

**Analyse zytotoxischer Lymphozyten
im Myelodysplastischen Syndrom (MDS)
und der Akuten Myeloischen Leukämie (AML)
unter Berücksichtigung des Zytomegalievirus-Status**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Wiebke Moskorz

aus Gelsenkirchen

Düsseldorf, August 2022

aus dem Institut für Virologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichterstatter:

1. Prof. Dr. med. Jörg Timm (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf)
2. Prof. Dr. med. Philipp Lang (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf)

Tag der mündlichen Prüfung: 30.01.2023

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinen Betreuern Prof. Jörg Timm, Prof. Rainer Haas und Dr. Christine Cosmovici dafür bedanken, dass ich durch sie die Möglichkeit hatte, an einem spannenden, interdisziplinären Projekt zu arbeiten. Ich bedanke mich hier auch ausdrücklich für die Motivation und den Enthusiasmus für das Projekt, das freundliche Miteinander, die Kommunikation auf Augenhöhe sowie das in mich gesetzte Vertrauen, die es ermöglicht haben dieses Projekt zu einem erfolgreichen Ende zu bringen. Danke!

Bei Prof. Philipp Lang möchte ich mich für die Übernahme der offiziellen Zweitbetreuung und damit auch für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Aus der Klinik für Hämatologie möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Ulrich Germing, Dr. Ron Patrick Cadeddu, Dr. Paul Sebastian Jäger und Dr. Stefanie Geyh bedanken, die mich bei der Probenaufnahme, beim Handling der Proben sowie der Einschätzung klinischer Parameter tatkräftig unterstützt haben.

Bei Dipl. Ing. Katharina Raba möchte ich mich recht herzlich für das souveräne Sortieren meiner Zellen bedanken.

Bei der Düsseldorf School of Oncology (DSO) möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung bedanken. In diesem Zuge möchte ich mich auch ganz herzlich bei Dr. Sabrina Bianca Bennstein bedanken, bei der ich das Glück hatte, sie dort kennenlernen zu dürfen und die mich als ihre Leidens-... pardon, ich meinte natürlich Weggefährtin, erwählt hat. Du hast mich gefordert, motiviert und unterstützt und dabei niemals ein Blatt vor den Mund genommen. Ich bewundere diese direkte, starke und kluge Art von dir.

Bei Johannes Ptok möchte ich mich dafür bedanken, dass du auch die zehnte Anfrage zu Änderungen in den grafischen Abbildungen ohne Murren erledigt hast. Vielen Dank auch für die Einblicke und die enorme Unterstützung in der bioinformatischen Auswertung meiner Daten. Ich bewundere stets das Problem und deine Lösungen dafür.

Bei unseren grandiosen Technischen Assistent*Innen Eugen Bäcker, Alexandra Graupner und Anja Voges möchte ich mich für die stetige Unterstützung rund um den Laboralltag bedanken. Ihr seid das Herz und die Seele dieser Arbeitsgruppe. Und Eugen, ich verspreche dir, dich nie zum Aliquotieren zu missbrauchen ;-).

Bei Christiane Cramer möchte ich mich für Ihre Hilfe rund um die Irrungen und Wirrungen, die mit dem Arbeiten am UKD zu tun haben, und für ihre moralische Unterstützung bedanken.

Ich möchte mich außerdem herzlich bei sämtlichen Mitarbeiter*Innen der Spülküche und des Reinigungsdienstes des Instituts für Virologie/Mikrobiologie dafür bedanken, dass ihr hinter uns her wischt und durch eure Vorbereitungen die Forschung am Laufen haltet. Ihr seid unverzichtbar!

Bei meinem Schwager, hier sollte ich Dipl. Betriebswirt ergänzen, Christian Stillert, möchte ich mich herzlich für die grammatikalische Korrektur dieser Arbeit bedanken (vermutlich selbst in diesem Teil hier - jap). Ich bin immer noch schwer beeindruckt davon, dass man mit, und hier untertreibe ich nicht, null Wissen

von Immunologie diesen für Laien doch recht anspruchsvollen Text so ausgezeichnet lektorieren kann. Ich hoffe, es war kein zweites MG2MEis.

So sehr jede wissenschaftliche Arbeit extrem von konkreter wissenschaftlicher Unterstützung, sei es in Form von Diskussionen der eigenen Daten oder dem „Beibringen“ von Assays, abhängt und ein ehrliches „Danke“ verdient, so sehr hängt sie auch vom Arbeitsklima und zwischenmenschlichen Beziehungen während der Doktorarbeit ab. Daher gilt ein großer Dank den Mitarbeiter*Innen meiner aktuellen (AG Timm) und ehemaligen Arbeitsgruppe (AG Schaal) am hiesigen Institut. Ihr seid mit mir nicht nur durch wissenschaftlich gute und schlechte Zeiten gegangen, sondern habt mich auch privat unterstützt und mir geholfen mich zu dem Menschen weiterzuentwickeln, der ich heute bin und auf den ich, und das sage ich nicht oft, wirklich stolz bin. Nicht zuletzt, aber im Besonderen möchte ich mich hier bei Lisa, Christopher, Livia und Rebezka bedanken, die mir beibrachten, dass Feminismus kein Schimpfwort ist und darüber hinaus mit Ramona, Ralf, Phipsi (übrigens Grüße von einer Kiste), Lara, Fabienne und Marie auch außerhalb des Instituts zu guten Freunden geworden sind. Ich danke euch für die vielen neuen Erfahrungen, die ich durch euch machen durfte und für den schönsten Abschiedsabend (der dann doch keiner war), den ihr mir bereitet habt. Und so sage ich mit den Worten des Kings of Elektrolore „Danke dir mein Freund!“. Ich werde mein Bestes geben, dass sich mein „sind wir ehrlich, vermutlich werden wir den Kontakt verlieren“ nicht bewahrheitet. Alle nicht ausdrücklich Genannten, auch ihr seid für mich in dieser ganzen Zeit ungemein wichtig gewesen. Jede*r einzelne*r von euch hat es geschafft, dass ich mich hier so unermesslich wohl gefühlt habe und die Zeit am Institut eine der schönsten in meinem Leben war. Also danke an euch alle!

Und wie sagt man so schön, last but not least, möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Ich war und bin eher das Einhorn in dieser Familie. Nichtsdestotrotz habt ihr mich immer so akzeptiert wie ich bin und mit der Gewissheit von euch geliebt und niemals ernsthaft enttäuscht zu werden, lebe ich bis heute. Ich bin mir bewusst, was für ein großes Glück ich habe, in so einer Familie groß geworden zu sein. Ich liebe euch alle unendlich und danke euch für eure Unterstützung und hoffe, dass ich sie euch irgendwann zurückgeben kann, Christine, beste große Schwester, die ich mir vorstellen kann, Mutter meiner geliebten Nichten und Neffen und Ehefrau des besten Blockflötenbegleiters, den man sich zu Weihnachten wünschen kann. Ihr habt so viel Licht und Leichtigkeit in unsere Familie zurückgebracht. Ich freue mich schon in euren Keller einzuziehen, wenn meine 10 Jahre in der Forschung vorbei sind. Meine Felsen Mama und Papa, danke dass ihr so tolle Eltern seid und immer das in mir gesehen habt, das langsam zum Vorschein kommt. Danke Oma, ich vermisse dich sehr, du großartige, clevere, starke und vorurteilsfreie Frau. Danke Tante Tina, du bist mein Tanten-Vorbild, ich kenne keine liebevollere, für allen Schabernack zu habende Tante.

Danke!

Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Die Arbeit habe ich bisher keinem anderen Prüfungsamt in gleicher oder vergleichbarer Form vorgelegt.

Teile dieser Arbeit wurden unter folgendem Titel bereits veröffentlicht:

Myelodysplastic syndrome patients display alterations in their immune status reflected by increased PD-L1-expressing stem cells and highly dynamic exhausted T-cell frequencies

W. Moskorz, C. Cosmovici, P. S. Jäger, R. P. Cadeddu, J. Timm and R. Haas;
Br J Haematol 2021 Vol. 193 Issue 5 Pages 941-945, DOI: 10.1111/bjh.17461

(Ort, Datum)

Wiebke Moskorz

Anmerkungen

In der vorliegenden Arbeit wird das generische Maskulinum verwendet. Hier sei ausdrücklich darauf hingewiesen, dass mit dieser Schreibweise, z.B. bei der Verwendung des Wortes „Patient“, Menschen jeglicher Geschlechtsidentität gleichermaßen angesprochen werden sollen. Auf Ausnahmen wird im Text hingewiesen.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....	III
Erklärung.....	V
Anmerkungen.....	V
Inhaltsverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
Abbildungsverzeichnis.....	XIV
Tabellenverzeichnis.....	XVI
Zusammenfassung.....	XVIII
Abstract.....	XX
I. EINLEITUNG.....	1
1.1. Das menschliche Immunsystem.....	1
1.1.1. Die Hämatopoese des Menschen.....	2
1.1.2. Immunantwort.....	4
1.2. Myelodysplastisches Syndrom (MDS) und Akute Myeloische Leukämie (AML).....	10
1.2.1. Klinisches Krankheitsbild und Inzidenz.....	10
1.2.2. Behandlung des MDS und der AML.....	13
1.2.3. Allogene hämatologische Stammzelltransplantation im MDS und in der AML.....	14
1.3. Immuntherapie.....	15
1.3.1. Erschöpftes Immunsystem als Faktor zur Entstehung maligner Erkrankungen.....	15
1.3.2. Immuncheckpointinhibitoren (ICIs).....	16
1.3.3. Immuncheckpointinhibitoren im MDS und in der AML.....	17
1.4. Zielsetzung.....	19
II. MATERIAL UND METHODEN.....	21
2.1. Material.....	21
2.1.1. Verbrauchsmaterialien.....	21
2.1.2. Chemikalien, Puffer und gebrauchsfertige Lösungen.....	22
2.1.3. Gebrauchsfertige, kommerziell erhältliche Kits.....	23
2.1.4. Medien, Puffer und Zusätze für die Zellkultur.....	23
2.1.5. Fluoreszenzgekoppelte Antikörper.....	24
2.1.6. Weitere Agenzien für den Einsatz in der Durchflusszytometrie.....	28

2.1.7.	Humane Zelllinien.....	28
2.1.8.	Patientenmaterial.....	29
2.1.9.	Zytomegalievirusstock – TB40-GFP.....	30
2.1.10.	Geräte und sonstige Hilfsmittel.....	30
2.1.11.	Software und Analysetools im Internet.....	31
2.2.	Methoden.....	32
2.2.1.	Isolation von mononukleären Zellen aus peripherem Blut (PBMCs) und Blutprodukten mittels Dichtegradientenzentrifugation	32
2.2.2.	Isolation von weißen Blutzellen (WBCs) aus Blut und Knochenmarksaspiraten mittels Erythrozytenlyse	32
2.2.3.	Phänotypische und funktionelle Charakterisierung von Blut- und Knochenmarkszellen mittels Durchflusszytometrie.....	33
2.2.4.	Infektion von Zellen mit humanem Zytomegalievirus	37
2.2.5.	Analyse des inflammatorischen Zytokinprofils des Zellkulturüberstandes CMV-infizierter AML-Zellen – LEGENDplex.....	37
2.2.6.	Vergleichende Analyse von CD8 ^{pos} und CD8 ^{neg} NK-Zellen	38
2.2.7.	Statistische Auswertung	39
III.	ERGEBNISSE	41
3.1.	Untersuchung von Immunzellen und hämatopoetischen Stammzellen im MDS und in der AML.....	41
3.1.1.	Patientencharakteristik	41
3.1.2.	Die Analyse von Immunzellpopulationen zeigt ein verschobenes NK- zu T-Zellverhältnis an.....	43
3.1.3.	Die erhöhte Expression von Immuncheckpointmolekülen deutet auf ein inhibiertes Immunsystem hin	45
3.1.4.	Tim-3 ^{pos} und PD1 ^{pos} T-Zellfrequenzen korrelieren mit dem Krankheitsverlauf dreier MDS-EB II-Patienten (Fallstudien).....	48
3.1.5.	Therapiebegleitendes T-Zellmonitoring von Immuncheckpointmolekülen könnte mittels peripheren Bluts durchgeführt werden	52
3.2.	Untersuchung des Einflusses von NK-Zellen auf das reduzierte AML Rezidiv-Risiko in hSCT-Empfängern mit CMV-Replikationsereignissen	54
3.2.1.	CMV-negative AML-Patienten exprimieren hohe Frequenzen an CD8 ^{pos} NK-Zellen	54
3.2.2.	NKG2C ^{pos} NK-Zellen aus Patienten mit einer aktiven CMV-Reaktivierung zeigen die höchsten Granzym B-Grundlevel	63

3.2.3.	CMV induziert durch direkte und indirekte Effekte die vermehrte Expression des NKG2C-Liganden HLA-E	66
3.2.4.	Die Zytotoxizität von NKG2C ^{pos} NK-Zellen profitiert durch eine IFN γ -Stimulation von AML-Zellen.....	68
3.2.5.	Die monozytären AML-Zelllinien sekretieren durch eine CMV-Infektion vermehrt IL-1 β , MCP-1 und IL-8	73
3.2.6.	AML-Patienten mit einer RUNX1-negativen Genmutation zeigen ein verringertes Rezidiv-Risiko nach hSCT, wenn sie eine CMV-Reaktivierung hatten.....	74
IV.	DISKUSSION UND AUSBLICK	79
4.1.	Untersuchungen von Immunzellpopulationen im MDS und in der AML	79
4.2.	Untersuchungen zu dem verringerten AML-Rezidiv-Risiko in hSCT-Empfängern durch akute CMV-Reaktivierungen	84
4.2.1.	Untersuchungen von NK-Zellsubsets – CD8 ^{pos} NK-Zellen	85
4.2.2.	Einfluss einer CMV-Replikation auf die NK-Zellfunktionalität in AML hSCT-Empfängern	88
4.3.	Fazit.....	96
V.	ANHANG	97
5.1.	Färbe-Panel für die phänotypische Untersuchung von diversen Blut- und Knochenmarkszellen mittels Durchflusszytometrie	97
5.2.	Färbe-Panel für die Untersuchung von CD8^{pos} und CD8^{neg} NK-Zellen	100
5.3.	Färbe-Panel für die funktionale Untersuchungen von Blutzellen mittels Durchflusszytometrie	103
5.4.	Patienten	106
5.5.	Ergebnisse der vergleichenden Untersuchung von CD8^{pos} und CD8^{neg} NK-Zellen.....	110
5.5.1.	RNA-Sequenzierung	110
5.5.2.	LEGENDScreen	115
5.6.	Ereigniszeitanalysen zum Rezidiv-Risiko in der AML.....	120
VI.	LITERATUR	121

Abkürzungsverzeichnis

ADCC	<i>Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity</i> , Antikörper-vermittelte zelluläre Toxizität
ADCP	<i>Antibody Dependent Cellular Phagocytosis</i> , Antikörper-vermittelte zelluläre Phagozytose
AFDN	<i>Afadin</i>
AIDS	<i>Aquired immunodeficiency Syndrome</i> , erworbenes Immunschwächesyndrom
AK	Antikörper
AML	Akute myelische Leukämie
AML-NOS	<i>AML not otherwise specified</i> , AML nicht anderweitig klassifiziert
APC	<i>Antigen-presenting cell</i> , Antigen-präsentierende Zelle
APL	Akute Promyelozyten Leukämie
Ara-C	Cytarabin
ASXL1	<i>Additional Sex Combs-Like 1</i> , Transkriptionsregulator, der häufig in der AML mutiert ist
ATG	Antithymozytenglobuline
BAHCC1	<i>Bromo Adjacent Homology Domain and Coiled-Coil Containing 1</i>
B-ALL	Akute Lymphatische Leukämie der B-Zelllinie
BCR	<i>B cell receptor</i> , B-Zellrezeptor
BFA	Brefeldin A
Blimp1	<i>B Lymphocyte-induced maturation protein</i>
BM	<i>Bone marrow</i> , Knochenmark
Bw4	Aminosäuremotif auf bestimmten HLA-Molekülen, KIR3DL1-Ligand
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CD56 ^{bright}	CD56 ^{pos} CD16 ^{neg} NK-Zellen
CD56 ^{dim}	CD56 ^{dim} CD16 ^{bright} NK-Zellen
CEPBA	Gen für <i>CCAAT/enhancer binding protein alpha</i> , häufig in der AML mutiert
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie
CLP	<i>Common Lymphoid Progenitor</i> , gemeinsame lymphatische Stammzelle
CM	<i>Central Memory T-Zelle</i>
CML	Chronische Myeloische Leukämie
CMML	Chronische Myelomonozytäre Leukämie
CMP	<i>Common Myeloid Progenitor</i> , gemeinsame myeloische Stammzelle
CMV	<i>Cytomegalovirus</i> , Zytomegalievirus
cmvIL-10	CMV-kodiertes IL-10
CMVneg	CMV-seronegativ

CMVpos	CMV-seropositiv
COL13A1	<i>Collagen Type XIII Alpha 1 Chain</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4</i>
DC	Dendritische Zellen
Δ	Änderung
Δ _{rel}	Relative Änderung
EBNA2	<i>EBV nuclear antigen 2</i>
EBV	Eppstein-Barr Virus
ELN	<i>European LeukemiaNet Classification,</i> Klassifikationssystem zur Risikobeurteilung der akuten myeloischen Leukämie
EM	<i>Effector Memory T-Zelle</i>
ENTPD1	<i>Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase 1</i>
EPO	Erythropoetin
FAB	<i>French-American-British classification,</i> Klassifikationssystem zur Einteilung der akuten myeloischen Leukämie
Fc	konstanter Teil eines Antikörpers
FCS	<i>Fetal Calf Serum,</i> Fötales Kälberserum
FLT3	<i>FMS-like tyrosine kinase 3,</i> häufig in der AML mutiert
FSC	<i>Forward Scatter,</i> Vorwärtsstreuung
FSC/SSC-A	<i>FSC/SSC-Area</i>
FSC/SSC-H	<i>FSC/SSC-Height</i>
GAREM2	<i>GRB2 Associated Regulator of MAPK1 Subtype 2</i>
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	Granulozyten/Monozyten koloniestimulierender Faktor
GMP	<i>Granulocyte-Monocyte Progenitor,</i> Granulozyten-Monozyten Vorläufer
GOI	<i>Gate of Interest</i>
GO-Term	<i>Gene-Ontology-Term</i>
GRB2	<i>Growth Factor Receptor-Bound Protein 2</i>
GvHD	<i>Graft versus Host Disease</i>
HA	Hämagglutinin
Hb	Hämoglobin
HBV	Hepatitis B Virus

HCV	Hepatitis C Virus
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HHV8	Humanes Herpesvirus 8
hIL-10	humanes IL-10
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HL-60	AML-Zelllinie
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HLA-I	HLA-Klasse I Molekül
HLA-II	HLA-Klasse II Molekül
HMA	Hypomethylierende Agenzien
HSC	<i>Hematopoietic Stem Cell</i> , hämatopoetische Stammzelle
hSCT	<i>hematopoietic Stem Cell Transplantation</i> , Stammzelltransplantation
IC	Immuncheckpoint
ICI	Immuncheckpointinhibitoren
ICM	Immuncheckpointmoleküle
IDH	<i>Isocitrate Dehydrogenase</i> , häufig in der AML mutiert
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IPSS-R	<i>International Prognostic Scoring System-Revised</i>
ITD	Interne Tandem Duplikation
K562	CML Zelllinie
KIR	<i>killer cell immunoglobulin-like receptors</i>
LSC	<i>leukemic stem cell</i> , leukämische Stammzelle
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MDS-EB I/II	MDS with Excess blast, MDS mit Blastenzexzess I/II
MDS-MLD	<i>MDS with multilineage dysplasia</i> , MDS mit Mehrliniendysplasie
MDS-NOS	<i>MDS not otherwise specified</i> , MDS nicht anderweitig klassifiziert
MDS-RS	MDS mit Ringsideroblasten
MDS-SLD	<i>MDS with single lineage dysplasia</i> , MDS mit Einliniendysplasie
MDS-U	MDS-Unklassifizierbar
MEP	<i>Megakaryocyte-Erythroid Progenitor</i> , Megakaryozyten-Erythrozyten-Vorläufer
MFI	Mediane Fluoreszenzintensität
mirR	<i>microRNA</i>

MM6	<i>MONO-MAC-6</i> , AML-Zelllinie
MPN	Myeloproliferative Neoplasie
MPP	<i>Multipotent Progenitor</i> , multipotente Vorläuferzelle
MRD	<i>Minimal Residual Disease</i> , minimale Resterkrankung
NA	Neuraminidase
NCR	<i>Natural Cytotoxicity Receptors</i> , natürliche Zytotoxizitätsrezeptoren
NKG2C ^{high}	Individuum mit hohen Frequenzen an NKG2C ^{pos} NK-Zellen
NKG2C ^{low}	Individuum mit geringen Frequenzen an NKG2C ^{pos} NK-Zellen
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
<i>NPM1</i>	Gen für <i>Nucleophosmin 1</i> , häufig in der AML mutiert
NRM	<i>nonrelapse mortality</i>
PB	Peripheres Blut
PBMCs	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> , mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PCA	<i>Principle Component Analyse</i>
PD1	<i>Programmed Death Receptor 1</i>
PD-L1 bzw. 2	<i>Programmed Death Receptor Ligand 1 bzw. 2</i>
PFU	<i>Plaque forming Units</i> , Plaque-bildende Einheiten
PMF	Primäre Myelofibrose
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i> , Mustererkennungsrezeptoren
PRR4	<i>Proline-rich protein 4</i>
RFS	<i>Relapse free survival</i> , Rezidiv-freies Überleben
RS	Ringsideroblasten
RT	Raumtemperatur
<i>RUNX1</i>	<i>Runt-related transcription factor 1</i> , häufig in der AML mutiert
<i>RUNX1-RUNX1T1</i>	Fusionsgen aus <i>RUNX1</i> und <i>RUNX1T1</i> , häufige genetische Anomalie in der AML
sAML	sekundäre AML
SF3B1	<i>Splicing Factor 3b Subunit 1</i> , häufig mutiert in MDS
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
sMDS	sekundäres MDS
SSC	<i>Side Scatter</i> , Seitwärtsstreuung
tAML	Therapie-assoziierte AML
TCR	<i>T cell receptor</i> , T-Zellrezeptor
T _{EMRA}	<i>Effector Memory T cells reexpressing CD45RA</i>

THP-1	AML-Zelllinie
Tim-3	<i>T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3</i>
TKD	Tyrosinkinasedomäne
TMB	<i>Tumour mutational burden</i> , Tumormutationslast
TNF	Tumornekrosefaktor
TP53	<i>Tumor Protein P53</i>
TPO	Thrombopoetin
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
t-SNE	<i>t-distributed stochastic neighbor embedding</i> , Algorithmus zur Analyse mehrdimensionaler Daten
WBCs	<i>White blood cells</i> , weiße Blutzellen
WHO	<i>World Health Organization</i> , Weltgesundheitsorganisation
WT1	<i>Wilms Tumour protein 1</i>
ZNF248	<i>Zinc Finger Protein 248</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Hämatopoese	3
Abbildung 2	Aktivierung von NK-Zellen.....	5
Abbildung 3	NK-Zellrezeptoren.....	7
Abbildung 4	T-Zellaktivierung.....	8
Abbildung 5	Workflow der Analyse durchflusszytometrischer Daten mittels t-SNE.....	36
Abbildung 6	Der Anteil von NK-Zellen im MDS und in der AML ist im Vergleich zu T-Zellen reduziert.....	44
Abbildung 7	Verstärkte PD-L1-Expression in CD34 ^{pos} -Stamm- und Vorläuferzellen korreliert mit der PD1-Expression auf CD8 T-Zellen	46
Abbildung 8	PD1 ^{pos} und Tim-3 ^{pos} T-Zellfrequenzänderungen korrelieren mit dem Krankheitsverlauf im MDS-EB II	50
Abbildung 9	Peripheres Blut kann zum Monitoring von T-Zellpopulationen herangezogen werden....	52
Abbildung 10	CMV-positive AML-Patienten zeigen hohe Frequenzen an CD8 ^{pos} NK-Zellen	55
Abbildung 11	CD8 ^{pos} und CD8 ^{neg} NK-Zellen unterscheiden sich durch die differentielle Genexpression von 39 Genen	57
Abbildung 12	<i>Gene-Ontology-Term Enrichment</i> Analyse	60
Abbildung 13	Bestätigung der LEGENDScreen- und RNA-Sequenzierungsdaten an 12 gesunden Probanden.....	62
Abbildung 14	Im Knochenmark von AML-Patienten befinden sich NKG2C ^{pos} NK-Zellen, die nach einer akuten CMV-Reaktivierung höhere Granzym B-Level aufwiesen als NKG2C ^{neg} NK-Zellen.....	64
Abbildung 15	HLA-E wird in CMV-infizierten AML-Zellen sowie über IFN γ im Kontext einer CMV-Reaktivierung in primären Blasten induziert.....	67
Abbildung 16	Die Zytotoxizität von NKG2C ^{pos} NK-Zellen wird durch eine Vorstimulation von AML-Zellen mit IFN γ erhöht	70
Abbildung 17	Eine CMV-Infektion führt zur Sekretion von IL-1 β , MCP-1 und IL-8.....	74
Abbildung 18	Ereigniszeitanalysen zur Evaluation des RFS im Zusammenhang einer CMV-Replikation.....	77
Abbildung 19	Untersuchung der differentiellen Proteinexpression (LEGENDScreen) von CD8 ^{pos} und CD8 ^{neg} NK-Zellen.....	116

Abbildung 20 Patienten mit einer FLT3-Mutation, nicht aber mit einer RUNX1-Genveränderung,
profitieren von einem CMV-Replikationsereignis 120

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Markerproteinexpression hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen [19].....	2
Tabelle 2	WHO-Klassifikation (2016) adulter myelodysplastischer Syndrome	11
Tabelle 3	WHO-Klassifikation (2016) akuter myeloischer Leukämien	12
Tabelle 4	Patientencharakteristik (eingeschlossene Proben).....	42
Tabelle 5	Charakteristik des Fallkollektivs der retrospektiven Ereigniszeitanalysen	75
Tabelle 6	Ex vivo Untersuchung von WBCs – „Stammzell-Panel“	97
Tabelle 7	Ex vivo Untersuchung von WBCs – „T-Zell-Panel“	98
Tabelle 8	Panel: Bestimmung der NKG2C ^{pos} NK-Zellen aus PB und BM	98
Tabelle 9	Panel: Vergleichende Analyse von PB- und BM-Proben.....	99
Tabelle 10	Panel: Bestimmung der Anteile von CD8 ^{pos} NK-Zellen in PBMCs.....	99
Tabelle 11	Panel: Sortierung von CD8 ^{pos} und CD8 ^{neg} NK-Zellen mittels FACS (MoFloXDP).....	100
Tabelle 12	Panel: Untersuchung von CD8 ^{pos} und CD8 ^{neg} NK-Zellen mit dem LEGENDScreen	100
Tabelle 13	Panel: Bestätigung der LEGENDScreen und RNA-Sequenzierungsdaten – Zellaktivierung.....	101
Tabelle 14	Panel: Bestätigung der LEGENDScreen und RNA-Sequenzierungsdaten – Zell-Zellinteraktion	102
Tabelle 15	Panel: Untersuchung des Einflusses von IFN γ auf die Funktionalität von NKG2C ^{pos} und NKG2C ^{neg} NK-Zellen – Induktion von Apoptose in AML-Zellen.....	103
Tabelle 16	Panel: Untersuchung des Einflusses von IFN γ auf die Funktionalität von NKG2C ^{pos} und NKG2C ^{neg} NK-Zellen – NK-Zellfunktionalität	104
Tabelle 17	Untersuchung des Einflusses einer CMV-Reaktivierung auf die NK-Zellfunktionalität	104
Tabelle 18	Panel: Untersuchung des Einflusses einer CMV-Infektion auf die Oberflächenexpression ausgewählter Moleküle	105
Tabelle 19	Panel: Untersuchung der Induktion von Apoptose in AML-Zellen durch Stimulation mit PBMCs aus CMV ^{pos} und CMV ^{neg} Individuen	105
Tabelle 20	Vollständige Probenliste der im ersten Teil der Arbeit untersuchten Probanden.....	106
Tabelle 21	Liste der differentiell exprimierten Gene (RNA-Sequenzierung) in CD8 ^{pos} NK-Zellen .	110

Tabelle 22	<i>GO-Term Enrichment</i> Analyse aller differentiell exprimierter Gene in CD8 ^{pos} NK-Zellen.....	111
Tabelle 23	Liste der differentiell exprimierten Proteine (LEGENDScreen) in CD8 ^{pos} NK-Zellen...	117
Tabelle 24	<i>GO-Term Enrichment</i> Analyse der differentiell exprimierten Proteine in CD8 ^{pos} NK-Zellen (LEGENDScreen).....	118

Zusammenfassung

Das Myelodysplastische Syndrom (MDS) und die Akute Myeloische Leukämie (AML) sind maligne Erkrankungen des blutbildenden Systems, die gehäuft in der älteren Bevölkerung auftreten und oft mit einer schlechten Prognose einhergehen. Obgleich eine hämatopoetische Stammzelltransplantation (hSCT) sowohl für MDS als auch AML letztlich die einzig potentiell kurative Therapieoption darstellt, ist diese aufgrund des zumeist fortgeschrittenen Alters der MDS- und teilweise auch AML-Patienten nicht immer möglich. Zudem kommt es auch nach einer hSCT immer wieder zu Rezidiven, was die Dringlichkeit für neue alternative Therapieoptionen deutlich macht. Infektionen mit dem in hämatopoetischen Stammzellen persistierenden Zytomegalievirus (CMV) sind in der besonders von MDS und AML betroffenen älteren Bevölkerung weit verbreitet und gehen mit anhaltenden Veränderungen der Immunzellpopulationen einher. Zudem können wiederkehrende Reaktivierungsereignisse, wie sie bei CMV vorkommen, dazu beitragen, dass zytotoxische Immunreaktionen unterdrückt werden. Daher ist ein möglicher Behandlungsansatz die individualisierte Therapie mit Immuncheckpointinhibitoren (ICIs), die die Wiederherstellung eines funktionierenden Immunsystems zum Ziel hat. Um zu evaluieren, ob eine Immuntherapie nicht nur in der AML, sondern auch im MDS eine geeignete Therapieoption darstellt, wurde das Knochenmark und Blut von MDS-Patienten hinsichtlich der Expression von Immuncheckpointmolekülen (ICM), wie PD1, PD-L1 und Tim-3, durchflusszytometrisch untersucht. Als Vergleich diente Material von AML-Patienten und Patienten mit hämatologischen Grunderkrankungen, die dauerhaft in Remission waren. Es konnte gezeigt werden, dass hämatopoetische Stammzellen vermehrt PD-L1 exprimierten und dass die PD-L1-Expression auf hämatopoetischen Stammzellen mit der Expression von PD1^{pos} T-Zellen korreliert. Des Weiteren zeigte die serielle Analyse dreier MDS-Patienten einen engen Zusammenhang zwischen Krankheitsparametern und der Expression von ICMs auf T- und Stammzellen. Bei der vergleichenden Analyse von gepaarten Knochenmarks- und peripheren Blutproben ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in den Anteilen von PD1-exprimierenden T-Zellen, sodass die vergleichsweise wenig invasive Analyse von peripherem Blut ein probates Mittel für ein T-Zellmonitoring darstellen könnte.

Daneben beschreibt die Literatur interessanterweise ein verringertes Rezidiv-Risiko für AML hSCT-Empfänger, die in frühen Phasen nach hSCT eine CMV-Reaktivierung zeigten. Da in dieser Phase nach hSCT vor allem NK-Zellen vollständig rekonstituiert sind, wurde des Weiteren diese Immunzellpopulation im Kontext von CMV näher untersucht, um auch hier mögliche Immunzelltherapieansätze formulieren zu können. Hier konnte zunächst in rein phänotypischen Untersuchungen ein Zusammenhang zwischen dem CMV-Serostatus und dem Anteil von CD8^{pos} NK-Zellen in der AML als auch in gesunden Probanden mittels Durchflusszytometrie hergestellt werden. Diese zuvor auch in der AML als besonders zytotoxisch beschrie-

benen NK-Zellen wurden hier anhand gesunder Probanden mittels RNA-Sequenzierung und einem durchflusszytometrischen Screening von Oberflächenmolekülen näher charakterisiert. Hierbei zeichneten sich CD8^{pos} NK-Zellen im Vergleich zu ihrem CD8^{neg} Pendant vor allem durch die vermehrte Expression von Zelladhäsionsmolekülen sowie aktivierender Rezeptoren aus.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass NKG2C^{pos} NK-Zellen, deren Expansion mit einer CMV-Infektion assoziiert ist, möglicherweise zu dem in der Literatur beschriebenen reduzierten Rezidiv-Risiko in AML hSCT-Empfängern beitragen. NKG2C^{pos} NK-Zellen wurden im Knochenmark von CMV-seropositiven Patienten in erhöhter Anzahl nachgewiesen und zeigten sich in funktionalen *in vitro* Untersuchungen gegenüber AML-Zellen zytotoxischer als ihre NKG2A^{pos} Pendants. Dieser Effekt konnte durch IFN γ , welches im Zuge einer CMV-Replikation transient vermehrt im Plasma nachweisbar war, insofern verstärkt werden, als hier eine verstärkte Expression des NKG2C-Liganden HLA-E durch IFN γ und durch eine CMV-Infektion in AML-Zellen und primären Blasten beobachtet werden konnte. Des Weiteren wurden Zytokine identifiziert, die durch eine CMV-Infektion von AML-Zellen im Zellkulturüberstand verändert vorlagen. Diese könnten ebenfalls durch direkte Effekte auf leukämische Stammzellen bzw. indirekt über die Modulation der Immunantwort von zytotoxischen Zellen die Eradikation verbliebener Stammzellen unterstützen. Ferner konnte hier anhand retrospektiver Ereigniszeitanalysen gezeigt werden, dass auch AML-Patienten mit einer ungünstigen FLT3-ITD^{high}-Mutation von einem CMV-Replikationsereignis hinsichtlich eines frühen Rezidivs profitierten.

Zusammenfassend konnte mit dieser Arbeit eine Rationale für den individualisierten Einsatz von ICIs auch im MDS geschaffen werden. Des Weiteren wurden mit CD8^{pos} NK-Zellen und NKG2C^{pos} NK-Zellen zwei NK-Zellpopulationen im Kontext von CMV identifiziert, die sich möglicherweise in der Immunzelltherapie von AML- und MDS-Patienten, gegebenenfalls unterstützt durch hier identifizierte CMV-assoziierte Zytokine, erfolgreich einsetzen ließen, was zukünftig insbesondere durch funktionelle und *in vivo* Untersuchungen verifiziert werden muss.

Abstract

Myelodysplastic Syndromes (MDS) and Acute Myeloid Leukemia (AML) are malignant diseases of the hematopoietic system that occur more frequently in the elderly population and are often associated with a poor prognosis. Although a hematopoietic stem cell transplantation (hSCT) is ultimately the only potentially curative treatment option for both MDS and AML, it is not always possible due to the mostly advanced age of MDS and some AML patients. In addition, relapses continue to occur even after hSCT, highlighting the urgency for new alternative therapeutic options. Infections with the cytomegalovirus (CMV) are common within the elderly population that is particularly affected by MDS and AML and are, furthermore, associated with lasting alterations in immune cell populations. In addition, recurrent reactivation events, such as those associated with CMV, may contribute to suppression of cytotoxic immune responses. Therefore, one possible treatment approach could be an individualized treatment with Immune Checkpoint Inhibitors (ICIs), which aims to restore a properly functioning immune system. To evaluate whether immunotherapy is a suitable therapeutic option not only in AML but also in MDS, the expression of immune checkpoint molecules (ICM), such as PD1, PD-L1 and Tim-3 were analyzed within the bone marrow and peripheral blood of MDS patients by flow cytometry. Material from AML patients and patients with an underlying hematological disease who were permanently in remission were used for comparison. It was shown that hematopoietic stem cells expressed more PD-L1 and that PD-L1 expression on hematopoietic stem cells correlated with the expression of PD1^{pos} T cells. Furthermore, serial analysis of three MDS patients showed a close correlation between disease parameters and the expression of ICMs on T and stem cells. Encouragingly, there were no significant differences in the proportions of PD1 expressing T cells between paired bone marrow and blood samples of AML patients, so that the less invasive analysis of peripheral blood could be an appropriate method for T cell monitoring.

Additionally, the literature interestingly describes a reduced risk of relapse for AML hSCT recipients who experienced CMV reactivation in early phases after hSCT. Since in this phase after hSCT mainly NK cells are completely reconstituted, this immune cell population was further investigated in the context of CMV in order to formulate possible immune cell therapy approaches. Here, in simple flow cytometry based phenotypic studies, a correlation between CMV serostatus and the proportion of CD8^{pos} NK cells in AML, as well as in healthy subjects could be observed. These NK cells, which were previously described as particularly cytotoxic in AML, were characterized in more detail on the basis of healthy subjects by means of RNA sequencing and a flow cytometric screening of cell surface molecules. CD8^{pos} NK cells, in comparison to their CD8^{neg} counterparts, differed most prominently by an increased expression of cell adhesion molecules, as well as activating receptors.

