointmolekül (45,54). Eine entsprechende Checkpointblockade durch den verwendeten TCB, die vermutlich ebenfalls zu einer Tumorregression führen könnte, kann nicht ausgeschlossen werden und es sollten Versuche angestrebt werden, die Signaltransduktion nach TCB-Bindung zu untersuchen. Die Tatsache, dass der verwendete Antikörper über zwei Mechanismen, der T-Zell-

Rekrutierung als auch der Checkpointblockade, zu einer Tumorlyse führen könnte, muss bei der Auswertung der Daten berücksichtigt werden.

Der beobachtete Anstieg der Zelllyse der TIM3⁻ HL-60-Zellen bei hohen Antikörperkonzentrationen ab 10^{-8} M (vgl. Abbildung 10) entstand vermutlich durch unspezifische T-Zell-Reaktionen bei Sättigung der CD3 Oberfläche und nicht durch eine spezifische Lyse durch Antikörper-vermittelte T-Zellen. Dieser Effekt konnte auch von anderen Arbeitsgruppen bei der Verwendung von bispezifischen Antikörperkonstrukten beobachtet werden (82). Die spezifische Korrelation zwischen Expressionsstärke des Antigens und Zelllyse konnte von einer weiteren Arbeitsgruppe bereits für das strukturgleiche Antikörperkonstrukt CEA/CD3-TCB gezeigt werden (75).

Der Versuch zeigte, dass die Oberflächenexpression von TIM3 ausschlaggebend für die spezifische T-Zell-vermittelte Lyse der Zielzellen ist. Die Tatsache, dass die TIM3⁺ humane AML-Zelllinie spezifisch abgetötet werden konnte, legt nahe, dass dies ebenso bei TIM3⁺ AML-Zellen *in vivo* der Fall sein könnte. Zellen, die kein TIM3 auf ihrer Oberfläche tragen, bleiben von der Wirkung des Antikörperkonstrukts ausgeschlossen. Dies ist besonders für gesunde hämatopoetische Zellen relevant, die bei einer Therapie möglichst erhalten bleiben sollen. Wichtig ist in diesem Zusammenhang auch die Tatsache, dass TIM3 auf aktivierten T-Zellen stark exprimiert wird (vgl. Abbildung 19). Im Hinblick auf Untersuchungen, die TIM3 als inhibitorisches Checkpointmolekül auf dysfunktionalen T-Zellen beschreiben (45,54,73), muss die T-Zell-Funktion bei Verwendung des TCBs genauere betrachtet werden. Würde es zu einem Funktionsverlust der T-Zellen durch den TCB kommen, so wäre ein verminderter Anti-Tumor-Effekt mit Progression der Tumorerkrankung zu erwarten. Andererseits zeigen Versuche, dass die T-Zell-Funktionalität durch Checkpointblockade wiederhergestellt werden kann (53,55). Sollte der TCB zu einer TIM3 Blockade auf den T-Zellen führen, wäre mit einer erhöhten Zytokinausschüttung und einer höheren Tumorzelllyse zu rechnen.

Eine Limitation in Versuchen mit den Zelllinien war die Schwierigkeit, eine geeignete TIM3⁺ Zelllinie zu finden. THP-1, eine AML-M5-Zelllinie, würde hierfür ebenfalls in Frage kommen (83) und sollte für weitere Zelllinienversuche in Betracht gezogen werden.

In einem nächsten Schritt wurden die Versuche auf primäres AML-Patientenmaterial ausgeweitet. In diesem Kultursystem konnte eine starke T-Zell-Aktivierung, in Form einer Erhöhung der MFI-Ratio für den Oberflächenmarker CD69, durch den Antikörper beobachtet werden. Diese Aktivierung konnte bei Verwendung eines strukturgleichen Antikörpers mit alleiniger CD3 Bindungsstelle nicht nachvollzogen werden (vgl. Abbildung 11). Der Versuch zeigte, dass eine T-Zell-Aktivierung nur in Anwesenheit des TCB stattfinden konnte, der gleichzeitig die monovalenten Bindungsstellen für CD3 und TIM3 besitzt (62). Die alleinige CD3-Stimulation ohne zusätzliche Bindung an ein weiteres Oberflächenmolekül war nicht ausreichend, um die T-Zellen zu stimulieren. Eine T-Zell-Aktivierung ohne Anwesenheit von TIM3⁺ Zellen erscheint somit sehr unwahrscheinlich. Betrachtet man die TIM3-Expression im untersuchten Patientenkollektiv, in der ein Großteil der AML-Zellen TIM3⁺ waren, scheint eine Therapie mit dem TCB hier gut möglich zu sein. Die TIM3-Expression sollte auch *in vivo* zu einer effektiven T-Zell-Aktivierung führen.

Trotz der gemessenen hohen T-Zell-Aktivität (CD69 MFI-Ratio >16), konnte mit dem Antikörperkonstrukt in sechs Versuchsansätzen eine nur gering ausgeprägte Lyse der AML-Zellen induziert werden (vgl. Abbildung 14). Die maximal erreichte spezifische Lyse lag mit 22 % deutlich unter den 80 %, die bei der Zelllyse der KASUMI-3-Zellen beobachtet werden konnten. Zusätzlich fiel die spezifische Lyse nach 13 Tagen auf nur 9 % ab. Im Hinblick auf eine mögliche Antikörper-Therapie mit dem TCB sprechen die Untersuchungsergebnisse, trotz T-Zell-Aktivierung, für ein möglicherweise geringes Ansprechen *in vivo*. Ein Grund für die geringe Zelllyse könnte die bereits beschriebene inhibitorische Wirkung von TIM3 auf T-Zellen sein (45,52,53). Kommt es durch Antigenpräsentation des Tumors *in vivo*, oder Aktivierung mit Interleukinen *in vitro* zu einer Hochregulation von TIM3 auf den T-Zellen, könnte eine verminderte Zytotoxizität die Folge sein. In der Tat konnte eine erhöhte TIM3-Expression auf den T-Zellen bei Verwendung des TCBs im Vergleich zum cTCB beobachtet werden. Im beschriebenen Versuch würde sich dies – wie gesehen – als geringe bis ausbleibende Tumorzelllyse zeigen. Auch der zeitliche Aspekt mit der maximalen Lyse an Tag 6, ließe sich durch eine langsame Hochregulation von TIM3 mit sukzessivem Funktionsverlust erklären. Fraglich bleibt, warum die T-Zellen in Versuchen mit der Zelllinie KASUMI-3 offensichtlich ihre Zytotoxizität behalten. Hier sollten weitere Versuche etabliert werden, die die Zytokinausschüttung der T-Zellen in Kombination mit KASUMI-3 und den AML-Zellen im Kultursystem vergleichen, um mögliche Unterschiede herauszuarbeiten.

Durch Beobachtung der TIM3-Expression auf den AML-Zellen über den Verlauf einer Langzeitkultur wurde eine weitere Hypothese erstellt, die den Funktionsverlust des Antikörperkonstrukts in diesem Setting erklären könnte: Die TIM3-Expression fiel innerhalb der Kultur so stark ab, dass die MFI am Versuchsende unter der Nachweisgrenze von 1,5 lag. Dadurch verlor der Antikörper sein Zielantigen und somit seinen Effekt. Dies würde auch erklären, warum die maximal beobachtete Zelllyse bereits an Tag sechs zu finden war: die berechnete TIM3-MFI-Ratio fiel erst zwischen den Messungen an Tag drei und sechs unter den Grenzwert von 1,5 (vgl. Abbildung 15).

Da der Großteil des TIM3-Expressionsrückganges bereits vor Zugabe des TCBs stattfand, lag die Vermutung nahe, dass das zur Kultivierung der Zellen verwendete Medium eine Rolle spielen könnte. Durch Verwendung eines serumfreien Mediums wurde dieser Fragestellung nachgegangen. Der Expressionsabfall wurde jedoch auch in diesem Versuchsansatz beobachtet (vgl. Abbildung 16). Zusätzlich war ein vorzeitiges Absterben der AML-Zellen zu beobachten, sodass auf die weitere Verwendung eines serumfreien Mediums verzichtet wurde.