Furthermore, it was shown that NKG2C^{pos} NK cells may contribute to the reduced relapse risk within AML hSCT recipients. Here, NKG2C^{pos} NK cells were detected in increased numbers in the bone marrow of CMV seropositive patients and were shown to be more cytotoxic to AML cells than their NKG2A^{pos} counterparts in functional *in vitro* assays. This effect could be enhanced by IFN γ , which was transiently increased in the plasma during CMV replication, as increased expression of the NKG2C ligand HLA-E through IFN γ and a CMV infection *per se* was observed in AML cells and primary blasts. Furthermore, an altered cytokine profile was detected in the supernatant of CMV infected AML cells. These cytokines could support the eradication of remaining stem cells by direct effects on leukemic stem cells or indirectly by modulating the immune response of cytotoxic cells. Furthermore, it was shown here that AML patients with the unfavorable FLT3-ITD^{high} mutation also benefited from a CMV replication event with respect to early relapse.

In summary, this work provided a rationale for the individualized use of ICIs also within MDS. Furthermore, with CD8^{pos} NK cells and NKG2C^{pos} NK cells, two NK cell populations were identified in the context of CMV that could potentially be successfully used in immune cell therapy of AML and MDS patients, possibly supported by the CMV-associated cytokines identified here, which needs to be further investigated in the future by functional and *in vivo* studies.

I. Einleitung

Das Myelodysplastische Syndrom (MDS) und die Akute Myeloische Leukämie (AML) sind heterogene Erkrankungen des blutbildenden Systems, die mit einer hohen Sterblichkeit einhergehen. Sie betrifft vor allem die ältere Bevölkerung (vgl. 1.2.1.). Diese Bevölkerungsgruppe ist außerdem von einer hohen Zytomegalievirus (*Cytomegalovirus*, CMV)-Prävalenz betroffen. Je nach sozioökonomischen Faktoren liegt die Durchseuchungsrate mit dem β -Herpesvirus bei knapp 50-100 % und steigt mit zunehmendem Alter an [1]. Die Primärinfektion findet meist bereits im Kindesalter statt und verläuft asymptomatisch bzw. geht i.d.R. lediglich mit milden grippeartigen Symptomen einher. Schwerwiegende Komplikationen sind bei ansonsten gesunden Individuen dagegen selten. Zu den Ausnahmen zählen Primärinfektionen während der Schwangerschaft, die bei den Neugeborenen gehäuft zu Hörschäden, Wachstumsverzögerungen sowie neurologischen Schäden führen können. Nach der Primärinfektion etabliert CMV eine lebenslange Latenz, aus der es durch verschiedene Stimuli, wie beispielsweise Stress und UV-Strahlung, reaktiviert werden kann. Dies kann insbesondere bei Immunsupprimierten, wie z.B. bei Empfängern von Stammzelltransplantationen, wie sie bei der Behandlung von MDS und AML üblich sind, mit schweren Organ- und Gewebeschäden einhergehen (zusammengefasst in [2]).

CMV etabliert seine Latenz in hämatopoetischen Stammzellen und Monozyten [3-6], Zellen, die von MDS und AML betroffen sind. Da weitere Vertreter der Herpesviren, wie z.B. das Epstein-Barr Virus (EBV) und das humane Herpesvirus 8 (HHV8), im Zusammenhang stehen, in den Zellen der Latenz lymphoproliferativen Erkrankungen auszulösen bzw. zu begünstigen (besprochen in [7]), stellt sich die Frage, ob CMV auch einen Einfluss auf die Erkrankungen MDS und AML haben kann.

Im Folgenden werden zunächst das Immunsystem und die Krankheitsbilder MDS und AML näher erläutert sowie an gegebener Stelle auf bereits bekannte CMV-assoziierte Einflüsse hingewiesen, um im Anschluss daran die genaue Zielsetzung dieser Arbeit zu formulieren.

1.1. Das menschliche Immunsystem

Das Immunsystem schützt den Körper sowohl vor externen Pathogenen, wie z.B. Viren, Bakterien, Pilzen und Parasiten, als auch vor körpereigenen Gefahren wie entarteten Zellen. Es setzt sich aus einem angeborenen und einem adaptiven Teil zusammen. Das angeborene Immunsystem zeigt eine schnelle Antwort auf Krankheitserreger, ist jedoch weniger spezifisch als das adaptive Immunsystem, das sich durch eine gezielte pathogenspezifische Immunantwort auszeichnet. Mit Ausnahme der Erythrozyten und Thrombozyten, die den Sauerstoff- und Nährstofftransport bzw. die Wundheilung gewährleisten, sind die übrigen Blutzellen

Teil des Immunsystems. T- und B-Zellen sind Teil des adaptiven Immunsystems, während Natürliche Killer (NK)-Zellen sowie die übrigen Immunzellen der myeloischen Reihe klassischerweise zum angeborenen Immunsystem gezählt werden [8].

1.1.1. Die Hämatopoese des Menschen

Sämtliche Immunzellen gehen aus einer gemeinsamen pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle (*Hematopoietic Stem Cell*, HSC) hervor (vgl. Abbildung 1), die sowohl langlebig ist als auch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzt [9-13]. Mit zunehmender Differenzierung nimmt die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und auch die Plastizität ab. Zunächst gehen aus der multipotenten Vorläuferzelle (*Multipotent Progenitor*, MPP) sowohl die gemeinsame lymphatische Stammzelle (*Common Lymphoid Progenitor*, CLP) als auch die gemeinsame myeloische Stammzelle (*Common Myeloid Progenitor*, CMP) hervor. Aus der CLP differenzieren sich schließlich die Zellen der lymphatischen Reihe: T-Zellen, B-Zellen und Natürliche Killer (NK)-Zellen [14-16]. Aus der CMP entwickeln sich über weitere Vorläuferzellen die Blutzellen der myeloischen Reihe: Thrombozyten und Erythrozyten über den *Megakaryocyte-Erythroid Progenitor* (MEP), Granulozyten und Monozyten bzw. Makrophagen über den *Granulocyte-Monocyte Progenitor* (GMP) und Mastzellen über einen nicht vollends aufgeklärten Vorläufer [17, 18]. Dendritische Zellen (*Dendritic Cells*, DCs) lassen sich sowohl aus der CLP als auch aus der CMP differenzieren [13]. Sämtliche Stamm- und Vorläuferzellen exprimieren CD34. Ferner können sie durch die Expression von CD38, CD90, CD45RA und CD123 voneinander unterschieden werden (vgl. Tabelle 1, [19]).

Tabelle 1 Markerproteinexpression hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen [19]

<i>Stamm-/Vorläuferzelle</i>	<i>Marker</i>
HSC	CD34 ^{pos} CD38 ^{neg} CD90 ^{pos} CD45RA ^{neg}
MPP	CD34 ^{pos} CD38 ^{neg} CD90 ^{neg} CD45RA ^{neg}
CLP	CD34 ^{pos} CD38 ^{neg} CD45RA ^{pos}
CMP	CD34 ^{pos} CD38 ^{pos} CD45RA ^{neg} CD123 ^{low}
MEP	CD34 ^{pos} CD38 ^{pos} CD45RA ^{neg} CD123 ^{neg}
GMP	CD34 ^{pos} CD38 ^{pos} CD45RA ^{pos} CD123 ^{pos}

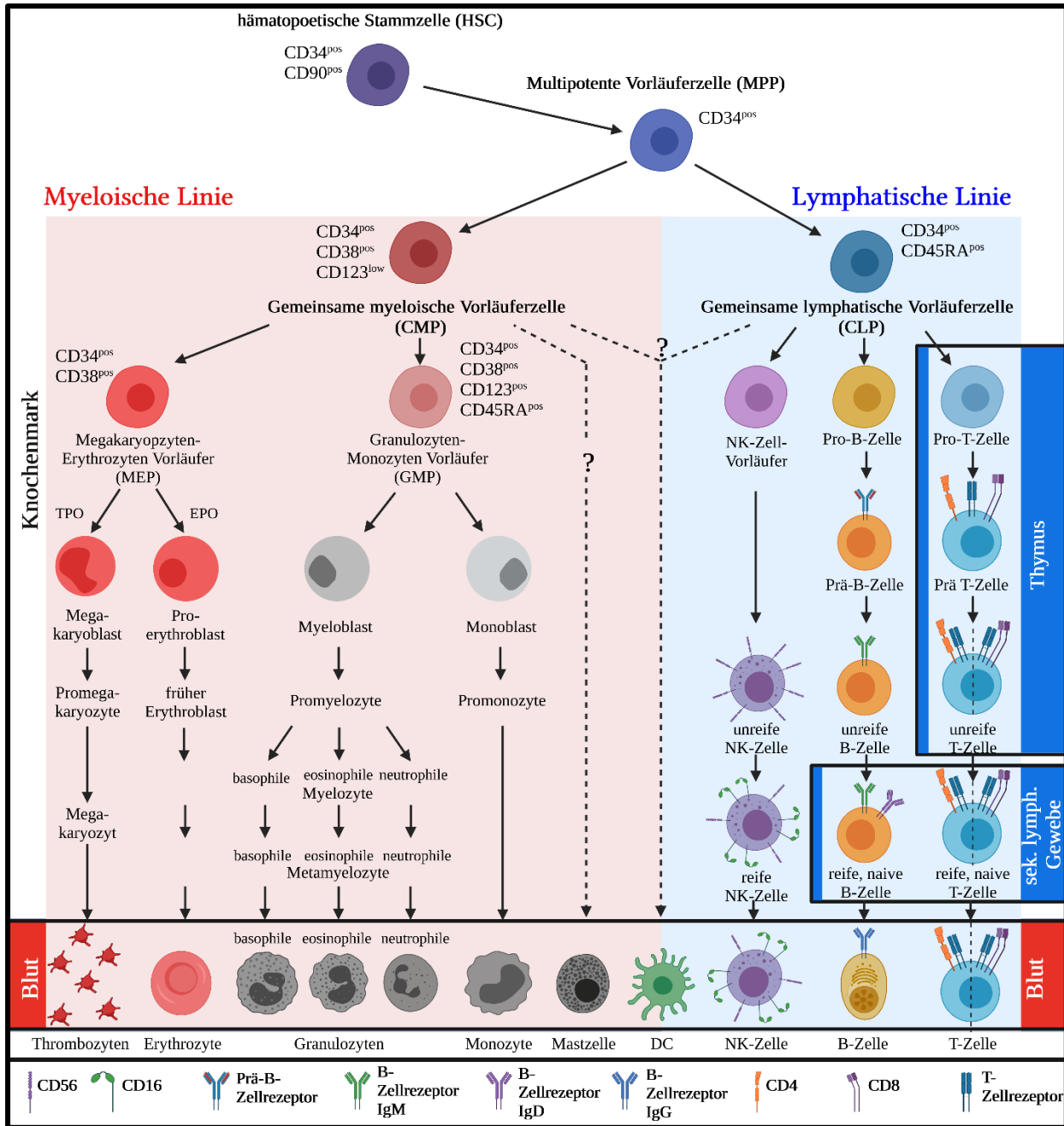


Abbildung 1 Hämatopoese

Sämtliche Zellen des Blutes gehen aus der HSC hervor. Über die MPP entwickeln sich die CMP und CLP. Aus der CMP gehen letztlich über weitere Vorläuferzellen, Thrombozyten, Erythrozyten, basophile, eosinophile und neutrophile Granulozyten, Monozyten bzw. Gewebsmakrophagen sowie Mastzellen und dendritische Zellen hervor. Entscheidend für die Thrombozytenentwicklung ist Thrombopoetin (TPO), für die Erythrozytenentwicklung Erythropoetin (EPO). Über die CLP gehen NK-Zellen, B- bzw. Plasmazellen, T-Zellen sowie vermutlich auch dendritische Zellen hervor. Während die NK- und B-Zellentwicklung vor allem im Knochenmark stattfindet, findet die Differenzierung von T-Zellen maßgeblich im Thymus statt [8, 19-22]. Abbildung erstellt mit Biorender.

1.1.2. Immunantwort

Zur Erkennung von Pathogenen stehen den Zellen des angeborenen Immunsystems eine Reihe von keimbahnkodierten Rezeptoren zur Verfügung, die eine schnelle Einleitung der Immunantwort ermöglichen. Diese sogenannten Mustererkennungsrezeptoren (*Pattern Recognition Receptors*, PRR), erkennen hoch konservierte, körperfremde Strukturen, die vielen Pathogenen gemein sind, wie z.B. Strukturelemente bakterieller Oberflächen oder Nukleinsäuren von Viren. Die Erkennung dieser Strukturen über PRRs induziert die Genexpression von proinflammatorischen Proteinen, wie z.B. Tumornekrosefaktoren (TNFs) und Interleukine (IL) (besprochen in [23]). Diese können in den Zielzellen beispielsweise Apoptose auslösen oder die Immunantwort anderer Immunzellen modulieren. Daneben exprimieren u.a. NK-Zellen, Makrophagen und neutrophile Granulozyten, Rezeptoren, die über die Bindung des konstanten Teils (Fc) von Antikörpern aktivierende Signale an die Zelle transduzieren. Die Aktivierung leitet entweder eine direkte Zerstörung der Zielzellen mittels zytotoxischer Moleküle (*Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity*, ADCC) oder eine indirekte Zerstörung durch Phagozytose der markierten Zelle (*Antibody Dependent Cellular Phagocytosis*, ADCP) ein (besprochen in [24, 25]). Die Phagozytose von infizierten und entarteten Zellen durch antigenpräsentierende Zellen (*Antigen presenting cells*, APCs) ist ein wichtiges Bindeglied zum adaptiven Immunsystem, da durch diese pathogenspezifische Peptide über das sogenannte humane Leukozyten Antigen (HLA) den B- und T-Zellen präsentiert werden, wodurch diese aktiviert werden können.

Die erstmalige Aktivierung von B- und T-Zellen wird durch die Interaktion des B- bzw. T-Zellrezeptors (*B cell receptor*, BCR bzw. *T cell receptor*, TCR) mit ihren Antigenen und zusätzlichen co-stimulierenden Signalen initiiert [8]. Sowohl der BCR als auch der TCR sind hochdivers und pathogenspezifisch (besprochen in [26]). Die Aktivierung von B-Zellen induziert primär die Differenzierung zu antikörpersezernierenden Plasmazellen. Antikörper können infizierte Zellen, u.a. für die Vernichtung über ADCC bzw. ADCP, markieren bzw. die Infektion in erster Instanz verhindern (Neutralisierung). T-Zellen hingegen induzieren direkt Apoptose in den Zielzellen bzw. modulieren die Immunreaktion mittels Zytokinen und zytotoxischer Moleküle (zusammengefasst in [8]).

Verschiedene Studien zeigen, dass sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem elementar für die Bekämpfung von körperfremden sowie körpereigenen Pathogenen sind und Defekte in einem Teil des Immunsystems bereits zu schwerwiegenden Erkrankungen, wie u.a. Immundefizienz und Krebs, führen können (besprochen in [27-29]). Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss zytotoxischer Zellen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems auf die Krankheitsbilder MDS und AML. Daher werden im Folgenden zytotoxische NK- und CD8 T-Zellen näher betrachtet.

1.1.2.1. NK-Zell-Immunantwort

NK-Zellen können ohne vorherige Sensibilisierung und Aktivierung Pathogene abtöten. Sie können dabei über drei Hauptwege aktiviert werden (vgl. Abbildung 2), erstens durch Interaktion mit aktivierenden Liganden, deren Expression von der Zielzelle hochreguliert wurde (*induced self*-Liganden), zweitens durch das Ausbleiben von inhibierenden Signalen (*missing self*) und drittens über CD16-vermittelte ADCC.

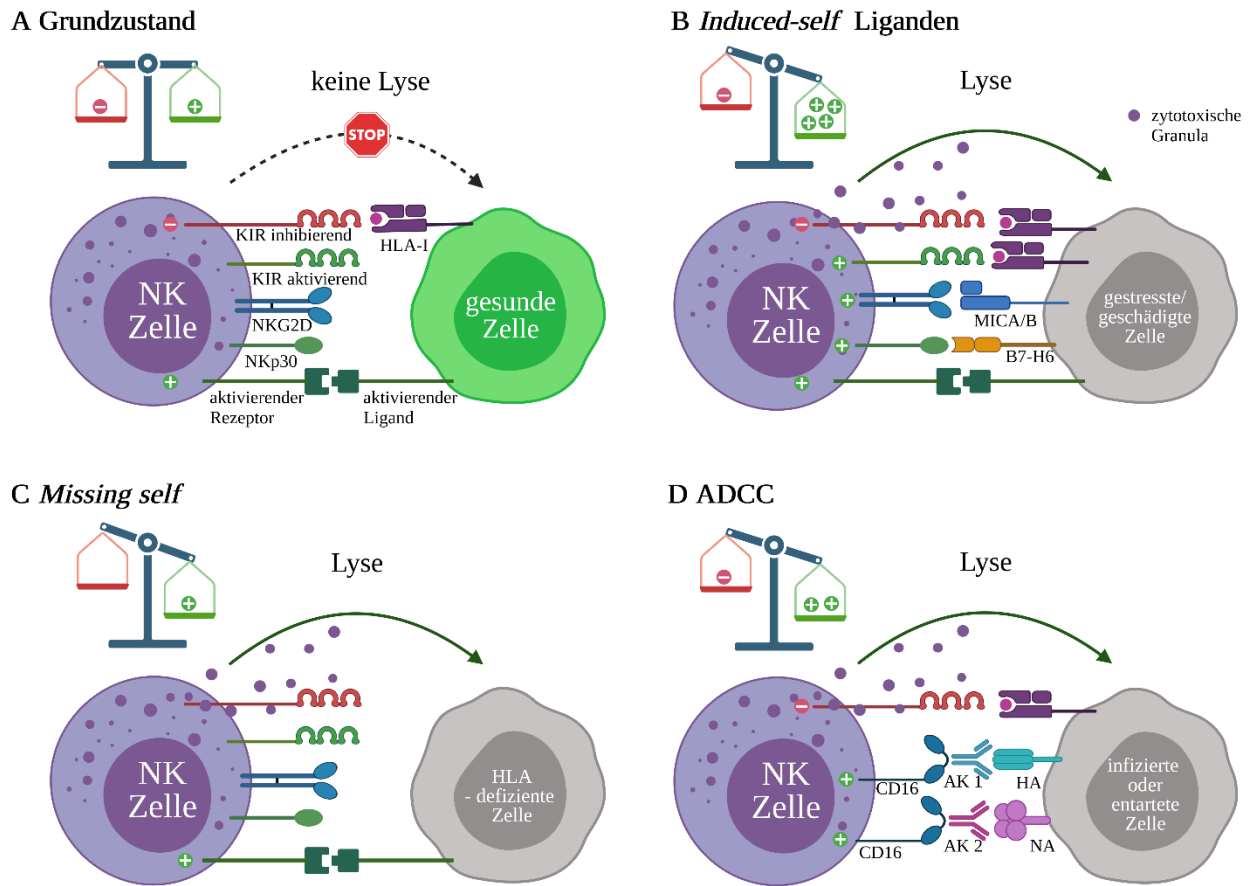


Abbildung 2 Aktivierung von NK-Zellen

Im Ruhezustand sind aktivierende und inhibierende Signale in der NK-Zelle im Gleichgewicht (A). Durch zytotoxischen Stress (UV-Licht, Hitze, Chemikalien, Infektionen, usw.) und bei DNA-Schäden werden Liganden hochreguliert, die mit aktivierenden Rezeptoren auf der NK-Zelle interagieren, woraufhin zytolytische Granula sezerniert werden (B). Infizierte Zellen und Tumorzellen können aktiv HLA-Klasse I Moleküle herunterregulieren, wodurch inhibierende Signale in der NK-Zelle fehlen (C). Die Bindung von CD16 an den Fc Teil von Antikörpern, die an Tumor- oder virale Antigene binden, führt ebenfalls zur Aktivierung von NK-Zellen (D). HA: Hämagglutinin, NA: Neuraminidase, AK: Antikörper

Veränderte Abbildung nach Morvan *et al.*, 2016, Nature reviews Cancer [30]. Abbildung erstellt mit Biorender.

Neben den PRRs [31-35] exprimieren NK-Zellen eine Reihe von Rezeptoren, über die inhibierende und aktivierende Signale transduziert werden können (vgl. Abbildung 3). Die prominentesten sind sogenannte *Killer cell Immunoglobulin-like Receptors* (KIRs), Rezeptoren der C-Typ Lektin-ähnlichen CD94-NKG2 Rezeptor Familie, die die Heterodimere NKG2A und NKG2C sowie das Homodimer NKG2D umfasst und *Natural Cytotoxicity Receptors* (NCRs) wie NKp30, NKp44 und NKp46 [21, 36, 37]. Diese Rezeptoren sind, wie auch PRRs, keimbahnkodiert und invariant. Sie zeigen jedoch eine gewisse Diversität, z.B. durch einen hohen KIR-Genpolymorphismus (besprochen in [8, 36, 38]). Die Aktivität von NK-Zellen kann zudem durch Zytokine wie IL-12, IL-15 und IL-18 initiiert bzw. verstärkt werden [39].

Reife NK-Zellen werden über die Expression von CD56 und CD16 charakterisiert. Sie zeigen hingegen keine Expression der T-Zell- und B-Zell-Linienmarker CD3 bzw. CD19. NK-Zellen gehen aus der CLP im Knochenmark hervor und differenzieren schließlich von CD56^{pos}CD16^{neg} (CD56^{bright}) NK-Zellen über CD56^{pos}CD16^{dim} NK-Zellen zu CD56^{dim}CD16^{bright} (CD56^{dim}) NK-Zellen (zusammengefasst in [40]). CD56^{bright} NK-Zellen produzieren hauptsächlich Zytokine wie Interferon γ (IFN γ), Tumornekrosefaktor α (TNF α), Granulozyten/Monozyten koloniestimulierender Faktor (GM-CSF) und IL-10 [39, 41]. Diese Zytokine haben einen modulierenden Einfluss auf die Immunreaktion. Sie unterstützen beispielsweise die Aktivierung anderer Immunzellen mittels Induktion von HLA-Molekülen (IFN γ , besprochen in [42]), begrenzen die Immunreaktion (IL-10) [43] oder regen die Differenzierung von eosinophilen Granulozyten und Monozyten an (GM-CSF) [44]. Sie können aber, wie z.B. TNF α , auch direkt das Absterben von Zellen bewirken [45].

Während CD56^{bright} NK-Zellen im Schnitt lediglich ca. 10 % der gesamten NK-Zellpopulation ausmachen, sind CD56^{dim} NK-Zellen der vorherrschende NK-Zell-Phänotyp im peripheren Blut [46]. Sie produzieren primär zytotoxische Granula, die Perforine und Granzyme enthalten, wodurch in den Zielzellen Caspase-abhängig und -unabhängig Apoptose ausgelöst wird [47, 48].

Äußere Einflüsse können die Expression bestimmter NK-Zellrezeptoren bzw. die Verteilung von NK-Zell-Subpopulationen und damit die Immunantwort gegen bestimmte Pathogene verändern. So zeigen beispielsweise einige Individuen eine CMV-spezifische Expansion von NK-Zellen, die den aktivierenden Rezeptor NKG2C exprimieren [49]. NKG2C und sein inhibierendes Pendant, NKG2A, interagieren mit HLA-E auf der Zelloberfläche von APCs [50, 51].

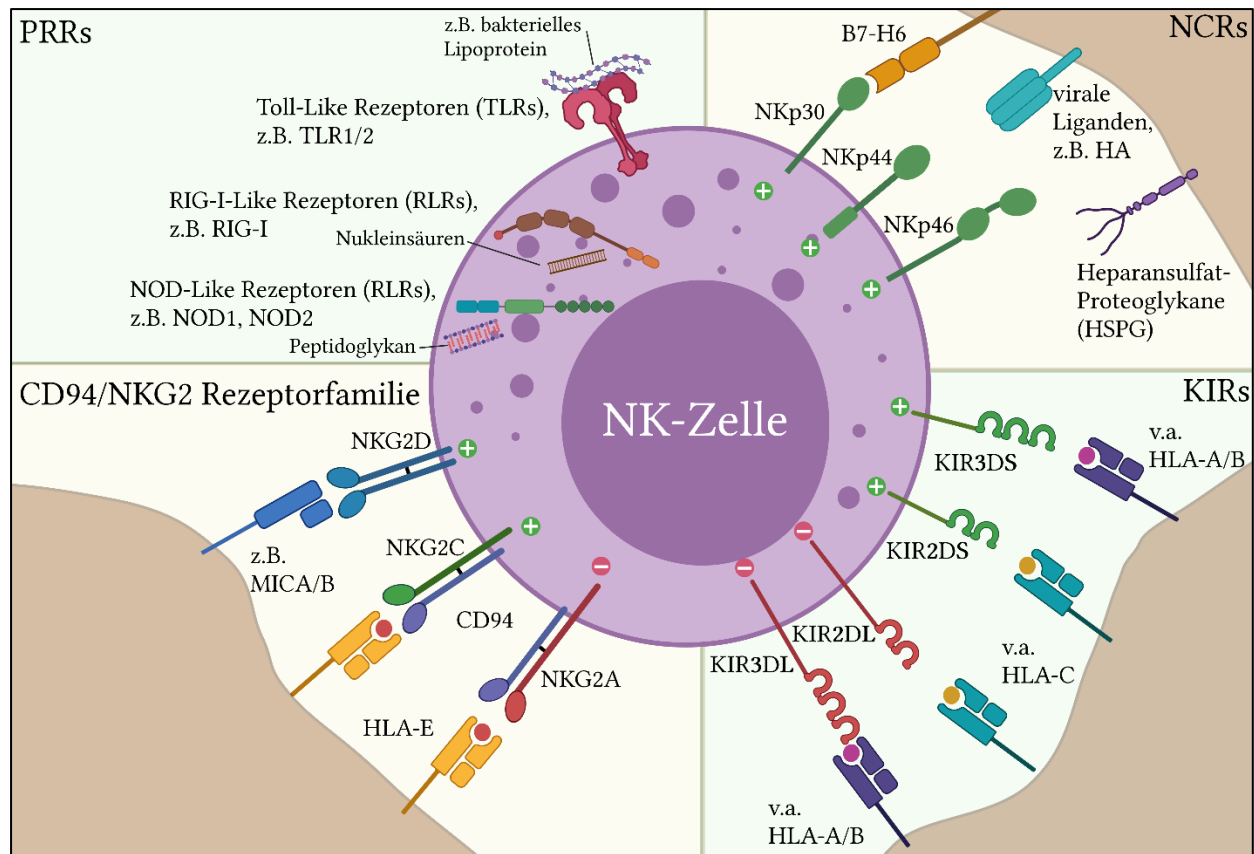


Abbildung 3 NK-Zellrezeptoren

NK-Zellen exprimieren eine Reihe von keimbahnkodierten Rezeptoren, mit denen sie sowohl endogene als auch exogene Strukturen und Moleküle detektieren können. Die hier dargestellten Rezeptoren werden den Rezeptorklassen der Mustererkennungsrezeptoren (PRRs), *Natural Cytotoxicity Receptors* (NCRs), *Killer cell Immunoglobulin-like Receptors* (KIRs) und der CD94/NKG2 Rezeptorfamilie zugeordnet. Mit diesen Rezeptoren können HLA-Moleküle (z.B. durch NKG2A/C und KIRs), körpereigene Stressliganden (durch NKG2D) und auch virale und bakterielle Strukturmoleküle und Nukleinsäuren (durch PRRs und NCRs) detektiert werden. Die Rezeptor/Liganden-Interaktion resultiert in der Aktivierung bzw. Inhibition der NK-Zelle, dargestellt durch ein Plus- bzw. Minuszeichen oder in der differentiellen Expression von proinflammatorischen Proteinen (über PRRs induziert).

Abbildung erstellt mit Biorender.

1.1.2.2. T-Zell-Immunantwort

T-Zellen können sowohl immunmodulierende (primär CD4 T-Zellen) als auch zytotoxische Funktionen (primär CD8 T-Zellen) ausüben. Der modulierende Einfluss wird über die Freisetzung verschiedener Zytokine und die Aktivierung oder Inhibition weiterer Immunzellen mittels Rezeptor/Liganden-Interaktion vermittelt. Die zytotoxische Funktion wird, ähnlich wie bei NK-Zellen, durch die Sezernierung zytotoxischer Granula, die u.a. $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, $\text{TNF}\beta$, und Perforine beinhalten, ausgeübt (besprochen in [52-55]). Ferner

exprimieren T-Zellen Liganden, wie z.B. Fas-Ligand (CD95L bzw. CD178) oder TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*), deren Wechselwirkung mit entsprechenden Rezeptoren an der Zelloberfläche sowohl im Menschen als auch im Mausmodell die Induktion von Apoptose in der Zielzelle einleitet [56-59].

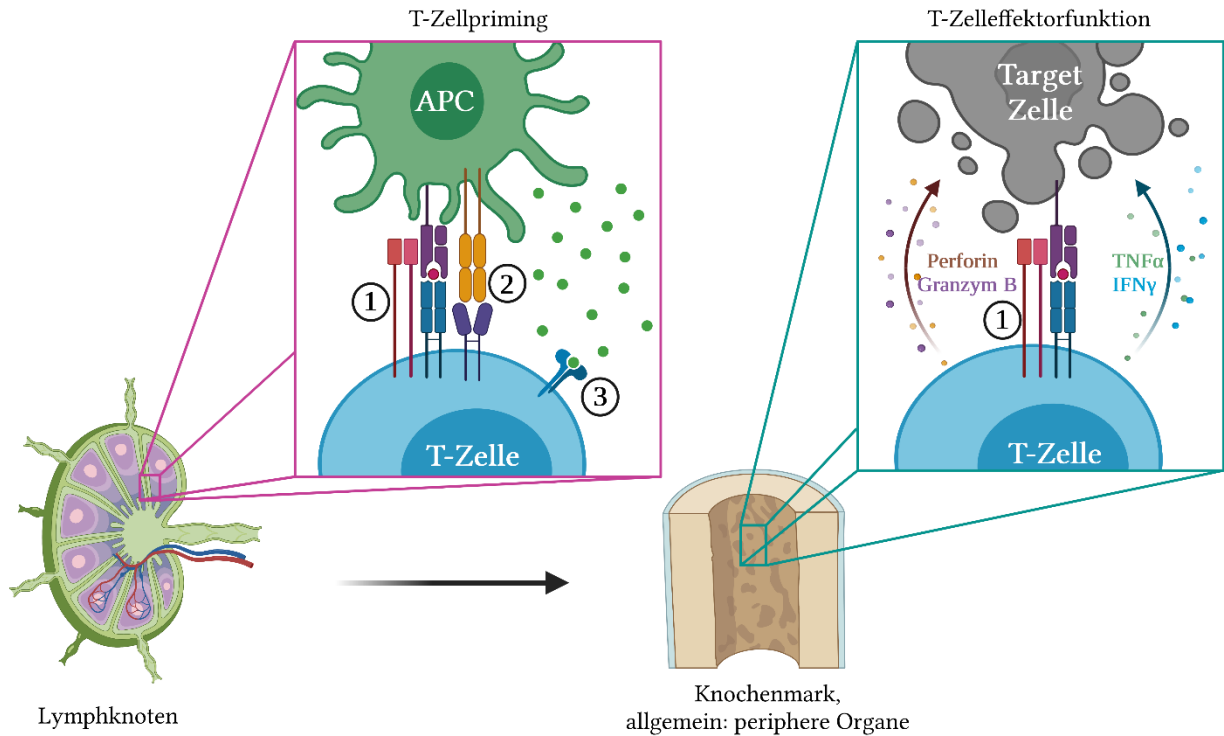


Abbildung 4 T-Zellaktivierung

Das Priming von T-Zellen findet in sekundären lymphatischen Geweben, wie den Lymphknoten, statt. Dort befindet sich eine hohe Dichte an DCs und T-Zellen, die dort in engen Kontakt kommen. DCs präsentieren Peptide über deren HLA-Moleküle. Bindet eine T-Zelle mit ihrem TCR an solch einen Peptid/HLA-Komplex (1) und findet gleichzeitig eine Co-Stimulation über aktivierende Rezeptoren, wie z.B. CD28/B7-H6 (2), und über Zytokine (3) statt, wird die T-Zelle „geprimed“. Sie wandert aus dem Lymphknoten in die Peripherie, wo sie differenziert und expandiert. Bindet der TCR nun mit hoher Spezifität erneut an den Peptid/HLA-Komplex (1) auf einer entarteten oder infizierten Zelle (graue Target Zelle), reicht dieses Signal aus, um die T-Zelle zu aktivieren, wodurch sie Zytokine und zytolytische Granula ausschüttet. Eine Co-Stimulation ist in diesem Fall nicht nötig, kann aber zu einer Verstärkung der Immunreaktion führen. Abbildung erstellt mit Biorender.

T-Zellen entwickeln sich ebenfalls aus der CLP und exprimieren den Linienmarker CD3. Sie differenzieren sich im Thymus überwiegend zu CD4 und CD8 T-Zellen. Sowohl CD4 als auch CD8 T-Zellen exprimieren einen TCR, über den sie an HLA gebundene Peptide erkennen. Noch während der T-Zellreifung im Thymus werden T-Zellen, die auf körpereigene Peptide reagieren, negativ selektiert (zusammengefasst in [60, 61]). Im Anschluss daran verlässt die reife, aber naive T-Zelle den Thymus und wandert in lymphatische Gewebe ein, wo sie in engen Kontakt zu APCs, allen voran DCs, kommt. Bindet eine T-Zelle erstmals über den

TCR/CD4 bzw. den TCR/CD8-Komplex an ein Peptid/HLA-Komplex und findet gleichzeitig eine Co-Stimulation über einen aktivierenden Co-Rezeptor, wie z.B. CD28, und über Zytokine statt (Primingphase, vgl. Abbildung 4), wird die T-Zelle aktiviert. Die aktivierte T-Zelle wandert in die Peripherie, expandiert und differenziert schließlich zur T-Effektorzelle, die ihre Zielzellen auch ohne co-stimulierendes Signal abtöten kann. Im Anschluss an das Infektionsgeschehen verbleiben einige Gedächtnis-T-Zellen in den lymphatischen Organen (*Central Memory* T-Zellen, CM) bzw. in der Peripherie (*Effector Memory* T-Zellen, EM), um im Falle eines erneuten Auftretens des Pathogens eine schnelle Immunantwort einzuleiten [62]. CM T-Zellen besitzen ein höheres proliferatives Potential als EM T-Zellen, zeigen jedoch eine geringere Effektorfunktionalität als diese. Ein weiteres T-Zell *Memory* Subset sind die sogenannten T_{EMRA} (*Effector Memory T cells reexpressing CD45RA*). Trotz einiger Kontroversen werden T_{EMRAS} im Allgemeinen als terminal differenzierte Effektorzellen angesehen, die ein geringes zytotoxisches Potential und eine geringe proliferative Kapazität besitzen sowie eine hohe Sensitivität gegenüber Apoptose zeigen [63].

1.2. Myelodysplastisches Syndrom (MDS) und Akute Myeloische Leukämie (AML)

Die Hämatopoese ist ein fein orchestrierter Prozess und entscheidend für ein funktionierendes Immunsystem. Etwaige Störungen in diesem Prozess können Fehlfunktionen des Immunsystems und damit die Entstehung von Krebs begünstigen. Ist die Bildung und Reifung der Immunzellen selbst betroffen, kann das zur Leukämie, also einer malignen Erkrankung des hämatopoetischen Systems, führen.

1.2.1. Klinisches Krankheitsbild und Inzidenz

1.2.1.1. MDS

Unter dem Myelodysplastischen Syndrom (MDS) wird eine Gruppe heterogener maligner Erkrankungen zusammengefasst, die sich durch Zytopenien und dysplastische, meist funktionsgestörte Zellen myeloischen Ursprungs, auszeichnet (vgl. Abbildung 1). Zusätzlich zeichnet sich das MDS durch ein erhöhtes Risiko aus, in eine Akute Myeloische Leukämie (AML) überzugehen (vgl. 1.2.1.2.). Aufgrund der Zytopenien treten symptomatisch vor allem Anämien sowie vermehrt bakterielle Infektionen auf (besprochen u.a. in [64-67]). MDS wird anhand morphologischer und genetischer Auffälligkeiten in verschiedene Subtypen eingeteilt. Die Einteilung gemäß der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization*, WHO) erfolgt über das Auftreten von Dysplasien und Zytopenien in einer der drei Entwicklungslinien zu Thrombozyten, Erythrozyten und Granulozyten, ferner über das Auftreten von Myeloblasten, Ringsideroblasten und Auerstäbchen sowie bestimmte chromosomale Veränderungen (vgl. Tabelle 2). Bei der Entwicklung eines MDS spielen bestimmte Treibermutationen bzw. Chromosomenaberrationen eine Rolle. In rund 75-90 % der Fälle zeigen sich Mutationen in mindestens einem Gen, das am Spleißprozess, an epigenetischen Modifikationen oder an der Transkription beteiligt ist [68, 69]. MDS tritt daher auch vermehrt infolge des vermehrten Kontaktes mit Mutagenen auf, z.B. nach einer Chemo- oder Radiotherapie oder durch häufige Exposition mit benzolhaltigen Stoffen und organischen Lösemitteln, z.B. durch Arbeiten im Bereich der chemischen Industrie [70-72].

In den USA sind 86 % der MDS-Patienten in der Gruppe der über 60-Jährigen zu finden. In dieser Gruppe liegt das mediane Erkrankungsalter bei 76 Jahren [73]. Das Gesamtüberleben liegt im Schnitt bei ca. 32 Monaten, variiert jedoch abhängig vom MDS-Subtyp und dem Erkrankungsalter [74]. Die Risikobeurteilung für den Verlauf der Erkrankung erfolgt anhand des *International Prognostic Scoring System-Revised* (IPSS-R), das zur Berechnung des individuellen Risikos den Karyotyp, die Blastenfrequenz, den Hämoglobinwert sowie die Konzentration von Thrombozyten und Neutrophilen im peripheren Blut heranzieht

[75]. Patienten mit einem sehr niedrigen Risiko zeigen ein medianes Überleben von 8,8 Jahren, während Patienten mit einem sehr hohen Risiko ein medianes Überleben von lediglich 0,8 Jahren zeigen [76].

Tabelle 2 WHO-Klassifikation (2016) adulter myelodysplastischer Syndrome

Myelodysplastisches Syndrom (MDS)	Besonderheit
<i>MDS mit Einliniendysplasie (SLD)</i>	eine dysplastische Linie, 1-2 Zytopenien*
<i>MDS mit Mehrliniendysplasie (MLD)</i>	2-3 dysplastische Linien, 1-2 Zytopenien*
<i>MDS mit Ringsideroblasten (RS)</i>	mind. 15 % bzw. 5 % ¹ RS in erythroiden Zellen
MDS-RS-SLD	zusätzlich eine dysplastische Linie
MDS-RS-MLD	zusätzlich 2-3 dysplastische Linien
<i>MDS mit isolierter del(5q)</i>	del(5q), ggf. weitere, außer -7 oder del(7q)
<i>MDS mit Blastenexzess (MDS-EB)</i>	BM und PB weisen erhöhten Anteil an Blasten auf
MDS-EB I	BM 5-9 % oder PB 2-4 %
MDS-EB II	BM 10-19 % oder PB 5-19 % oder Auerstäbchen
<i>MDS, unklassifizierbar (MDS-U)</i>	
MDS-U	mindestens 1 % Blutblasten ²
MDS-U mit SLD und Panzytopenie	eine dysplastische Linie, drei Zytopenien*
MDS-U mit definierender zytogenetischer Veränderung	MDS-definierende karyotypische Anomalität ohne RS ³

BM: Knochenmark (*bone marrow*), PB: peripheres Blut, RS: Ringsideroblasten

*Zytopenien sind definiert als: Hämoglobin (Hb) < 10 g/dL; Thrombozytenzahl < 100 x 10⁹/L und absolute Neutrophilenzahl < 1,8 x 10⁹/L

¹ falls *SF3B1* mutiert ist

² 1 % der peripheren Blasten müssen zu 2 verschiedenen Zeitpunkten bestimmt werden

³ Fälle mit ≥ 15 % Ringsideroblasten haben definitionsgemäß eine signifikante Dyserythropoese und sind daher MDS mit Ringsideroblasten und Einliniendysplasie

Gekürzte Tabelle aus Arber *et al.*, The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia [75].

1.2.1.2. AML

Die AML zeichnet sich ebenfalls durch ein abnormales Wachstum und eine gestörte Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen der myeloischen Reihe aus. In der Regel bestehen mind. 20 % der Blut- oder Knochenmarkszellen aus myeloischen Blasten, wie z.B. Myeloblasten, Monoblasten oder Megakaryoblasten (vgl. Abbildung 1). Dies äußert sich symptomatisch, ähnlich wie beim MDS, in Abgeschlagenheit aufgrund von Anämien, Infektneigung aufgrund von Neutropenien und Blutungsneigung aufgrund von Thrombozytopenien (zusammengefasst u.a. in [77-80]). Ursprünglich wurde die AML anhand morphologischer und zytochemischer Charakteristika der myeloischen Blasten, die typisch für die Differenzierungsstadien zu Granulozyten, Monozyten bzw. Erythrozyten sind, kategorisiert (*French-American-British* (FAB) Klassifikation) [81]. Die überarbeitete WHO-Klassifikation ist eher funktionaler Natur und erwägt neben dem Differenzierungsgrad auch bestimmte Treibermutationen bzw. Genomaberrationen, vorausgegangene zytotoxische Therapien (z.B. Chemotherapien) und MDS-Erkrankungen (vgl. Tabelle 3) [75]. Die Risikobeurteilung erfolgt anhand genetischer Besonderheiten, wie z.B. bestimmte Mutationen, Gentranslokationen und -deletionen, gemäß der *European LeukemiaNet* (ELN)-Klassifikation [82].

AML tritt grundsätzlich in jeder Altersgruppe auf, ist jedoch mit einem medianen Erkrankungsalter von 63-71 Jahren ebenfalls eine Erkrankung der älteren Bevölkerung (besprochen in [83]). AML ist eine meist tödliche Erkrankung mit einem medianen Gesamtüberleben von lediglich rund 8,5 Monaten [83]. Es gibt jedoch deutliche altersabhängige Unterschiede [84].

Tabelle 3 WHO-Klassifikation (2016) akuter myeloischer Leukämien

Akute myeloische Leukämie (AML)

AML mit wiederholt auftretenden genetischen Anomalien

RUNX1-RUNX1T1; CFBF-MYH11; PML-RARA; MLLT3-KMT2A; DEK-NUP214;

GATA2, MECOM(EV11); RBM15-MKL1; BCR-ABL1

mutiertes *NPM1*, biallelische Mutation von *CEBPA*, mutiertes *RUNX1*

AML mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen

Therapie-assoziierte AML (tAML)

AML, nicht anderweitig klassifiziert (NOS, not otherwise specified)

u.a. eingeteilt nach Grad der Differenzierung bzw. Ausreifung myeloischer Zellen, betroffene Zelllinie bzw. betroffene Vorläuferzelle

Übersetzte und gekürzte Tabelle aus Arber *et al.* [75].

1.2.2. Behandlung des MDS und der AML

Die Therapie eines MDS bzw. einer AML richtet sich einerseits nach dem individuellen Risiko des Patienten ein Progress der Erkrankung zu erleiden, andererseits auch nach dessen individueller physischen und psychischen Konstitution.

1.2.2.1. Behandlung des MDS

Insbesondere Patienten mit einem geringen individuellen Risiko profitieren im MDS bereits von einer supportiven Therapie. Diese hat die Verbesserung der Lebensqualität zum Ziel, indem vor allem die Zytopenien und die damit einhergehenden Anämien und Infektionen behandelt werden. So werden beispielsweise Erythrozyten-Konzentrate und Wachstumsfaktoren, wie Erythropoetin (EPO), verabreicht, um die verringerte Erythrozytenzahl einiger Patienten zu stabilisieren (besprochen in [85, 86]). Daneben werden im MDS mit niedrigem Risiko in Abhängigkeit des Subtyps auch Immunmodulatoren, wie Lenalidomid oder Anti-thymozytenglobuline (ATG), eingesetzt. Lenalidomid macht T-Zellen mit einer isolierten 5q Deletion anfälliger für eine p53 induzierte Apoptose (besprochen in [87]), während ATGs die Abtötung von hämatologischen Vorläuferzellen durch körpereigene, autoreaktive T-Zellen verhindern [88].

Dessen ungeachtet stellt die hämatopoetische Stammzelltransplantation (hSCT) letztlich die einzige potentiell kurative Behandlungsoption dar (vgl. 1.2.3.). Dies gilt insbesondere in der Hochrisikogruppe, die ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer AML aufweist. Durch das meist fortgeschrittene Alter der Patienten ist eine hSCT jedoch nicht immer eine Option. Somit stehen neben der hSCT für die Behandlung des Hochrisiko-MDS ferner die Behandlung mit hypomethylierenden Agenzien (HMA) sowie mit einer Chemotherapie analog zur Behandlung der AML zur Verfügung (vgl. 1.2.2.2.). Die HMAs Azacytidin und Decitabin werden während der DNA-Replikation anstelle von Desoxycytidintriphosphat in die neu synthetisierte DNA eingebaut. Dadurch wird an diesen Stellen die Methylierung verhindert und die Expression der hier befindlichen Gene, z.B. Gene für Tumorsuppressorproteine, induziert (besprochen in [89, 90]).

1.2.2.2. Behandlung der AML

Die Therapie der AML wird bei physiologisch geeigneten Patienten, i.d.R. mit einer Induktionschemotherapie nach dem „3+7“ Therapieschema, eingeleitet [91]. Bei dieser wird an drei Tagen ein Antrazyklin wie z.B. Daunorubicin und an sieben Tagen Cytarabin (Ara-C) verabreicht. Die eingesetzten Antrazykline interkalieren in die DNA, wodurch die Replikation gehemmt wird. Ferner entstehen reaktive Abbauprodukte,

die DNA-Schäden bewirken können (besprochen in [92-94]). Ara-C wirkt zytostatisch, indem dessen phosphorylierte Form anstelle von Desoxycytidintriphosphat in die DNA eingebaut und dadurch die DNA-Synthese gehemmt wird [95, 96]. Je nach genetischen Besonderheiten wird diese Therapie um weitere Agenzien ergänzt [82]. Sofern im Anschluss an die Induktionschemotherapie kein passender Spender für eine hSCT gefunden wird oder falls ein günstiges Risikoprofil besteht, wird eine Konsolidierungschemotherapie mit hochdosiertem Ara-C durchgeführt [91].

Da jedoch auch bei einer AML mit einer Chemotherapie in der Regel keine Aussicht auf vollständige Heilung besteht, wird bei entsprechendem körperlichen Zustand in der AML meist eine hSCT angestrebt. Zeigt der Patient einen schlechten körperlichen Zustand, wird die AML, ähnlich zum MDS, mit HMAs, niedrig dosiertem Ara-C bzw. lediglich mit supportiven Maßnahmen behandelt.

1.2.3. Allogene hämatologische Stammzelltransplantation im MDS und in der AML

Insbesondere für MDS- und AML-Patienten, die ein ungünstiges Risikoprofil aufweisen, stellt die hSCT die einzig potentiell kurative Behandlungsoption dar. Die Patienten werden mittels einer Konditionierungstherapie auf die hSCT vorbereitet. Das Ziel der Konditionierung ist es, das Knochenmark des Empfängers, inklusive maligner Stammzellen, zu zerstören. Dies stellt sicher, dass sich die anschließend transplantierten hämatopoetischen Stammzellen des Spenders im Knochenmark des Empfängers ansiedeln können, ohne vom Empfängerimmunsystem angegriffen zu werden. Um das Risiko eines Rezidivs zu reduzieren, erfolgt die hSCT optimalerweise zum Zeitpunkt der ersten kompletten Remission, die durch eine vorangegangene Therapie erzielt wurde [97]. Bei der vorbereitenden Konditionierung werden mit einer Kombination aus hochdosierten Zytostatika wie Nukleosidanaloga (Fludarabin, Ara-C), DNA-Interkalatoren (Amsacrin), Alkylanzien (Treosulfan, Bulsufan, Melphalan, Cyclophosphamid) und/oder einer Ganzkörperbestrahlung Blutzellen zerstört (besprochen in [82, 98-101]).

Faktoren, die mit einem erhöhten Rezidiv-Risiko einhergehen, sind u.a. das Vorhandensein einer minimalen Resterkrankung (*minimal residual disease*, MRD) bzw. eines Rezidivs zum Zeitpunkt der hSCT [102-105] sowie ein ungünstiges genetisches Risikoprofil [106-109]. Dahingegen gibt es neben einem günstigen Risikoprofil weitere Faktoren, die mit einem reduzierten Rezidiv-Risiko assoziiert sind. Unter anderem zeigte sich ein reduziertes Rezidiv-Risiko für AML-Patienten, die kurz nach erfolgter hSCT an einer CMV-Replikation litten, obschon sie zugleich eine höhere nicht-Rezidiv bedingte Mortalität aufwiesen [110-114].

1.3. Immuntherapie

Klassische Krebstherapien umfassen die chirurgische Entfernung solider Tumore, Radio- und Chemotherapien sowie im Falle hämatologischer Erkrankungen ggf. eine anschließende Stammzelltransplantation. Diese Therapien können mit schweren Nebenwirkungen einhergehen, da neben dem Tumorgewebe häufig auch gesundes Gewebe zerstört wird.

Neuere Therapieansätze verfolgen daher eine gezieltere Eliminierung maligner Zellen über tumorspezifische Antigene und genetische Besonderheiten des Tumors oder des Patienten [115]. In diesem Zuge gewinnen Immuntherapien in den letzten Jahren an Bedeutung, die auf die (Wieder-)Herstellung eines funktionierenden Immunsystems abzielen. Dies wird auf unterschiedliche Weise realisiert, u.a. durch Immuncheckpointinhibitoren (ICIs), die in einem immer größeren Umfang bei der Krebstherapie eingesetzt werden.

1.3.1. Erschöpftes Immunsystem als Faktor zur Entstehung maligner Erkrankungen

Für die Entstehung und das Fortschreiten maligner Erkrankungen wird eine Reihe von Faktoren genannt, die eine zentrale Rolle spielen können. Einer dieser entscheidenden Faktoren ist das gehäufte Auftreten von vererbten oder erworbenen Mutationen. Diese können mit einer Dysregulation der zellulären Proliferation und Differenzierung, einschließlich der unkontrollierten Teilung und des möglichen Funktionsverlusts der entsprechenden Zelle, einhergehen (zusammengefasst in [116]). Die immense Bedeutung der frühzeitigen Eliminierung von Tumorstammzellen führt zu der Annahme, dass das Fehlen bzw. komplette Ausbleiben einer adäquaten Immunantwort bei der Beseitigung entarteter Zellen ebenfalls einen großen Einfluss auf die Entstehung maligner Erkrankungen haben kann (besprochen in [117]).

Für eine adäquate Immunantwort muss eine entartete Zelle zunächst als solche erkannt werden. Genmutationen, die zu veränderten „selbst“-Peptiden bzw. zu deren veränderter Expression führen, können somit zu einer verstärkten Aktivierung von T- und auch NK-Zellen führen (besprochen in [118, 119]). Haben die Mutationen hingegen keinen Einfluss auf die Präsentation von körperfremden bzw. veränderten „selbst“-Peptiden, kann eine Immunantwort ausbleiben. Des Weiteren kann die anhaltende, dauerhafte Stimulation von zytotoxischen Zellen dazu führen, dass diese keine weitere Immunreaktion auf aktivierende Signale zeigen. In diesem Zusammenhang exprimieren insbesondere T-Zellen vermehrt inhibierende Rezeptoren, wie z.B. den *Programmed Death Receptor 1* (PD1 bzw. PD-1), über den sie mittels entsprechender Liganden funktionell gestört und sogar in Apoptose getrieben werden können. Im Kontext maligner Erkrankungen ist zugleich auch die vermehrte Expression inhibierender Liganden bekannt, wie z.B. den *Programmed*

Death Receptor Ligand 1 (PD-L1) (u.a. in [120-123] zusammengefasst). Für diesen Zustand des Immunsystems bzw. von T-Zellen hat sich der Begriff „erschöpft“ etabliert, wenngleich hier anzumerken ist, dass in der Forschungsgemeinschaft kein klarer Konsens darüber herrscht, was genau eine erschöpfte T-Zelle ausmacht [124].

Ein „Erschöpfungszustand“ ist auch im Kontext von chronisch viralen bzw. bakteriellen Infektionen bekannt. Aufgrund der dauerhaften Antigenstimulation von T-Zellen durch persistierende externe Pathogene scheint sich auch im Immunsystem von chronisch Infizierten ein erhöhter „Erschöpfungszustand“ zu ergeben, der sich ebenfalls in der verstärkten Expression inhibierender Rezeptoren zeigen kann. Dies konnte beispielsweise bei Humanen Immundefizienzvirus (HIV)- [125-127] und chronischen Hepatitis C Virus (HCV)-Infektionen [128, 129] sowie bei Infektionen mit *Helicobacter pylori* [130] und bei *Mycobacterium tuberculosis* [131, 132] beobachtet werden.

Des Weiteren kodieren einige Pathogene für Moleküle, die es ihnen ermöglichen, einer Immunantwort durch Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems zu entgehen. CMV entkommt einer Immunantwort durch T-Zellen, indem es für die Proteine US2, US3, US6 und US11 kodiert, die die Oberflächenexpression von HLA-Molekülen verhindern bzw. deren Degradation induzieren [133-136]. Zugleich kodiert CMV für ein Peptid, UL-40, das HLA-E an der Zelloberfläche stabilisiert [137]. HLA-E ist u.a. der Ligand für den inhibierenden Rezeptor NKG2A. Die verstärkte Expression von HLA-E durch das UL-40 Peptid kann somit vor einer Immunantwort durch NKG2A^{pos} NK-Zellen schützen [138]. Eine chronische virale oder bakterielle Infektion könnte somit zu einem erschöpften Immunsystem beitragen, das den Nährboden für die Entstehung maligner Erkrankungen bereitet.

1.3.2. Immuncheckpointinhibitoren (ICIs)

Zum Schutz vor einer überschießenden Immunreaktion müssen Immunzellen in den verschiedenen Stadien ihrer Differenzierung sogenannte Immuncheckpoints durchlaufen. Zwei dieser Immuncheckpoints sind die Primingphase von T-Zellen und die eigentliche Aktivierung von Immunzellen in der Peripherie.

Während des Primings von T-Zellen führt die Co-Stimulation über CD28 zur Expression des inhibierenden Rezeptors CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4*), der mit höherer Affinität den CD28-Liganden bindet als CD28. Eine extrem starke Stimulation über CD28 während der Primingphase, wie sie bei der Präsentation von körpereigenen „selbst“-Peptiden vorkommt, führt zur Inhibition der T-Zelle, die letztlich anerg wird (besprochen in [139, 140]). Auch bei der späteren Aktivierung von T-Zellen und anderen zytotoxischen Zellen in der Peripherie kann deren Funktion durch die Interaktion von inhibierenden Liganden auf den Zielzellen mit inhibierenden Rezeptoren auf zytotoxischen Zellen eingedämmt werden.

Die Stärke von stimulierenden und inhibierenden Signalen während der Priming- und Aktivierungsphase von zytotoxischen Zellen ist daher von enormer Bedeutung für eine adäquate Immunantwort.

Was in gesunden Individuen zum Schutz vor einer überschießenden Immunreaktion dient, hat sich im Kontext der Immunreaktion gegenüber entarteten Zellen als nachteilig erwiesen. Diverse Studien konnten zeigen, dass ein erschöpftes Immunsystem ein häufiges Charakteristikum von Tumorerkrankungen ist (vgl. 1.3.1.). Die vermehrte Expression von Molekülen, die an Immuncheckpoints beteiligt sind und die die Funktion von zytotoxischen Zellen inhibieren (z.B. PD-L1), ist ein Immunevasionsmechanismus, der in diesem Zusammenhang häufig auftritt, z.B. im Hodgkin Lymphom, Multiplen Melanom und weiteren soliden Tumoren, wie z.B. Ösophaguskarzinom, Magenkarzinom, hepatozellulären Karzinom, Brust- und Urothelkarzinom [121, 141-143]. Immuncheckpointinhibitoren (ICIs) sind Antikörper, die inhibierende Signale während des Primings oder der Aktivierung von T-Zellen in der Peripherie unterbrechen und somit die Funktion der T-Zellen wiederherstellen (vgl. 1.1.2.2.) [118].

Die ersten klinisch erprobten ICIs Ipilimumab und Tremelimumab sind Antikörper gegen CTLA-4. Das erhoffte Ansprechen der anti-CTLA-4 Antikörper gegenüber Tumoren war jedoch teilweise von schweren inflammatorischen Nebenwirkungen begleitet, die vermutlich auf ein vermehrtes Auftreten von autoreaktiven T-Zellen zurückgeführt werden können (besprochen in [118, 144]). Neuere, bereits klinisch erprobte ICIs, haben die PD1/PD-L1-Achse zum Ziel, die vor allem bei der Aktivierung von Effektor T-Zellen eine Rolle spielen. Diese zeigen, zumindest im Einsatz als Monotherapie, weniger Nebenwirkungen als anti-CTLA-4 Antikörper [145]. Insgesamt war der Einsatz von ICIs in verschiedenen Tumorentitäten gegenüber der traditionellen Standardchemotherapie überlegen, sodass ICIs beispielsweise in fortgeschrittenem Melanom und nichtkleinzelligem Lungenkarzinom inzwischen frühere Standardtherapien ersetzen [146-150]. Zuletzt wurden auch NK-Zellen für eine ICI-Therapie ins Visier genommen. Beispielsweise wurde im Plattenepithelkarzinom von Kopf und Hals der anti-NKG2A-Antikörper Monalizumab eingesetzt, um eine NK-Zellinhibition über eine vermehrte Expression von HLA-E zu verhindern [151].

1.3.3. Immuncheckpointinhibitoren im MDS und in der AML

Ein Vorteil von ICIs ergibt sich daraus, dass sie sich auch bei älteren Patienten vergleichsweise sicher zeigen (zusammengefasst in [152, 153]). Dies macht sie zu einer attraktiven möglichen Therapieoption im MDS und in der AML. In der AML berichten mehrere Studien, vor allem im Kontext von Rezidiven, von einem vermehrten Auftreten erschöpfter T-Zellen [154-158]. Eine kombinierte Blockade der PD1/PD-L1- und Tim-3/Galectin-9-Achse führte in Mäusen, denen PD-L1-exprimierende AML-Zellen injiziert wurden, zu einer reduzierten Tumorlast und geringeren Letalität, während eine Monotherapie unzureichend war [159].

Auf Basis dieser Studien wurden bereits eine Reihe von klinischen Phase I- und II-Studien initiiert, die den Erfolg von anti-PD1 und anti-CTLA-4 Antikörper als Monotherapie oder aber in Kombination mit HMAs im Menschen untersuchen (besprochen in [160-162]).

Im Gegensatz dazu befassen sich nur sehr wenige Studien mit Immuncheckpointmolekülen im MDS. Yang und Kollegen berichten von einer anomalen (≥ 2 -fach) Hochregulation der PD-L1-, PD-L2-, PD1- und CTLA-4-mRNA-Transkripte in sortierten CD34^{pos} Knochenmarkzellen bei 34 % der MDS-Patienten. Diese korrelierten des Weiteren mit immunhistochemischen Analysen von Knochenmarksbiopsien. Darüber hinaus konnte eine vermehrte PD-L1-Expression auf hämatopoetischen Stammzellen und eine erhöhte PD1-Expression auf T-Zellen im Zusammenhang mit HMAs auch im MDS festgestellt werden, die für die Therapieresistenz in Patienten mit entsprechendem Phänotyp mitverantwortlich gemacht wird [163]. Auch für MDS wurden erste klinische Studien initiiert, die HMAs mit PD1/PD-L1-Inhibitoren kombinieren. Hier zeigte beispielsweise eine klinische Phase II-Studie in MDS-Patienten nur einen geringen Nutzen einer ICI-Monotherapie, da keiner der zuvor mit HMAs behandelten Patienten eine Antwort auf eine Monotherapie mit Nivolumab (anti-PD1) und lediglich 2 von 9 Patienten eine Antwort auf eine Monotherapie mit Ipilimumab (anti-CTLA-4) zeigten [160, 163-166]. Folglich sind weitere Untersuchungen, die eine bessere Prognose bezüglich eines erfolgreichen Einsatzes von ICIs erlauben, unerlässlich.

1.4. Zielsetzung

Aktuelle Therapieoptionen gegen MDS und AML sind begrenzt. Selbst im Fall der potentiell kurativen hSCT, die hohe Rezidivrate zeigt, kann eine Heilung nicht immer erreicht werden. Alternative Behandlungsansätze werden daher dringend benötigt. Häufig, aber nicht ausschließlich, kann die Entstehung des MDS und der AML auf das Auftreten bestimmter genetischer Veränderungen innerhalb von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen der myeloischen Reihe zurückgeführt werden. Da CMV in der erwachsenen Bevölkerung weltweit eine hohe Prävalenz aufweist, die mit zunehmendem Alter ansteigt, CMV latent in myeloischen Stammzellen persistiert und zudem mit anhaltenden Veränderungen des Immunsystems assoziiert ist, stellt sich die Frage, ob und wie eine CMV-Infektion die Erkrankungen AML bzw. MDS beeinflusst.

Neben einem direkten Einfluss des latenten Virus auf hämatopoetische Stammzellen ist auch ein Einfluss von CMV auf das Immunsystem denkbar. So hat CMV einige Mechanismen entwickelt, einer zellulären Immunantwort durch T- und NK-Zellen zu entgehen. Beispielsweise wurde neben der Degradierung von HLA-Molekülen durch virale Proteine zum Schutz vor T-Zellen (vgl. 1.3.1.) auch die Hochregulation des inhibitorischen Liganden PD-L1 auf der Oberfläche von CMV-infizierten DCs im Mausmodell beschrieben [167]. Dies kann zu einer verminderten zellulären Immunantwort durch erschöpfte T- und NK-Zellen beitragen. Daher soll zunächst der Frage nach dem „Erschöpfungszustand“ des Immunsystems von MDS- und AML-Patienten nachgegangen werden. Immuntherapien, die auf die Optimierung bzw. die Wiederherstellung der Immunzellfunktionalität gegenüber Krebszellen abzielen, sind ein relativ neuer und vielversprechender Ansatz. In der Literatur herrscht großer Konsens darüber, dass in AML verschiedene Immuncheckpointmoleküle (ICM) auf T-Zellen und myeloischen Stammzellen, insbesondere während eines Rezidivs, erhöht sind. Im Gegensatz dazu wurden erst wenige Studien mit ähnlicher Thematik im MDS durchgeführt (vgl. 1.3.3.). Diese beschäftigen sich vor allem mit deren erhöhter Expression im Zusammenhang mit HMAs. Insgesamt macht die vorliegende Datenlage jedoch eine klare Empfehlung für oder wider den Einsatz von ICI im MDS schwer. Daher beschäftigt sich ein Teil dieser Arbeit mit der vergleichenden *ex vivo* Untersuchung von verschiedenen BM und PB Zellpopulationen im MDS und in der AML, mit besonderem Fokus auf der Expression von ICMs.

Andererseits berichten verschiedene Publikationen im Zusammenhang von wiederkehrenden, akuten CMV-Replikationsereignissen von einem reduzierten Rezidiv-Risiko für AML hSCT-Empfänger. Diese Patienten zeigen jedoch zugleich ein erhöhtes Risiko, an CMV-bedingten Organschäden zu versterben (vgl. 1.2.3.). Die Aufklärung der Mechanismen, die dem reduzierten Rezidiv-Risiko zugrunde liegen, könnte zu der Entwicklung von Therapien beitragen, die die vorteilhaften Effekte einer CMV-Reaktivierung nutzt, ohne zugleich die nachteiligen Effekte herbeizuführen. Eine CMV-Infektion ist beispielsweise mit der Expansion

von NK-Zellen assoziiert, die den aktivierenden Rezeptor NKG2C exprimieren. Zugleich kodiert CMV jedoch für ein Peptid, das den NKG2C-Liganden HLA-E an der Oberfläche stabilisiert (vgl. 1.1.2.1. und 1.3.1.) und somit NKG2C^{pos} NK-Zellen aktivieren kann. Daher soll ein weiterer Teil dieser Arbeit die Effekte, die durch eine CMV-Replikation hervorgerufen werden, untersuchen, mit besonderem Fokus auf die NK-Zell/Tumorzell-Interaktion.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit können dazu beitragen, sowohl für die Erstlinientherapie als auch für die Behandlung nach Therapieversagen dringend benötigte neue, individuelle Behandlungsoptionen und vorhandene Therapien zu entwickeln bzw. zu optimieren.

II. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Verbrauchsmaterialien

Funktion	REF	Hersteller
T-25 Zellkulturflasche	10288990	Thermo Fisher Scientific
T-75 Zellkulturflasche	15360591	Thermo Fisher Scientific
T-175 Zellkulturflasche	83.3912.002	Sarstedt
1,5 mL Reagiergefäß	72.706.400	Sarstedt
2,0 mL Reagiergefäß	0030120094	Eppendorf
Filter Spitzen (TipOne®)		Starlap
10/20 µL	S1120-3810	
200 µL	S1120-8810	
1000 µL	S1122-1830	
Serologische Pipetten (Stripette)		Corning® Costar®
5 mL	CLS4487	
10 mL	CLS4488	
25 mL	CLS4489	
100 µm Zellsieb	352360	Falcon®
6-well Zellkulturplatte (Flachboden)	Z707767	Sigma-Aldrich
12-well Zellkulturplatte (Flachboden)	92412	TPP
24-well Zellkulturplatte (Flachboden)	CLS3524	Corning® Costar®
48-well Zellkulturplatte (Flachboden)	677180	Greiner Bio-One
96-well Zellkulturplatte (Rundboden)	10062-902	VWR
FACS Röhrchen	55.1579.002	Sarstedt

Funktion	REF	Hersteller
15 mL Zentrifugenröhrchen	62.554.502	Sarstedt
50 mL Zentrifugenröhrchen	62.547.254	Sarstedt
50 mL Leukosep™ Röhrchen	227290	Greiner Bio-One

2.1.2. Chemikalien, Puffer und gebrauchsfertige Lösungen

Bezeichnung	REF	Hersteller
BD FACS Clean	BD 340345	Fisher scientific
BD FACS Flow	BD 342003	Fisher scientific
BD FACS Rinse	BD 340346	Fisher scientific
Biocoll Separating Solution (Ficoll)	L6113	Biochrom
Brilliant Stain Buffer	566349	BD Horizon™
Dimethylsulfoxid (DMSO)	4720.2	Carl Roth
eBioscience™ intrazellulärer Fixierpuffer	00-8222	Invitrogen™
eBioscience™ Permeabilisierungspuffer	00-8333	Invitrogen™
EDTA (0,5 M)	AM9261	Invitrogen™
Lyse-Puffer pH 7,4 (isotone Ammoniumchlorid-Lösung)		Apotheke des Universitäts- klinikums Düsseldorf
Ammoniumchlorid	8,29 mg	
Kaliumhydrogencarbonat	1,00 mg	
Na-EDTA	0,0375 mg	
Wasser für Injektionszwecke	ad 1,00 mL	
Tween 20	P1379	Sigma-Aldrich

2.1.3. Gebrauchsfertige, kommerziell erhältliche Kits

Bezeichnung	REF	Hersteller
Anti-Biotin MicroBeads UltraPure	130-105637	Miltenyi Biotec
CD3-Biotin - functional grade, human (OKT3)	130-093-377	Miltenyi Biotec
LEGENDplex™ Human Inflammation Panel 1 (13-plex)	740809	BioLegend
LEGENDScreen™ Human PE Kit	700007	BioLegend
NK Cell Isolation Kit, human	130-092-657	Miltenyi Biotec
RNeasy® Plus Micro Kit	74034	QIAGEN

2.1.4. Medien, Puffer und Zusätze für die Zellkultur

Bezeichnung	REF	Hersteller
Brefeldin A (BFA) [10 mg/mL]	B5936	Sigma-Aldrich
<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> (DPBS)	14190	Gibco™
IFN γ [100 U/ μ L]	11500	Pbl assay science
R10 bzw. R20 Medium		
RPMI 1640	218750	Gibco™
10 % (R10) bzw. 20 % (R20) FCS superior	S0615	Sigma Aldrich
1 % HEPES Puffer (1M)	15615	Gibco™
1 % Penicillin Streptomycin	15140	Gibco™
10 000 U/mL Penicillin		
10 000 μ g/mL Streptomycin		

2.1.5. Fluoreszenzgekoppelte Antikörper

Sämtliche Antikörper wurden zuvor auf die optimale Konzentration titriert und wie in der Liste bzw. im Panel angegeben, eingesetzt.

Spezifität	Fluoreszenzfarbstoff	Klon	Menge [x/100 µL]	REF	Hersteller
Bw4	FITC	REA274	1,0 µL	130-103-846	Miltenyi Biotec
CCR7	BV421	G043H7	1,0 µL	353207	BioLegend®
CD3	Alexa Flour 700	HIT3a	0,1 µL	300324	BioLegend®
CD3	BV510	OKT3	1,0 µL	317332	BioLegend®
CD3	BV650	SK7	0,5 µL	563999	BD Horizon™
CD3	eFlour 450	OKT3	2,0 µL	48-0037	eBioscience™
CD3	PE-Cy5	HIT3a	1,0 µL	300310	BioLegend®
CD3	PerCP-Cy5.5	OKT3	1,0 µL	45-0037	eBioscience™
CD4	Alexa Flour 700	RPA-T4	1,0 µL	56-0049	eBioscience™
CD4	BV786	RPA-T4	0,5 µL	740962	BD OptiBuild™
CD8	APC-Fire750	RPA-T8	0,25 µL	301066	BioLegend®
CD8	BV650	RPA-T8	0,2 µL	301042	BioLegend®
CD8	eFlour 450	RPA-T8	1,0 µL	48-0088	eBioscience™
CD8	FITC	RPA-T8	1,0 µL	11-0088	eBioscience™
CD8	PE-Cy7	RPA-T8	1 zu 32 µL	301012	BioLegend®
CD8	PerCP-Cy5.5	RPA-T8	0,25 µL	45-0088	eBioscience™
CD13	BV711	WM15	0,5 µL	301722	BioLegend®
CD14	BV510	M5E2	2,0 µL	301842	BioLegend®
CD14	BV605	63D3	0,5 µL	367126	BioLegend®
CD14	eFlour 450	61D3	2,0 µL	48-0149	eBioscience™

Spezifität	Fluoreszenzfarbstoff	Klon	Menge [x/100 µL]	REF	Hersteller
CD14	eFlour506	61D3	0,5 µL	69-0149	eBioscience™
CD14	PerCP-Cy5.5	61D3	2,0 µL	45-0149	eBioscience™
CD16	APC-Cy7	B73.1	2,0 µL	360710	BioLegend®
CD16	BV605	3G8	2,0 µL	563172	BD Horizon™
CD16	BV785	B73.1	0,5 µL	360734	BioLegend®
CD16	ECD	3G8	2,0 µL	B49216	Beckman Coulter
CD19	BV510	H1B19	0,25 µL	302242	BioLegend®
CD19	BV605	SJ25C1	0,5 µL	562653	BD Horizon™
CD19	eFlour 450	SJ25C1	2,0 µL	48-00198	eBioscience™
CD19	eFlour506	H1B19	0,5 µL	69-0199	eBioscience™
CD19	PerCP-Cy5.5	SJ25C1	2,0 µL	45-0198	eBioscience™
CD27	BV510	L128	0,5 µL	563092	BD Horizon™
CD31	PE/Dazzle594	WM59	0,25 µL	303130	BioLegend®
CD34	APC	4H11	2,0 µL	17-0349	eBioscience™
CD38	APC-eFlour 780	HIT2	2,0 µL	47-0389	eBioscience™
CD38	PE	HB-7	0,125 µL	356604	BioLegend®
CD38	PE-Cy5	HIT2	2,0 µL	15-0389	eBioscience™
CD39	BV711	A1	0,25 µL	328228	BioLegend®
CD43	PE	REA833	0,003 µL	130-114-593	Miltenyi
CD45	PE-Cy5	HI30	0,5 µL	304010	BioLegend®
CD45RA	APC	HI100	2,0 µL	17-0458	eBioscience™
CD45RA	PE-Cy7	HI100	0,5 µL	25-0458	eBioscience™
CD47	PerCP-Cy5.5	CC2C6	1,0 µL	323110	BioLegend®

Spezifität	Fluoreszenzfarbstoff	Klon	Menge [x/100 µL]	REF	Hersteller
CD49e	FITC	REA686	0,5 µL	130-110-534	Miltenyi Biotec
CD56	APC	TULY56	0,5 µL	17-0566	eBioscience™
CD56	BV605	HCD56	2,0 µL	318334	BioLegend®
CD56	BV650	HCD56	2,0 µL	318344	BioLegend®
CD56	FITC	TULY56	1,0 µL	11-0566	eBioscience™
CD56	PE-Cy7	CMSSB	2,0 µL	25-0567	eBioscience™
CD56	Super Bright 702	TULY56	2,0 µL	67-0566	eBioscience™
CD62L (SELL)	BV650	DREG-56	1,0 µL	304832	BioLegend®
CD84	APC	CD84.1.21	0,5 µL	326010	BioLegend®
CD95 (FAS)	PE/Dazzle 594	DX2	1,0 µL	305634	BioLegend®
CD107a	PE-Cy7	H4A3	2,0 µL	561348	BD Pharmingen™
CD119	APC	REA161	2,0 µL	130-125-846	Miltenyi Biotec
CD123	PE	6H6	1,0 µL	12-1239	eBioscience™
CD258 (LIGHT)	PE-Cy7	T5-39	1,0 µL	318708	BioLegend®
CTLA-4	PerCP-Cy5.5	BNI3	2,0 µL	369608	BioLegend®
CXCR4	BV605	12G5	0,5 µL	306522	BioLegend®
Granzym B	APC/Fire750	QA16A02	1,0 µL	372210	BioLegend®
Granzym B	PE-Dazzle 594	QA16A02	5,0 µL	372216	BioLegend®
HLA-C	BV711	DT-9	2,0 µL	747594	BD OptiBuild™
HLA-E	PE-Cy7	3D12	2,0 µL	342608	BioLegend®
HLA-E	PerCP-Cy5.5	3D12	1,0 µL	342610	BioLegend™
ICOS	BV711	C398.4A	1,0 µL	313548	BioLegend®
IFN γ	PerCP-Cy5.5	4S.B3	3,0 µL	45-7319	eBioscience™

Spezifität	Fluoreszenzfarbstoff	Klon	Menge [x/100 µL]	REF	Hersteller
KLRG1	PE	REA261	5,0 µL	130-103-638	Miltenyi Biotec
NKG2A	Alexa Flour 700	S19004C	1,0 µL	375120	BioLegend®
NKG2A	APC	Z199	5,0 µL	A60797	Beckman Coulter
NKG2A	FITC	REA110	2,0-3,0 µL	130-098-818	Miltenyi Biotec
NKG2C	BV421	134591	0,25 µL	748169	BD OptiBuild™
NKG2C	PE	#1234591	5,0 µL	FAB138P	R&D Systems
NKG2D	Vio Bright B515	REA797	2,0 µL	130-111-647	Miltenyi Biotec
PD-1	BV786	MIH4	5,0 µL	741018	BD OptiBuild™
PD-L1	PerCP-eFlour 710	MIH5	2,0 µL	46-5983	eBioscience™
Perforin	BV711	dG9	5,0 µL	308130	BioLegend®
Siglec-7 (CD328)	PerCP-Cy5.5	6-434	0,5 µL	339216	BioLegend®
TCR γ/δ	PE-Dazzle 594	B1	2,0 µL	331226	BioLegend®
Tim-3	PE-Cy7	F38-2E2	2,0 µL	25-3109	eBioscience™
TRAIL R2	APC	#71908	10,0 µL	FAB6311A	R&D Systems

2.1.6. Weitere Agenzien für den Einsatz in der Durchflusszytometrie

Bezeichnung	Einsatzmenge	REF	Hersteller
Annexin V, Alexa Flour 680 Konjugat	1 zu 50	A35109	Invitrogen™
CellEvent™ Caspase 3/7 Green Flow Cytometry Kit		C10427	Invitrogen™
CellEvent™ Caspase 3/7 Detection Reagent	1 zu 5 000		
SYTOX™ AADvanced dead cell stain	1 zu 10 000		
Fixable Viability Dye eFlour 506	1 zu 1000	65-0666	eBioscience™
Fixable Viability Dye eFlour 780	1 zu 5000	65-0865	eBioscience™
Tag-it Violet™ Proliferation and Cell Tracking Dye	1 zu 2000	425101	BioLegend®

2.1.7. Humane Zelllinien

2.1.7.1. MONO-MAC-6 (MM6)-Zellen

MONO-MAC-6 (MM6)-Zellen wurden 1985 von einem 64-jährigen Mann mit einer AML des FAB-Subtyps M5 isoliert [168]. Dieser Subtyp zeichnet sich durch eine fast vollständige Verdrängung des Knochenmarks durch Monoblasten bzw. Monozyten aus [81]. Die Zellen wurden in R20-Medium kultiviert und wöchentlich zweimal im Verhältnis 1 zu 5 passagiert.