Es gilt nun ein Langzeitkulturmodell zu etablieren, in dem die Oberflächenmarker, im speziellen TIM3 auf der Oberfläche der AML-Zellen über einen längeren Zeitraum konstant exprimiert werden, damit der Antikörper seine volle Wirkung entfalten kann. Hilfreich wäre in diesem Zusammenhang ein *in vivo* Imaging der TCB Bindung an TIM3 auf den AML-Zellen und CD3 auf den T-Zellen, analog zu den Versuchen von Bacac mit dem strukturgleichen CEA/CD3-Konstrukt (75,76).

Um die Wirkung des TCBs auf gesunde Zellen des hämatologischen Systems näher zu charakterisieren, wurde zunächst die Expression auf gesunden NK-Zellen untersucht. Dabei

konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen schon im nativen Zustand eine hohe TIM3-Expression aufzeigten und diese sich durch zusätzliche Stimulation mit Interleukin-15 um das Vierfache steigern ließ (vgl. Abbildung 17). In Zusammenschau mit den vorherigen Untersuchungen bestand also die Gefahr, dass der TCB fälschlicherweise zu einer T-Zell-induzierten Lyse der gesunden TIM3⁺ NK-Zellen führen könnte. Dies würde bei einer klinischen Anwendung unerwünschte Nebenwirkungen hervorrufen. Aus diesem Grund wurde die Zytotoxizität gegenüber NK-Zellen näher betrachtet.

In sechs von sieben Versuchen mit gesunden NK-Zellen wurde über 48 Stunden eine nur geringe spezifische Zelllyse (Mittelwert: 15 %) beobachtet (vgl. Abbildung 21). Es lässt sich also vermuten, dass bei Verwendung des TCBs an Patienten kein relevanter Abfall der NK-Zellzahl und damit keine unerwünschten Nebenwirkungen zu befürchten sind.

In einem zweiten Schritt wurden gesunde T-Lymphozyten näher betrachtet. Native T-Zellen zeigten zunächst keine erhöhte TIM3-Expression auf ihrer Oberfläche (vgl. Abbildung 18). Dies ließ die Schlussfolgerung zu, dass eine fehlerhafte Bindung der TIM3-Domäne des verwendeten Antikörperkonstrukts an T-Zellen, anstelle der leukämischen Zellen, nicht stattfinden kann.

Nach Stimulation mit CD3/CD28-Beads konnte hingegen auch bei den T-Zellen eine erhöhte Oberflächenexpression von TIM3 induziert werden (vgl. Abbildung 19). Analog zu den NK-Zellen wurde also auch hier die Frage aufgeworfen, ob stimulierte T-Zellen ebenfalls einer T-Zell vermittelten Lyse durch den TCB unterliegen können. Zusätzlich stellte sich die Frage, ob der TCB durch gleichzeitige Bindung der CD3 und TIM3 Domäne an den T-Zellen (anstelle der TIM3-Bindung an den AML-Zellen) neutralisiert werden kann. Leisegang aus der Arbeitsgruppe von Dolores Schendel konnte zeigen, dass T-Zellen, die einen bestimmten Tumormarker erkennen, andere T-Zellen, die ebenfalls diesen Marker exprimieren, abtöten (84). Diesen Prozess nennt er *T-cell fratricide* und vermutet, dass auch andere Oberflächenmarker Auslöser sein könnten. Ein solches T-Zell-Absterben könnte mit Hinblick auf das Langzeitkulturmodell ein möglicher Grund für die fehlende Zelllyse sein.

Diese Hypothese für die fehlende Lyse in der Zellkultur mit primären AML-Zellen konnte jedoch für den TIM3-TCB ausgeschlossen werden. In Versuchsansätzen über 24 und 48 Stunden, sowie mit verschiedenen E:T Ratios konnte keine Lyse von TIM3⁺ T-Zellen durch TIM3⁻ T-Zellen beobachtet werden (vgl. Abbildung 24).

Die Versuchsreihe sollte in einem nächsten Schritt mit mehr Spendern fortgeführt werden, um eine mögliche Schädigung des hämatopoetischen Systems vollständig ausschließen zu können.

In Folge der Versuche im Langzeitkulturmodell wurde die Frage aufgeworfen, welcher Mechanismus der rückläufigen TIM3-Expression zu Grunde liegt. Als eine mögliche Ursache hierfür könnte die Internalisierung von TIM3 durch die AML-Zellen bei Exposition gegenüber dem TCB eine Rolle spielen.

Mit Hilfe eines Internalisierungsassays konnte festgestellt werden, dass TIM3 auf den AML-Zellen nach Zugabe des Antikörpers innerhalb von 60 Minuten zu 60 % internalisiert wurde und somit dem Antikörper ein großer Teil sein Zielantigen in der Zellkultur verloren ging (vgl. Abbildung 28).

Das Phänomen „Antigenverlust“ bei Tumorzellen ist als sogenannter „Immune escape“-Mechanismus bekannt (85). Ähnlich wie es bereits für PD1 beschrieben wurde (86), könnte es auch bei TIM3 durch die spezielle Tumorumgebung zu einer schnellen Herabregulation kommen, um somit die Erkennung durch das Immunsystem zu umgehen. Es bleibt die Frage offen, warum TIM3 auf der Oberfläche von T-Zellen auch nach mehreren Tagen in der Kultur nicht verloren geht, auf den AML Blasten jedoch internalisiert wird. Grund hierfür ist vermutlich die anhaltende Antigenpräsentation, die, wie bereits beschrieben, zu einer erhöhten TIM3-Expression führen kann (53). Zudem ist zu bemerken, dass die TIM3 MFI-Ratio zwar deutlich sank, jedoch nicht unter den Grenzwert von 1,5 abfiel. Die verbleibende Expression auf den Zellen, die nicht niedriger als die Expression auf den getesteten KASUMI-3-Zellen war, müsste für eine T-Zell-induzierte Lyse noch ausreichend sein. Es sollten weitere Einflussfaktoren im Langzeitkulturmodell identifiziert und modifiziert werden, um die Wirkungsweise des TCBs besser charakterisieren zu können.

Um die hohe Proliferationsrate von AML-Zellen auch *in vitro* zu berücksichtigen, müssten im Langzeitversuch stetig neue Blasten hinzugefügt werden. Ein Versuch zur spezifischen Lyse von leukämischen Stammzellen sollte ebenfalls angestrebt werden. Um die Wirkung auf das gesunde hämatopoetische System des Patienten besser abschätzen zu können, sollte der Antikörper ebenfalls an gesunden Knochenmarkszellen getestet werden.

Bispezifische Antikörper haben im Vergleich zu monoklonalen Antikörpern den Vorteil, dass sie über die Rekrutierung von körpereigenen Immunzellen eine gesteigerte Zytotoxizität gegenüber den Tumorzellen erreichen können (87). Gleichzeitig erhöht sich das Risiko einer gesteigerten Zytokinfreisetzung bis hin zum gefürchteten Cytokine-Release-Syndrom (88). Ein wichtiges Ziel in der Erforschung neuer bispezifischer Antikörper wird daher sein, einen optimalen Applikationszeitpunkt zu finden.