2.1.7.2. HL-60-Zellen

Die AML-Zelllinie HL-60 wurde 1976 aus einer 35-jährigen Frau mit AML des FAB-Subtyps M2 isoliert [169]. Dieser Subtyp zeichnet sich durch das Vorhandensein von mind. 50 % Myeloblasten bzw. Promyelozyten aus [81]. Die Zellen wurden in R10-Medium kultiviert und wöchentlich zweimal im Verhältnis 1 zu 10 passagiert.

2.1.7.3. THP-1-Zellen

Die AML-Zelllinie THP-1 wurde 1978 aus einem 1-jährigen Jungen mit akuter monozytischer AML isoliert [170]. Die Kultivierung von THP-1 erfolgte analog zu HL-60 in R10-Medium.

2.1.7.4. K562-Zellen

K562-Zellen wurden 1970 aus einer 53-jährigen Frau mit einer chronischen myeloischen Leukämie (CML) isoliert [171]. K562-Zellen sind HLA-Klasse I defizitär [172], wodurch sie NK-Zellen über verschiedene Signalwege stimulieren können. Die Kultivierung von K562 erfolgte analog zu HL-60-Zellen in R10-Medium.

2.1.8. Patientenmaterial

Peripheres Blut (PB), Blutplasma und Knochenmark (*Bone Marrow*, BM) von Patienten mit hämatologischen Grunderkrankungen wurden durch die Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie des Universitätsklinikums Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Das schriftliche Einverständnis zur Teilnahme an der Studie (Studiennummer/Ethikvotum: 3768, 3973 und 2020-1222) wurde zuvor eingeholt. Die Diagnose eines MDS bzw. einer AML inklusive des Subtyps, Krankheitsstatus zum Zeitpunkt der Probenahme sowie weitere klinische Parameter wurden routinemäßig durch die Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie des Universitätsklinikums Düsseldorf erhoben und in Form von Arztbriefen dem Institut für Virologie zugänglich gemacht. Eine detaillierte Auflistung aller untersuchten Proben ist im Anhang unter 5.4., Tabelle 20, zu finden.

Als „gesunde“ Kontrollen für eine vergleichende Knochenmarksuntersuchung diente BM von Patienten mit hämatologischen Grunderkrankungen, die aufgrund dieser eine hSCT erhalten haben und seit über 6 Monaten durchgängig in Remission waren. Ferner zeichneten sich diese Proben dadurch aus, dass Infektionen mit folgenden Viren ausgeschlossen wurden: Humanes Immundefizienzvirus (HIV), Hepatitis B Virus (HBV) und Hepatitis C Virus (HCV). Ausgeschlossen wurden außerdem ein hypo- oder hyperzelluläres BM, reaktives oder toxisches BM, Mutationen, die dem initialen Immunphänotyp bei Diagnosestellung entsprachen, grenzwertiger Blastenanteil von 5 % und höher sowie rezidivierende *Graft versus Host Disease* (GvHD),

letztere zusammengefasst unter „unklarer Status“ (vgl. Anhang, Tabelle 20). Diese Kriterien sollten sicherstellen, dass das Knochenmark der Kontrollen weitestgehend dem Knochenmark von gesunden Individuen entsprach.

Für die funktionelle Analyse von NK-Zellen aus CMV-positiven Individuen wurden ferner PBMCs aus *Buffy Coats* isoliert, die von der Blutspendezentrale des Universitätsklinikums Düsseldorf zur Verfügung gestellt wurden. Die Untersuchungen dieser Proben wurden ebenfalls durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität geprüft und bewilligt (Ethikvotum: 2018-131-KFogU).

2.1.9. Zytomegalievirusstock – TB40-GFP

Für die Infektion von AML-Zellen wurde ein an „Grün Fluoreszierendes Protein“ (GFP)-gekoppelter humaner CMV-Virusstock genutzt, der freundlicherweise von Prof. Dr. Albert Zimmermann, Institut für Virologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, zur Verfügung gestellt wurde. Der Virusstock wurde vom TB40/E-BAC4 Vektor rekonstituiert, der für den endotheliotropen humanen CMV-Virusstamm TB40/E kodiert [173]. Das GFP wird über einen *elongation factor 1* Promoter innerhalb der bakteriellen Sequenzanteile exprimiert, sodass hierfür die CMV-Gensequenz nicht verändert wurde. Der verwendete Virusstock hatte eine Konzentration von 10^8 PFU/mL.

2.1.10. Geräte und sonstige Hilfsmittel

Funktion	Modell	Hersteller
Heizblock	Thermomixer Comfort	Eppendorf
Spektralphotometer	Nanodrop 2000	Thermo Fisher Scientific
Tischzentrifuge (Kleinvolumen)	Centrifuge 5417R	Eppendorf
Blutbild Analysegerät	Sysmex XP-300	Sysmex Corporation
Durchflusszytometer	LSRFortessa	BD
Wasserbad	3044	Köttermann
Tischzentrifuge (kühlbar) für Großvolumen und Zellkulturplatten	MEGAFUFE 40R	Heraeus

Funktion	Modell	Hersteller
CO ₂ Inkubator	BBD 6220	Heraeus
Gefrierbehälter	Mr. Frosty	Thermo Fisher Scientific

2.1.11. Software und Analysetools im Internet

Folgende Software und Tools wurden für die Datenanalyse und Illustrationen verwendet.

Name	Hersteller	Nutzung
FlowJo Version 10.5.3	FlowJo, LLC, Ashland, USA	Phänotypische und funktionelle Analyse von Zellpopulationen aus durchflusszytometrischen Daten mittels klassischen Gatings und t-SNE
LEGENDplex 8.0	VigeneTech Inc., Carlisle, USA	Zytokin-Quantifizierung durchflusszytometrischer Daten aus LEGENDplex assays
GraphPad Prism 8.4.0	GraphPad Software, San Diego California, USA	Statistische Analyse von FlowJo und LEGENDplex Daten
biorender.com	BioRender, Toronto Ontario, Canada	Illustrationen
GORilla: http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il/		<i>GO-Term Enrichment</i> Analyse und Visualisierungstool [174, 175], Analyse der RNA-Sequenzdaten (Target und Referenzliste)
g:Profiler – g:GOST: https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost		<i>GO-Term Enrichment</i> Analyse Tool [176], Analyse der LEGENDScreen Daten (ausschließlich mit Targetliste)
REVIGO: http://revigo.irb.hr/		Tool zur Reduktion redundanter <i>GO-Terms</i> und Visualisierungstool [177]
https://www.deepl.com/translator		Übersetzung

2.2. Methoden

2.2.1. Isolation von mononukleären Zellen aus peripherem Blut (PBMCs) und Blutprodukten mittels Dichtegradientenzentrifugation

Die Isolation von mononukleären Zellen aus peripherem Blut (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMCs) erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation, angelehnt an das Protokoll von Böyum 1968 [178]. Zunächst wurden 15 mL Ficoll-Lösung in ein Leukosep™ Röhrchen überführt. Durch Zentrifugieren des Röhrchens für eine Minute bei 200 g durchdrang die Lösung die in den Leukosep™ Röhrchen enthaltene Membran. Anschließend wurde das Blut mit DPBS im Verhältnis 1 zu 2 verdünnt und über die Membran der Leukosep™ Röhrchen geschichtet. Durch Zentrifugieren für 10 min bei 1100 g sammelten sich die PBMCs entsprechend ihrer Dichte in einer Grenzschicht zwischen Blutplasma und Ficoll-Lösung, während die mit der Ficoll-Lösung koagulierten Erythrozyten und Granulozyten unterhalb der Ficoll-Lösung und unterhalb der Membran zu finden waren. Die PBMCs wurden anschließend in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt und zweimal mit DPBS gewaschen. Die Waschschrte wurden für 7 min bei 200 g durchgeführt. Die isolierten PBMCs wurden anschließend entweder direkt für phänotypische bzw. funktionelle Analysen verwendet oder cryokonserviert. Zur Cryokonservierung wurden die Proben in FCS superior, versetzt mit 10 % DMSO, zunächst in einem Gefrierbehälter auf -80 °C vorgekühlt und anschließend in Flüssigstickstoff (-190 °C) überführt.

2.2.2. Isolation von weißen Blutzellen (WBCs) aus Blut und Knochenmarksaspiraten mittels Erythrozytenlyse

Um eine vollständige Analyse aller weißen Blutzellen (*White Blood Cells*, WBCs) vornehmen zu können, wurde bei Probenmaterial von Patienten mit hämatologischen Grunderkrankungen eine Lyse mit isotoner Ammoniumchlorid-Lösung durchgeführt, um Erythrozyten aus der Zellsuspension zu entfernen. Sowohl Peripheres Blut (PB) als auch Knochenmark (BM) wurde in EDTA beschichteten Röhrchen bzw. Spritzen bis zur Isolation der WBCs oder bis zur Entnahme des Blutplasmas aufbewahrt. Die Isolation erfolgte spätestens am zweiten Tag nach Probenentnahme. WBCs wurden isoliert, indem ein Teil PB bzw. BM mit zehn Teilen Lysepuffer versetzt und für 10 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert wurde. Die Zellen wurden anschließend für 5 min bei 500 g pelletiert, in DPBS resuspendiert und zweimal mit DPBS gewaschen. Die isolierten WBCs wurden anschließend entweder direkt für phänotypische bzw. funktionelle Analysen verwendet oder cryokonserviert (vgl. 2.2.1.).

2.2.3. Phänotypische und funktionelle Charakterisierung von Blut- und Knochenmarkszellen mittels Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie erlaubt die Charakterisierung einzelner Zellen aus einer Zellsuspension. Dazu werden die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom vereinzelt und mit Licht bestrahlt. Aufgrund der Seitwärtsstreuung (*Side Scatter*, SSC) des Lichts erhält man Informationen zur Granularität und anhand der Vorwärtsstreuung (*Forward Scatter*, FSC) Informationen zur Größe einer Zelle. Zusätzlich können Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt werden, die an Antikörper oder Moleküle gekoppelt sind, die spezifische Strukturen auf oder in den Zellen binden und somit deren Vorhandensein signalisieren. Durch den Einsatz von Lasern, die verschiedene Wellenlängen (λ) emittieren, und Filtern, die nur Licht bestimmter Wellenlängen passieren lassen, können bei dem in dieser Arbeit genutzten Durchflusszytometer (LSRFortessa, BD) bis zu 16 Farbstoffe kombiniert eingesetzt werden. Dies lässt eine detaillierte Charakterisierung der PB- und BM-Zellpopulationen zu.

2.2.3.1. Aufbereitung von Zellen für die Durchflusszytometrie

Die zu analysierenden Zellen wurden, sofern cryokonserviert, zunächst im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, in DPBS überführt und bei 200 g für 7 min pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in DPBS resuspendiert und die Zellzahl am Sysmex bestimmt. Für eine Analyse wurden i.d.R. 10^6 Zellen in FACS-Tubes oder in eine Kavität einer 96-well U-Bottom Platte vorgelegt. Die Zellen wurden mit DPBS gewaschen, und tote Zellen wurden für 15 min bei RT mit einem Viabilitätsfarbstoff angefärbt. Anschließend wurden die Zellen mit DPBS gewaschen und bei 500 g für 5 min pelletiert. Es folgte die Färbung von extrazellulären Molekülen für 15 min bei RT. Der Mastermix, mit dem die Zellen gefärbt wurden, wurde in einer 1 zu 2 Verdünnung des Brilliant Stain Buffers angesetzt, um eine Polymerisierung von Brilliant Violet-Farbstoffen zu unterbinden. Nach der Färbung wurden die Zellen erneut gewaschen und anschließend für 10 min bei RT bzw. bei der Analyse von WBCs von AML- und MDS-Patienten über Nacht bei 4 °C in eBioscience™ intrazellulärer Fixierpuffer fixiert. Wurden ausschließlich extrazelluläre Moleküle analysiert, wurde der anschließende Waschschrift in DPBS durchgeführt und die Zellen danach in 100 μ L DPBS aufgenommen. Erfolgte jedoch auch eine Analyse von intrazellulären Molekülen, wurden die Zellen zweimal in eBioscience™ Permeabilisierungspuffer gewaschen. Intrazelluläre Moleküle wurden dann für 15 min bei RT gefärbt. Der Antikörper-Mastermix wurde hierzu in eBioscience™ Permeabilisierungspuffer angesetzt. Es erfolgten ein finaler Waschschrift mit DPBS und die Aufnahme der Zellen in 100 μ L DPBS. Die gefärbten Zellen wurden schließlich mittels Durchflusszytometer analysiert.

Die für die verschiedenen phänotypischen und funktionellen Analysen verwendeten fluoreszenzgekoppelten Antikörper bzw. Molekülkombinationen sind im Anhang unter 5.1 bis 5.3. aufgeführt.

2.2.3.2. Funktionelle Untersuchung der NK-Zellantwort auf AML-Zellen – *in vitro* „killing assay“

Um zu evaluieren, wie NK-Zellen von CMV-positiven (CMV_{pos}) Individuen zum verringerten Risiko eines Rezidivs in hSCT-Empfängern mit CMV-Reaktivierung beitragen können, wurden PBMCs mit den AML-Zelllinien HL-60 und MM6 stimuliert und die Funktionalität von NK-Zellen anhand Granzym B- und Perforin-Induktion bzw. -Ausschüttung determiniert.

Die zu untersuchenden Zellen wurden zunächst wie unter 2.2.3.1. beschrieben aufgetaut, auf 2×10^6 Zellen/mL in R10-Medium eingestellt und für mindestens 16 h bei 37 °C ruhen gelassen. Die AML-Zellen wurden für den gleichen Zeitraum auf eine Konzentration von 5×10^5 Zellen/mL in R10-Medium eingestellt und entweder ruhen gelassen oder mit 100 U/mL IFN γ stimuliert. Anschließend wurden die zu untersuchenden Zellen in verschiedenen Effektor zu Target Verhältnissen mit den AML-Zellen für verschiedene Zeiträume stimuliert. Die Reaktionsansätze enthielten ferner Antikörper, die gegen den Degranulationsmarker CD107a gerichtet waren. Abhängig vom Versuchsaufbau wurde den Reaktionsansätzen 10 ng/mL Brefeldin A (BFA) zugesetzt, um die Induktion von Granzym B und Perforin analysieren zu können. Die eingesetzten Effektor zu Target-Verhältnisse sowie Stimulationszeiträume sind an der entsprechenden Stelle im Ergebnisteil vermerkt. Nach erfolgter Stimulation wurden die Granzym B- und Perforin-Level in NK-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

2.2.3.3. Analyse durchflusszytometrischer Daten mittels manuellem Gating und unsupervised clustering

Manuelles Gating

Das sogenannte „Gating“ ist ein wichtiges Instrument in der Analyse von durchflusszytometrischen Daten. Mittels Gating identifiziert man aus der Gesamtheit aller Zellen diejenigen, die näher betrachtet werden sollen. Beim manuellen, hierarchischen Gating werden sukzessive nur die Zellen für die weitere Analyse eingeschlossen („gated“), die von Interesse sind. Dabei macht man es sich zu Nutze, dass bestimmte Moleküle ausschließlich von einem oder wenigen Zelltypen exprimiert werden. So können beispielsweise T-Zellen gezielt über CD3 und B-Zellen gezielt über CD19 identifiziert werden. Manuelles Gating wurde

sowohl für die phänotypische Charakterisierung von Zellpopulationen als auch für die Analyse funktioneller Assays angewandt.

Unsupervised clustering

Manuelle Gatingstrategien haben einige entscheidende Nachteile. Durch den sukzessiven Ausschluss bestimmter Zellpopulationen gehen diese für die Analyse der nächsten Hierarchiestufe „verloren“. Außerdem benötigt man beim manuellen Gating bereits ein profundes Vorwissen bezüglich der zu erwartenden Proteinexpression der untersuchten Zellpopulationen. Ferner kann man i.d.R. nur zwei Moleküle gleichzeitig betrachten. Dies ist insbesondere bei der Analyse von hochdimensionalen durchflusszytometrischen Daten kritisch. Diese Nachteile können jedoch durch die Anwendung von *unsupervised Clustering* Methoden, wie u.a. dem in dieser Arbeit genutzten *t-distributed stochastic neighbor embedding* (t-SNE) Algorithmus, minimiert werden [179].

Der t-SNE Algorithmus clustert Datenpunkte (hier Zellen) mit ähnlichen Eigenschaften in einem zwei- oder dreidimensionalen Raum visuell eng beieinander, während Datenpunkte, die sich stark unterscheiden, in diesem Raum weit voneinander entfernt dargestellt werden. Die „Ähnlichkeit“ von Zellen ergibt sich aus der Expressionsstärke der untersuchten Moleküle sowie durch Größen- und Granularitätsunterschiede der Zellen, die über die Fluoreszenzintensität der gefärbten Moleküle bestimmt bzw. über FSC und SSC ermittelt werden. Aufgrund ähnlicher Oberflächenexpression clustern somit Zellen eines bestimmten Zelltyps (z.B. CD8 T-Zellen) eng zusammen, ohne zuvor manuell gated worden zu sein (vgl. Abbildung 5). Es können aber auch solche Zellen clustern, die aufgrund der Expression von bestimmten Molekülen, wie z.B. Granzyme, ähnliche Funktionen ausüben können, beispielsweise CD8 T-Zellen und CD56^{dim} NK-Zellen. In dieser Arbeit sollten vornehmlich T- und NK-Zellen analysiert werden. Dazu wurden u.a. die WBCs von AML-Patienten vergleichend mit denen von gesunden Probanden untersucht. Die t-SNE Analyse wurde mit FlowJo, Version 10.5.3, durchgeführt. Dazu wurde der Datensatz zunächst um die Zellen bereinigt, die für die gewünschte Analyse irrelevant waren. Dazu zählte der Ausschluss von Dubletten (FSC-A gegen FSC-H) und toten Zellen sowie CD34^{pos}-Stammzellen, um den Fokus auf T- und NK-Zellen zu richten. Die Daten jeder Probe wurden anschließend reduziert (plugin „Downsample“) und alle Proben zu einer Datei zusammengefasst (plugin „Concatenate“). Nachfolgend wurde mit dem so präparierten Datensatz der t-SNE Algorithmus mit den Standardeinstellungen ausgeführt. Zur Identifizierung von Zellpopulationen, die im gegebenen Kontext einen Einfluss haben könnten, wurden nun die t-SNE Grafiken der untersuchten Gruppen (z.B. gesunde und erkrankte Probanden) verglichen und Populationen, die auffällige Unterschiede zwischen den Gruppen aufwiesen, näher untersucht.

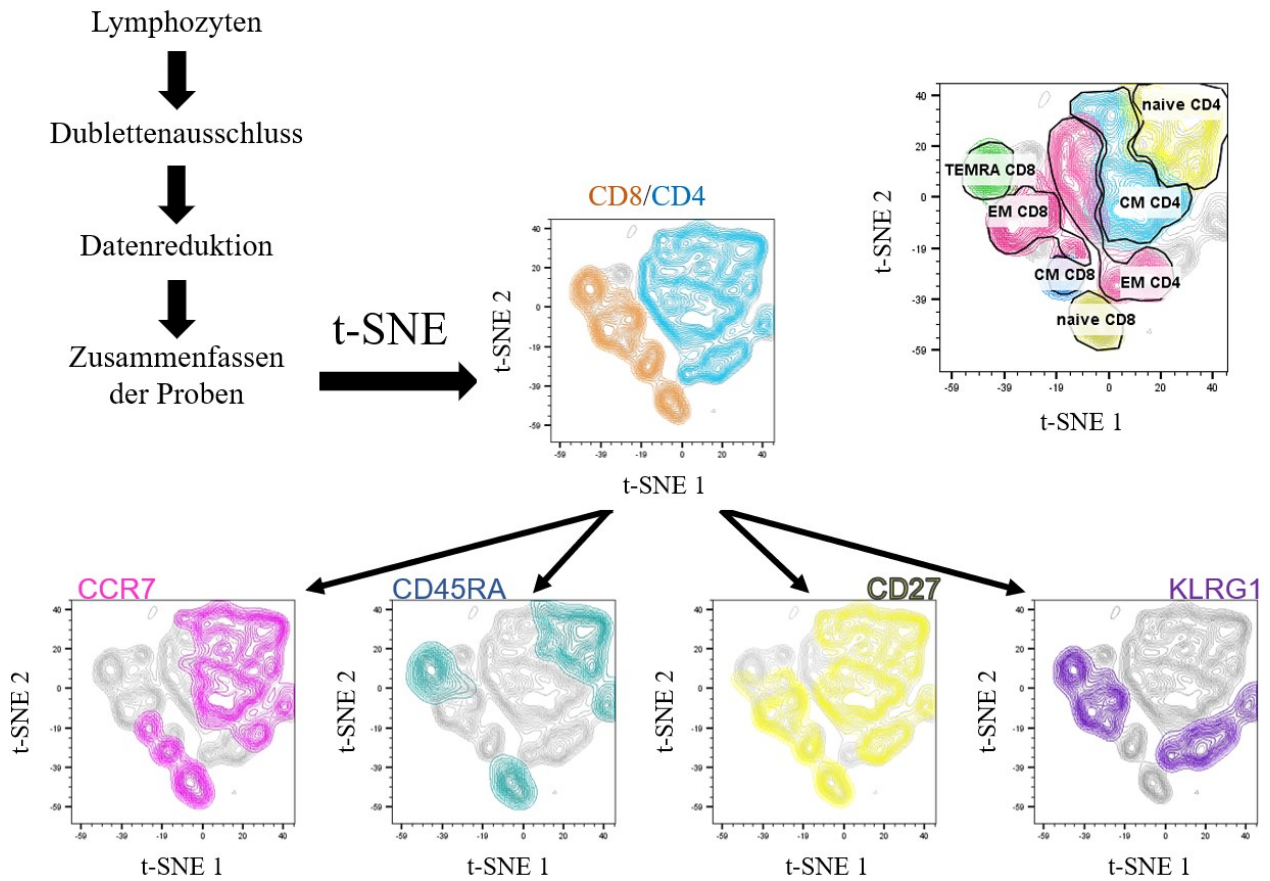


Abbildung 5 Workflow der Analyse durchflusszytometrischer Daten mittels t-SNE

Bei der t-SNE Analyse werden hochdimensionale Daten in einem zweidimensionalen Raum dargestellt. Dazu wird der Datensatz zunächst um unerwünschte Zellen, wie Dubletten, bereinigt, die Datenmenge pro Probe reduziert (plugin „Downsample“) und alle zu analysierenden Proben zu einer Datei zusammengefasst. Anschließend wird der Algorithmus ausgeführt. Nachfolgend kann man aufgrund der Expressionsstärke von Oberflächenmolekülen bestimmte Zelltypen identifizieren, wie in diesem Beispiel CD4- und CD8-T-Zellen, die jeweils auf einer Seite des zweidimensionalen Raums clustern. Weiterhin kann auch eine genauere Unterteilung in naive, EM, CM und TEMRA T-Zellen erfolgen, die in diesem Beispiel ebenfalls voneinander abgegrenzt sind.

2.2.4. Infektion von Zellen mit humanem Zytomegalievirus

Um den direkten Einfluss einer CMV-Infektion auf myeloische Zellen untersuchen zu können, wurden die myeloischen AML-Zelllinien THP-1, HL-60, MM6 sowie die CML-Zelllinie K562 mit dem GFP^{POS} CMV-Stamm (TB40-GFP, vgl. 2.1.9.) zunächst infiziert und anschließend die Zellen sowie Zytokine des Zellkulturüberstands durchflusszytometrisch analysiert. Es wurden jeweils 5×10^5 myeloische Zellen in eine 24-well Zellkulturplatte vorgelegt und die Zellen durch Zugabe des Virus in einer Konzentration von zwei Plaque-bildenden Einheiten pro Zelle (2 PFU/Zelle) infiziert. Die Infektionseffizienz wurde durch Zentrifugieren für 30 min bei 1000 g erhöht und die Zellen anschließend für 4 Tage bei 37 °C inkubiert. Der Zellkulturüberstand wurde sodann für die spätere Zytokinanalyse bei -80 °C verwahrt, und die Zellen wurden durchflusszytometrisch untersucht.

2.2.5. Analyse des inflammatorischen Zytokinprofils des Zellkulturüberstandes CMV-infizierter AML-Zellen – LEGENDplex

Um zu analysieren, welche Zytokine im Zusammenhang mit einer CMV-Infektion von AML-Zellen sekretiert werden, wurde das Zytokinprofil des Zellkulturüberstands (vgl. 2.2.4.) mithilfe des LEGENDplex human Inflammation Panel 1 (BioLegend®) bestimmt. Der LEGENDplex-Assay baut auf dem Prinzip eines Sandwich *Enzyme-linked Immunosorbent Assays* auf, lässt jedoch durch den Einsatz von Kügelchen unterschiedlicher Größe und durch die unterschiedliche Intensität gekoppelter Fluoreszenzfarbstoffe die simultane Quantifizierung von bis zu 13 Molekülen mittels Durchflusszytometrie zu. Zusammengefasst werden die in Plasma oder Zellkultur vorhandenen zu untersuchenden Moleküle zunächst an molekulspezifische Kügelchen gebunden, anschließend mit molekulspezifischen, biotinylierten Antikörpern markiert und in einem dritten Schritt durch fluoreszenzmarkierte anti-Biotin Antikörper gebunden. Mit den so präparierten Kügelchen können dann mittels Durchflusszytometrie anhand einer Standardreihe die unbekanntes Zytokinkonzentrationen quantifiziert werden. Für den Assay wurden die Proben zunächst bei RT aufgetaut und der Assay anschließend entsprechend des Herstellerprotokolls durchgeführt.

2.2.6. Vergleichende Analyse von CD8^{pos} und CD8^{neg} NK-Zellen

Zur vergleichenden Analyse von CD8^{pos} und CD8^{neg} NK-Zellen mittels mRNA-Sequenzierung wurden Zellen durchflusszytometrisch sortiert, die in den Zellen enthaltene RNA isoliert und anschließend mittels mRNA-Sequenzierung analysiert. Dazu wurden zunächst PBMCs von 6 CMV^{neg} Blutspendern aus *Buffy Coats* gemäß Punkt 2.2.1. isoliert und anschließend NK-Zellen mithilfe des NK Cell Isolation Kits (Miltenyi Biotec) gemäß Herstellerangaben angereichert. Zusammengefasst wurden „nicht-NK-Zellen“ mit Antikörpern, die an magnetische Kügelchen gekoppelt sind, markiert und durch das Anlegen eines magnetischen Feldes in einer Säule zurückgehalten, während die unmarkierten NK-Zellen die Säule durchliefen. Zur Identifizierung von CD8^{neg} bzw. CD8^{pos} CD56^{dim} NK-Zellen wurden die angereicherten NK-Zellen ohne anschließende Fixierung oberflächlich gefärbt und in der Core Flow Cytometry Facility des Düsseldorfer Uniklinikums durchflusszytometrisch sortiert.

2.2.6.1. RNA-Isolation

Die RNA wurde im Anschluss mithilfe des RNeasy[®] Plus Micro Kits (Qiagen) gemäß Herstellerangaben isoliert, nachdem die Zellen zuvor zweimal mit DPBS gewaschen wurden. Abweichend vom Herstellerprotokoll wurden zur Erhöhung der RNA-Konzentration zwei konsekutive Elutionsschritte durchgeführt, indem der Durchlauf des ersten Schrittes erneut auf die Säule aufgetragen und zentrifugiert wurde. Die Reinheit und Konzentration der RNA wurde photometrisch am Nanodrop2000 bestimmt und die RNA bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C verwahrt.

2.2.6.2. RNA-Sequenzierung

Zur Transkriptomanalyse wurde am Biologisch Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf aus der Gesamt-RNA zunächst mittels „VAHTS Small RNA Library Prep Kit for Illumina“ (Vazyme) eine *stranded library* erstellt und diese anschließend an einem Illumina HiSeq3000 analysiert. Die bioinformatische Aufbereitung der Daten wurde freundlicherweise am hiesigen Institut für Virologie durch Johannes Ptok durchgeführt.

2.2.6.3. LEGENDScreen

Die Untersuchung der differentiellen Proteinexpression von CD8^{pos} und CD8^{neg} NK-Zellen wurde mittels des LEGENDScreen™ der Firma Biolegend untersucht. Dieses kommerziell erhältliche Kit beinhaltet fluoreszenzgekoppelte Antikörper gegen 361 verschiedene Oberflächenmoleküle und erlaubt somit die detaillierte Oberflächenprotein-Expressionsanalyse von Immunzellen. Die zu untersuchenden Zellen wurden zunächst mit Antikörpern gefärbt, die die Identifizierung von CD8^{pos} und CD8^{neg} NK-Zellen ermöglichen (Panel vgl. Anhang, Tabelle 12). Im Anschluss daran wurden die Zellen auf die vier 96-well Platten verteilt, die die Antikörper gegen die 361 Oberflächenmoleküle und Isotypenkontrollen enthalten. Die Färbung wurde gemäß des Herstellerprotokolls durchgeführt. Abweichend davon wurde jeder Ansatz auf vier separate Ansätze aufgeteilt, um mit einem Kit die Immunzellen von vier verschiedenen Probanden untersuchen zu können. Im Anschluss an die Färbung wurden die Zellen durchflusszytometrisch untersucht und mit der Software FlowJo ausgewertet.

Die Signale der jeweiligen Isotypenkontrolle wurden genutzt, um die Gates für die positive Population zu setzen. Um möglichst nur immunologisch relevante Unterschiede aufzudecken, wurden bei der Analyse solche Moleküle ausgeschlossen, die im Schnitt von weniger als 5 % der untersuchten NK-Zellen exprimiert wurden, da hier davon ausgegangen werden kann, dass sie vermutlich kein typisches Charakteristikum zur Unterscheidung von CD8^{pos} bzw. CD8^{neg} NK-Zellen darstellen. Ferner wurden solche Moleküle als vergleichsweise wenig relevant für die Differenzierung von CD8^{pos} und CD8^{neg} NK-Zellen gewertet, bei denen der absolute (Δ) bzw. relative Unterschied (Δ_{rel}) zwischen CD8^{pos} und CD8^{neg} NK-Zellen bezogen auf die Frequenz (Δ) bzw. auf die mediane Fluoreszenzintensität (MFI, Δ_{rel}) weniger als 5 % ausmachte. Bei einem Anteil von 5-90 % wurden sowohl der Anteil an positiven NK-Zellen als auch die MFI der positiven NK-Zellen ausgewertet. Bei einem Anteil von über 90 % wurde lediglich die MFI der positiven Zellen für weitere Analysen in Betracht gezogen. Unabhängig von diesen Kriterien wurden, sofern im LEGENDScreen inkludiert, die Moleküle untersucht, die in der RNA-Sequenzierung einen signifikanten Unterschied zwischen CD8^{pos} und CD8^{neg} NK-Zellen aufwiesen.

2.2.7. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism 8.4.0, GraphPad Software, San Diego California, USA. Da es sich um humane Proben handelt, wurde eine Normalverteilung der intervallskalierten Testdaten unabhängig einer tatsächlichen per Testverfahren abgesicherten Normalverteilung der Testdaten angenom-

men. Der Vergleich zweier Gruppen erfolgte mittels zweiseitigen ungepaarten bzw. bei Innersubjektvergleichen mittels gepaarten t-Tests. Der Vergleich von mindestens drei Gruppen wurde mit einem one-way ANOVA durchgeführt. Zur Identifikation von Gruppenunterschieden wurde im Anschluss daran ein *post-hoc*-Test mittels Tukey- (Vergleich aller Gruppen miteinander) oder Dunnett's T3- (Vergleich mit einer Kontrollgruppe) Test durchgeführt. Korrelationen wurden mit einer linearen Regressionsanalyse („simple linear regression“) überprüft. Ereigniszeitanalysen wurden mittels Log-rank- (Mantel-Cox) Test durchgeführt. Die ausgewählten Tests sowie die Signifikanzniveaus sind, sofern grafisch aufbereitet, in den Bildunterschriften bzw. bei nicht vorhandener grafischer Aufbereitung im Text zu finden.

III. Ergebnisse

3.1. Untersuchung von Immunzellen und hämatopoetischen Stammzellen im MDS und in der AML

Im Zusammenhang verschiedener maligner Erkrankungen wird neben dem Auftreten bestimmter Tumor-assoziiierter Mutationen von einem Versagen des Immunsystems berichtet. Dies kann sich in Form von erschöpften zytotoxischen Zellen, die inhibierende Rezeptoren (z.B. PD1) exprimieren sowie in Tumorzellen, die inhibierende Liganden (z.B. PD-L1) exprimieren, äußern (vgl. 1.3.1.). Während die Expression dieser Immuncheckpointmoleküle (ICMs) in AML relativ gut erforscht ist, gibt es wenige Untersuchungen mit ähnlicher Thematik in Patienten mit MDS. Insgesamt kann auf Basis der bisher vorliegenden Daten keine klare Empfehlung für oder wider den Einsatz von Immuncheckpointinhibitoren (ICIs) im MDS ausgesprochen werden. Daher war das Ziel des ersten Teils dieser Arbeit die weitergehende Charakterisierung des Immunstatus im MDS und in der AML, mit besonderem Fokus auf der Expression von ICMs.

Die bisherigen Untersuchungen wurden i.d.R. an Zellen des PBs, teilweise ohne Angabe der Lagerungsbedingung, durchgeführt. Da beispielsweise die Cryokonservierung von Immunzellen nicht nur erheblichen Einfluss auf die Viabilität der Zellen, sondern auch auf die Molekülexpression haben kann [180, 181], wurde die hier durchgeführte phänotypische Charakterisierung von BM-Zellen an frisch isolierten WBCs durchgeführt.

3.1.1. Patientencharakteristik

Im Zeitraum von Juli 2017 bis Dezember 2019 wurden von 95 Patienten weiße Blutzellen (WBCs) aus insgesamt 121 BM- und 26 PB-Proben isoliert (Gesamttabelle vgl. Anhang, Tabelle 20). Sieben Patienten hatten ein aktives MDS und weitere neun Patienten eine aktive AML. Von den sieben MDS-Patienten waren drei therapienaiv, von den neun AML-Patienten waren fünf therapienaiv. Die übrigen Patienten zeigten ein molekulares bzw. hämatologisches Rezidiv nach bereits erfolgter hSCT bzw. Therapie. Während in der AML-Gruppe alle Subtypen nach der WHO 2016 Klassifikation vorkommen, liegen in der MDS-Gruppe lediglich die Subtypen MDS-EB II und MDS-RS-MLD vor. Abgesehen davon waren die Proben hinsichtlich des Karyotyps (normal vs. abnormal) sowie des molekularen/genetischen Risikos (günstig vs. intermediär vs. ungünstig) sehr heterogen. Daher wurde auf eine weitere Unterteilung der Gruppen, z.B. nach Subtyp, Karyotyp und Therapiestatus, verzichtet.