Unabhängig von der T-Zell-vermittelten Zytotoxizität kann ein TIM3-Antikörper auch als Immuncheckpoint-Inhibitor eingesetzt werden. Erste Untersuchungen zeigen, dass Patienten, nach PD1-Blockade vermehrt TIM3 auf der Oberfläche von T-Zellen exprimieren. Die Kombination mit einem TIM3-Antikörper könnte hier den Antitumoreffekt deutlich verstärken (89). Denkbar wären Versuche analog zur Kombination der beiden Checkpoint-Inhibitoren Nivolumab und Ipilimumab, die als Kombinationstherapie deutlich längerer Überlebensraten bei Tumorpatienten als in Monotherapie zeigten (77). Auch nach der Therapie mit gentechnisch veränderten T-Zellen (CAR-T-Zell-Therapie) zeigte sich bei einem Patienten mit einem diffus großzelligen B-Zell-Lymphom eine erhöhte TIM3-Expression (90), die eine Kombination der verschiedenen immuntherapeutischen Ansätze denkbar macht. Nicht zuletzt die Nobelpreisvergabe an Tasuku Honjo und James Allison 2018 für die Entdeckung der inhibitorischen Checkpointmoleküle CTLA-4 und PD-1 zeigt, dass der Erforschung dieser Oberflächenmarker großes therapeutisches Potential zugesagt wird (91).

Auch eine Kombination aus Checkpoint-Inhibitor und TIM3-TCB sollte ebenfalls in Betracht gezogen werden.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Immuntherapie mit bispezifischen Antikörpern als neue Behandlungsstrategien für AML-Patienten eine vielversprechende Option darstellen können. TIM3 kommt dabei sowohl wegen seiner Expression auf leukämischen Stammzellen, als auch wegen seiner Funktion als inhibitorischer Checkpoint auf T-Zellen als vielversprechendes Zielmolekül in Frage. In Versuchen mit AML-Zelllinien konnte mit einem TIM3-TCB eine hohe Tumorzelllyse erreicht werden. Vorerst konnte dies jedoch nicht mit primären AML-Zellen reproduziert werden. Die Internalisierung von TIM3, sowie dysfunktionale T-Zellen könnte hierbei eine große Rolle spielen. Diese Arbeit liefert erste Einblicke in mögliche Resistenzmechanismen und Hindernisse, die bei der Antikörper-basierten Therapie auftreten können und soll somit zur stetigen Weiterentwicklung neuer Immuntherapien beitragen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine bösartige Neoplasie des blutbildenden Systems. Viele Patienten, die zunächst erfolgreich mittels Chemotherapie in Remission gehen, erleiden nach einiger Zeit einen Rückfall der Erkrankung. Zuzuschreiben ist das Neuaufflammen der AML residuellen chemoresistenten Leukämie-induzierenden Zellen (LICs), die im Knochenmark des Patienten über einen langen Zeitraum überdauern können. Der einzig kurative Ansatz in der AML-Therapie ist die Transplantation von Knochenmark eines gesunden Spenders. Da viele Patienten auf Grund ihres Alters oder ihres schlechten Allgemeinzustandes nicht für eine Transplantation in Frage kommen, besteht die Notwendigkeit, neue Therapieformen für die AML zu etablieren. Ein erfolgversprechender Ansatz ist die Immuntherapie, im speziellen die Antikörper-basierte Immuntherapie mittels bispezifischer T-/NK-Zell-rekrutierender Antikörper. Ziel ist es, körpereigene Immunzellen mittels eines Antikörper-Linkers in die unmittelbare Nähe der Krebszellen zu bringen und zu aktivieren. Umgesetzt wird dies im Falle des hier verwendeten TCBs über eine CD3-Bindung an T-Zellen und eine TIM3-Bindung an den Krebszellen. TIM3 ist ein Protein, welches physiologisch auf vielen Zellen im Körper vorkommt. Interessant für die AML-Therapie ist jedoch das Vorhandensein auf leukämischen Blasten und speziell auf LSCs, bei gleichzeitigem Fehlen auf hämatopoetischen Stammzellen.

Durch Untersuchung von AML-Patientenproben konnte gezeigt werden, dass über 87 % der Patienten TIM3 auf der Oberfläche von CD33⁺ Blasten und/oder CD34⁺/CD38⁻ LSCs trugen. Dies war sowohl für Patienten mit Erstdiagnose, als auch für Rezidivpatienten der Fall. In Zytotoxizitätsversuchen mit ALM-Zelllinien konnte die T-Zell-Aktivierung durch den TCB, sowie eine spezifische Lyse von über 75 % der AML-Zellen nachgewiesen werden. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass Zellen ohne TIM3 auf ihrer Oberfläche nicht lysiert wurden. In Langzeitkulturversuchen mit AML-Zellen aus Patientenmaterial über 12 Tage konnte ebenfalls eine starke T-Zell-Aktivierung gezeigt werden. Da diese Zellen jedoch trotz aktivierter T-Zellen nicht mit Hilfe des TCBs lysiert werden konnten, leitete sich die Frage nach möglichen Resistenzmechanismen der AML-Zellen ab. Es konnte gezeigt werden, dass die TIM3-Oberflächenexpression auf den AML-Zellen innerhalb der ersten drei Tage in der Langzeitkultur abnahm. Mit Hilfe eines Internalisierungsassays wurde festgestellt, dass TIM3 auf der Blastenoberfläche nach Zugabe des TCBs innerhalb von 60 Minuten zu 60 % internalisiert wurde. Ein *T-cell-fratricide*, also das gegenseitige Abtöten von aktivierten T-Zellen als Resistenzmechanismus konnte für den TCB ausgeschlossen werden.

Zusätzlich wurde die TIM3-Expression auf gesunden T- und NK-Zellen untersucht. T-Zellen zeigten ohne Stimulation keine TIM3-Expression, nach Stimulation mit CD3/CD28 jedoch eine deutliche Hochregulation des Oberflächenantigens. NK-Zellen zeigten bereits ohne Stimulation eine erhöhte TIM3-Expression auf ihrer Oberfläche, nach Stimulation wurde die Expression jedoch deutlich verstärkt. Für beide Zellpopulationen zeigte sich jedoch, dass sie nicht durch die TCB-vermittelte T-Zell-Aktivität lysiert werden konnten.

Primäres Ziel sollte es nun sein, ein Zellkultursystem zu etablieren, in dem die Oberflächenmoleküle auf den AML-Zellen über einen längeren Zeitraum bestehen bleiben, um die Wirkung des TCBs besser charakterisieren zu können. Ein möglicher Beitrag der TIM3-Expression auf T-Zellen, der zu einem dysfunktionalen Phänotyp führt und damit eine effektive Zelllyse verhindert muss beachtet werden. Gleichzeitig sollte die Wirkung auf gesunde hämatopoetische Stammzellen mit Hilfe von gesunden Knochenmarkszellen untersucht werden.

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit wurden erste Erkenntnisse über Wirkung und mögliche Schwierigkeiten bei der Verwendung des TIM3-TCBs gewonnen, die den Grundstein für weitere Untersuchungen legen. Diese müssen jetzt darauf abzielen, ein geeignetes Modell für die Untersuchung von Patientenproben sowie gesunden hämatologischen Stammzellen zu etablieren.

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Erläuterung
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
BiT	Serumfreies Zellmedium (Bovines Serumalbumin + rekombinantes humanes Insulin + humanes Transferrin)
BSA	Bovine serum albumin
CAR	Chimeric antigen receptor
CD	Cluster of differentiation
Ceacam-1	Carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CMML	Chronische myelomonozytäre Leukämie
CR	Complete remission
CrossMAb	Immunglobulin domain crossover
CRS	Cytokine release syndrome
cTCB	Kontroll-TCB
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
DC	Dendritic cell
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's Phosphat buffered saline
E:T Ratio	Effector- to target-cell ratio
ED	Erstdiagnose
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELN	European Leukemia Net
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
FAB	French-American-British
Fab	Fragment antigen binding
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FBS	Fetal Bovine Serum
Fc	Fragment crystallisable
FDA	US Food and Drug Association
Gal-9	Galectin-9
GvHD	Graft-versus-Host-disease
GvL	Graft-versus-Leukemia
Gy	Gray
HD	Healthy donor
HLA	Human leukocyte antigen
HMGB-1	High-mobility group box 1

Abkürzung	Erläuterung
HSC	Hematopoietic stem cells
HWZ	Halbwertszeit
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KiH	Knob-into-hole
KM	Knochenmark
LAG-3	Lymphocyte-activation gene 3
LSC	Leukemic stem cell
LZK	Langzeitkultur
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MFI	Median fluorescence intensity
MHC	Major histocompatibility complex
NK	Natürliche Killerzellen
PB	Peripheres Blut
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PD-1	Programmed cell death protein 1
Pt.	Patient
PtdSer	Phosphatidylserin
RCF	Relative centrifugal force
RCMDS	
Rez	Rezidiv
sAML	Sekundäre AML
SCID	Severe combined immune-deficient
SD	Standard deviation
TCB	T-cell bispecific
TCR	T-Zell-Rezeptor
T _{ex}	Exhausted T-cell
TILs	Tumor-infiltrating lymphocytes
TIM3	T-cell immunoglobulin and mucin domain 3

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Robert Koch Institut. Krebs in Deutschland für 2015/2016. Berlin; 2016.
2. Longo DL, Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2015;373(12):1136–52.
3. Hiddemann W, Bartram C. *Die Onkologie - Teil 2*. 2nd ed. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2010. 1636–1671 p.
4. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937–51.
5. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391–405.
6. Bennett JM, Catovsky D, Daniel M-T, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, et al. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. *British Journal of Haematology*. 1976;33(4):451–8.
7. Xhaard A, Brunstein C, Fontbrune FS De, Rowe JM, Tallman MS, Papaemmanuil E, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: Recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2016;51(6):1411–2.
8. Estey EH. Acute myeloid leukemia: 2019 update on risk-stratification and management. *American Journal of Hematology*. 2018;93(10):1267–91.
9. Büchner T, Schlenk RF, Schaich M, Döhner K, Krahl R, Krauter J, et al. Acute Myeloid Leukemia (AML): Different Treatment Strategies Versus a Common Standard Arm—Combined Prospective Analysis by the German AML Intergroup. *Journal of Clinical Oncology*. 2012;30(29):3604–10.
10. Ferrara F, Schiffer CA. Acute myeloid leukaemia in adults. *The Lancet*. 2013;381(9865):484–95.
11. Koreth J, Schlenk R, Kopecky KJ, Honda S, Sierra J, Djulbegovic BJ, et al. Allogeneic Stem Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia in First Complete Remission. *JAMA*. 2009;301(22):2349.
12. Possinger K, Regierer AC. *Facharztwissen Hämatologie Onkologie*. 3rd ed. München: Elsevier; 2015. 197–216 p.
13. Singh AK, McGuirk JP. Allogeneic Stem Cell Transplantation: A Historical and Scientific Overview. *Cancer Research*. 2016;76(22):6445–51.
14. Murphy K, Travers P, Walport M. *Janeway Immunologie*. 7th ed. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2018. 1–38 p.
15. Sweeney C, Vyas P. The Graft-Versus-Leukemia Effect in AML. *Frontiers in Oncology*. 2019;9.
16. Czerw T, Labopin M, Gorin N-C, Giebel S, Blaise D, Meloni G, et al. Long-Term Follow-Up of Patients with AML Surviving and Free of Disease Recurrence for at Least 2 Years After Autologous Stem Cell Transplantation: A Report From the Acute Leukemia Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Cancer*. 2016;122(12):1880–7.
17. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *The Lancet*. 2009;373(9674):1550–61.

18. Welniak LA, Blazar BR, Murphy WJ. Immunobiology of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Annual Review of Immunology*. 2007;25(1):139–70.
19. Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, Prentice R, Fefer A, Buckner CD, et al. Antileukemic Effect of Graft-versus-Host Disease in Human Recipients of Allogeneic-Marrow Grafts. *New England Journal of Medicine*. 1979;300(19):1068–73.
20. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*. 1990;75(3):555–62.
21. Butturini A, Bortin MM, Gale RP. Graft-versus-leukemia following bone marrow transplantation. Vol. 2, Bone marrow transplantation. 1987. p. 233–42.
22. Ravandi F. Eradication of Leukemia Stem Cells as a New Goal of Therapy in Leukemia. *Clinical Cancer Research*. 2006;12(2):340–4.
23. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 1994;367(6464):645–8.
24. Guzman ML, Jordan CT. Considerations for Targeting Malignant Stem Cells in Leukemia. *Cancer Control*. 2004;11(2):97–104.
25. Jamieson CHM, Ailles LE, Dylla SJ, Muijtjens M, Jones C, Zehnder JL, et al. Granulocyte–Macrophage Progenitors as Candidate Leukemic Stem Cells in Blast-Crisis CML. *New England Journal of Medicine*. 2004;351(7):657–67.
26. Chabner BA, Roberts TG. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2005;5(1):65–72.
27. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. *Annual Review of Immunology*. 2011;29:235–71.
28. Mack M, Riethmuller G, Kufer P. A small bispecific antibody construct expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity. *Immunology*. 1995;92:7021–5.
29. Sanford M. Blinatumomab: First Global Approval. *Drugs*. 2015;75(3):321–7.
30. Shankaran V, Ikeda H, Bruce a T, White JM, Swanson PE, Old LJ, et al. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. 2001;410(6832):1107–11.
31. Tran E, Robbins PF, Rosenberg SA. “Final common pathway” of human cancer immunotherapy: targeting random somatic mutations. *Nature Immunology*. 2017;18(3):255–62.
32. Frey N V, Porter DL. Cytokine release syndrome with novel therapeutics for acute lymphoblastic leukemia. *Hematology*. 2016;2016(1):567–72.
33. Kikushige Y, Miyamoto T. TIM-3 as a novel therapeutic target for eradicating acute myelogenous leukemia stem cells. *International Journal of Hematology*. 2013;98(6):627–33.
34. Jan M, Chao MP, Cha AC, Alizadeh AA, Gentles AJ, Weissman IL, et al. Prospective separation of normal and leukemic stem cells based on differential expression of TIM3, a human acute myeloid leukemia stem cell marker. *PNAS*. 2011;108(12):5009–14.
35. Pelosi E, Castelli G, Testa U. Targeting LSCs through membrane antigens selectively or preferentially expressed on these cells. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2015;55(4):336–46.

36. A Phase 1 Study of AMG 330 in Subjects With Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia. [retrieved 2019 Jun 4]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02520427?term=AMG330&rank=1>
37. Safety Study of MGD006 in Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia (AML) or Intermediate-2/High Risk MDS. [retrieved 2019 Jun 4]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02152956?term=Flotetuzumab&rank=2>
38. Owen J, Punt J, Stranford S, Jones; PP. Kuby Immunobiology. 7th ed. W. H. Freeman and Company; 2013. 832 p.
39. Schwartz RH. Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell*. 1992;71(7):1065–8.
40. Curtsinger JM, Mescher MF. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Current Opinion in Immunology*. 2010;22(3):333–40.
41. Mescher MF, Curtsinger JM, Agarwal P, Casey KA, Gerner M, Hammerbeck CD, et al. Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. *Immunological Reviews*. 2006;211(1):81–92.
42. Monney L, Sabatos CA, Gaglia JL, Ryu A, Waldner H, Chernova T, et al. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature*. 2002;415(6871):536–41.
43. Das M, Zhu C, Kuchroo VK. Tim-3 and its role in regulating anti-tumor immunity. *Immunological Reviews*. 2017;276(1):97–111.
44. Meyers JH, Sabatos CA, Chakravarti S, Kuchroo VK. The TIM gene family regulates autoimmune and allergic diseases. *Trends in Molecular Medicine*. 2005;11(8):362–9.
45. Anderson AC, Joller N, Kuchroo VK. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. *Immunity*. 2016;44(5):989–1004.
46. Kikushige Y, Miyamoto T, Yuda J, Jabbarzadeh-Tabrizi S, Shima T, Takayanagi SI, et al. A TIM-3/Gal-9 Autocrine Stimulatory Loop Drives Self-Renewal of Human Myeloid Leukemia Stem Cells and Leukemic Progression. *Cell Stem Cell*. 2015;17(3):341–52.
47. Nagahara K, Arikawa T, Oomizu S, Kontani K, Nobumoto A, Tateno H, et al. Galectin-9 increases Tim-3+ dendritic cells and CD8+ T cells and enhances antitumor immunity via galectin-9-Tim-3 interactions. *Journal of immunology*. 2008;181(11):7660–9.
48. Zhu C, Anderson AC, Schubart A, Xiong H, Imitola J, Houry SJ, et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nature immunology*. 2005;6(12):1245–52.
49. Sánchez-Fueyo A, Tian J, Picarella D, Domenig C, Zheng XX, Sabatos CA, et al. Tim-3 inhibits T helper type 1-mediated auto- and alloimmune responses and promotes immunological tolerance. *Nature Immunology*. 2003;4(11):1093–101.
50. Gleason MK, Lenvik TR, Mccullar V, Felices M, Brien MSO, Sarah A, et al. Interferon gamma production in response to galectin-9 Tim-3 is an inducible human natural killer cell receptor that enhances interferon gamma production in response to galectin-9. *Blood*. 2012;119(13):3064–72.
51. Tao J, Han D, Gao S, Zhang W, Yu H, Liu P, et al. CD8 + T cells exhaustion induced by myeloid-derived suppressor cells in myelodysplastic syndromes patients might be through TIM3/Gal-9