Als Vergleichsgruppe („Remission > 6 Monate“) wurden aus dem übrigen Probenkollektiv sechs BM-Proben von Patienten identifiziert, die aufgrund einer hämatologischen Grunderkrankung (MDS, AML und chronische myelomonozytäre Leukämie (CMML)) eine hSCT erhalten haben und für mind. sechs Monate durchgängig in Remission waren. Daneben wurden weitere strenge Ausschlusskriterien (vgl. 2.1.8.) definiert um sicherzustellen, dass diese mit Ausnahme der Grunderkrankung als Anlass für die hSCT und der damit einhergehenden immunsupprimierenden Therapie weitestgehend dem Knochenmark von gesunden Patienten entsprechen. Die Charakteristika aller eingeschlossenen Patienten kann der nachfolgenden Tabelle 4 entnommen werden.

Unter den gesammelten Proben befanden sich zudem serielle BM-Proben von drei MDS hSCT-Empfängern mit jeweils mind. drei Entnahmezeitpunkten im Therapieverlauf. Zwei der drei Patienten zeigten ein Rezidiv ihres MDS, der dritte Patient blieb über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg in Remission. Ferner konnten von vier therapienaiven AML-Patienten PB- und BM-Proben des gleichen Zeitpunkts entnommen und analysiert werden.

Tabelle 4 **Patientencharakteristik (eingeschlossene Proben)**

	Remission > 6 Monate		MDS		AML	
	#	%	#	%	#	%
<i>Anzahl #:</i>	6		7		9	
<i>Alter (Median)</i>	64		58		58	
<i>Spannweite</i>		40-76		39-72		27-69
<i>Geschlecht</i>						
weiblich	4	66,7	2	28,6	6	66,7
männlich	2	33,3	5	71,4	3	33,3
<i>Grunderkrankung</i>						
MDS	2	33,3	7	100		
WHO Klassifizierung:						
<i>MDS-EB II</i>	2	100	5	71,4		
<i>MDS-RS-MLD</i>	0	0	2	28,6		
AML	3	50,0			9	100
WHO Klassifizierung:						
<i>With recurrent genetic abnormalities</i>	3	100			3	33,3
<i>MDS-related changes</i>	0	0			3	33,3
<i>Not otherwise specified (NOS)</i>	0	0			2	22,2
<i>Therapy related</i>	0	0			1	11,1

Fortsetzung Tabelle 4

	Remission > 6 Monate		MDS		AML	
	#	%	#	%	#	%
CMML	1	16,7				
WHO-Klassifizierung:						
<i>CMML-2</i>	1	100				
<i>Karyotyp</i>						
normal			3	42,9	3	33,3
abnormal			3	42,9	5	55,6
fehlend			1	14,3	1	11,1
<i>Molekulares/genetisches Risiko</i>			<i>IPSS-R</i>		<i>ELN</i>	
günstig			2	28,6	3	33,3
intermediär			2	28,6	3	33,3
ungünstig			3	42,9	1	11,1
fehlend			0	0	2	22,2
	Remission > 6 Monate		MDS		AML	
BM Blasten [Median %]	1,6		6,0		35,0	
Spannweite	1,0-3,0		1,0-13,0		3,0-88,0	
BM WBCs [Median 10 ⁹ /L]	6,65		3,8		4,9	
Spannweite	4,5-9,8		1,8-83,6		2,2-28,1	
BM Hämoglobin [Median g/dL]	11,25		9,4		8,55	
Spannweite	8,7-12,1		5,1-14,0		5,7-12,2	
BM Thrombozyten [Median 10 ⁹ /L]	83,5		127,0		82,0	
Spannweite	29,0-114,0		34,0-155,0		12,0-247,0	

3.1.2. Die Analyse von Immunzellpopulationen zeigt ein verschobenes NK- zu T-Zellverhältnis an

Die phänotypische Charakterisierung der frisch isolierten WBCs konzentrierte sich zunächst auf die Untersuchung der Zellzusammensetzung des BMs sowie auf die Untersuchung von ICMs in hämatopoetischen Stammzellen („Stammzellpanel“, vgl. Anhang, Tabelle 6) und in T-Zellen („T-Zellpanel“, vgl. Anhang, Tabelle 7).

MDS- und AML-Stammzellen befinden sich i.d.R. in der CD34^{pos} Population des BMs und PBs. Im gesunden Menschen können maligne Stammzellen u.a. von zytotoxischen T- und NK-Zellen abgetötet werden.

Daher wurden in einem ersten Schritt die Anteile von CD34^{pos}-Vorläuferzellen sowie der knochenmarksinfiltrierenden T- und NK-Zellen, gemessen an der Gesamtheit aller WBCs mit Ausnahme von Granulozyten (GOI), bestimmt (vgl. Abbildung 6 A). Der Anteil an CD34^{pos}-Zellen nahm erwartungsgemäß von der Vergleichsgruppe über MDS nach AML zu. Da sich unter den AML-Patienten auch solche Patienten befanden, die lediglich ein molekulares Rezidiv ohne Blastenexzess bzw. einen CD34^{neg} AML-Klon aufwiesen, erreicht dieser Trend keine statistische Signifikanz (p = 0,0701, Abbildung 6 B).

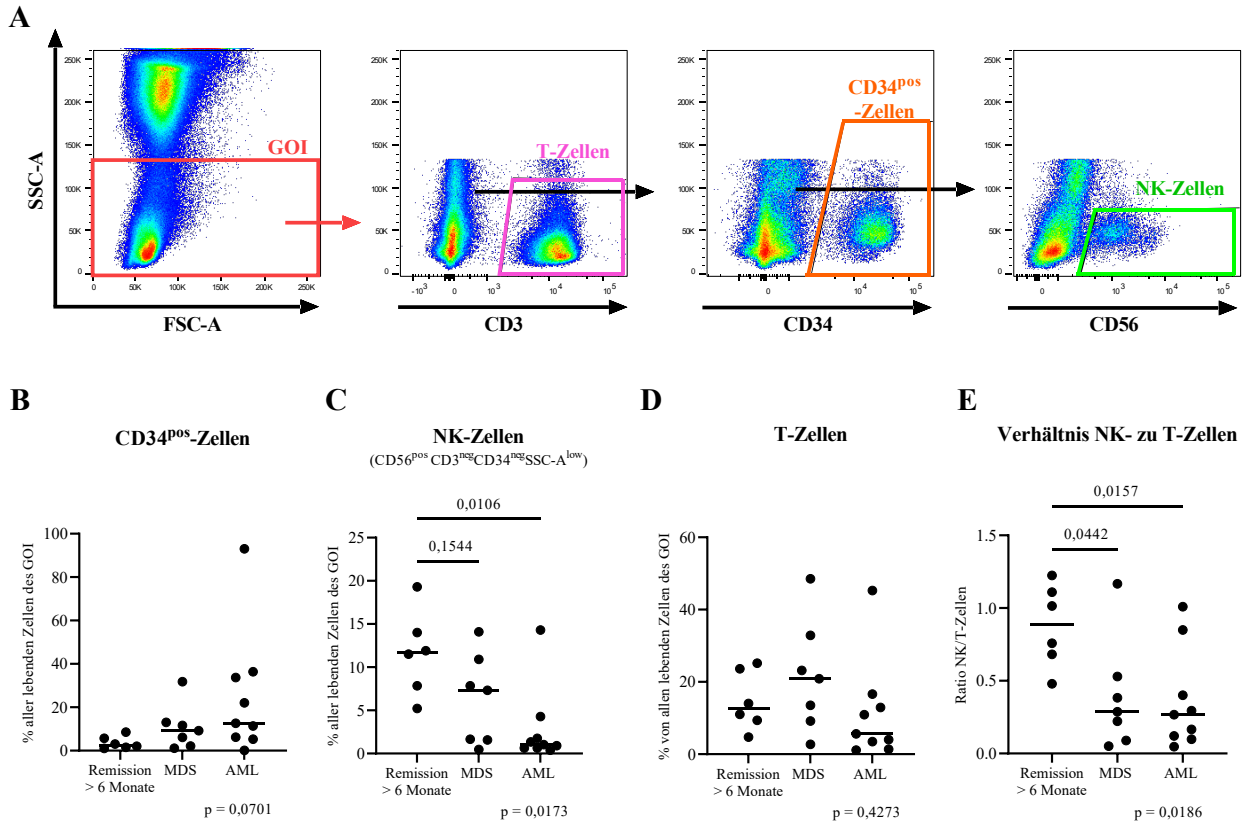


Abbildung 6 Der Anteil von NK-Zellen im MDS und in der AML ist im Vergleich zu T-Zellen reduziert

WBCs aus dem BM von MDS- und AML-Patienten sowie hSCT-Empfänger, die seit über 6 Monaten durchgehend in Remission waren („Remission > 6 Monate“), wurden mittels Erythrozytenlyse isoliert und direkt im Anschluss daran durchflusszytometrisch untersucht. **A** Die Gatingstrategie für die Identifizierung von CD34^{pos} hämatopoetischen Vorläuferzellen, CD3^{pos} T-Zellen und CD56^{pos} NK-Zellen ist anhand eines repräsentativen Stainings gezeigt. Das "Gate of Interest" (GOI) beinhaltet alle lebenden Zellen mit Ausnahme von Zelldebris und Granulozyten. Die Anteile der verschiedenen Zellpopulationen wurden sukzessive, bezugnehmend auf das GOI, bestimmt. Die Negativpopulation eines jeden Gatingsschritts stellte die Basis des sich anschließenden Gatingsschritts dar. Da das entsprechende Panel („Stammzellpanel“, vgl. Anhang, Tabelle 6) kein CD16 Antikörper enthielt, wurde der Anteil an NK-Zellen entgegen der klassischen Definition über CD16 und CD56 anhand des Anteils an CD34^{neg}CD3^{neg}CD56^{pos}-Zellen bestimmt. **B** Der Anteil an CD34^{pos} hämatopoetischen Vorläuferzellen war erwartungsgemäß in der AML am größten. **C** In der AML waren NK-Zellen signifikant reduziert (p = 0,0106, Welch's ANOVA, gefolgt von Dunnett's T3 multiple comparison).

D Die T-Zellfrequenzen waren vergleichbar in den untersuchten Gruppen. **E** Das NK- zu T-Zellverhältnis nahm von der Vergleichsgruppe über MDS- ($p = 0,0442$) bis hin zu AML-Patienten ab ($p = 0,0157$, Welch's ANOVA, gefolgt von Dunnett's T3 multiple comparison).

Dahingegen waren die Anteile an NK-Zellen in der AML und tendenziell auch im MDS gegenüber der Vergleichsgruppe verringert (Remission > 6 Monate vs. AML $p = 0,0106$, Abbildung 6 C). Die T-Zellfrequenz wiederum war in allen drei Gruppen vergleichbar ($p = 0,4273$, Abbildung 6 D). Um den Einfluss des erhöhten Blastenanteils in der AML Rechnung zu tragen, wurde zur besseren Einordnung der NK- und T-Zellanteile deren Ratio gebildet. Dieses verdeutlicht, dass sowohl im MDS als auch in der AML im Vergleich zur Kontrollgruppe das Verhältnis von NK- zu T-Zellen zugunsten von T-Zellen verschoben war (MDS: $p = 0,0442$, AML: $p = 0,0157$, Abbildung 6 E).

3.1.3. Die erhöhte Expression von Immuncheckpointmolekülen deutet auf ein inhibiertes Immunsystem hin

Eine adäquate Immunantwort gegen Tumorstammzellen setzt voraus, dass die Interaktion mit Immunzellen zu deren Aktivierung führt. Daher sollte untersucht werden, ob hämatopoetische Stammzellen von Patienten mit MDS und AML vermehrt den inhibierenden Liganden PD-L1 exprimieren, um einer solchen Antwort zu entgehen. Lapidot *et al.* und Li *et al.* konnten zeigen, dass tumorinduzierende leukämische Stammzellen (*leukemic stem cells*, LSCs) in AML und MDS in der CD34^{pos}CD38^{neg}-Zellpopulation zu finden sind [182, 183]. Daher wurde zwischen CD34^{pos}CD38^{neg}- und CD34^{pos}CD38^{pos}-Stamm- und Vorläuferzellen unterschieden (vgl. Abbildung 7 A). Sowohl die Analyse von PD-L1-exprimierenden CD34^{pos}CD38^{pos}- als auch von CD34^{pos}CD38^{neg}-Zellen zeigten im MDS signifikant erhöhte Frequenzen (PD-L1^{pos} CD34^{pos}CD38^{neg}: $p = 0,0127$ und PD-L1^{pos} CD34^{pos}CD38^{pos}: $p = 0,0336$, Abbildung 7 B und C). Hier sei jedoch darauf hingewiesen, dass einige Individuen kein bzw. sehr wenig PD-L1 auf ihren Stamm- und Vorläuferzellen exprimierten. Ungeachtet dessen zeigten die CD34^{pos}CD38^{neg}-Zellen von AML- und MDS-Patienten interessanterweise geringere Anteile PD-L1-exprimierender Zellen als CD34^{pos}CD38^{pos}-Zellen ($p = 0,0135$, Abbildung 7 D). Dies stimmt mit Berichten überein, die im Kontext von AML und MDS zeigen konnten, dass PD-L1 in der Regel auf nicht-tumorösen Zellen exprimiert wird [184]. Zusammengefasst konnte hier gezeigt werden, dass gegenüber der Vergleichsgruppe in der CD34^{pos}CD38^{neg}-Zellfraktion, aus der LSCs in der Regel hervorgehen, erhöhte Anteile PD-L1-exprimierender Zellen im MDS zu finden sind, wodurch eine Blockade der PD1/PD-L1-Achse auch in der Behandlung eines MDS in Betracht gezogen werden könnte.

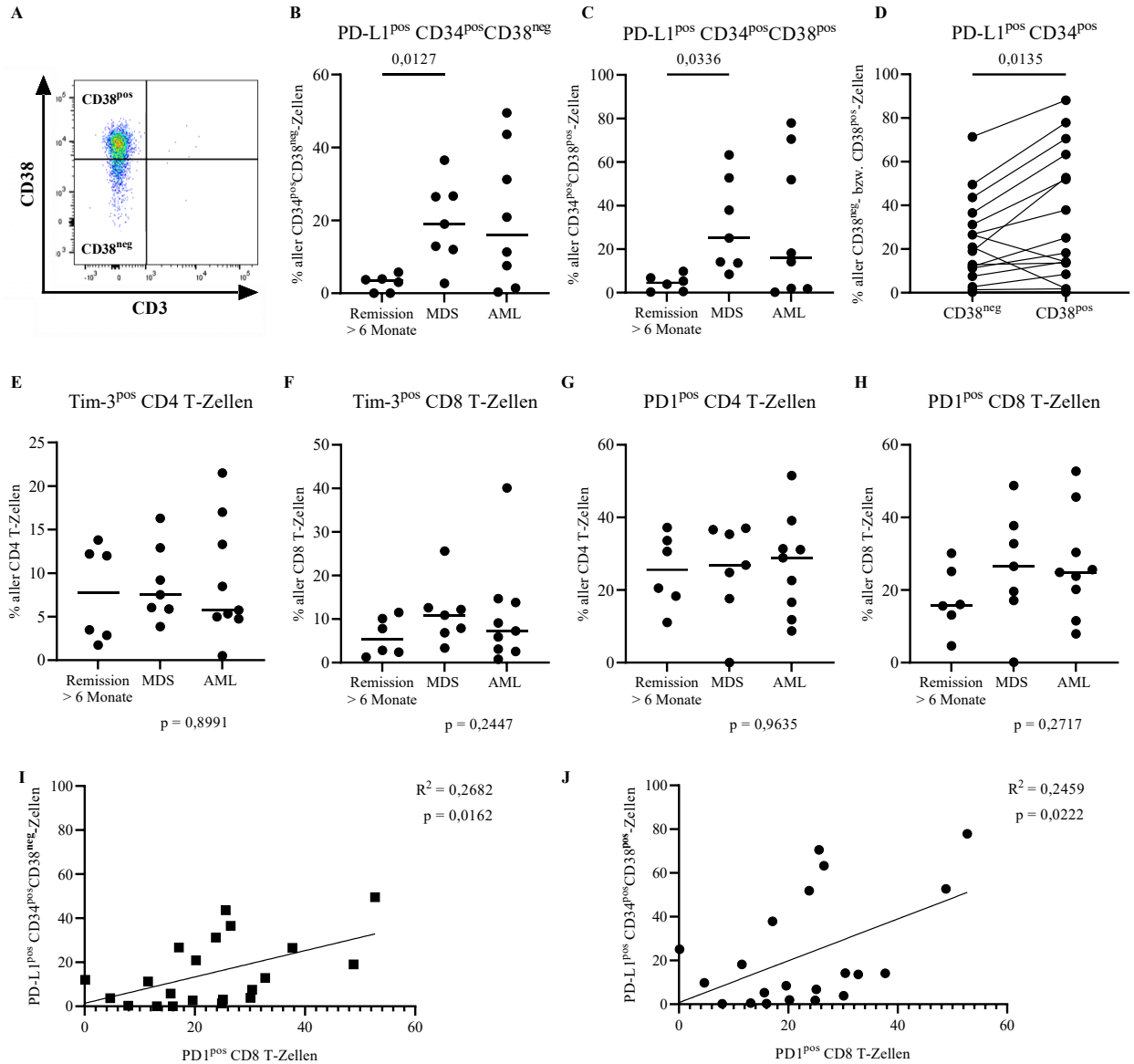


Abbildung 7 Verstärkte PD-L1-Expression in CD34^{pos}-Stamm- und Vorläuferzellen korreliert mit der PD1-Expression auf CD8 T-Zellen

WBCs aus dem BM von MDS- und AML-Patienten sowie hSCT-Empfänger, die seit über 6 Monaten durchgängig in Remission waren („Remission > 6 Monate“), wurden mittels Erythrozytenlyse isoliert. Die PD-L1-Expression von CD34^{pos}-Progenitoren wurde direkt im Anschluss daran durchflusszytometrisch untersucht. **A** Die Gatingstrategie für die Identifizierung von CD34^{pos}CD38^{pos}- bzw. CD34^{pos}CD38^{neg}-Progenitoren ist anhand eines repräsentativen Stainings gezeigt. **B** Im MDS könnten erhöhte Anteile an PD-L1^{pos} CD34^{pos}CD38^{neg}-Progenitoren im Vergleich zu hSCT-Empfängern, die über 6 Monate durchgehend in Remission waren, festgestellt werden ($p = 0,0127$, Welch's ANOVA, gefolgt von Dunnett's T3 multiple comparison). **C** Für PD-L1^{pos} CD34^{pos}CD38^{pos}-Progenitoren konnte ebenfalls ein signifikanter Anstieg gegenüber der Kontrollgruppe verzeichnet werden ($p = 0,0336$, Welch's ANOVA, gefolgt von Dunnett's T3 multiple comparison). **D** CD34^{pos}CD38^{pos}-Progenitoren zeigten in MDS- und AML-Patienten gegenüber CD34^{pos}CD38^{neg}-Progenitoren signifikant erhöhte Anteile an PD-L1-exprimierenden Zellen

($p = 0,0135$, gepaarter t-test). **E-H** Es konnte kein signifikanter Unterschied in den Anteilen von Tim-3^{pos} CD4 T-Zellen (E), Tim-3^{pos} CD8 T-Zellen (F), PD1^{pos} CD4 T-Zellen (G) und PD1^{pos} CD8 T-Zellen (H) festgestellt werden. **I, J** Die Frequenzen von PD-L1^{pos} CD34^{pos}CD38^{neg}- (I) bzw. PD-L1^{pos} CD34^{pos}CD38^{pos}- (J) Stamm- und Vorläuferzellen zeigten jeweils eine moderate positive Korrelation mit PD1^{pos} CD8 T-Zellen (CD38^{neg}: $R^2 = 0,2682$, $p = 0,0162$; CD38^{pos}: $R^2 = 0,2459$, $p = 0,0222$, simple linear regression).

Damit eine Wiederherstellung der T-Zelleffektorfunktion über eine Blockade der PD1/PD-L1-Achse grundsätzlich funktioniert, müssen die tumorspezifischen T-Zellen auch über diese Achse inhibiert sein. Daher sollte schließlich der „Erschöpfungszustand“ des Immunsystems anhand der Frequenz von PD1^{pos} und Tim-3^{pos} T-Zellen untersucht werden. Ähnlich wie bei den CD34^{pos}-Stamm- und Vorläuferzellen ist auch hier zunächst darauf hinzuweisen, dass in der MDS-Gruppe ein Patient kein PD1 auf seinen CD8 T-Zellen exprimiert. Insgesamt konnte weder für CD4 noch für CD8 T-Zellen ein signifikanter Unterschied der PD1- und Tim-3-Expression in der vorliegenden Kohorte festgestellt werden (vgl. Abbildung 7 E-H). Insbesondere CD4 T-Zellen zeigten vergleichbare Frequenzen in den 3 untersuchten Gruppen (Tim-3^{pos} CD4 T-Zellen: $p = 0,8991$, PD1^{pos} CD4 T-Zellen: $p = 0,9635$, Abbildung 7 E und G). Obwohl nicht signifikant, wiesen MDS bzw. AML tendenziell höhere Tim-3^{pos} und PD1^{pos} CD8 T-Zellfrequenzen auf als die Vergleichsgruppe (Tim-3^{pos} CD8 T-Zellen: $p = 0,2447$, PD1^{pos} CD8 T-Zellen: $p = 0,2717$, Abbildung 7 F und H). Zudem waren die jeweiligen Anteile zwischen MDS und AML untereinander vergleichbar (MDS vs. AML jeweils $p = 0,9992$ für Tim-3 und PD1).

Da verschiedene Studien in AML über erhöhte Anteile an PD1^{pos} CD8 T-Zellen berichten und auch in der hier vorliegenden Untersuchung die Frequenzen im MDS und der AML höher als in der Vergleichsgruppe und zudem untereinander vergleichbar waren, kann die Vermutung aufgestellt werden, dass auch in der Krankheitsentstehung bzw. Progression von MDS erhöhte PD1^{pos} und Tim-3^{pos} CD8 T-Zellfrequenzen eine relevante Rolle spielen. Um diesen Verdacht zu erhärten, sollte untersucht werden, ob es einen Zusammenhang zwischen der Expression von PD-L1 auf hämatopoetischen Stammzellen und PD1 auf CD8 T-Zellen gibt. In der Tat konnte ein moderater, positiver Zusammenhang sowohl zwischen CD8 T-Zellen und der CD38^{neg} Stammzellfraktion ($p = 0,0162$, $R^2 = 0,2682$, Abbildung 7 I) als auch der CD38^{pos} Stammzellfraktion hergestellt werden ($p = 0,0222$, $R^2 = 0,2459$, Abbildung 7 J).

Leider konnte keine vergleichende Untersuchung in Abhängigkeit des CMV-Serostatus durchgeführt werden, da sowohl in der MDS-Gruppe als auch in der Vergleichsgruppe, mit einer Ausnahme, sämtliche eingeschlossene Probanden CMV_{pos} waren. Dennoch lässt sich insgesamt zusammenfassen, dass sowohl die veränderten NK- und T-Zellanteile als auch die Expression von ICMs auf ein inhibiertes, dysreguliertes Immunsystem in der AML und im MDS hindeuten.

3.1.4. Tim-3^{pos} und PD1^{pos} T-Zellfrequenzen korrelieren mit dem Krankheitsverlauf dreier MDS-EB II-Patienten (Fallstudien)

Obwohl ICIs in vielen Tumorentitäten bereits vielversprechende Resultate erzielten, so ist der Erfolg häufig von intraindividuellen Aspekten abhängig. Auch in der vorliegenden Kohorte zeigte sich, dass es Individuen gab, die keine PD1-exprimierenden T-Zellen oder PD-L1^{pos} hämatopoetischen Stammzellen besaßen (vgl. 3.1.3.). Dies könnte einem erfolgreichen Einsatz von ICIs entgegenstehen. Daher wurde als nächstes in drei MDS-EB II-Patienten, die eine hSCT erhalten haben, therapiebegleitend überprüft, inwiefern Fluktuationen in der Frequenz von PD1^{pos} und Tim-3^{pos} T-Zellen sowie PD-L1^{pos} Progenitoren festgestellt werden können und ob sie mit dem individuellen Krankheitsverlauf korrelieren (vgl. Abbildung 8). Dazu wurden aus dem BM WBCs isoliert, direkt im Anschluss daran T-Zellen und CD34^{pos}-Vorläuferzellen durchflusszytometrisch analysiert (Stammzell- und T-Zellpanel, vgl. Anhang, Tabelle 6 und 7) und anschließend mit verschiedenen klinischen Parametern, die im Zuge des Krankheitsmonitoring routinemäßig erhoben werden, wie u.a. Blastenfrequenz, *Wilms Tumour protein 1* (WT1)-Expression im PB sowie Spenderchimärismus, korreliert.

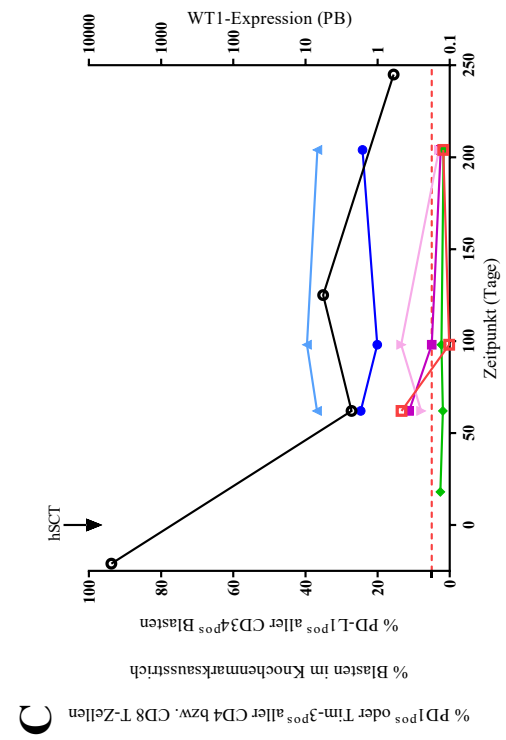
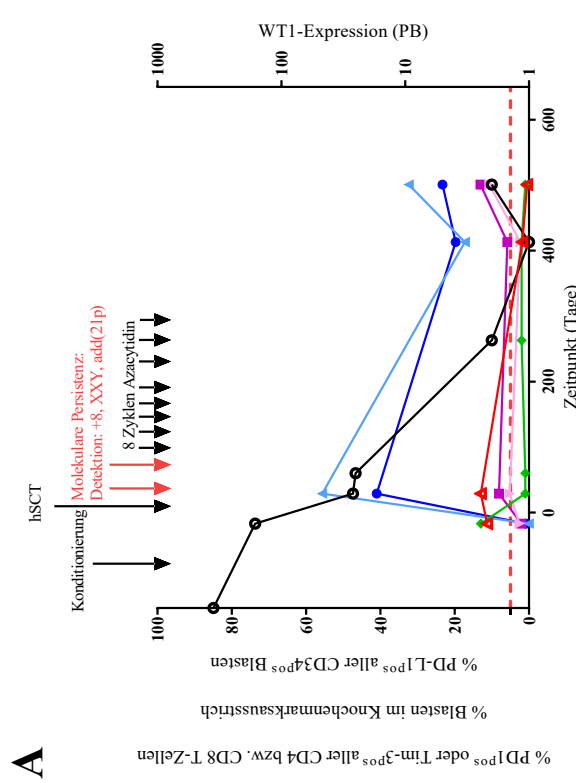
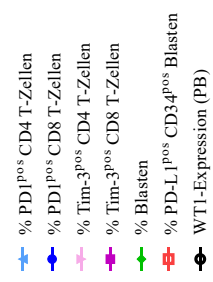
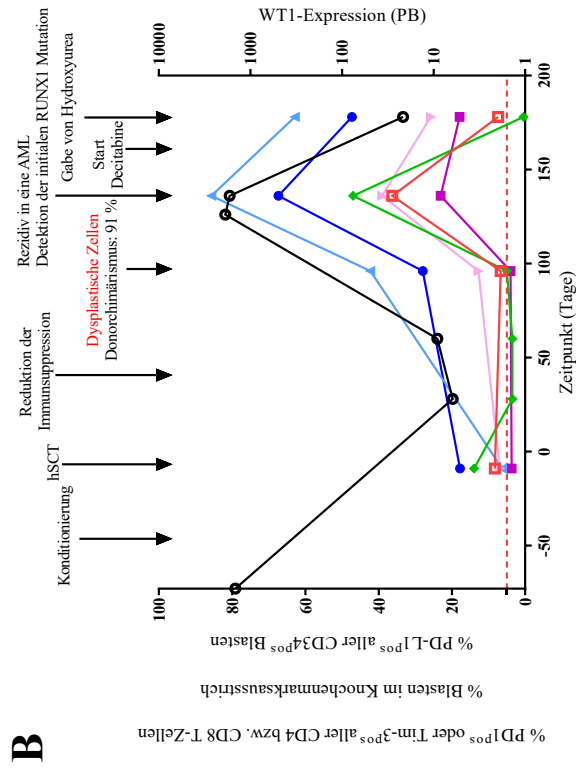
Der erste Patient zeigte im Verlauf nach hSCT ein molekulares Rezidiv seines MDS (vgl. Abbildung 8 A). Initial wies der Patient eine Trisomie 8 (+8), Aneuploidie der Geschlechtschromosomen (XXY) und zusätzliches genetisches Material unbekannter Herkunft an Chromosom 21 (add(21p)) auf. Der Patient wurde mit einer Induktionstherapie auf die hSCT vorbereitet, erreichte jedoch zum Zeitpunkt der Transplantation keine Remission und zeigte weiterhin einen Blastenanteil von 13 %. Zum gleichen Zeitpunkt lag der Anteil von PD1- und Tim-3-exprimierenden T-Zellen jeweils bei unter 3 %, während der Anteil an PD-L1^{pos} CD34^{pos}-Vorläufern bei 11 % lag. Bereits 30 Tage nach hSCT konnten die bei Diagnose festgestellten genetischen Marker seines MDS erneut detektiert werden. Zwar blieb zu diesem Zeitpunkt die Blastenfrequenz bei unter 5 %, jedoch zeigte sich der Anteil der PD-L1-exprimierenden Progenitoren mit 13 % ähnlich hoch wie vor hSCT. Zugleich konnten zu diesem Zeitpunkt die höchsten PD1^{pos} T-Zellfrequenzen im gesamten Beobachtungszeitraum verzeichnet werden. Mit der Gabe von 8 Zyklen Azacytidin verringerten sich diese deutlich von 55,7 % auf 17,3 % in CD4 T-Zellen und von 41,0 % auf 19,8 % in CD8 T-Zellen. Die WT1-Expression im PB sank simultan ab. Zum letzten Entnahmezeitpunkt zeigte sich sowohl ein erneuter Anstieg von PD1^{pos} als auch von Tim-3^{pos} T-Zellfrequenzen in CD4 und CD8 T-Zellen sowie ein marginaler Anstieg der WT1-Expression von 1 auf 2, der jedoch im Bereich der Messunsicherheit liegt. Der Anteil an PD-L1^{pos} CD34^{pos}-Progenitoren, der zuvor auf 1,84 % gesunken war, blieb mit nun 0,52 % konstant niedrig. Die geringe WT1-Expression und die unter 5 % liegende Blastenfrequenz deuteten nach aktuellen Leitlinien auf eine Remission hin. Interessanterweise waren jedoch die Tim-3^{pos} CD4 und CD8 T-Zellfrequenzen hier mit 10,7 % (CD4) und 13,1 % (CD8) am höchsten. Erhöhte Tim-3^{pos} T-Zellen sind sowohl alleine als auch

in Kombination mit PD1 in rezidivierenden AML PB-Proben beschrieben worden [156]. Daher könnten die vergleichsweise hohen, simultan angestiegenen Tim-3^{pos} T-Zellfrequenzen, die von einem erneuten Anstieg PD1^{pos} T-Zellen begleitet wurden, auf ein erneutes Erschöpfen des adaptiven Immunsystems hinweisen, sodass eine enge Überwachung als ratsam erscheint.

Der zweite Patient zeigte im Verlauf nach hSCT ein hämatologisches Rezidiv des MDS mit Progression in eine AML (vgl. Abbildung 8 B). Auch dieser Patient wurde mit einer Induktionschemotherapie auf die hSCT vorbereitet und zeigte mit 14 % Blasten ebenfalls eine aktive Erkrankung zum Zeitpunkt der Transplantation. Tim-3^{pos} und PD1^{pos} CD4 T-Zellfrequenzen waren mit 6,96 % bzw. 6,29 % vergleichbar niedrig, während PD1^{pos} CD8 T-Zellfrequenzen mit 17,8 % deutlich höher lagen als Tim-3^{pos} CD8 T-Zellen (3,69 %). Bereits 30 Tage nach hSCT zeigten sich Dysplasien in allen 3 Zellreihen, begleitet von einem Abfall des Donorchimärismus auf 72,5 % (nicht gezeigt). Folglich wurde die Immunsuppression reduziert, um einen *Graft-versus-Leukemia* Effekt zu initiieren. Daraufhin erreichte der Patient 60 Tage nach hSCT eine Remission mit einem Donorchimärismus von 93,5 %. Dysplasiezeichen oder ein Blastenexzess konnten hier ebenfalls nicht beobachtet werden (keine BM-Proben vorhanden). Allerdings konnten bei der nächsten Kontrolle, 96 Tage nach hSCT, erneut dysplastische Zellen und ein grenzwertiger Blastenanteil von 5 % beobachtet werden. Zu diesem Zeitpunkt zeigten sich Anteile von 42,3 % PD1^{pos} CD4 T-Zellen und von 28,0 % PD1^{pos} CD8 T-Zellen. Letztlich zeigte der Patient an Tag 136 nach hSCT eine Krankheitsprogression in eine AML mit einem Blastenexzess von 47 % und einen Nachweis der initialen *RUNX1*-Mutation. PD1- und Tim-3-exprimierende T-Zellen, PD-L1-exprimierende Blasten, Blastenfrequenz und WT1-Expression korrelierten dahingehend, dass sie simultan anstiegen, während der Donorchimärismus auf 12,8 % abfiel. Nach Gabe eines Zyklus Decitabine und Hydroxyurea konnte ein Abfall der zuvor genannten Parameter festgestellt werden mit Ausnahme des Donorchimärismus, der passend dazu auf 71,4 % anstieg. Dennoch ist hier festzuhalten, dass die jeweiligen Tim-3^{pos} T-Zellfrequenzen mit 25,8 % (CD4) und 23,1 % (CD8) sowie die PD1^{pos} T-Zellfrequenzen mit 62,9 % (CD4) und 47,3 % (CD8) ausnahmslos über denen zum Zeitpunkt der ersten Dysplasiezeichen 96 Tage nach hSCT lagen, sodass auch hier zumindest eine weitere Überwachung angezeigt erscheint. Die enge Korrelation von ICM-exprimierenden Zellen mit weiteren Krankheitsparametern suggeriert zudem, dass der Patient möglicherweise von einem ergänzenden Einsatz von ICIs, die die Tim-3/Galectin-9- bzw. PD1/PD-L1-Achse zum Ziel haben, profitieren könnte.

Abbildung 8

PD1^{pos} und Tim-3^{pos} T-Zellfrequenzänderungen korrelieren mit dem Krankheitsverlauf im MDS-EB II



WBCs aus dem BM von drei MDS-Patienten mit MDS-EB II, die eine hSCT erhielten, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten um ihre hSCT (Zeitpunkt 0 Tage) isoliert und direkt im Anschluss daran durchflusszytometrisch analysiert. PD1^{pos} (blaue Linien) und Tim-3^{pos} (violette Linien) CD4 (helle Linien) bzw. CD8 (dunkle Linien) T-Zellfrequenzen sowie PD-L1^{pos} CD34^{pos}-Blasten (rote Linien) wurden mit der Blastenfrequenz aus Knochenmarksausstrichen (grüne Linien) und WT1-Expression im PB (schwarze Linien) korreliert. **A** Der Krankheitsverlauf eines MDS-EB II-Patienten, der ein molekulares Rezidiv entwickelte, ist hier abgebildet. Bereits 30 Tage nach Stammzelltransplantation zeigten sich Anzeichen des initialen molekularen MDS-Phänotyps. Zum gleichen Zeitpunkt zeigten sich die höchsten PD1^{pos} T-Zellfrequenzen im kompletten Beobachtungszeitraum, die sich, ebenso wie die WT1-Expression, durch Applikation von 8 Zyklen Azacytidin deutlich reduzierten. Zum letzten Zeitpunkt zeigte sich ein leichter, erneuter Anstieg von Tim-3^{pos} und PD1^{pos} T-Zellen und der WT1-Expression im PB. **B** Der Krankheitsverlauf eines MDS-EB II-Patienten, der im Verlauf ein hämatologisches Rezidiv bis hin zum Progress in eine AML zeigte, ist hier abgebildet. Die Anteile von PD1- und Tim-3-exprimierenden T-Zellen, PD-L1-exprimierenden Blasten, Blastenfrequenz und WT1-Expression korrelierten eng miteinander in der Hinsicht, dass diese Parameter simultan mit den ersten Dysplasiezeichen anstiegen. Zum Zeitpunkt des Progresses in eine AML erreichten sie ihren Höchstwert, durch Gabe von Decitabine und Hydroxyurea fielen sie wieder. **C** Der Krankheitsverlauf eines MDS-EB II-Patienten, der im gesamten Beobachtungszeitraum hinweg in Remission blieb, ist hier abgebildet. PD1^{pos} und Tim-3^{pos} T-Zellen, Blastenfrequenz und WT1-Expression waren nur geringen Schwankungen unterworfen.