- pathway. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2020;24(1):1046–58.
52. van der Leun AM, Thommen DS, Schumacher TN. CD8+ T cell states in human cancer: insights from single-cell analysis. *Nature Reviews Cancer*. 2020;20(4):218–32.
 53. McLane LM, Abdel-Hakeem MS, Wherry EJ. CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer. *Annual Review of Immunology*. 2019;37(1):457–95.
 54. Chen BJ, Dashnamoorthy R, Galera P, Makarenko V, Chang H, Ghosh S, et al. The immune checkpoint molecules PD-1, PD-L1, TIM-3 and LAG-3 in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget*. 2019;10(21):2030–40.
 55. Iwai Y. PD-1 blockade inhibits hematogenous spread of poorly immunogenic tumor cells by enhanced recruitment of effector T cells. *International Immunology*. 2004;17(2):133–44.
 56. Golden-Mason L, Palmer BE, Kassam N, Townshend-Bulson L, Livingston S, McMahon BJ, et al. Negative Immune Regulator Tim-3 Is Overexpressed on T Cells in Hepatitis C Virus Infection and Its Blockade Rescues Dysfunctional CD4+ and CD8+ T Cells. *Journal of Virology*. 2009;83(18):9122–30.
 57. McMahan RH, Golden-Mason L, Nishimura MI, McMahon BJ, Kemper M, Allen TM, et al. Tim-3 expression on PD-1+ HCV-specific human CTLs is associated with viral persistence, and its blockade restores hepatocyte-directed in vitro cytotoxicity. *Journal of Clinical Investigation*. 2010;120(12):4546–57.
 58. Nebbia G, Peppas D, Schurich A, Khanna P, Singh HD, Cheng Y, et al. Upregulation of the Tim-3/Galectin-9 Pathway of T Cell Exhaustion in Chronic Hepatitis B Virus Infection. Shoukry NH, editor. *PLoS ONE*. 2012;7(10):e47648.
 59. Kikushige Y, Shima T, Takayanagi SI, Urata S, Miyamoto T, Iwasaki H, et al. TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010;7(6):708–17.
 60. Kikushige Y, Miyamoto T. Identification of TIM-3 as a Leukemic Stem Cell Surface Molecule in Primary Acute Myeloid Leukemia. *Oncology*. 2015;89 Suppl 1(Suppl. 1):28–32.
 61. Klein C, Schaefer W, Regula JT. The use of CrossMAb technology for the generation of bi- and multispecific antibodies. *mAbs*. 2016;8(6):1010–20.
 62. Klein C. Antibody based Immunotherapy of Cancer: Immunotrain 2 Conference, Munich. München; 2016.
 63. Bar J, Ofek E, Barshack I, Gottfried T, Zadok O, Kamer I, et al. Transformation to small cell lung cancer as a mechanism of resistance to immunotherapy in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2019;138:109–15.
 64. Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, Ribas A. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell*. 2017;168(4):707–23.
 65. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature*. 2014;515(7528):563–7.
 66. Sack U, Tárnok A, Rothe G. *Cellular Diagnostics*. S. Karger AG; 2009.
 67. Yamazaki T, Akiba H, Iwai H, Matsuda H, Aoki M, Tanno Y, et al. Expression of Programmed Death 1 Ligands by Murine T Cells and APC. *The Journal of Immunology*. 2002;169(10).
 68. Ziegler SF, Ramsdell F, Alderson MR. The activation antigen CD69. *Stem Cells*.

- 1994;12(5):456–65.
69. Leisegang M, Wilde S, Spranger S, Milosevic S, Frankenberger B, Uckert W, et al. MHC-restricted fratricide of human lymphocytes expressing survivin-specific transgenic T cell receptors. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(11):3869–77.
 70. Rudnick SI, Lou J, Shaller CC, Tang Y, Klein-Szanto AJP, Weiner LM, et al. Influence of affinity and antigen internalization on the uptake and penetration of Anti-HER2 antibodies in solid tumors. *Cancer research*. 2011;71(6):2250–9.
 71. Yang Z-Z, Grote DM, Ziesmer SC, Niki T, Hirashima M, Novak AJ, et al. IL-12 upregulates TIM-3 expression and induces T cell exhaustion in patients with follicular B cell non-Hodgkin lymphoma. *Journal of Clinical Investigation*. 2012;122(4):1271–82.
 72. Gao X, Zhu Y, Li G, Huang H, Zhang G, Wang F, et al. TIM-3 Expression Characterizes Regulatory T Cells in Tumor Tissues and Is Associated with Lung Cancer Progression. Bachmann MP, editor. *PLoS ONE*. 2012;7(2):e30676.
 73. Jones RB, Ndhlovu LC, Barbour JD, Sheth PM, Jha AR, Long BR, et al. Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection. *Journal of Experimental Medicine*. 2008;205(12):2763–79.
 74. Wu W, Shi Y, Li J, Chen F, Chen Z, Zheng M. Tim-3 expression on peripheral T cell subsets correlates with disease progression in hepatitis B infection. *Virology Journal*. 2011;8(1):113.
 75. Bacac M, Fauti T, Sam J, Colombetti S, Weinzierl T, Ouaret D, et al. A Novel Carcinoembryonic Antigen T-Cell Bispecific Antibody (CEA TCB) for the Treatment of Solid Tumors. *Clinical Cancer Research*. 2016;22(13):3286–97.
 76. Lehmann S, Perera R, Grimm H-P, Sam J, Colombetti S, Fauti T, et al. In Vivo Fluorescence Imaging of the Activity of CEA TCB, a Novel T-Cell Bispecific Antibody, Reveals Highly Specific Tumor Targeting and Fast Induction of T-Cell-Mediated Tumor Killing. *Clinical Cancer Research*. 2016;22(17):4417–27.
 77. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *New England Journal of Medicine*. 2015;373(1):23–34.
 78. Deeks ED. Nivolumab: A Review of Its Use in Patients with Malignant Melanoma. *Drugs*. 2014;74(11):1233–9.
 79. Rounds A, Kolesar J. Nivolumab for second-line treatment of metastatic squamous non-small-cell lung cancer. *American Journal of Health-System Pharmacy*. 2015;72(21):1851–5.
 80. Cameron F, Whiteside G, Perry C. Ipilimumab: first global approval. *Drugs*. 2011;71(8):1093–104.
 81. Lipson EJ, Drake CG. Ipilimumab: An Anti-CTLA-4 Antibody for Metastatic Melanoma. *Clinical Cancer Research*. 2011;17(22):6958–62.
 82. Herrmann AC, Im JS, Pareek S, Ruiz-Vasquez W, Lu S, Sergeeva A, et al. A Novel T-Cell Engaging Bi-specific Antibody Targeting the Leukemia Antigen PR1/HLA-A2. *Frontiers in Immunology*. 2019;9.
 83. Prokhorov A, Gibbs BF, Bardelli M, Rüegg L, Fasler-Kan E, Varani L, et al. The immune receptor Tim-3 mediates activation of PI3 kinase/mTOR and HIF-1 pathways in human myeloid leukaemia

- cells. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2015;59:11–20.
84. Leisegang M, Wilde S, Spranger S, Milosevic S, Frankenberger B, Uckert W, et al. MHC-restricted fratricide of human lymphocytes expressing survivin-specific transgenic T cell receptors. *Journal of Clinical Investigation*. 2010;120(11):3869–77.
85. Seliger B, Huber C. 'Immune escape'-Mechanismen von humanen tumoren. *Onkologie*. 1999;5(8):668–78.
86. Wang Y, Wang H, Yao H, Li C, Fang J-Y, Xu J. Regulation of PD-L1: Emerging Routes for Targeting Tumor Immune Evasion. *Frontiers in Pharmacology*. 2018;9.
87. Hoseini SS, Cheung NK. Acute myeloid leukemia targets for bispecific antibodies. *Blood Cancer Journal*. 2017;7(2):e522.
88. Teachey DT, Rheingold SR, Maude SL, Zugmaier G, Barrett DM, Seif AE, et al. Cytokine release syndrome after blinatumomab treatment related to abnormal macrophage activation and ameliorated with cytokine-directed therapy. *Blood*. 2013;121(26).
89. Koyama S, Akbay EA, Li YY, Herter-Sprie GS, Buczkowski KA, Richards WG, et al. Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints. *Nature Communications*. 2016;
90. Funk CR, Petersen CT, Jagirdar N, Ravindranathan S, Jaye DL, Flowers CR, et al. Oligoclonal T cells transiently expand and express Tim-3 and PD-1 following anti-CD19 car T cell therapy: A case report. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(12):1–11.
91. Huang P-W, Chang JW-C. Immune checkpoint inhibitors win the 2018 Nobel Prize. *Biomedical Journal*. 2019;42(5):299–306.

9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schematische Darstellung des TIM3-Transmembranproteins auf der Zelloberfläche	18
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Antikörperkonstrukts und Bindung an TIM3 auf der Zelloberfläche.....	21
Abbildung 3: Gating-Strategie I	33
Abbildung 4: Gating-Strategie II	34
Abbildung 5: Zeitachse Internalisierungsprotokoll	35
Abbildung 6: TIM3-Expression Patientenproben AML Erstdiagnose (ED)	37
Abbildung 7: TIM3-MFI-Ratio Patientenproben AML Rezidiv (Rez)	38
Abbildung 8: TIM3-MFI-Ratio der verwendeten Zelllinien.....	39
Abbildung 9: Zusammenfassung TIM3-MFI-Ratio der verwendeten Zelllinien.....	40
Abbildung 10: Antikörper-vermittelte spezifische Lyse von AML-Zelllinien in Kokulturen mit T-Zellen von gesunden Spendern	41
Abbildung 11: CD69-Expression auf gesunden Spender-T-Zellen in Kokultur mit primären AML-Zellen und Antikörper-Zusatz (cTCB, TIM3-TCB und CD33-TCB)	43
Abbildung 12: Zusammenfassung der CD69-, PD1- und TIM3-Expression auf gesunden Spender-T-Zellen	44
Abbildung 13: Langzeitkultur mit AML-Blasten, Spender-T-Zellen und Antikörperzusatz.....	45
Abbildung 14: Zusammenfassung der T-Zell-vermittelten spezifischen Lyse von AML-Zellen mit TIM3-TCB und CD33-TCB.....	46
Abbildung 15: TIM3-Expression auf CD33 ⁺ AML-Zellen in der Langzeitkultur I.....	47
Abbildung 16: TIM3-Expression auf CD33 ⁺ AML-Zellen in der Langzeitkultur II.....	48
Abbildung 17: Gesunde Spender-NK-Zellen vor und nach 12-stündiger Stimulation mit IL15	49
Abbildung 18: TIM3-Expression auf nativen Spender-T-Zellen.....	50
Abbildung 19: TIM3-Expression auf stimulierten T-Zellen.....	51
Abbildung 20: Stimulierte Spender-NK-Zellen in Kokultur mit autologen Spender-T-Zellen und TIM3-TCB.....	52
Abbildung 21: T-Zell-vermittelte spezifische Lyse von stimulierten NK-Zellen in Kokultur mit autologen Spender-T-Zellen und TIM3-TCB	53
Abbildung 22: Versuchsaufbau T-cell fratricide	54
Abbildung 23: Stimulierte Spender-T-Zellen in Kokultur mit autologen, nativen T-Zellen und TIM3-TCB	54
Abbildung 24: T-Zell-vermittelte spezifische Lyse von stimulierten T-Zellen in Kokultur mit autologen nativen T-Zellen und TIM3-TCB.....	55
Abbildung 25: TIM3-Expression auf stimulierten Spender-T-Zellen nach Zugabe von TIM3-TCB.....	56
Abbildung 26: TIM3-Expression auf stimulierten NK-Zellen nach Zugabe von TIM3-TCB	56

Abbildung 27: Internalisierungsassay mit stimulierten NK-Zellen..... 57
Abbildung 28: Internalisierungsassay mit AML Primärmaterial 58

10. ANHANG

Anhang A: Charakterisierung der Patienten mit Erstdiagnose

Pt.	Geschlecht	Material	Alter bei ED	Blasten (%)	MFI-Ratio TIM3 Bulk	MFI-Ratio TIM3 LSC	FAB Klassifikation	Risikogruppe nach ELN
0	w	PB	83	85,5	0,99	0,99	M1	günstig
1	m	KM	59	90	1,07	1,15	M1	günstig
2	w	KM	60	41,6	1,16	0,44	sAML: CMML	intermediär-I
3	m	KM	68	58,9	1,17	1,60	sAML: CMML	unbekannt
4	m	PB	74	76,6	1,18	1,47	unbekannt	günstig
5	w	KM	52	81,8	1,20	2,47	M4	günstig
6	w	KM	67	56	1,21	0,99	M4	günstig
7	m	KM	57	38,3	1,25	1,12	sAML: MDS/sAML	ungünstig
8	w	KM	57	93	1,25	2,23	M1	günstig
9	w	PB	0	86,3	1,31	1,47	unbekannt	unbekannt
10	w	KM	66	39,9	1,32	0,69	unbekannt	ungünstig
11	m	PB	64	61,1	1,33	1,24	sAML: MDS/sAML	günstig
12	m	KM	52	82,6	1,35	4,56	M3	günstig
13	m	KM	45	86,4	1,35	1,38	sAML: MDS/sAML	ungünstig
14	w	KM	68	83,3	1,35	1,02	M5b	ungünstig
15	m	KM	65	77,4	1,37	1,79	M1	intermediär-I
16	m	KM	74	60,6	1,38	1,16	sAML: MDS/sAML	intermediär-I
17	m	PB	68	56,4	1,40	0,99	sAML: MDS/sAML	intermediär-II
18	w	KM	74	87,2	1,42	3,02	M1	günstig
19	w	KM	69	88,8	1,43	1,40	unbekannt	intermediär-I
20	m	KM	64	85,9	1,57	1,88	M1	intermediär-I
21	m	PB	59	96,4	1,64	1,35	unbekannt	intermediär-II
22	m	KM	55	93,9	1,66	1,18	M1	ungünstig
23	m	PB	57	95,3	1,68	2,57	M1	intermediär-I
24	m	KM	15	85,6	1,68	1,65	M1	intermediär-I
25	m	PB	86	68,9	1,69	1,03	unbekannt	intermediär-II
26	w	KM	72	69	1,71	1,57	M4	unbekannt
27	m	PB	79	49,4	1,75	10,78	unbekannt	unbekannt
28	m	KM	74	87,5	1,75	1,33	sAML: MDS/sAML	ungünstig
29	m	KM	73	80	1,78	1,08	M0/M1	ungünstig
30	w	KM	67	31,5	1,79	1,35	M6	intermediär-II
31	m	KM	70	77,3	1,80	1,23	unbekannt	günstig
32	m	KM	40	82,2	1,82	4,08	M3	ungünstig
33	m	KM	34	65,5	1,94	1,93	sAML: tAML	ungünstig
34	w	PB	44	97,7	1,96	5,42	M1	ungünstig