Der dritte Patient zeigte sich über den gesamten Überwachungszeitraum hinweg in Remission mit einer durchgehend geringen Blastenfrequenz von unter 5 % (vgl. Abbildung 8 C). PD-L1^{pos} CD34^{pos}-Blasten reduzierten sich von 13,4 % am ersten Entnahmezeitpunkt auf 0,2 % und blieben zum dritten Zeitpunkt mit 1,8 % niedrig. Interessanterweise war das erste deutliche Absinken der PD-L1^{pos} CD34^{pos}-Blasten mit einem gleichzeitigen Absinken der PD1^{pos} und Tim-3^{pos} CD8 T-Zellen verbunden, während die CD4^{pos} Pendants im gleichen Zeitraum anstiegen. Insgesamt waren die PD1- und Tim-3-exprimierenden T-Zellen, Blastenfrequenz und WT1-Expression an allen drei analysierten Zeitpunkten jedoch vergleichbar. Insbesondere die PD1^{pos} T-Zellfrequenzen blieben relativ konstant und fluktuierten lediglich zwischen 36,7 % und 39,6 % bei PD1^{pos} CD4 T-Zellen und zwischen 20,1 % und 24,7 % bei PD1^{pos} CD8 T-Zellen. Auch die Tim-3^{pos} CD4 und CD8 T-Zellen schwankten lediglich zwischen 3,0 % und 13,5 % (CD4) bzw. zwischen 2,5 % und 11,3 % (CD8), wobei die Höchstwerte jeweils zu verschiedenen Zeitpunkten detektiert wurden und ihren niedrigsten Wert zum spätesten Entnahmezeitpunkt erzielten. Insgesamt spricht der vorliegende Therapieverlauf dafür, dass in diesem Patienten eine anhaltende Remission durch geringe Schwankungen in der Expression erschöpfter T-Zellen und PD-L1-exprimierenden CD34^{pos} Blasten gekennzeichnet ist.

Wenngleich die Analysen der PD1^{pos} und Tim-3^{pos} T-Zellfrequenzen im Gruppenvergleich bei aktueller Gruppengröße keine signifikanten Unterschiede zeigten (vgl. Abbildung 7 E-H), sprechen die vorliegenden Fallanalysen für einen Zusammenhang zwischen PD1^{pos} bzw. Tim-3^{pos} T-Zellen sowie PD-L1^{pos} CD34^{pos}-Vorläuferzellen und dem Krankheitsverlauf, zumindest im MDS-EB II. Die Verläufe von PD1^{pos} und Tim-3^{pos} T-Zellfrequenzen stellten zwar keinen zusätzlichen prognostischen Faktor in diesen Patienten dar, zeigten aber in den rezidivierenden Patienten unabhängig vom individuellen Basislevel der Zellanteile wesentlich dynamischere Verläufe als die des Patienten in Remission.

3.1.5. Therapiebegleitendes T-Zellmonitoring von Immuncheckpointmolekülen könnte mittels peripheren Bluts durchgeführt werden

Eine Blutentnahme ist im Vergleich zu einer Knochenmarksentnahme weniger invasiv, kostenärmer, zeitsparender und psychisch angenehmer für den Patienten. Daher wurde anhand von PB- und BM-Proben desselben Entnahmezeitpunkts überprüft, ob für ein therapiebegleitendes Monitoring von PD1^{pos} und Tim-3^{pos} T-Zellen die Analyse von peripherem Blut ausreichend sein kann. Da keine zusammengehörenden BM- und PB-Proben von MDS-Patienten verfügbar waren, wurden vier PB- und BM-Proben von therapie-naiven AML-Patienten analysiert.

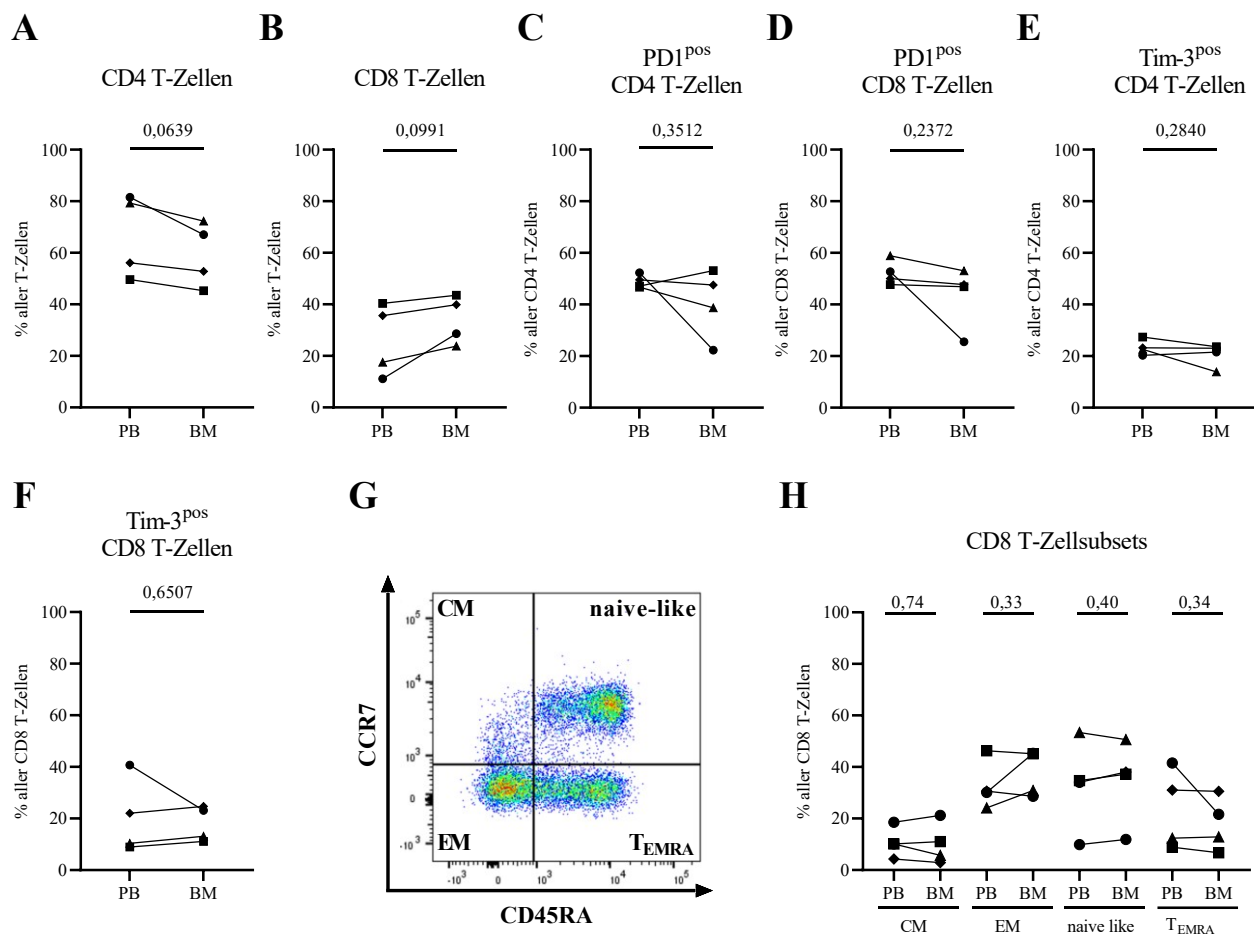


Abbildung 9 Peripheres Blut kann zum Monitoring von T-Zellpopulationen herangezogen werden

PB- und BM-Proben von vier therapie-naiven AML-Patienten wurden zum gleichen Zeitpunkt entnommen, WBCs mittels Erythrozytenlyse isoliert und T-Zellsubsets im Anschluss daran durchflusszytometrisch analysiert. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in den **A** CD4 T-Zell-, **B** CD8 T-Zell-, **C** PD1^{pos} CD4 T-Zell-, **D** PD1^{pos} CD8 T-Zell-, **E** Tim-3^{pos} CD4 T-Zell- und **F** Tim-3^{pos} CD8 T-Zellfrequenzen zwischen PB und BM festgestellt werden. **G** Die Gatingstrategie zur Identifizierung von CD8 *Central Memory* (CM, CCR7^{pos}CD45RA^{neg}), *Effector Memory* (EM, CCR7^{neg}CD45RA^{neg}), *naive-like* (CCR7^{pos}CD45RA^{pos}) und *Terminally*

differentiated Effector Memory cells reexpressing CD45RA (T_{EMRA} , $CCR7^{neg}CD45RA^{pos}$) T-Zellen ist anhand eines repräsentativen Stainings gezeigt. **H** Die Verteilung von CD8 CM, EM, naive-like und T_{EMRA} T-Zellen ist vergleichbar zwischen PB und BM. Die verschiedenen Symbole entsprechen je einem Patienten.

Tendenziell wurden im BM weniger CD4 ($p = 0,0639$, Abbildung 9 A) und mehr CD8 T-Zellen ($p = 0,0991$, Abbildung 9 B) detektiert, wenngleich dieser Trend keine Signifikanz erreichte. Davon abgesehen konnte weiterhin kein signifikanter Unterschied in der PD1^{pos} CD4 T-Zell- ($p = 0,3512$), PD1^{pos} CD8 T-Zell- ($p = 0,2372$), Tim-3^{pos} CD4 T-Zell- ($p = 0,2840$) und Tim-3^{pos} CD8-T-Zellfrequenz ($p = 0,6507$; Abbildung 9 C-F) festgestellt werden. Unterschiede zwischen PB und BM in den Anteilen der CD8 T-Zellsubsets *Central Memory* (CM, $CCR7^{pos}CD45RA^{neg}$, $p = 0,7414$), *Effector Memory* (EM, $CCR7^{neg}CD45RA^{neg}$, $p = 0,3272$), *naive-like* ($CCR7^{pos}CD45RA^{pos}$, $p = 0,4048$) und *Terminal differentiated Effector Memory cells reexpressing CD45RA* (T_{EMRA} , $CCR7^{neg}CD45RA^{pos}$, $p = 0,3361$, Abbildung 9 G und H) konnten ebenfalls nicht verzeichnet werden. Die vorliegenden Daten deuten somit darauf hin, dass für ein therapiebegleitendes ICM T-Zellmonitoring die Analyse von PB ein adäquates Mittel sein kann, wenngleich eine Analyse von gepaarten, seriellen PB- und BM-Proben, insbesondere von MDS-Patienten, noch aussteht.

3.2. Untersuchung des Einflusses von NK-Zellen auf das reduzierte AML Rezidiv-Risiko in hSCT-Empfängern mit CMV-Replikationsereignissen

Im ersten Teil dieser Arbeit, der sich primär mit dem Erschöpfungszustand des Immunsystems, insbesondere von T-Zellen und hämatopoetischen Stammzellen im MDS und in der AML, beschäftigte, zeigte sich, dass der Anteil von NK-Zellen sowohl im MDS als auch in der AML reduziert war und legte zudem auch einen Einfluss von NK-Zellen bzw. das Fehlen dieser an der Krankheitsentstehung bzw. eines Rezidivs nach hSCT in den beiden Krankheitsbildern nahe. Verschiedene Publikationen berichten darüber hinaus von einem reduzierten AML-Rezidiv-Risiko für hSCT-Empfänger, die von wiederkehrenden CMV-Reaktivierungen betroffen sind (u.a. [110-114, 185]). Da sich CMV-Infektionen u.a. auf den Phänotyp von NK-Zellen auswirken und NK-Zellen nach einer hSCT noch vor T-Zellen rekonstituieren, sollte in dieser Arbeit der Frage nachgegangen werden, ob und wie NK-Zellen zu einem reduzierten Rezidiv-Risiko nach hSCT beitragen können.

3.2.1. CMV-negative AML-Patienten exprimieren hohe Frequenzen an CD8^{pos} NK-Zellen

Um in einem ersten Schritt herauszufinden, ob und wie sich NK-Zellen von MDS- und AML-Patienten von NK-Zellen gesunder Probanden unterscheiden, wurden cryokonservierte Blutproben von zwei MDS- und drei AML-Patienten mit denen von vier gesunden Spendern verglichen. Dazu wurden die Zellen zunächst aufgetaut und die Lymphozyten anschließend mittels des „Stammzellpanels“ (vgl. Tabelle 6) durchflusszytometrisch charakterisiert. Für die Analyse wurde der t-SNE Algorithmus verwendet, der Zellen aufgrund ähnlicher Eigenschaften eng beieinander clustert (vgl. 2.2.3.3.). Da die untersuchten AML-Patienten alle therapienaiv waren und damit einen massiven Blastenexzess aufwiesen, den es in gesunden und in den hier untersuchten MDS-Patienten nicht gibt, wurden CD34^{pos}-Zellen aus der Analyse ausgeschlossen. Abgesehen davon wurde keine weitere Vorselektion durchgeführt. Folgende Zellpopulationen konnten identifiziert werden: CD4 T-Zellen (pink), CD8 T-Zellen (hellblau), CD4^{neg}CD8^{neg} T-Zellen (gelb), CD8^{pos} NK-Zellen (violett) und CD8^{neg} NK-Zellen (orange) sowie zwei weitere im Folgenden nicht näher charakterisierte Populationen, CD123^{pos} CD34^{neg}CD38^{pos}- und CD45RA^{pos} CD38^{dim}-Zellen, die nicht dem NK- oder T-Zellspektrum zugeordnet werden können (vgl. Abbildung 10 A).

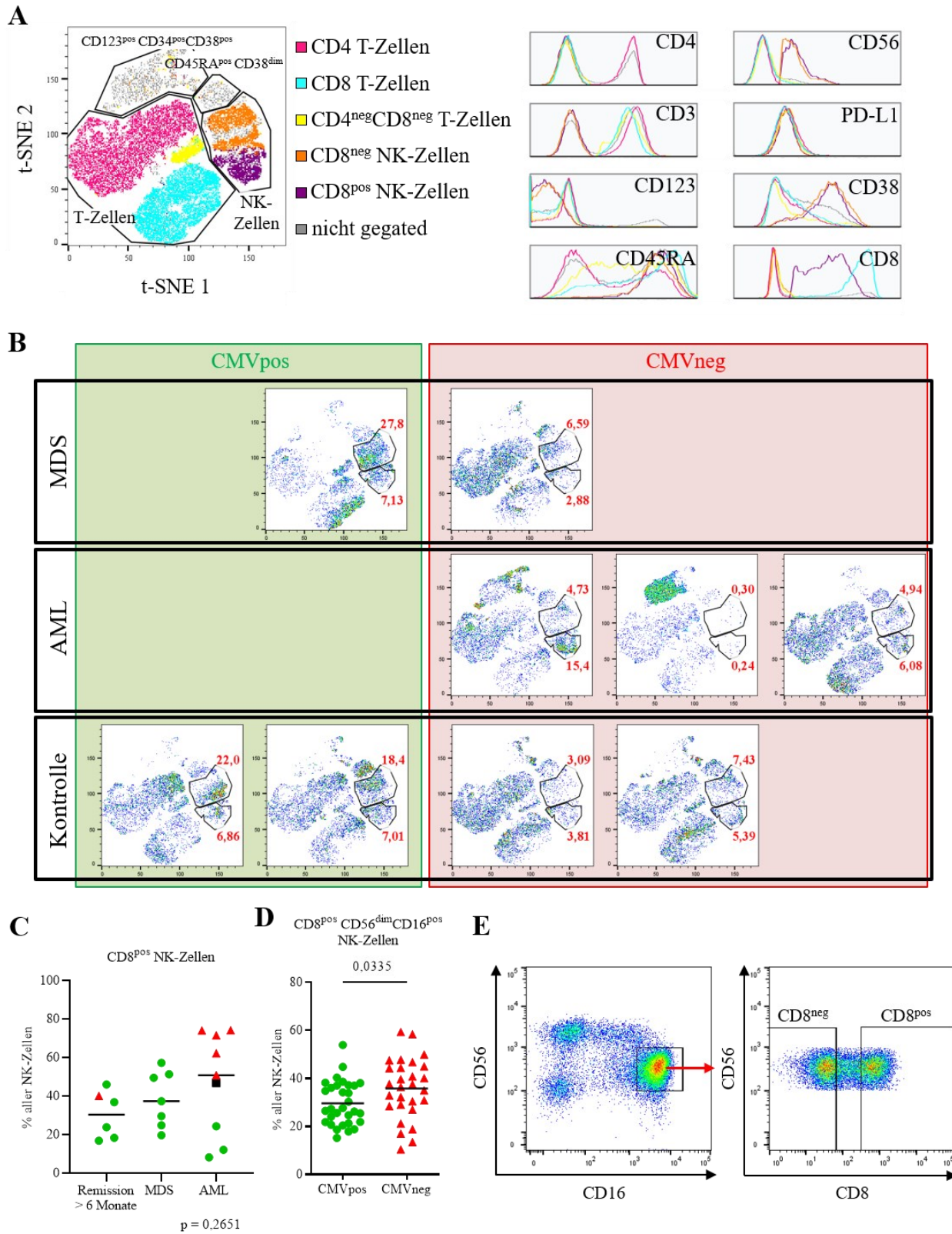


Abbildung 10 CMV-positive AML-Patienten zeigen hohe Frequenzen an CD8^{pos} NK-Zellen

Cryokonservierte PBMCs aus dem PB von zwei MDS-, drei AML- und vier gesunden Probanden wurden durchflusszytometrisch mittels t-SNE Algorithmus analysiert. **A** Die t-SNE Analyse clusterte CD4 T-Zellen (pink), CD8 T-Zellen (blau), CD4^{neg}CD8^{neg} T-Zellen (gelb), CD8^{neg} NK-Zellen (orange) und CD8^{pos} NK-Zellen (lila) sowie eine nicht näher identifizierbare CD123^{pos}CD34^{neg}CD38^{pos}- und CD45RA^{pos}CD38^{dim}-Population (grau) über die unterschiedliche Expression der Moleküle CD3, CD4, CD8, CD38, CD45RA, CD56, CD123 sowie PD-L1, die für T- und NK-Zell-Populationen farblich in den Histogrammen dargestellt sind. **B** Die Anteile der CD8^{neg} (oberes Gate) und CD8^{pos} NK-Zellen (unteres Gate) sind für jede der neun Proben, die in die t-SNE Berechnung eingeflossen sind, getrennt nach CMV-Serostatus und Krankheit in den jeweiligen t-SNE Plots notiert. **C** CD8^{pos} BM NK-Zellfrequenzen von MDS-, AML- und Vergleichsproben wurden quantifiziert. CMVneg (rote Dreiecke), CMVpos (grüne Kreise) sowie Proben von Individuen, deren CMV-Serostatus unbekannt ist (schwarzes Quadrat) wurden gesondert markiert. Es konnten keine Unterschiede zwischen den drei Gruppen festgestellt werden, jedoch zeigten CMVneg Individuen in der AML-Gruppe deutlich höhere CD8^{pos} NK-Zellfrequenzen als CMVpos Individuen. **D** CD8^{pos}CD56^{dim}CD16^{pos} NK-Zellfrequenzen wurden in PBMCs von ansonsten gesunden CMVpos und CMVneg Individuen bestimmt. CMVneg Individuen zeigten signifikant höhere CD8^{pos} NK-Zellfrequenzen als CMVpos Individuen ($p = 0,0335$, ungepaarter t-Test). **E** Die Gating-Strategie für die Sortierung von CD8^{pos} und CD8^{neg} NK-Zellen ist anhand eines repräsentativen Stainings gezeigt.

Als nächstes wurden die NK-Zellen in den einzelnen Patienten näher betrachtet. Der t-SNE Algorithmus hat CD8^{neg} und CD8^{pos} NK-Zellen getrennt voneinander geclustert. Die Expressionsstärke von CD8 auf NK-Zellen war dabei geringer als die von CD8 T-Zellen (vgl. Histogramm von CD8, Abbildung 10 A). Vergleicht man die Patienten untereinander, zeigten die CMV-seropositiven Individuen (CMVpos, grün hinterlegt) im Verhältnis weniger CD8^{pos} NK-Zellen als CD8^{neg} NK-Zellen, während sich in CMV-seronegativen Individuen (CMVneg, rot hinterlegt) ein gemischtes Bild ergab (vgl. Abbildung 10 B). Auffällig war jedoch, dass in dem CMVneg MDS-Patienten ebenfalls geringere Anteile CD8^{neg} NK-Zellen zu verzeichnen waren, sodass der Frage nachgegangen wurde, ob der CMV-Serostatus eine Erkrankung wie MDS oder AML oder vielleicht auch eine Kombination aus beiden einen Einfluss auf die Frequenz von CD8^{pos} NK-Zellen haben kann.

Daher wurde als nächstes die Verteilung der CD8^{pos} NK-Zellen im Knochenmark von MDS-, AML- und Remissions-Patienten untersucht (vgl. Anhang, Tabelle 7). Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den CD8^{pos} NK-Zellfrequenzen (vgl. Abbildung 10 C). Allerdings war keiner der MDS-Patienten CMVneg, und auch die Vergleichsgruppe enthielt lediglich nur eine CMVneg Probe, sodass nicht abschließend geklärt werden kann, ob auch ein Zusammenhang mit einer AML oder einem MDS besteht.

Nichtsdestotrotz zeigten sich in der AML-Gruppe deutliche Unterschiede zwischen CMVneg Individuen (rote Dreiecke) und CMVpos Individuen (grüne Kreise, vgl. Abbildung 10 C). Die CMVneg Individuen zeigten allesamt deutlich höhere Frequenzen als die CMVpos Individuen. In einer der wenigen Untersuchungen zu diesem NK-Zellsubtyp wird den CD8^{pos} NK-Zellen im Vergleich zu CD8^{neg} NK-Zellen eine höhere Zytotoxizität gegenüber AML-Zellen zugeschrieben [186, 187]. Um zu evaluieren, wie sich CD8^{pos}

von CD8^{neg} NK-Zellen auf Gen- und Proteineexpressionsebene unterscheiden, wurden daher in sechs gesunden Individuen mittels RNA-Sequenzierung und in vier weiteren gesunden Individuen mittels LEGEND-Screen CD8^{pos} NK-Zellen näher untersucht.

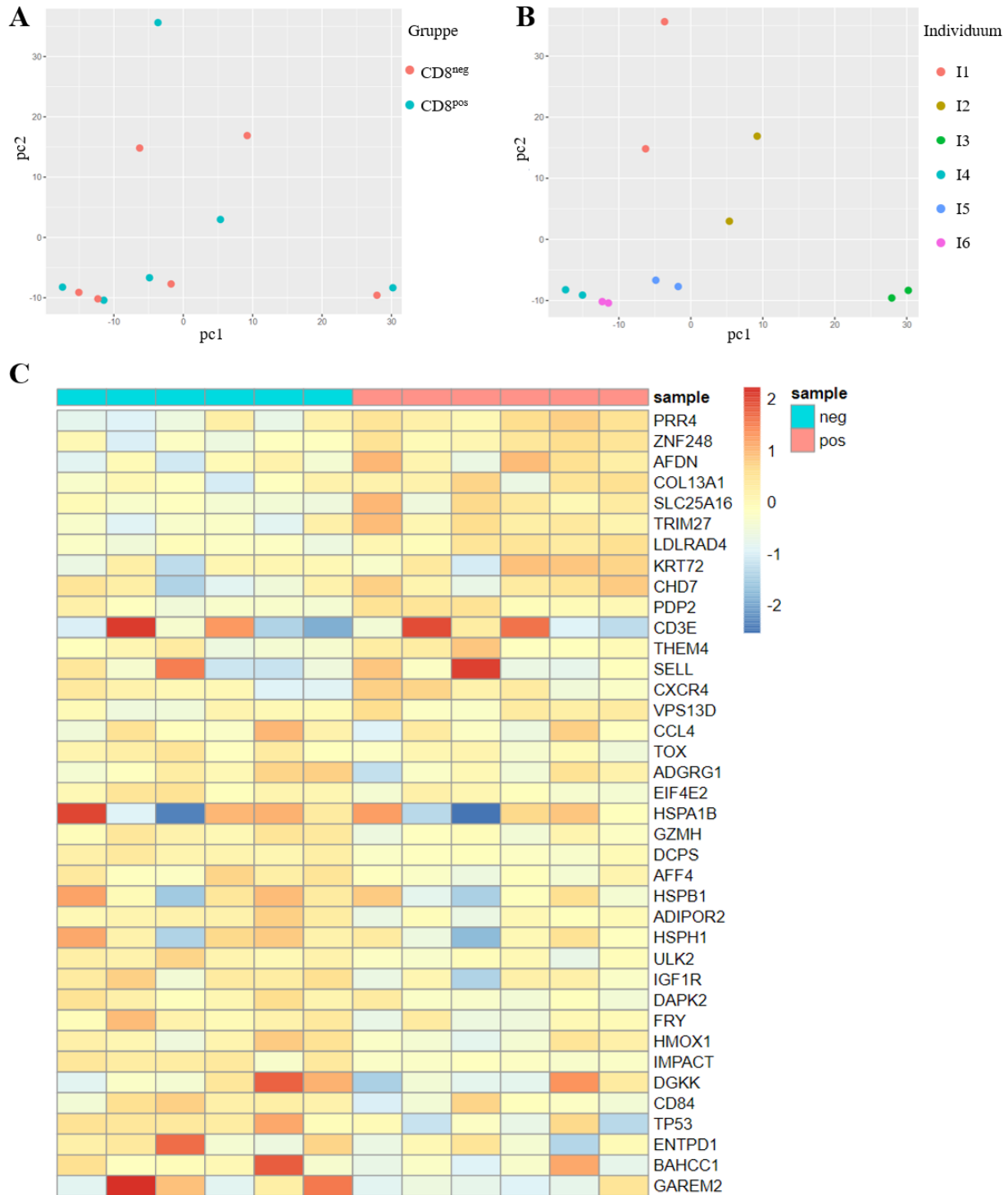


Abbildung 11 CD8^{pos} und CD8^{neg} NK-Zellen unterscheiden sich durch die differentielle Genexpression von 39 Genen

CD8^{pos} und CD8^{neg} NK-Zellen von sechs gesunden Probanden wurden mittels FACS sortiert, die Gesamt-RNA isoliert und anschließend mittels RNA-Sequenzierung analysiert. **A** In der *PCA* der insgesamt 12 Proben konnte kein Clustering von CD8^{neg} (blau) bzw. CD8^{pos} (rot) NK-Zellen festgestellt werden. **B** Die CD8^{pos} und CD8^{neg} NK-Zellen eines Individuums clusterten eng beieinander. **C** Es konnten insgesamt 39 signifikant differentiell exprimierte Gene detektiert werden. Die Heatmap der neben CD8 alternativ exprimierten 38 Gene mit einem adjustierten p-Wert von $< 0,05$ ist hier dargestellt. Zur besseren Übersichtlichkeit der übrigen alternativ exprimierten Gene wurde CD8 in dieser Heatmap nicht dargestellt.

Dienstbier hat in seiner Masterarbeit herausgefunden, dass die Expression von CD8 auf NK-Zellen von CD56^{pos}CD16^{neg} (CD56^{bright}) über CD56^{pos}CD16^{dim} zu CD56^{dim}CD16^{bright} (CD56^{dim}) NK-Zellen zunimmt [188]. CD56^{bright} NK-Zellen unterscheiden sich funktionell und in ihrem Expressionsprofil von CD56^{dim} NK-Zellen (vgl. 1.1.2.1.). Um etwaige Verzerrungen zu minimieren, die durch erhöhte Anteile von CD56^{bright} NK-Zellen zustande kommen können, wie z.B. geringere KIR^{pos} NK-Zellfrequenzen, wurden die folgenden Analysen ausschließlich an CD56^{dim} NK-Zellen durchgeführt. In der Tat zeigten die 28 CMVneg Blutspender signifikant erhöhte Anteile an CD8^{pos} NK-Zellen, verglichen zu den 31 CMVpos Blutspendern ($p = 0,0335$, Abbildung 10 D). Daraufhin wurde zunächst das Transkriptionsprofil von CD8^{pos} bzw. CD8^{neg} CD56^{dim} NK-Zellen mittels RNA-Sequenzierung vergleichend analysiert (Sortierstrategie vgl. Abbildung 10 E). Die *Principle Component* Analyse (PCA, vgl. Abbildung 11 A und B) zeigte, dass die stärksten Transkriptionsunterschiede individuell bedingt waren, da die jeweils zusammengehörenden Proben eines Individuums (vgl. Abbildung 11 B), nicht aber CD8^{pos} bzw. CD8^{neg} NK-Zellen, beieinander clusterten (vgl. Abbildung 11 A).

Dennoch konnten insgesamt 39 differentiell exprimierte Gene, davon 16 hochregulierte (inklusive des Gens für CD8 α) und 23 herunterregulierte Gene, identifiziert werden (adjustierter p-Wert $< 0,05$, vgl. Anhang, Tabelle 21 und Abbildung 11 C). Beispielsweise zeigte sich für die Gene für *Proline-rich protein 4* (PRR4), *Zinc Finger Protein 248* (ZNF248), *Afadin* (AFDN) und *Collagen Type XIII Alpha 1 Chain* (COL13A1) eine um mind. zweifach erhöhte Expression, während die Transkription der Gene für *Growth Factor Receptor-Bound Protein 2* (GRB2) *Associated Regulator of MAPK1 Subtype 2* (GAREM2), *Bromo Adjacent Homology Domain And Coiled-Coil Containing 1* (BAHCC1), *Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase 1* (ENTPD1), *Tumor Protein P53* (TP53) und CD84 in CD8^{pos} NK-Zellen gegenüber CD8^{neg} NK-Zellen um die Hälfte reduziert war.

Um die biologische Bedeutung der differentiell exprimierten Gene einzuschätzen, wurde mittels Online-tools, wie z.B. GOrilla getestet, ob Gene, die einer bereits beschriebenen Genliste (wie z.B. dem *Gene Ontology (GO)-Term* "immune response") angehören, signifikant angereichert waren. Schwach exprimierte Gene mit einer mittleren normierten Expression von unter 100 über alle Proben hinweg oder einem adjustierten p-Wert von über 0,2 wurden hierfür ausgeschlossen. Die Analyse ergab eine Anreicherung differentiell exprimierter Gene in solchen *GO-Terms*, die der Antwort auf chemische und abiotische Stimuli, der Signaltransduktion, Zelladhäsion, Zelldifferenzierung und Leukozytenmigration zugeordnet werden können (vgl. Abbildung 12). Diese können direkt und indirekt einen Einfluss auf die Immunantwort auf Pathogene haben.

Um zu untersuchen, wie der Einfluss durch Zelloberflächenproteine moduliert werden könnte und um die observierte differentielle Genexpression mit einer daraus entstehenden differentiellen Proteinexpression abzugleichen, wurde ein LEGENDScreen durchgeführt. Insgesamt konnten 22 Proteine identifiziert werden, die im Schnitt von mind. 5 % der NK-Zellen exprimiert wurden und sich um mind. 5 % in der Frequenz oder MFI unterschieden (vgl. Anhang, Abbildung 19). Davon waren 15 Proteine auf CD8^{pos} NK-Zellen im Vergleich zu den CD8^{neg} NK-Zellen angereichert, während die übrigen 7 reduziert waren.

Eine *GO-Term Enrichment* Analyse der hochregulierten Proteine, sortiert nach der relativen Veränderung der MFI, mit dem Onlinetool g:Profiler/gost und der anschließenden Reduktion redundanter *GO-Terms* mittels des Onlinetools REVIGO, konnte eine verstärkte Expression von Molekülen bestätigen, die an der Adhäsion und Migration von Zellen, der Antwort auf Stress, auf abiotische Stimuli und auf endogene Organismen sowie der Signaltransduktion zuzuordnen sind. Zusätzlich zeigte sich eine Anreicherung von Molekülen, die der Zellaktivierung und, bedingt durch das verwendete LEGENDScreen Kit, vor allem Immunsystemprozessen zuzuordnen sind. Die herunterregulierten Proteine sind den *GO-Terms* Oberflächenrezeptor-Signalwegen, der Peptidyl-Tyrosin Phosphorylierung und der $\alpha\beta$ T-Zellproliferation zuzuordnen (vgl. Anhang, Tabelle 24).

Vergleicht man die signifikant differentiell exprimierten Gene (unkorrigierter p-Wert) und Proteine, so zeigten sich CD184 (CXCR4), CD119 (IFNGR1), CD49e (ITGA5), CD328 (SIGLEC7), CD31 (PECAM), CD186 (CXCR6) und CD39 (ENTPD1) in beiden Analysen jeweils hoch- bzw. herunter-exprimiert. CD221 (IGF1R) war ebenfalls in beiden Analysen signifikant differentiell exprimiert, jedoch zeigte sich im LEGENDScreen ein signifikant erhöhter Anteil CD221^{pos} CD8^{pos} NK-Zellen, während in der RNA-Sequenzierung eine Reduktion der Transkription festzustellen war (vgl. Anhang, Tabelle 23).

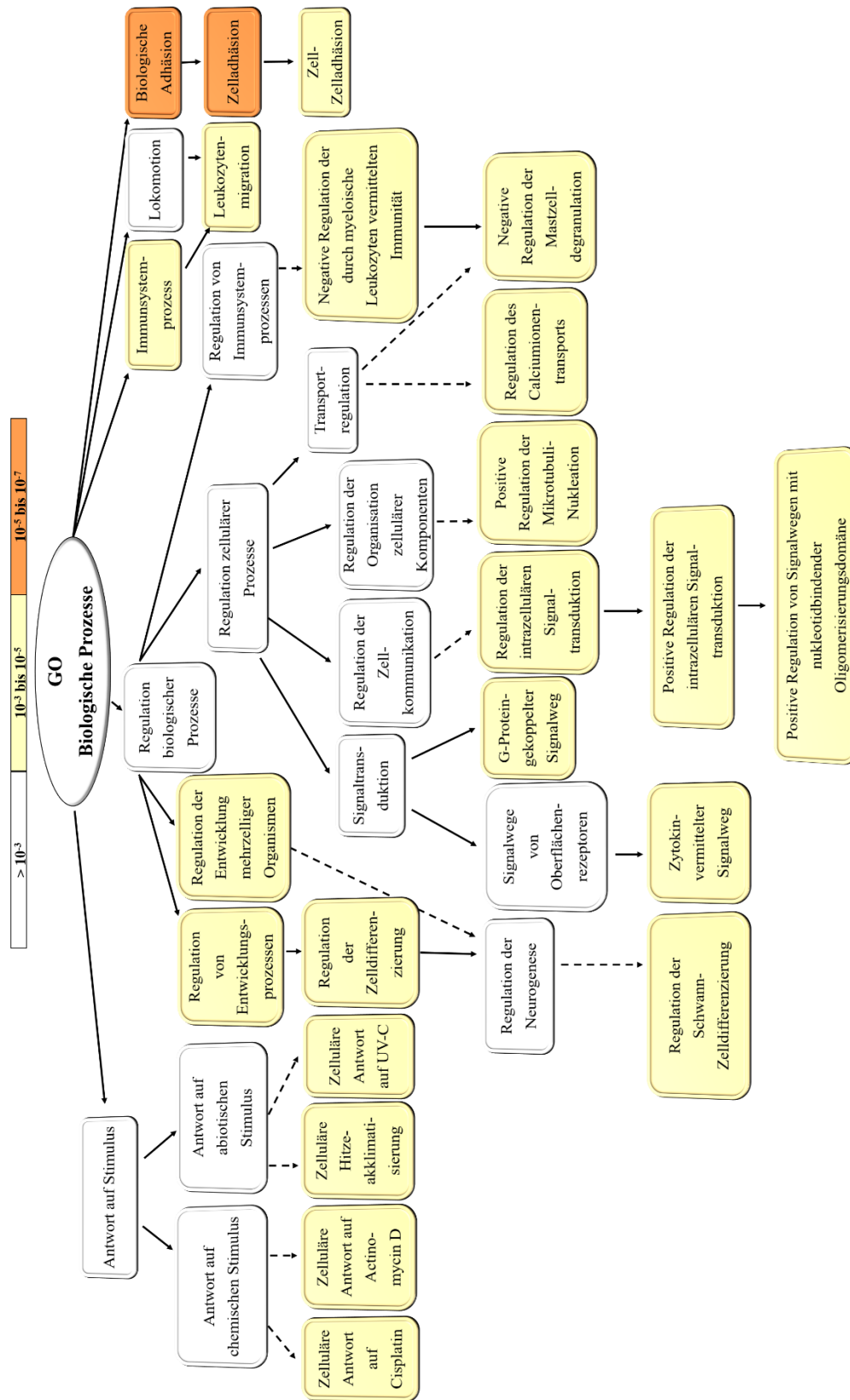
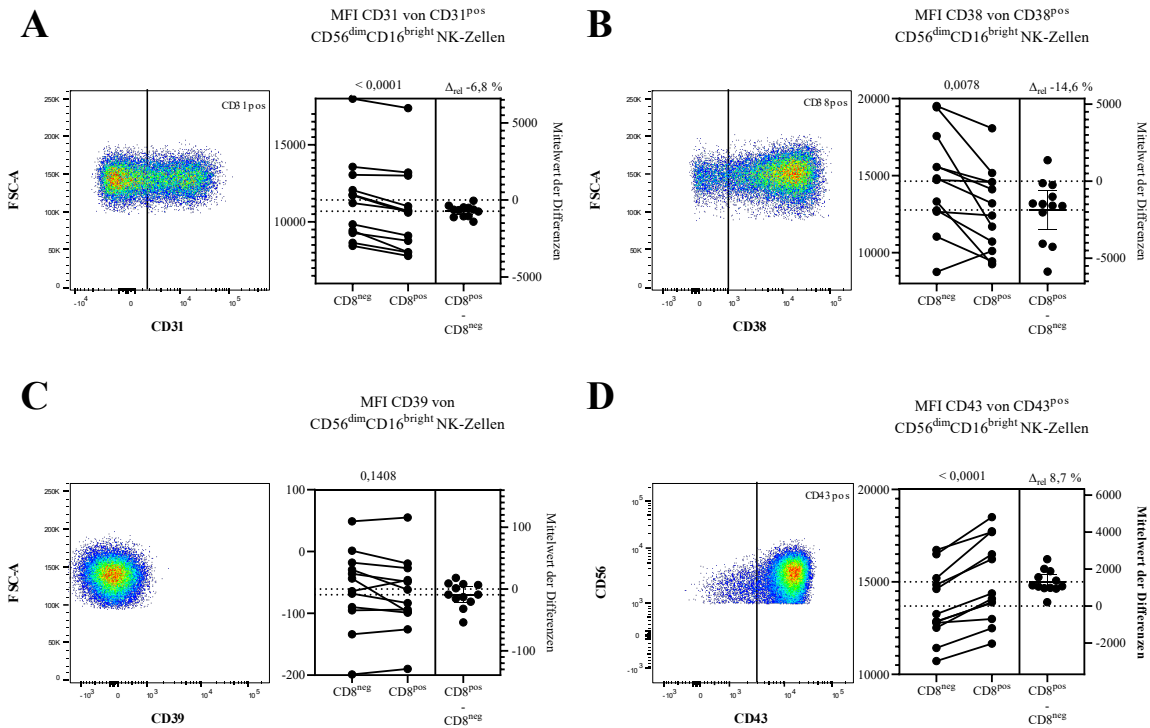


Abbildung 12 Gene-Ontology-Term Enrichment Analyse

Gene-Ontology-Term Enrichment Analyse aller differentiell exprimierten Gene in CD8^{pos} NK-Zellen im Vergleich zu CD8^{neg} NK-Zellen mittels des Onlinetools Gorilla (<http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il/>). Schwach exprimierte Gene mit einer mittleren normierten Expression von unter 100 über alle Proben hinweg oder einem adjustierten p-Wert von über 0,2 wurden hierfür ausgeschlossen. Gestrichelte Pfeile zeigen weitere, in der originalen Auswertung vorhandene, hier aber nicht aufgeführte Verbindungsstufen an. Die tabellarische Form der angereicherten *GO-Terms* und der dafür verantwortlichen Gene aller differentiell exprimierten Gene kann der Tabelle 22 im Anhang entnommen werden.