Pt.	Geschlecht	Material	Alter bei ED	Blasten (%)	MFI-Ratio TIM3 Bulk	MFI-Ratio TIM3 LSC	FAB Klassifikation	Risikogruppe nach ELN
35	m	KM	45	77,2	2,02	1,22	M2	ungünstig
36	m	KM	56	53,6	2,04	1,56	M0	intermediär-I
37	w	KM	56	76,6	2,07	2,58	M2	intermediär-I
38	w	KM	63	47,8	2,10	1,54	sAML: MDS/sAML	intermediär-II
39	m	KM	46	66,6	2,11	3,30	M1	ungünstig
40	m	KM	70	95,4	2,11	1,37	M0	ungünstig
41	m	KM	70	73,7	2,12	15,78	M2	günstig
42	m	KM	63	29,3	2,19	1,45	M2	ungünstig
43	m	KM	72	74,9	2,42	1,09	M1	ungünstig
44	w	KM	28	38,6	2,44	2,10	M2	intermediär-I
45	m	KM	57	92,2	2,50	1,73	unbekannt	intermediär-II
46	w	KM	65	28,3	2,51	2,11	unbekannt	ungünstig
47	m	KM	47	51,9	2,57	1,79	M0	intermediär-II
48	m	KM	66	73,9	2,58	2,59	sAML: MDS/sAML	ungünstig
49	w	KM	33	47,4	2,69	1,48	M4Eo	günstig
50	w	KM	65	19,5	2,71	3,04	sAML: tAML	intermediär-I
51	m	KM	43	92,5	2,73	1,65	unbekannt	intermediär-I
52	w	KM	75	28,9	2,74	1,53	sAML: tAML	intermediär-II
53	m	KM	78	26,9	2,77	5,46	M5a	günstig
54	m	KM	61	46,4	2,81	2,45	sAML: CMML	intermediär-I
55	m	KM	77	91,3	2,82	1,17	unbekannt	ungünstig
56	w	KM	56	29,1	2,91	1,25	M4/M4Eo/M5a/M5b	günstig
57	w	PB	79	58,1	2,96	1,02	sAML: MDS/sAML	ungünstig
58	w	KM	51	11,4	2,98	2,81	sAML: MDS/sAML	ungünstig
59	m	KM	75	85,7	3,03	1,50	unbekannt	intermediär-II
60	w	KM	66	80,8	3,04	2,83	M5a	intermediär-II
61	m	KM	53	85,4	3,04	1,96	M1	intermediär-I
62	m	KM	53	27,5	3,05	1,70	sAML: MDS/sAML	ungünstig
63	m	KM	45	93,2	3,06	1,23	M1	ungünstig
64	m	KM	65	76,4	3,06	2,27	M5b	günstig
65	m	KM	58	82,6	3,07	1,86	M1	intermediär-I
66	m	KM	75	16,7	3,20	1,94	sAML: MDS/sAML	intermediär-II
67	m	PB	81	88	3,22	0,69	sAML: CMML	ungünstig
68	m	KM	31	44,1	3,35	1,73	sAML: MDS/sAML	ungünstig
69	w	KM	56	68,5	3,42	2,36	M5b	ungünstig
70	w	KM	76	67,1	3,53	2,07	M2	ungünstig
71	m	KM	66	58,2	3,54	1,33	sAML: MDS/sAML	intermediär-II
72	w	KM	69	36,6	3,64	1,52	unbekannt	intermediär-I
73	m	KM	70	72,7	3,74	2,55	unbekannt	günstig

Pt.	Geschlecht	Material	Alter bei ED	Blasten (%)	MFI-Ratio TIM3 Bulk	MFI-Ratio TIM3 LSC	FAB Klassifikation	Risikogruppe nach ELN
74	m	PB	86	82,4	3,76	2,40	unbekannt	intermediär-II
75	w	KM	67	83,5	3,78	4,85	M4	günstig
76	w	KM	55	62,1	3,82	2,18	M3v	intermediär-II
77	w	PB	78	87,3	3,86	5,86	unbekannt	ungünstig
78	m	KM	80	63,6	3,89	1,68	M1	unbekannt
79	w	KM	41	86	3,90	4,52	M1	günstig
80	m	KM	53	83,8	3,94	2,08	M4/M4Eo/M5a/M5b	ungünstig
81	m	KM	61	30,5	3,94	2,32	M2	günstig
82	w	KM	77	62,5	3,98	1,47	sAML: CMML	intermediär-II
83	m	KM	79	15,2	4,07	1,48	sAML: MDS/sAML	intermediär-I
84	m	PB	31	61,5	4,10	3,08	M1/M2	unbekannt
85	w	KM	59	82,9	4,12	1,72	M1	günstig
86	m	KM	58	79,9	4,15	1,86	M0	intermediär-II
87	w	KM	45	34,8	4,16	2,57	sAML: MDS/sAML	unbekannt
88	m	KM	72	72,9	4,16	1,80	sAML: MDS/sAML	ungünstig
89	m	KM	37	85,7	4,24	0,69	M4	günstig
90	m	KM	49	54,7	4,41	2,80	M1	günstig
91	w	KM	30	64,7	4,43	3,07	unbekannt	günstig
92	m	KM	51	55,3	4,46	7,54	M4	intermediär-I
93	m	KM	76	95,8	4,46	3,44	M1	intermediär-I
94	m	KM	69	90,8	4,48	2,40	unbekannt	intermediär-II
95	m	PB	76	85,9	4,53	2,23	sAML: MDS/sAML	ungünstig
96	m	PB	75	49,5	4,60	1,16	M5a	nicht bekannt
97	m	KM	82	87,6	4,71	1,95	unbekannt	ungünstig
98	m	PB	67	86,5	4,77	3,35	unbekannt	unbekannt
99	m	KM	81	34,2	4,83	3,89	M3	unbekannt
100	m	KM	75	75,2	4,87	1,90	M5b	unbekannt
101	w	PB	53	83,5	4,96	2,57	M1	intermediär-I
102	m	KM	92	71,1	5,21	4,26	M0	ungünstig
103	m	KM	55	9,19	5,22	1,55	sAML: MDS/sAML	ungünstig
104	m	KM	67	66,7	5,34	3,66	M5a/M5b	ungünstig
105	m	KM	79	67,6	5,34	1,67	M2	günstig
106	m	KM	33	64,6	5,39	1,53	M5a	ungünstig
107	m	KM	60	78,3	5,41	2,02	unbekannt	intermediär-I
108	m	KM	89	77	5,43	3,64	M1	intermediär-II
109	m	KM	68	60	5,48	3,05	sAML: MDS/sAML	ungünstig
110	m	KM	48	78,3	5,60	5,37	M4	intermediär-I
111	w	KM	64	35	5,66	3,02	M2	intermediär-I
112	w	KM	75	49,7	5,75	2,98	M4Eo	günstig

Pt.	Geschlecht	Material	Alter bei ED	Blasten (%)	MFI-Ratio TIM3 Bulk	MFI-Ratio TIM3 LSC	FAB Klassifikation	Risikogruppe nach ELN
113	w	KM	35	68,4	5,81	1,49	M5a	intermediär-II
114	m	PB	75	15,6	5,83	5,42	M5a/M5b	intermediär-I
115	m	KM	33	20,5	5,91	3,35	unbekannt	intermediär-II
116	m	KM	60	69,6	5,95	1,59	M1	intermediär-I
117	m	KM	67	83,3	5,98	4,10	M4	günstig
118	m	KM	73	79,4	6,03	1,61	unbekannt	ungünstig
119	w	KM	64	78,7	6,04	6,62	sAML: MDS/sAML	intermediär-I
120	m	KM	61	53,9	6,04	4,64	sAML: MDS/sAML	ungünstig
121	w	KM	76	58,7	6,06	2,24	sAML: MDS/sAML	intermediär-I
122	w	KM	32	54	6,07	4,89	M2	günstig
123	w	KM	34	78,1	6,23	2,30	M1	ungünstig
124	m	KM	73	56,9	6,31	2,49	sAML: MDS/sAML	intermediär-II
125	w	KM	21	60,5	6,41	2,48	M2	günstig
126	m	KM	52	93,2	6,45	5,71	M1	unbekannt
127	w	KM	87	30	6,45	5,86	M1	ungünstig
128	w	KM	61	68,3	6,80	5,42	sAML: MDS/sAML	ungünstig
129	w	KM	45	37,2	6,92	1,93	M4	günstig
130	w	KM	47	84,1	7,02	2,67	M1	intermediär-II
131	w	KM	0	97,1	7,08	3,71	M5a/M5b	ungünstig
132	w	KM	76	27,4	7,57	1,41	M2	ungünstig
133	m	KM	51	29,4	7,94	2,57	M2	günstig
134	w	KM	49	93,5	8,07	6,80	M1	günstig
135	w	KM	56	74,1	8,15	2,90	M1	intermediär-I
136	m	KM	52	48,7	8,21	5,06	sAML: MDS/sAML	günstig
137	m	KM	74	89,7	8,23	10,14	M5a	günstig
138	w	KM	50	68,8	8,26	9,68	M1/M2	intermediär-I
139	w	KM	72	68,9	8,38	4,65	sAML: MDS/sAML	ungünstig
140	m	PB	76	92,2	8,63	4,56	unbekannt	intermediär-I
141	w	KM	31	89	8,63	5,67	unbekannt	günstig
142	w	KM	81	83,1	8,68	9,35	M5b	ungünstig
143	w	PB	30	19,1	8,73	2,57	M2	intermediär-I
144	m	KM	73	49,8	9,80	5,96	M2	günstig
145	w	KM	29	78	9,90	4,54	M2	günstig
146	w	KM	69	89,7	10,22	10,78	M4	intermediär-I
147	m	KM	68	87,2	10,29	15,69	M4	günstig
148	m	KM	57	32,6	11,04	2,51	M4	günstig
149	w	KM	29	61,6	12,02	12,11	M2	intermediär-I
150	m	KM	36	86,1	12,24	4,64	sAML: CMML	ungünstig
151	m	KM	82	43	13,83	9,75	sAML: MDS/sAML	intermediär-I

Pt.	Geschlecht	Material	Alter bei ED	Blasten (%)	MFI-Ratio TIM3 Bulk	MFI-Ratio TIM3 LSC	FAB Klassifikation	Risikogruppe nach ELN
152	m	KM	55	60,6	14,19	4,46	M1	günstig
153	m	KM	70	93,6	14,39	15,78	M0	intermediär-I
154	w	KM	51	92	16,31	2,00	M1	günstig
155	m	KM	75	59,3	17,72	3,35	sAML: MDS/sAML	unbekannt

Anhang B: Charakterisierung der Rezidivpatienten

Pt.	Geschlecht	Material	Alter bei ED	Blasten (%)	MFI-Ratio TIM3 Bulk	MFI-Ratio TIM3 LSC	FAB Klassifikation	Risikogruppe nach ELN
0	m	KM	27	69,8	0,63	3,53	M3	ungünstig
1	m	KM	23	88	1,30	1,17	M4	ungünstig
2	m	KM	74	86,6	1,30	1,32	unbekannt	günstig
3	w	KM	63	88,1	1,53	1,70	M1	intermediär-II
4	m	KM	42	30,4	2,06	1,65	M2	ungünstig
5	m	KM	57	64,2	2,31	1,75	sAML: MDS/sAML	ungünstig
6	w	KM	63	21,9	2,31	1,09	unbekannt	intermediär-I
7	w	KM	30	14,7	3,10	0,97	M2	intermediär-I
8	w	KM	31	92,2	3,50	2,44	M4	intermediär-I
9	m	KM	30	46,4	3,54	1,16	sAML: MDS/sAML	intermediär-II
10	m	KM	71	60,4	3,63	0,75	sAML: CMML	ungünstig
11	w	KM	78	46,4	4,38	2,63	M1	intermediär-I
12	m	KM	49	58,7	4,46	3,25	M1	ungünstig
13	w	KM	53	98,8	5,31	3,69	M1	ungünstig
14	m	KM	61	42,8	5,47	2,12	unbekannt	günstig
15	w	KM	56	93,5	8,19	2,97	M0	intermediär-I
16	m	KM	unbekannt	92,4	11,36	7,71	M2	ungünstig

Anhang C: Messdaten Abbildung 15

Graph 1 MFI-Ratio	d-3	d0	d3	d6	d10	d13
TIM3	7,6	5,3	4,8	1,5	1,5	1,4
CD33	7,6	5,3	3,5	2,6	2,7	2,2
cTCB	7,6	5,3	2,4	2,5	3,2	2,2

Graph 2 MFI-Ratio	d-3	d0	d3	d6	d10	d13
TIM3	4,4	2,3	1,3	1,3	1,3	1,2
CD33	4,4	2,3	1,9	2,5	1,5	1,2
cTCB	4,4	2,3	1,5	1,7	1,5	1,6

Graph 3 MFI-Ratio	d-3	d0	d3	d6	d10	d13
TIM3	2,9	1,5	1,2	1,1	1,3	1,0
CD33	2,9	1,5	1,6	1,0	1,3	1,1
cTCB	2,9	1,5	1,7	1,0	1,7	1,2

Anhang D: Messdaten Abbildung 16

Graph 1 MFI-Ratio	d-3	d0	d3	d6	d10	d13
TIM3 BM	2,7	5,5	2,3	2,0	2,3	2,0
CD33 BM	2,7	5,5	2,5	2,5	2,5	X
cTCB BM	2,7	5,5	3,8	3,6	3,2	2,6
TIM3 BiT	2,7	3,3	1,7	1,6	X	X
CD33 BiT	2,7	3,3	X	X	X	X
cTCB BiT	2,7	3,3	3,1	2,6	X	X

Graph 2 MFI-Ratio	d-3	d0	d3	d6	d10	d13
TIM3 BM	5,8	2,6	1,8	1,8	1,8	1,8
CD33 BM	5,8	2,6	2,0	2,3	2,3	X
cTCB BM	5,8	2,6	2,1	2,4	2,1	2,2
TIM3 BiT	5,8	4,5	1,8	1,8	X	X
CD33 BiT	5,8	4,5	2,6	X	X	X
cTCB BiT	5,8	4,5	2,2	2,0	X	X

11. DANKSAGUNG

Meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. med. Marion Subklewe, danke ich für die Überlassung des Themas dieser Dissertation sowie die stetige Betreuung und Unterstützung meiner Arbeit und ihren fachlichen Rat.

Besonders danken möchte ich meinem Betreuer Christian Augsberger für die anregenden Diskussionen, die Hilfe, die konstruktive Kritik und die vielfach nötige Geduld.

Ein großer Dank gilt dem gesamten Team der Arbeitsgruppe *Translational Cancer Immunology* für die herzliche Aufnahme und das kollegiale Miteinander. Danke für die zahlreichen Hilfestellungen und Anregungen auch gegen Ende meiner Arbeit.

Gerne möchte ich mich bei allen Patienten bedanken, die mit ihrem Einverständnis diese Arbeit erst ermöglicht haben.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, Ester Stein und Werner Stein, meiner Schwester Carolin Stein und meinem Freund Simon Lötzerich. Diese Arbeit möchte ich euch widmen für alle Mühen, die Ihr euch gemacht habt, die Nerven, die ich euch gekostet habe und euren unermüdlichen Glaube an mich, wenn er mir gefehlt hat. Ich danke euch von Herzen.