Mit Ausnahme von CD39, das in dieser größeren Kohorte keinen Unterschied zeigte (vgl. Abbildung 13 C), konnten für die übrigen Moleküle die Expressionsunterschiede zwischen CD8^{pos} und CD8^{neg} NK-Zellen bestätigt werden (vgl. Abbildung 13 A und D-L). CD43 (relative Änderung (Δ_{rel}) = 8,7 %, Abbildung 13 D), CD47 (Δ_{rel} = 6,9 %, Abbildung 13 E), CD49e (Δ_{rel} = 9,6 %, Abbildung 13 F), CD84 (Änderung (Δ) = 1,4 %, Abbildung 13 G), CD119 (Δ_{rel} = 6,8 %, Abbildung 13 I), CXCR4 (Δ_{rel} = 13,0 %, Abbildung 13 J), NKG2D (Δ_{rel} = 8,3 %, Abbildung 13 K) und Siglec-7 (Δ_{rel} = 10,4 %, Abbildung 13 L) waren im Einklang mit den RNA-Sequenzierungs- und LEGENDScreen-Daten auch in dieser Kohorte auf CD8^{pos} NK-Zellen im Vergleich zu CD8^{neg} NK-Zellen verstärkt exprimiert, während CD31 (Δ_{rel} = -6,8 %, Abbildung 13 A) und CD95 (Δ_{rel} = -9,1 %, Abbildung 13 H) erneut eine geringere Expression zeigten. Zusätzlich wurde CD38 als Aktivierungsmarker untersucht. Dieser zeigte eine Reduktion innerhalb der CD8^{pos} NK-Zellpopulation (Δ_{rel} = 14,6 %, Abbildung 13 B). Hier bleibt zunächst anhand von funktionalen Assays zu evaluieren, wie genau diese Veränderungen die Funktion von CD8^{pos} NK-Zellen beeinflussen und wie diese möglicherweise bei einer Therapie gegen AML eingesetzt werden könnten.



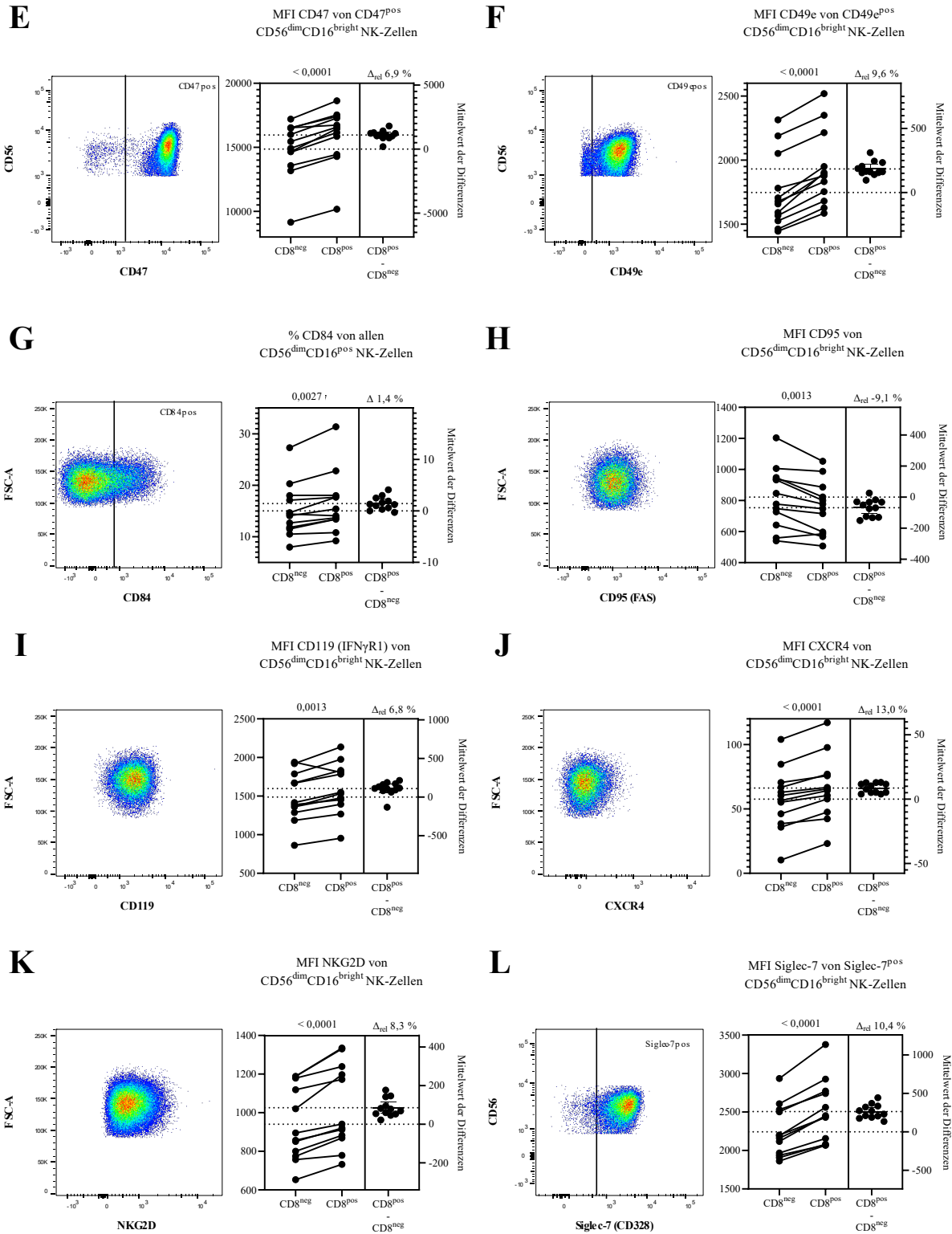


Abbildung 13 Bestätigung der LEGENDScreen- und RNA-Sequenzierungsdaten an 12 gesunden Probanden

Zur Bestätigung der LEGENDScreen- und RNA-Sequenzierungsdaten wurden solche Moleküle erneut durchflusszytometrisch untersucht, die in beiden Analysen eine gleichgerichtete Veränderung in ihrer Gen- bzw. Proteinexpression aufwiesen. Diese sind grob der Zelladhäsion bzw. der Zellaktivierung zuzuordnen und wurden mittels zweier Panels (vgl. Tabelle 13 und Tabelle 14) an PBMCs von 12 gesunden Probanden analysiert. **A-L** Es ist jeweils die Gatingstrategie sowie der „Estimationplot“ dargestellt. Der Estimationplot zeigt links im Bild die gepaarte Analyse von CD8^{neg} vs. CD8^{pos} NK-Zellen an. Der p-Wert der gepaarten t-Tests ist über dem Plot angegeben; p-Werte < 0,05 werden als signifikant betrachtet. Rechts im Plot ist die Differenz der jeweils gepaarten Werte darstellt. Der darüber angegebene Δ - bzw. Δ_{rel} -Wert stellt die Änderung von CD8^{neg} zu CD8^{pos} NK-Zellen dar. Dieser Wert berechnete sich bei der Untersuchung der Frequenzanteile durch die Differenz der Mittelwerte der Molekül^{pos} CD8^{pos} und CD8^{neg} NK-Zellfrequenzen (Δ) bzw. durch den Quotienten aus der Differenz der Mittelwerte der MFI des jeweiligen Moleküls auf CD8^{pos} und CD8^{neg} NK-Zellen, dividiert durch die MFI des Moleküls auf CD8^{pos} NK-Zellen (Δ_{rel}). Sofern zwei Populationen unterschieden werden konnten, wurden sowohl die Frequenzanteile als auch die MFI der Molekül^{pos} NK-Zellen untersucht. Hier dargestellt ist in Anlehnung an den Ergebnissen des LEGENDScreens, mit Ausnahme von CD84, die MFI der gesamten Population bzw. Molekül^{pos} NK-Zellen (A-F und H-L). CD84 zeigte nur in der Frequenz (G), nicht aber in der MFI der CD84^{pos} NK-Zellen, Unterschiede zwischen CD8^{neg} und CD8^{pos} NK-Zellen (nicht gezeigt).

3.2.2. NKG2C^{pos} NK-Zellen aus Patienten mit einer aktiven CMV-Reaktivierung zeigen die höchsten Granzym B-Grundlevel

Eine CMV-Infektion geht auf zellulärer Ebene mit einer Expansion von CMV-spezifischen T-Zellen [189] und einer Expansion von NK-Zellen, die den aktivierenden Rezeptor NKG2C exprimieren, einher [49]. Dabei kodiert CMV für ein Peptid, das den NKG2C-Liganden HLA-E an der Zelloberfläche stabilisiert [137]. Daher stellte sich die Frage, ob NKG2C^{pos} NK-Zellen in besonderem Maße zu dem beschriebenen reduzierten Rezidiv-Risiko beitragen können.

Zunächst wurde der Frage nachgegangen, ob NK-Zellen dazu in der Lage sind, AML-Zellen abzutöten. Dazu wurden die AML-Zelllinien HL-60 und MM6 jeweils mit PBMCs von CMVpos Spendern für 8 Stunden ohne Zugabe von BFA inkubiert und apoptotische AML-Zellen über Annexin V bestimmt (vgl. Abbildung 14 A). Die Inkubation der AML-Zellen mit PBMCs führte zu einer starken Induktion von Apoptose in beiden Zelllinien (HL-60 und MM6 jeweils $p < 0,0001$, Abbildung 14 B). Da die PBMCs von gesunden Spendern stammten, scheint eine adaptive Immunantwort durch tumorspezifische T-Zellen eher unwahrscheinlich, und es kann davon ausgegangen werden, dass die Apoptose in den AML-Zellen hauptsächlich durch Zellen der angeborenen Immunität, darunter NK-Zellen, mittels NCRs induziert wurde. Daher wurde als nächstes untersucht, ob BM-infiltrierende NK-Zellen ebenfalls eine CMV-spezifische Expansion von NKG2C^{pos} NK-Zellen zeigen.

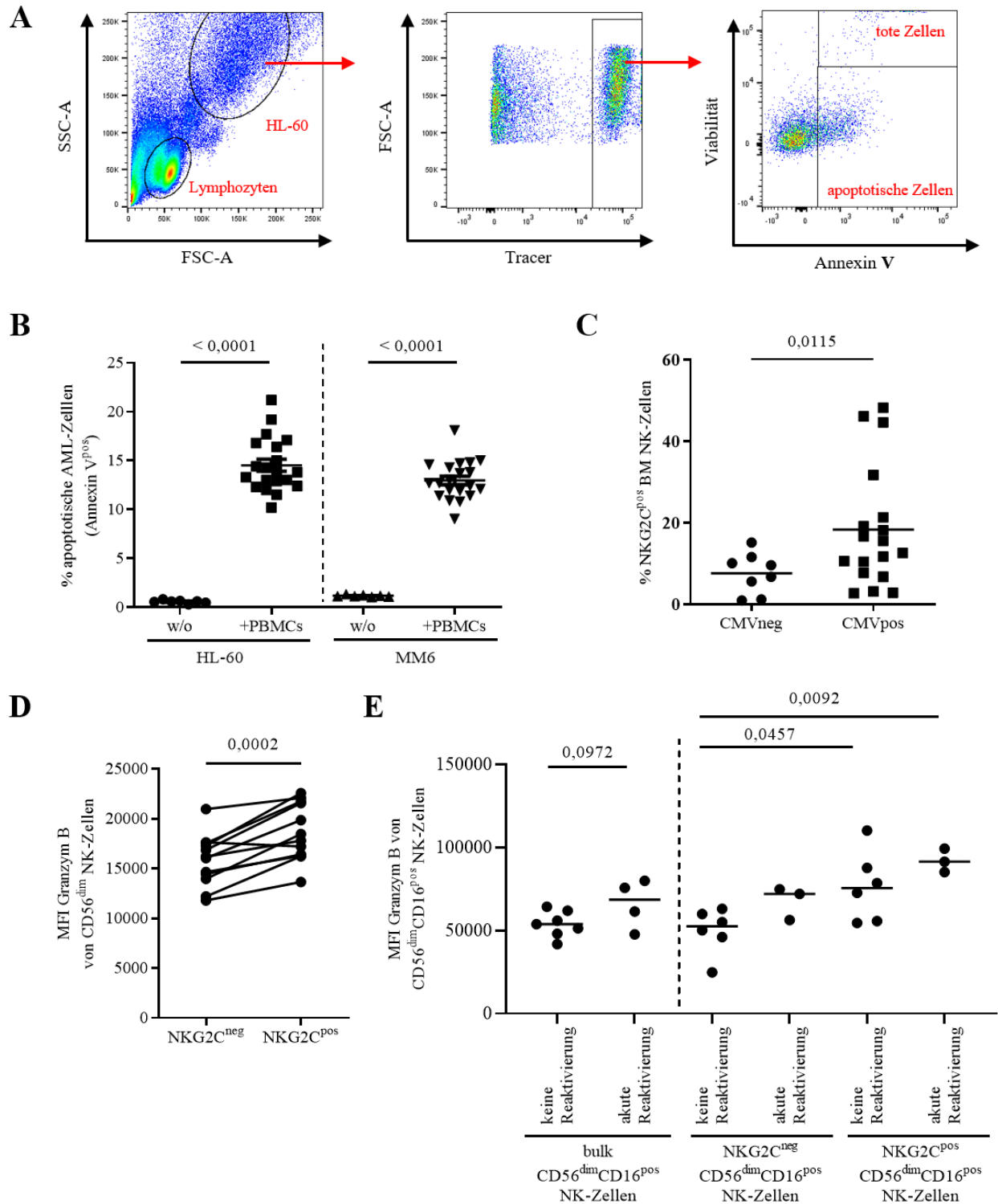


Abbildung 14 Im Knochenmark von AML-Patienten befinden sich $\text{NKG2C}^{\text{pos}}$ NK-Zellen, die nach einer akuten CMV-Reaktivierung höhere Granzym B-Level aufwiesen als $\text{NKG2C}^{\text{neg}}$ NK-Zellen

A und **B** Die AML-Zelllinien HL-60 und MM6 wurden mit einem Zell-Tracer markiert, mit PBMCs aus CMVpos Individuen für 8 Stunden ohne Zugabe von BFA inkubiert und anschließend daran apoptotische Zellen über die Detektion von Annexin V bestimmt. **A** Die Detektion von apoptotischen Zellen ist anhand eines repräsentativen Stainings gezeigt. **B** AML-Zellen zeigten nach Stimulation mit PBMCs von CMVpos Spendern deutlich erhöhte Anteile apoptotischer Zellen (HL-60 und MM6 jeweils $p < 0,0001$, ungepaarter t-Test). **C** Die Frequenz von NKG2C^{pos} NK-Zellen ist auch im Knochenmark von CMVpos Individuen erhöht ($p = 0,0115$, ungepaarter t-Test). **D** NKG2C^{pos} CD56^{dim} NK-Zellen aus dem peripheren Blut von gesunden Probanden zeigten im Grundzustand gegenüber NKG2C^{neg} CD56^{dim} NK-Zellen erhöhte Granzym B-Level ($p = 0,0002$, gepaarter t-Test). **E** NKG2C^{pos} CD56^{dim}CD16^{pos} NK-Zellen aus dem PB von Patienten mit akuter CMV-Reaktivierung zeigten die höchsten Granzym B-Level im Grundzustand.

Dazu wurden WBCs aus dem Knochenmark von AML-Patienten isoliert und der Anteil NKG2C^{pos} NK-Zellen mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. In der Tat fanden sich im Knochenmark von CMVpos gegenüber CMVneg Individuen erhöhte Anteile an NKG2C^{pos} NK-Zellen ($p = 0,0115$, Abbildung 14 C). Granzym B, das in Zielzellen u.a. über Caspasen Apoptose induzieren kann, wird vor allem von den primär zytotoxischen CD56^{dim} NK-Zellen exprimiert. Um das zytotoxische Potential von NKG2C^{pos} NK-Zellen zu untersuchen, wurden Granzym B-Level in unstimulierten CD56^{dim} NK-Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Die Zellen stammten dabei aus dem PB von CMVpos Individuen. NKG2C^{pos} NK-Zellen zeigten im Vergleich zu NKG2C^{neg} NK-Zellen höhere Granzym B-Grundlevel ($p = 0,0002$, Abbildung 14 D). Dieses Phänomen konnte auch im peripheren Blut von Patienten beobachtet werden, die sich aufgrund hämatologischer Grunderkrankungen in stationärer Behandlung befanden (NKG2C^{neg} CD56^{dim}CD16^{pos} vs. NKG2C^{pos} CD56^{dim}CD16^{pos}: $p < 0,0001$, gepaarter t-Test, Daten nicht gezeigt). Des Weiteren konnten tendenziell höhere Granzym B-Level in CD56^{dim}CD16^{pos} NK-Zellen in Individuen mit einer akuten CMV-Reaktivierung detektiert werden als in Individuen ohne akute CMV-Reaktivierung ($p = 0,0972$, Abbildung 14 E). Unterscheidet man weiter zwischen NKG2C^{pos} und NKG2C^{neg} CD56^{dim}CD16^{pos} NK-Zellen, so zeigte sich, dass NKG2C^{pos} NK-Zellen aus Patienten mit einer akuten CMV-Reaktivierung die höchsten Granzym B-Level aufwiesen (vgl. Abbildung 14 E). Für diese Analyse wurden sowohl in der Gruppe „keine Reaktivierung“ als auch in der Gruppe „akute Reaktivierung“ je ein Individuum aufgrund der geringen NK-Gesamtzellzahl ausgeschlossen, da eine weitere Unterteilung nach NKG2C^{pos} und NKG2C^{neg} NK-Zellen keine verlässlichen Daten generiert hätte. Zusammenfassend konnten NK-Zellen in AML-Zellen Apoptose induzieren. NKG2C^{pos} NK-Zellen, die auch im BM zu finden sind, zeichneten sich insbesondere im Kontext einer CMV-Reaktivierung durch hohe Granzym B-Grundlevel aus.

3.2.3. CMV induziert durch direkte und indirekte Effekte die vermehrte Expression des NKG2C-Liganden HLA-E

Die in NKG2C^{pos} NK-Zellen erhöhten Granzym B-Grundlevel ließen ein höheres zytotoxisches Potential dieser Subpopulation im Vergleich zu NKG2C^{neg} NK-Zellen vermuten. Daher wurde im nächsten Schritt analysiert, inwiefern der NKG2C-Ligand HLA-E durch eine CMV-Replikation (Infektion bzw. Reaktivierung) beeinflusst wird. Dazu wurde zunächst überprüft, ob die bereits beschriebene Stabilisierung von HLA-E durch ein CMV-Peptid auch in den AML-Zelllinien HL-60 und MM6 beobachtet werden kann. Die Zellen wurden mit einem GFP-gekoppelten CMV-Stamm infiziert, und nach viertägiger Inkubation wurde die HLA-E-Oberflächenexpression von infizierten und nicht infizierten Zellen durchflusszytometrisch verglichen. HL-60-Zellen waren bei gleicher Anzahl PFU im geringeren Maße infiziert als MM6-Zellen (0,39 % infizierte Zellen vs. 3,88 % nicht-infizierte Zellen, vgl. Abbildung 15 A und B). In beiden Zelllinien zeigten die CMV-infizierten Zellen eine stärkere HLA-E-Expression als die nicht infizierten Zellen. Auffällig war jedoch, dass bei den nicht-infizierten MM6-Zellen zwei voneinander getrennte Populationen erkennbar waren, eine mit geringer HLA-E-Expression und eine, deren Expression sich mit der von infizierten Zellen deckte (vgl. Abbildung 15 B). Insgesamt konnte ein CMV-bedingter Anstieg von HLA-E in beiden AML-Zelllinien festgestellt werden, obgleich mit den hier eingesetzten Methoden nicht geklärt werden kann, ob dieser Anstieg direkt durch das CMV-Peptid vermittelt wurde.

Zugleich stellte sich die Frage, ob auch andere Faktoren zu einer vermehrten HLA-E-Expression beitragen können. IFN γ kann neben direkten antiviralen Effekten die Expression von HLA-Klasse I Molekülen und damit auch die Expression des NKG2C-Liganden HLA-E induzieren (besprochen in [190, 191]). In einem *in vivo* CMV-Mausmodell konnte gezeigt werden, dass isolierte NK-Zellen aus akut CMV-infizierten Mäusen verstärkt IFN γ produzieren [192]. Daneben konnte in Patienten, die eine allogene Nierentransplantation erhalten haben, zum Zeitpunkt einer CMV-Reaktivierung ein signifikant erhöhter IFN γ -Serumspiegel detektiert werden [193]. Folglich wurde als nächstes die Frage untersucht, ob auch bei hSCT-Empfängern mit hämatologischen Grunderkrankungen ein Zusammenhang der IFN γ -Plasmakonzentration mit einer CMV-Replikation besteht. Dazu wurden serielle Plasmaproben von 6 Patienten mit verschiedenen hämatologischen Grunderkrankungen entnommen und mittels LEGENDplex die IFN γ -Plasmakonzentration bestimmt (vgl. Abbildung 15 C). Dabei zeigte sich ein enger Zusammenhang zwischen der CMV-Viruslast und der IFN γ -Konzentration insofern, als dass diese in Patienten mit einer CMV-Reaktivierung simultan stiegen und fielen (Patienten # 1-4, vgl. Abbildung 15 C). Der Anstieg der IFN γ -Konzentration schien dabei jedoch weniger abhängig von der konkreten Höhe der Viruslast zu sein als vielmehr von dem Ereignis der Replikation an sich. Dies spiegelte sich in den unterschiedlichen maximalen Viruslasten bei vergleichbaren ma-

ximalen IFN γ -Plasmakonzentrationen wider (Viruslast zwischen 36-152 000 Kopien/ μ g DNA, Patienten # 1 und 4, vgl. Abbildung 15 C). In Patienten ohne akute CMV-Replikation hingegen war die IFN γ -Konzentration über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg nur geringen Schwankungen unterworfen (Patienten # 5 und 6, vgl. Abbildung 15 C).

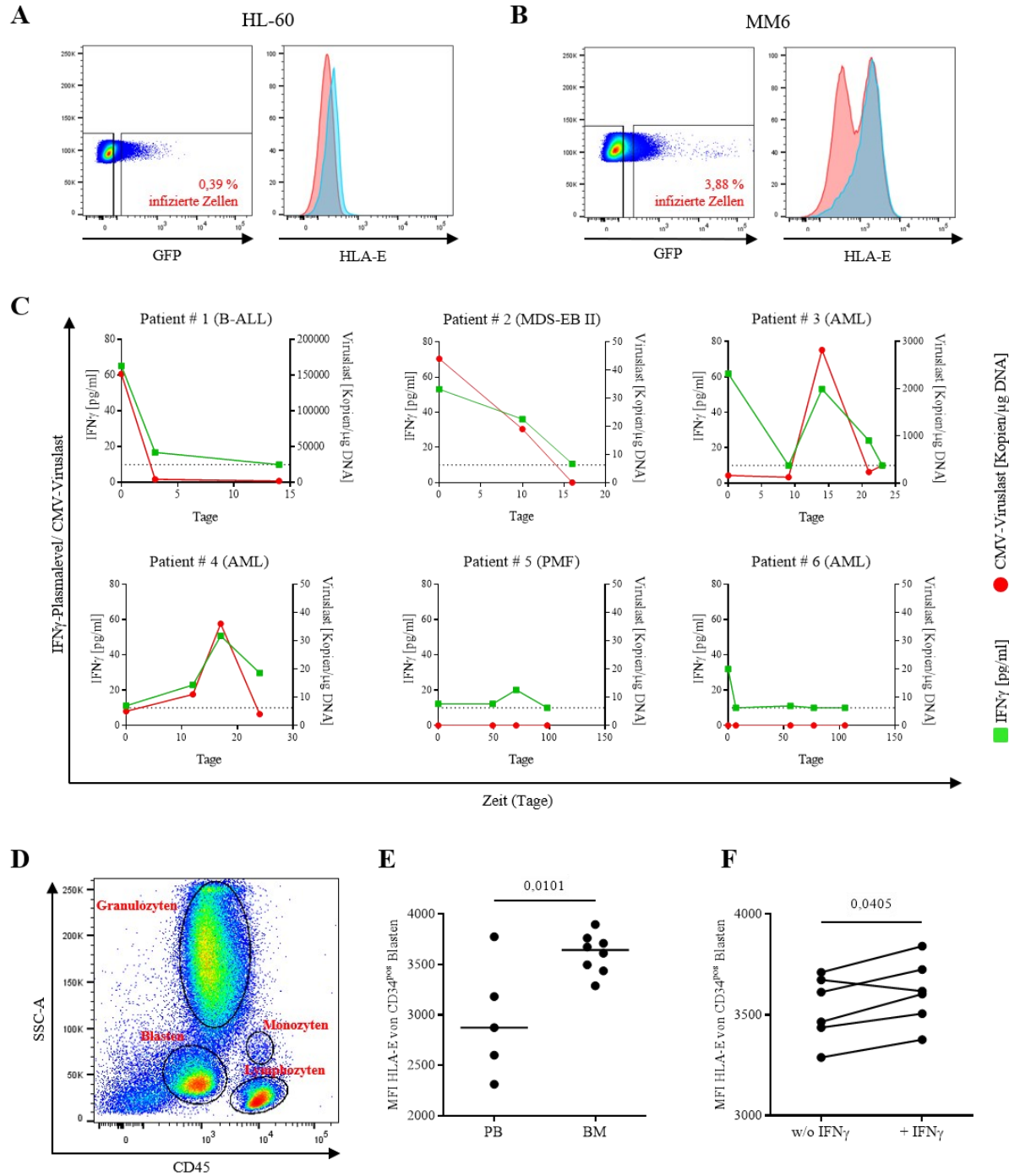


Abbildung 15 HLA-E wird in CMV-infizierten AML-Zellen sowie über IFN γ im Kontext einer CMV-Reaktivierung in primären Blasten induziert

Die AML-Zelllinien HL-60 **A** und MM6 **B** wurden mit CMV infiziert. Die HLA-E-Expressionslevel von infizierten (blau) und nicht infizierten Zellen (rot) wurden anschließend miteinander verglichen. Sowohl CMV-infizierte HL-60- als auch MM6-Zellen zeigten im Mittel eine höhere HLA-E-Expression als nicht infizierte Zellen. **C** Serielle Plasmaproben von sechs Patienten mit hämatologischen Grunderkrankungen wurden isoliert, und die IFN γ -Konzentration wurde mittels LEGENDplex assay (Human inflammation Panel 1) analysiert. In Patienten mit einer CMV-Reaktivierung im Verlauf (Patienten # 1-4) stiegen und fielen CMV-Viruslast und IFN γ -Konzentration, während in Patienten ohne akute CMV-Reaktivierung (Patienten # 5 und 6) die IFN γ -Plasmalevel keinen großen Schwankungen unterworfen waren. **D-F** WBCs aus dem BM von AML- und MDS-EB II-Patienten wurden isoliert und anschließend für 16 Stunden mit 100 U/mL IFN γ stimuliert. **D** Die Identifizierung von myeloischen Blasten mittels SSC-A und CD45 ist anhand eines repräsentativen Stainings dargestellt. **E** CD34^{pos} BM-Blasten exprimieren signifikant mehr HLA-E als Blasten aus dem PB ($p = 0,0101$, ungepaarter t-Test). **F** Die Expression von HLA-E war in CD34^{pos} BM-Blasten nach Stimulation mit IFN γ signifikant erhöht ($p = 0,0405$, gepaarter t-Test). B-ALL: Akute Lymphatische Leukämie der B-Zelllinie, PMF: Primäre Myelofibrose

Schließlich sollte die Frage beantwortet werden, ob primäre myeloische Blasten HLA-E exprimieren und ob auch diese durch IFN γ die HLA-E-Expression hochregulieren. Dazu wurden WBCs aus PB und BM von AML- und MDS-Patienten mit IFN γ stimuliert und schließlich die HLA-E-Expression der Blasten durchflusszytometrisch analysiert (vgl. Abbildung 15 D-F). Zunächst zeigte sich, dass unbehandelte Blasten aus dem BM signifikant höhere HLA-E Level zeigten als Blasten aus dem PB ($p = 0,0101$, Abbildung 15 E). Gleichzeitig wurde in den BM-Blasten, die mit IFN γ stimuliert wurden, signifikant mehr HLA-E exprimiert als in den BM-Blasten, die lediglich 16 Stunden in Medium allein inkubiert wurden ($p = 0,0405$, Abbildung 15 F). Ein solcher Anstieg konnte im PB jedoch nur bei 2 von 6 Patientenproben beobachtet werden, sodass insgesamt kein signifikanter Anstieg von HLA-E im PB durch IFN γ zu verzeichnen war ($p = 0,1954$, Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend kann sowohl die CMV-Infektion direkt als auch indirekt durch eine CMV-assoziierte erhöhte IFN γ -Konzentration zu einer verstärkten Expression von HLA-E beitragen. Insbesondere Blasten im BM scheinen durch ihre vergleichsweise hohe HLA-E-Expression, die durch IFN γ noch weiter verstärkt wird, potentiell gute Targets für BM-infiltrierende NKG2C^{pos} NK-Zellen zu sein.

3.2.4. Die Zytotoxizität von NKG2C^{pos} NK-Zellen profitiert durch eine IFN γ -Stimulation von AML-Zellen

Die erhöhte CMV-bedingte HLA-E-Expression, die erhöhten NKG2C^{pos} NK-Zellfrequenzen im BM von CMV^{pos} Individuen und die erhöhten Granzym B-Level in NKG2C^{pos} NK-Zellen lassen die Vermutung zu, dass in Kombination eine verstärkte Immunantwort gegen Tumorzellen im Kontext einer aktiven CMV-Replikation generiert werden kann. Um diese Theorie zu überprüfen, wurden HL-60- und MM6-Zellen entweder in Medium allein oder mit IFN γ über Nacht kultiviert und anschließend mit PBMCs von CMV^{pos}

Spendern für 8 Stunden stimuliert. Die Inkubation mit IFN γ führte sowohl in HL-60 als auch in MM6-Zellen zu einem Anstieg der HLA-E-Oberflächenexpression (vgl. Abbildung 16 A). Des Weiteren wurden auch die Liganden HLA-C und Bw4, die mit KIR-Rezeptoren auf NK-Zellen interagieren, durch eine IFN γ -Stimulation in den AML-Zellen hochreguliert (nicht gezeigt). Nach Inkubation mit PBMCs zeigten die IFN γ -vorstimulierten AML-Zellen signifikant höhere Frequenzen an apoptotischen Zellen im Vergleich zu AML-Zellen, die für den gleichen Zeitraum lediglich in Medium kultiviert wurden (HL-60 und MM6 jeweils $p < 0,0001$, gepaarter t-Test, Abbildung 16 B und C).

Für die anschließende Analyse der Granzym B- und Perforin-Induktion wurden die PBMCs unter Zugabe von BFA lediglich mit den HLA-C1/C2 heterozygoten MM6-Zellen inkubiert, um KIR-spezifische Verzerrungen in der Analyse zu minimieren. Dabei zeigte sich in NKG2C^{pos} NK-Zellen eine stärkere Perforin-Induktion als in NKG2C^{neg} NK-Zellen (Stimulation mit MM6 w/o IFN γ bzw. MM6 + IFN γ : NKG2C^{neg} vs. NKG2C^{pos} NK-Zellen jeweils $p < 0,0001$, Abbildung 16 D). Zusätzlich zeigten NKG2C^{pos} NK-Zellen eine höhere Perforin-Induktion, wenn sie mit IFN γ -vorbehandelten MM6-Zellen statt mit unbehandelten MM6-Zellen stimuliert wurden ($p = 0,0180$, Abbildung 16 D). Im Gegensatz dazu war die Granzym B-Induktion durch unbehandelte MM6-Zellen in NKG2C^{neg} und NKG2C^{pos} NK-Zellen vergleichbar ($p = 0,4174$). Jedoch zeigte auch die Stimulation mit IFN γ -vorbehandelten MM6-Zellen in NKG2C^{pos} NK-Zellen eine im Vergleich zu NKG2C^{neg} NK-Zellen erhöhte Granzym B-Induktion ($p < 0,0001$). Vergleicht man jeweils NKG2C^{neg} bzw. NKG2C^{pos} NK-Zellen, so stellt man interessanterweise fest, dass NKG2C^{neg} NK-Zellen eine geringere Granzym B-Induktion zeigten, wenn sie mit IFN γ -vorbehandelten MM6-Zellen stimuliert wurden statt mit unbehandelten MM6-Zellen ($p = 0,0363$). NKG2C^{pos} NK-Zellen hingegen zeigten hier eine stärkere Granzym B-Induktion ($p < 0,0001$, alle vgl. Abbildung 16 E). Zusammenfassend induzierten NKG2C^{pos} NK-Zellen als Antwort auf die Stimulation mit IFN γ -vorbehandelten MM6-Zellen jeweils die höchste Perforin- als auch Granzym B-Level. Folglich lässt sich die Vermutung aufstellen, dass diese Zellpopulation in besonderem Maße von einer IFN γ -Stimulation von AML-Zellen und somit von einer CMV-Replikation hinsichtlich ihrer Zytotoxizität profitieren könnte.

Im Setting einer CMV-Reaktivierung zeigten die NK-Zellen von Patienten mit einer akuten CMV-Reaktivierung, zumindest im Trend, höhere Granzym B-Level als solche ohne aktive CMV-Reaktivierung (vgl. Abbildung 14 E). Daher sollte zudem untersucht werden, ob diese nach Stimulation mit IFN γ -vorbehandelten MM6-Zellen mehr Granzym B freisetzen als nach Stimulation mit unbehandelten MM6-Zellen. Dazu wurden WBCs aus dem PB von hSCT-Empfängern für 16 Stunden mit MM6-Zellen (mit und ohne IFN γ -Vorstimulation) ohne BFA-Zugabe inkubiert und die Granzym B-Freisetzung bestimmt.

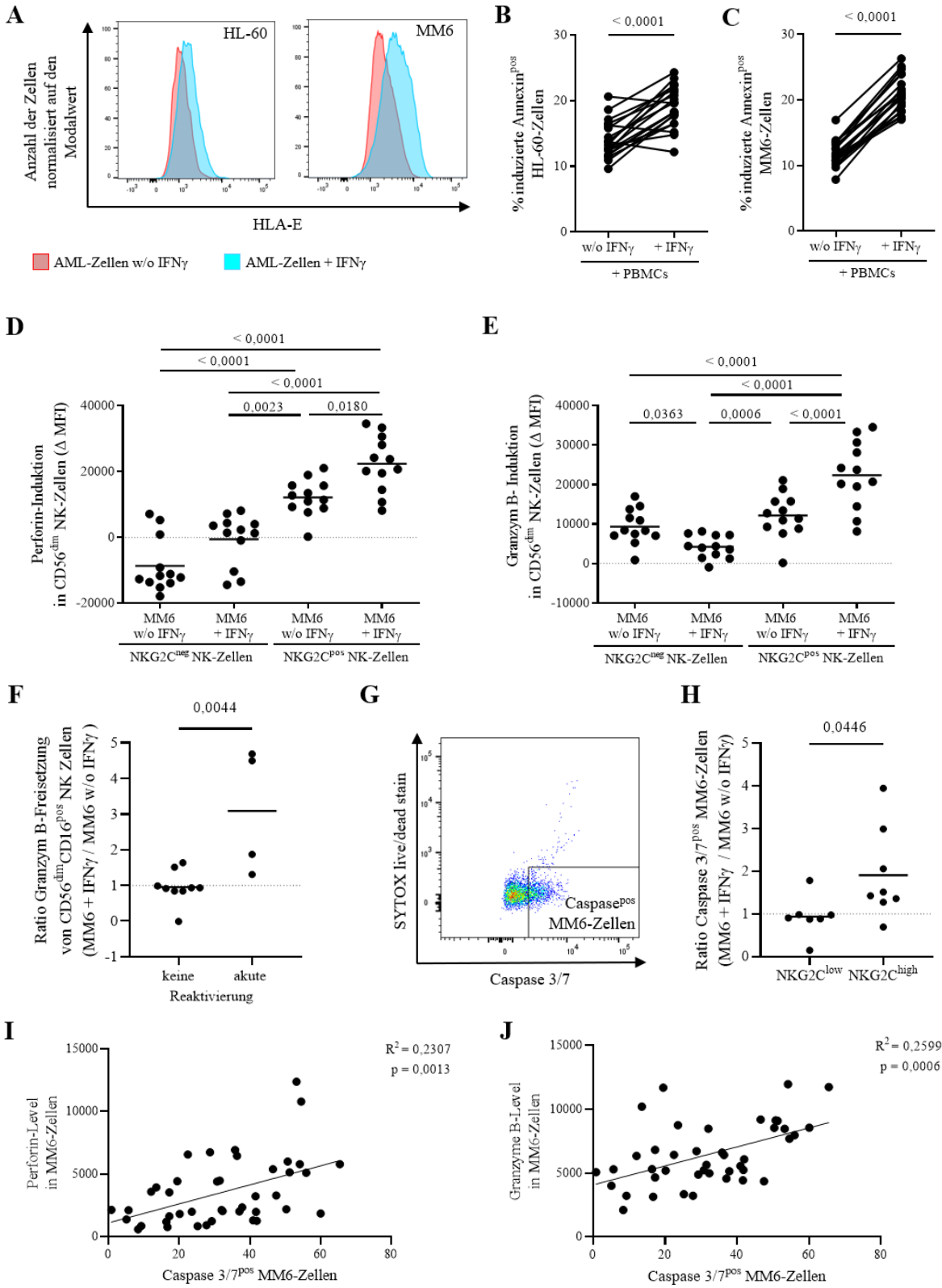


Abbildung 16 Die Zytotoxizität von NKG2C^{pos} NK-Zellen wird durch eine Vorstimulation von AML-Zellen mit IFN γ erhöht

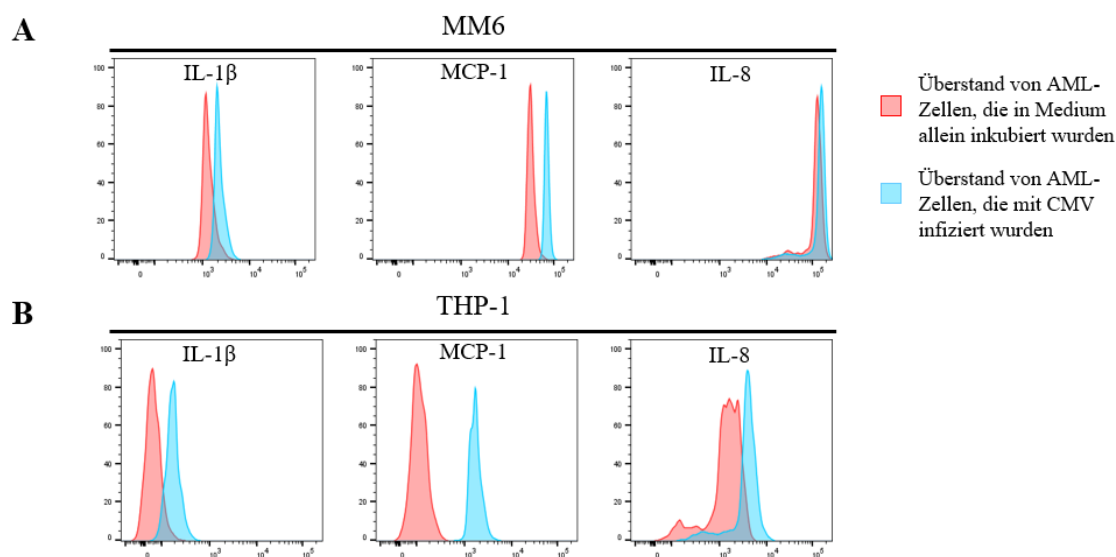
A HL-60- und MM6-Zellen wurden mit 100 U/mL IFN γ für 16 Stunden vorstimuliert, mit einem Zell-Tracer markiert und anschließend mit PBMCs von CMV pos Individuen für 8 Stunden inkubiert. Die Stimulation von HL-60- und MM6-Zellen mit IFN γ führte zu einer erhöhten Expression des NK-Zell-Liganden HLA-E. **B-C** In IFN γ -vorstimulierten HL-60- (B) und MM6-Zellen (C) wurde nach Inkubation mit PBMCs mehr Apoptose ausgelöst als in Zellen, die zuvor nur in Medium allein inkubiert wurden (HL-60 und MM6 jeweils $p < 0,0001$, gepaarter t-Test). Der Anteil apoptotischer Zellen ohne Stimulation (Medium allein bzw. IFN γ allein) wurden jeweils vom Anteil apoptotischer Zellen nach Stimulation mit PBMCs subtrahiert. **D** Die Perforin-Induktion wurde unter Zugabe von BFA ermittelt. Die Induktion ist hier definiert als die Differenz der Perforin-MFI nach Stimulation mit PBMCs und der Perforin-MFI ohne PBMC-Stimulation. NKG2C pos CD56 dim NK-Zellen zeigten eine höhere Perforin-Induktion durch Stimulation mit MM6-Zellen als NKG2C neg CD56 dim NK-Zellen, sowohl nach Stimulation mit unbehandelten MM6-Zellen (NKG2C neg vs. NKG2C pos : $p < 0,0001$) als auch nach Stimulation mit IFN γ -vorstimulierten MM6-Zellen (NKG2C neg vs. NKG2C pos : $p < 0,0001$, jeweils one-way ANOVA, gefolgt von Tukey's multiple comparison). NKG2C pos NK-Zellen zeigten dabei eine höhere Perforin-Induktion, wenn sie mit IFN γ -vorstimulierten MM6-Zellen inkubiert wurden im Vergleich zur Stimulation mit unbehandelten MM6-Zellen ($p = 0,0180$, one-way ANOVA, gefolgt von Tukey's multiple comparison). **E** Die Granzym B-Induktion in NK-Zellen wurde unter Zugabe von BFA ermittelt. Die Granzym B-Induktion wurde hier definiert als die Differenz der Granzym B-MFI nach Stimulation mit PBMCs und der Granzym B-MFI ohne PBMC-Stimulation. NKG2C pos CD56 dim NK-Zellen zeigten nach Stimulation mit IFN γ -vorbehandelten MM6-Zellen eine stärkere Granzym B-Induktion als mit NKG2C neg CD56 dim NK-Zellen ($p < 0,0001$, one-way ANOVA, gefolgt von Tukey's multiple comparison), nicht jedoch nach Stimulation mit unbehandelten MM6-Zellen. NKG2C neg CD56 dim NK-Zellen zeigten nach Stimulation mit IFN γ -vorbehandelten MM6-Zellen eine geringere Granzym B-Induktion als nach Stimulation mit unbehandelten MM6-Zellen ($p = 0,0363$, one-way ANOVA, gefolgt von Tukey's multiple comparison). Dagegen zeigten NKG2C pos CD56 dim NK-Zellen eine stärkere Granzym B-Induktion nach Stimulation mit IFN γ -vorbehandelten MM6-Zellen als nach Stimulation mit unbehandelten MM6-Zellen ($p < 0,0001$, one-way ANOVA, gefolgt von Tukey's multiple comparison). **F** WBCs aus dem PB von Patienten mit hämatologischen Grunderkrankungen wurden mit MM6-Zellen, die mit IFN γ vorstimuliert oder unbehandelt blieben, für 16 Stunden ohne Zugabe von BFA inkubiert. Die Granzym B-Freisetzung von CD56 dim CD16 pos NK-Zellen wurde anschließend bestimmt. Die Freisetzung von Granzym B wurde definiert als die Differenz aus der Granzym B-MFI in NK-Zellen nach Stimulation mit MM6-Zellen und der Granzym B-MFI in NK-Zellen, die nicht mit MM6 stimuliert wurden. Die Granzym B-Freisetzung von CD56 dim CD16 pos NK-Zellen von Patienten, die keine CMV-Virämie aufwiesen, war unabhängig von einer MM6-Vorstimulation vergleichbar, während in Patienten, die eine akute Reaktivierung durchmachten, eine stärkere Freisetzung von Granzym B nach Inkubation mit IFN γ -vorstimulierten MM6-Zellen als mit unbehandelten MM6-Zellen beobachtet werden konnte ($p = 0,0044$, ungepaarter t-Test). **G-J** MM6-Zellen, die mit IFN γ vorstimuliert oder unbehandelt blieben, wurden für 12 Stunden ohne Zugabe von BFA mit T-Zell-depletierten PBMCs von gesunden Spendern mit unterschiedlich hohen NKG2C-exprimierenden NK-Zellfrequenzen inkubiert, und Caspase 3/7 pos MM6-Zellen wurden quantifiziert. Ein repräsentatives Staining von Caspase pos MM6-Zellen ist in **G** gezeigt. **H** NKG2C high T-Zell-depletierte PBMCs induzierten in IFN γ -vorstimulierten MM6-Zellen im Vergleich zu unstimulierten MM6-Zellen mehr Caspase 3/7 pos -Zellen als NKG2C low -exprimierende Zellen ($p = 0,0446$, ungepaarter t-Test). Dabei korrelierte der Anteil Caspase 3/7 pos MM6-Zellen mit **I** Perforin ($p = 0,0013$, lineare Regression) und **J** Granzym B-Level ($p = 0,0006$, lineare Regression) in MM6-Zellen.

Hier zeigte sich in Individuen, die eine akute CMV-Reaktivierung durchmachten, eine verstärkte Granzym B-Freisetzung durch Stimulation mit IFN γ -vorbehandelten MM6-Zellen (Verhältnis der Granzym B-Freisetzung induziert durch MM6 + IFN γ bzw. durch MM6 w/o IFN γ : Median = 3,09, keine Reaktivierung vs. akute Reaktivierung: $p = 0,0044$, Abbildung 16 F). Individuen ohne CMV-Reaktivierung zeigten hingegen keine deutliche Verbesserung der Granzym B-Freisetzung durch eine IFN γ -Vorstimulation der MM6-Zellen (Verhältnis der Granzym B-Freisetzung induziert durch MM6 + IFN γ bzw. durch MM6 w/o IFN γ : Median = 0,9527, vgl. Abbildung 16 F).

Schließlich sollte analysiert werden, ob eine vermehrte Granzym B-Freisetzung durch NK-Zellen auch zu erhöhter Induktion von Apoptose über Caspase 3/7 führt. Gleichzeitig sollte überprüft werden, ob die Immunantwort in Individuen mit hohen NKG2C^{pos} NK-Zellfrequenzen durch eine IFN γ -Stimulation von AML-Zellen profitieren kann. Dazu wurden zunächst T-Zellen aus PBMCs von CMV^{pos} Individuen mit unterschiedlich hohen NKG2C^{pos} NK-Zellfrequenzen depletiert, um eine mögliche Induktion von Apoptose durch Granzym B-exprimierende T-Zellen auszuschließen. Die T-Zell-depletierten PBMCs wurden nach vierstündiger Ruhe für 12 Stunden mit unbehandelten bzw. IFN γ -vorstimulierten MM6-Zellen inkubiert, und anschließend wurden Caspase 3/7^{pos} MM6-Zellen quantifiziert (vgl. Abbildung 16 G). Individuen, die hohe NKG2C^{pos} NK-Zellfrequenzen aufwiesen, zeigten nach Stimulation mit IFN γ -vorbehandelten MM6-Zellen einen höheren Anteil Caspase 3/7^{pos} MM6-Zellen als nach Stimulation mit unbehandelten MM6-Zellen (Verhältnis von Caspase 3/7^{pos} MM6 w/o IFN γ zu Caspase 3/7^{pos} MM6 + IFN γ : Median = 1,471, NKG2C^{low} vs. NKG2C^{high}: $p = 0,0446$, Abbildung 16 H). Bei Individuen, die geringe NKG2C^{pos} NK-Zellfrequenzen aufwiesen, zeigte die Stimulation mit MM6-Zellen, unabhängig von einer IFN γ -Vorstimulation, vergleichbare Anteile an Caspase 3/7^{pos} MM6-Zellen (Verhältnis von Caspase 3/7^{pos} MM6 w/o IFN γ zu Caspase 3/7^{pos} MM6 + IFN γ : Median = 0,9077, vgl. Abbildung 16 H). Zudem zeigte sich sowohl für Perforin ($p = 0,0013$, $R^2 = 0,2307$) als auch für Granzym B ($p = 0,0006$, $R^2 = 0,2599$) ein starker positiver Zusammenhang zwischen Perforin- bzw. Granzym B-Level und Caspase 3/7^{pos} MM6-Zellen (vgl. Abbildung 16 I und J). Da MM6-Zellen kein Perforin und Granzym B exprimieren, sind die detektierten intrazellulären Moleküle durch deren Aufnahme bedingt. Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse, dass eine vermehrte Ausschüttung von Granzym B zu einer vermehrten Induktion von Apoptose in AML-Zellen führen kann und NKG2C^{high}-exprimierende Individuen von einer Stimulation mit IFN γ , wie sie vermehrt im Zuge einer CMV-Reaktivierung vorkommen kann, profitieren können.

3.2.5. Die monozytären AML-Zelllinien sekretieren durch eine CMV-Infektion vermehrt IL-1 β , MCP-1 und IL-8

Myeloische Zellen, darunter Monozyten, sind Produzenten einer Vielzahl an Zytokinen. Je nach Subtyp der AML besteht der maligne Klon aus mehr oder weniger ausdifferenzierten Monozyten und Monozyten-Vorläufern. Daher sollte abschließend geklärt werden, welche Zytokine durch eine CMV-Replikation durch Monozyten selbst sekretiert werden und somit speziell im AML-Setting einen Einfluss haben könnten. Dazu wurden die Monozyten-Zelllinien MM6 und THP-1 (beide AML) mit CMV infiziert und der Zellkulturüberstand nach viertägiger Inkubation mit dem LEGENDplex assay (human Inflammation Panel) untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Zytokine IL-1 β , MCP-1 und IL-8 in beiden Zelllinien durch eine CMV-Infektion verstärkt sekretiert wurden (vgl. Abbildung 17 A und B). Die Grundlevel und das Ausmaß des Anstiegs unterschieden sich dabei jedoch zwischen den zwei Zelllinien (MM6: 3,88 % infizierte Zellen, THP-1: 15,6 % infizierte Zellen). MM6-Zellen zeigten außerdem einen Anstieg von IL-6 und IL-10 sowie einen leichten Anstieg von IL-18, während in THP-1-Zellen diese Zytokine im Überstand von uninfizierten und infizierten Zellen vergleichbar waren bzw. im Fall von IL-18 durch die CMV-Infektion weniger stark sekretiert wurde (vgl. Abbildung 17 C und D). Laut Kommunikation mit dem Hersteller kann hierbei für IL-10 nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem detektierten IL-10 nicht um das CMV-Homolog (cmvIL-10) handelt. Um außerdem neue Therapie-Ansätze formulieren zu können, müsste ferner abschließend geklärt werden, inwiefern Immunzellen und leukämische Blasten durch die Stimulation mit den differentiell regulierten Zytokinen beeinflusst werden.



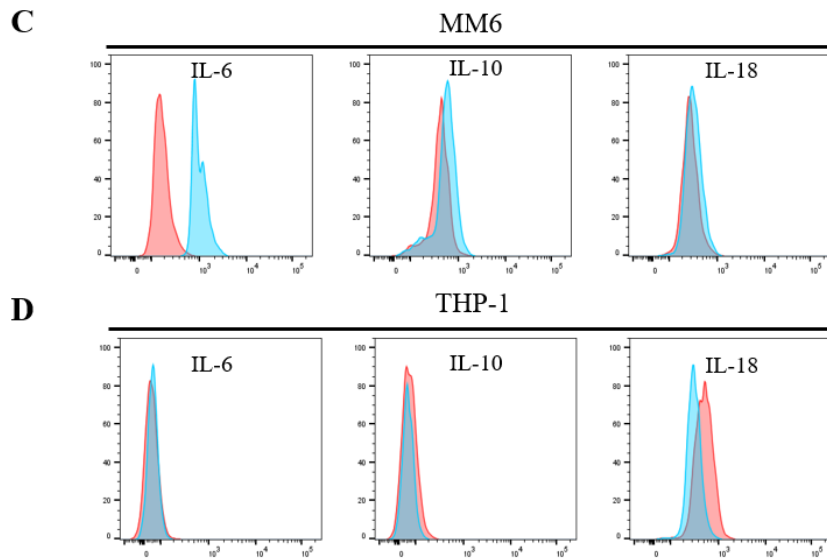


Abbildung 17 Eine CMV-Infektion führt zur Sekretion von IL-1 β , MCP-1 und IL-8

Die AML Monozyten-Zelllinien MM6 und THP-1 wurden mit dem TB40-GFP CMV-Stamm infiziert und für 4 Tage inkubiert oder in Medium allein ruhen gelassen. Anschließend daran wurde der Zellkulturüberstand isoliert und mit dem LEGENDplex™ Human Inflammation Panel 1 Kit analysiert. Sowohl in **A** MM6- als auch in **B** THP-1-Zellen wurden im Überstand von infizierten Zellen erhöhte IL-1 β -, MCP-1- und IL-8-Konzentrationen beobachtet. **C** In MM6-Zellen waren zusätzlich die Konzentrationen von IL-6, IL-10 und IL-18 im Zellkulturüberstand infizierter Zellen erhöht. **D** Währenddessen wurde im Überstand von infizierten und nicht infizierten THP-1-Zellen IL-6 und IL-10 zu gleichen Mengen bzw. IL-18 in infizierten Zellen weniger stark sekretiert.

3.2.6. AML-Patienten mit einer RUNX1-negativen Genmutation zeigen ein verringertes Rezidiv-Risiko nach hSCT, wenn sie eine CMV-Reaktivierung hatten

Das Auftreten bestimmter genetischer Aberrationen im Karyotyp oder bestimmter mit AML-assoziierten Genen beeinflusst maßgeblich das Rezidiv-Risiko [78, 194]. Daher sollte der Frage nachgegangen werden, wer besonders von den positiven Effekten einer CMV-Replikation hinsichtlich des Rezidiv-Risikos profitieren könnte. Daher wurde eine retrospektive Ereigniszeitanalyse von AML-Patienten, die eine hSCT erhalten hatten, unter Berücksichtigung genetischer Veränderungen durchgeführt. Die Analyse umfasste 105 AML-Patienten, die im Zeitraum von 2009 bis 2020 am Universitätsklinikum Düsseldorf eine hSCT erhalten hatten. Das Auftreten eines Rezidivs sowie einer akuten CMV-Replikation wurden für einen Zeitraum von 365 Tagen nach hSCT untersucht. Von den 105 Patienten wiesen 36 ein Rezidiv oder eine Persistenz ihrer AML auf. Insgesamt zeigten 57 Patienten eine aktive CMV-Replikation innerhalb des ersten Jahres nach hSCT. Das mediane Alter und die Anzahl der Patienten mit zytogenetischen Aberrationen war zwischen Menschen weiblichen und männlichen biologischen Geschlechts, ebenso wie die jeweilige Anzahl an

sich, vergleichbar (vgl. Tabelle 5). Die häufigsten genetischen Veränderungen wurden für die Gene *FLT3* (n = 31), *NPM1* (n = 18), *RUNX1* inklusive der t(8;21)(q22;q22.1) *RUNX1-RUNX1T1* Translokation (n = 8), *CEPBA* (n = 5), *IDH1/2* (n = 5) und *ASXL1* (n = 4) gefunden.

Tabelle 5 Charakteristik des Fallkollektivs der retrospektiven Ereigniszeitanalysen

	gesamt	weiblich	männlich
<i>n</i>	105	53	52
<i>Alter (Spannweite)</i>	54 (19-76)	55 (21-74)	53 (19-76)
<i>FAB Klassifikation</i>			
M0	5	1	4
M0/M1	7	3	4
M1	17	7	10
M1/M2	1	0	1
M2	16	13	3
M3	1	0	1
M4	8	4	4
M4/M5	6	3	3
M5	19	11	8
sAML	5	2	3
tAML	1	1	0
n. a. *	19	8	11
<i>Gruppierung</i>			
Veränderter Karyotyp (ohne Mutation)	34	16	18
AML-assoziierte Mutationen (ohne Karyotyp-Veränderungen)	39	20	19
Veränderter Karyotyp und AML-assoziierte Mutationen	17	9	8
Ohne bekannte AML-assoziierte genetische Veränderung	15	8	7
CMV-Replikation <i>post</i> hSCT	57	34	23
Rezidiv oder Persistenz der AML	36	16	20

* vier der hier aufgeführten Fälle sind nach der 2016 Version der WHO definiert als „AML mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderung“, zwei weitere als „AML - nicht anderweitig klassifiziert“ und ein weiterer Fall als AML "mit wiederholt auftretenden genetischen Anomalien".

Zunächst wurde die Wahrscheinlichkeit für das Rezidiv-freie Überleben (*relapse free survival*, RFS) in Abhängigkeit von einer akuten CMV-Replikation bestimmt. Im Gegensatz zur Literatur konnte in der vorliegenden Kohorte kein reduziertes Rückfallrisiko für Patienten mit einer CMV-Replikation bestätigt werden (vgl. Abbildung 18 A). Jedoch konnte in Übereinstimmung mit früheren Veröffentlichungen ein reduziertes RFS in Verbindung mit genetischen Aberrationen beobachtet werden ($p = 0,0035$, Abbildung 18 B). Daher wurde als nächstes der Einfluss einer CMV-Replikation in Abhängigkeit von der Art der genetischen Veränderungen untersucht. Es konnte kein Unterschied des RFS bei Patienten festgestellt werden, die sowohl Karyotypveränderungen als auch distinkte AML-assoziierte Genmutationen aufwiesen (vgl. Abbildung 18 C) bzw. die nur karyotypische Veränderungen aufwiesen (vgl. Abbildung 18 D). Interessanterweise zeigte sich ein Trend zu einer verbesserten RFS bei Patienten mit einer CMV-Replikation, die eine oder mehrere AML-assoziierte Genmutationen ohne begleitende karyotypische Veränderungen aufwiesen ($p = 0,0755$, Abbildung 18 E).

Da FLT3-ITD-Mutationen eine der häufigsten Treibermutationen in der AML sowie auch in dieser Kohorte sind und im Falle einer FLT3-ITD^{high}-Mutation mit einer schlechten Prognose assoziiert sind [195], wurde für die drei häufigsten Mutationen des Kollektivs überprüft, ob auch diese Patienten von einem CMV-Replikationsereignis profitierten. Tatsächlich zeigten Patienten mit einer FLT3-Mutation ein signifikant erhöhtes RFS, wenn sie eine CMV-Replikation aufwiesen ($p = 0,0170$, vgl. Anhang, Abbildung 20 A). Für NPM1-mutierte Patienten zeigte sich ein ähnlicher Trend ($p = 0,1555$, vgl. Anhang, Abbildung 20 B), während für eine Veränderung von RUNX1 ein Nachteil durch eine CMV-Replikation beobachtet werden konnte ($p = 0,0039$, Anhang Abbildung 20 C). Von den insgesamt 31 FLT3-mutierten Patienten hatten zwei Patienten eine Mutation in der Tyrosinkinase-Domäne (FLT3-TKD). Für sieben weitere war die Art der Mutation nicht näher diagnostiziert. Die übrigen 22 Patienten zeigten eine interne Tandem Duplikation der juxtamembran Domäne (FLT-ITD). Für diese 22 FLT-ITD-mutierten Patienten lag das Verhältnis der mutierten zur Wildtyp-Variante vor, 17 von ihnen hatten eine hohe Ratio. Für diese Patienten zeigte sich ebenfalls ein verbessertes RFS trotz der mit der FLT3-ITD^{high}-Mutation einhergehenden schlechteren Prognose ($p = 0,0035$, Abbildung 18 F). Somit könnte auch diese Gruppe empfänglich für eine „CMV-basierte“ Therapie sein.

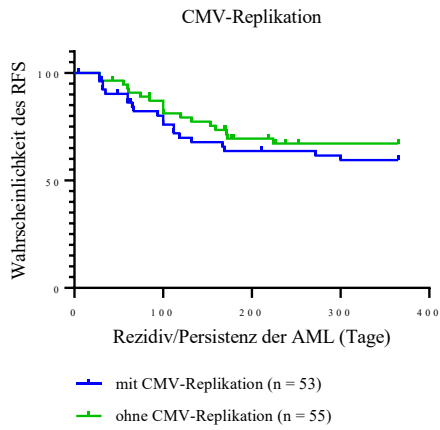
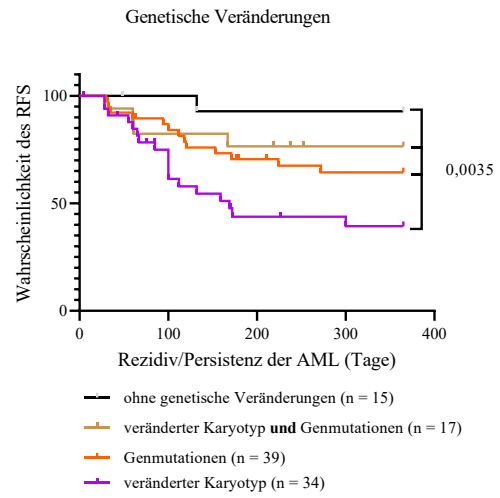
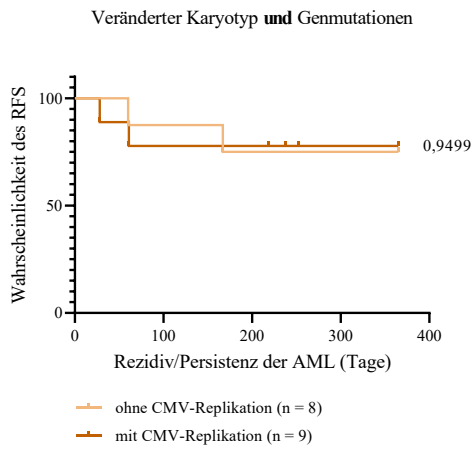
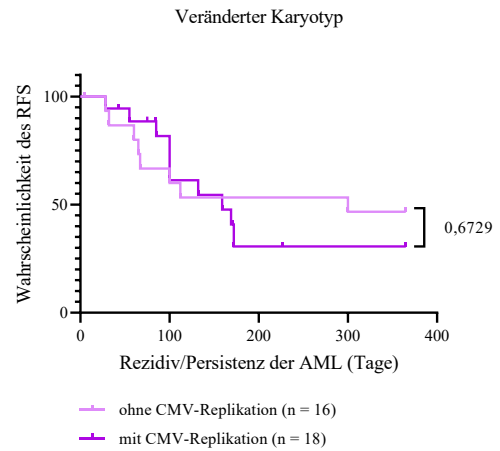
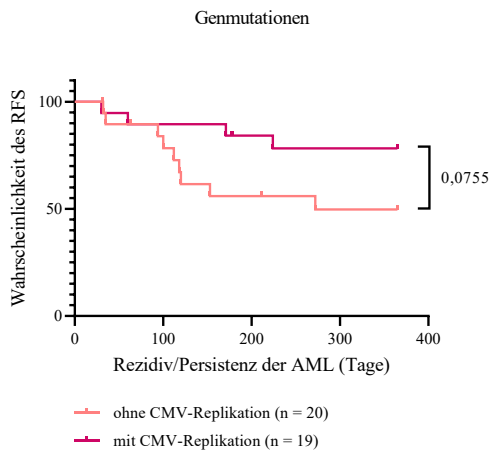
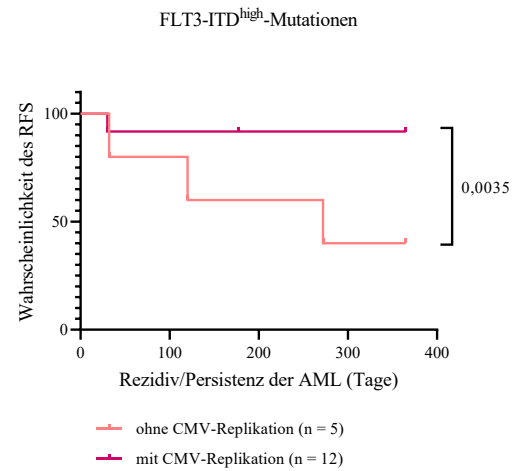
A**B****C****D****E****F**

Abbildung 18 Ereigniszeitanalysen zur Evaluation des RFS im Zusammenhang einer CMV-Replikation

Die Wahrscheinlichkeit des Rezidiv-freien Überlebens (RFS) wurde für AML-Patienten, die eine hSCT erhielten, für den Zeitraum von bis zu einem Jahr nach der hSCT ermittelt. Zu den "Rezidiven" gehörte sowohl das Wiederauftreten als auch die Persistenz der zugrundeliegenden AML. **A** Die Wahrscheinlichkeit des RSF wurde für 108 Patienten in Abhängigkeit von einer CMV-Replikation innerhalb des ersten Jahres nach der hSCT ermittelt. **B** Die Wahrscheinlichkeit des RSF wurde für 108 Patienten in Abhängigkeit von der Art der genetischen Aberrationen ihres AML-Klons bestimmt. **C-F** Die Wahrscheinlichkeit des RFS wurde in Abhängigkeit vom Auftreten einer CMV-Replikation innerhalb des ersten Jahres nach hSCT bei Patienten mit einem aberranten Karyotyp und AML-assoziierten Genmutationen (C), einem aberranten Karyotyp (D), mit AML-assoziierten Genmutationen (E) und FLT3-ITD^{high}-Mutationen (F) bestimmt. Die Ereigniszeitanalysen wurden mit dem Log-rank-Test (Mantel-Cox) durchgeführt. Als signifikant wurden p-Werte < 0,05 angesehen.

IV. Diskussion und Ausblick

MDS ist eine höchst heterogene Gruppe von Erkrankungen des Blutes, die durch eine gestörte Hämatopoese der myeloischen Reihe gekennzeichnet ist. Diese führt zu einem gehäuften Auftreten von Zytopenien und einem erhöhten Risiko dieser Patienten, eine AML zu entwickeln. Während einige MDS-Patienten bereits von einer supportiven Therapie profitieren, die die Verbesserung der Lebensqualität der Patienten zum Ziel hat, ist eine hSCT sowohl im MDS als auch in der AML die einzig potentiell kurative Behandlungsoption [86]. Mit einem medianen Erkrankungsalter von 76 Jahren im MDS und 63-71 Jahren in der AML [73, 83] und der damit einhergehenden physischen und psychischen Konstitution der Patienten ist eine hSCT nicht immer durchführbar. Daher werden alternative, weniger invasive und möglichst individuelle Therapiekonzepte dringend benötigt.

4.1. Untersuchungen von Immunzellpopulationen im MDS und in der AML

Im Feld der Krebstherapie gewinnt die Immuntherapie immer mehr an Bedeutung seitdem gezeigt wurde, dass die Expression von inhibitorischen Molekülen ein häufiger Immunevasionsmechanismus ist, der zum Ausbleiben einer adäquaten Immunantwort führt (vgl. 1.3.). Der dadurch ausgelöste Erschöpfungszustand kann sich auch durch das Vorliegen von chronischen oder latenten Infektionen, wie z.B. eine CMV-Infektion, ergeben, die eine hohe Prävalenz in der primär von MDS und AML betroffenen älteren Bevölkerung aufweist. Die Gabe von ICIs, die die Funktion von zytotoxischen Zellen wiederherstellen können, scheint somit, nicht zuletzt durch die bestätigte Sicherheit von ICIs auch in älteren Patienten, eine interessante Therapieoption im MDS und in der AML zu sein (vgl. 1.3.3.). Daher sollte in der hier vorliegenden Arbeit evaluiert werden, ob ein Versagen der Immunantwort im MDS einen relevanten Einfluss auf die Krankheitsentstehung bzw. den Progress hat und wie sich ein individuelles Therapiekonzept umsetzen lassen könnte.

In Mausstudien konnte gezeigt werden, dass das Ansprechen auf eine ICI-Therapie mit einer signifikant erhöhten Anzahl Tumor-infiltrierender NK-Zellen einhergeht [196]. Sowohl diese Studie als auch weitere im Menschen durchgeführte Studien zeigen, dass neben T-Zellen auch NK-Zellen in der Bekämpfung von Tumor- und Tumorstammzellen im MDS und in der AML essentiell sind [197, 198]. Zwar konnte hier im Vergleich mit hSCT-Empfängern in anhaltender Remission kein Unterschied im Anteil von NK-Zellen festgestellt werden, jedoch konnte im Einklang mit der Studie von Montes *et al.* [199] in der vorliegenden Arbeit ein verringertes NK- zu T-Zellverhältnis nun auch im BM von MDS- und AML-Patienten gezeigt

werden. Zwar sind sowohl NK- als auch T-Zellen essentiell für eine funktionierende Immunabwehr gegenüber Pathogenen und töten ihre Zielzellen über ähnliche Mechanismen ab, jedoch werden sie i.d.R. durch unterschiedliche Wege aktiviert (vgl. 1.1.2.1. und 1.1.2.2.). Zudem sind die bei einer Immunreaktion ausgeschütteten Zytokine wichtig für das Zusammenspiel der verschiedenen Immunzellpopulationen (besprochen in [200]). Kurz, die hier gezeigte Verschiebung in den Immunzellpopulationen deutet bereits auf eine Dysregulation des Immunsystems hin. Dieser Eindruck konnte durch die Beobachtung bestätigt werden, dass sich im vorliegenden Probenkollektiv zwischen MDS- und AML-Patienten jeweils vergleichbare PD1^{pos} und Tim-3^{pos} CD8 T-Zellfrequenzen zeigten, die positiv mit den signifikant erhöhten PD-L1^{pos} Stamm- und Vorläuferzellfrequenzen korrelierten. Zusammen deuten diese Daten auf eine Inhibition von T-Zellen durch myeloische Stamm- und Vorläuferzellen hin, was im Einklang mit bisherigen Studien steht, die in der AML gezeigt haben, dass insbesondere im Kontext von Rezidiven und dem Einsatz von hypomethylierenden Agenzien (HMAs) eine vermehrte Expression inhibierender Rezeptoren auf T-Zellen und inhibierender Liganden auf myeloischen Stamm- und Vorläuferzellen nachzuweisen ist. Auch im MDS konnte ein Zusammenhang mit dem Einsatz von HMAs bereits nachgewiesen werden [154-158, 163, 165, 184].

Die Frage, ob z.B. auch eine CMV-Infektion einen Einfluss auf den Erschöpfungszustand des Immunsystems in MDS- und AML-Patienten hat, konnte aufgrund der geringen Anzahl an CMVneg Probanden insbesondere in der Vergleichsgruppe, die für die Altersstruktur der untersuchten Probanden nicht ungewöhnlich ist, mit dem vorliegenden Probenkollektiv leider nicht adressiert werden. Außerdem wurde im vorliegenden Kollektiv aufgrund der dadurch entstehenden Gruppengröße nicht nach Therapiestatus unterschieden. So sind sowohl therapienaive als auch therapierte Patienten eingeschlossen worden. Zudem muss die Einschränkung gemacht werden, dass sich in der MDS-Gruppe lediglich Patienten mit dem Subtyp MDS-EB II oder MDS-RS-MLD befanden. Dies macht es schwer, die vorliegenden Daten uneingeschränkt auf „das“ MDS beziehen zu können. Daher sollten zukünftige Untersuchungen auch die übrigen Subtypen mit einschließen. Im Zuge dessen sollten die Untersuchungen auch auf tumorspezifische T-Zellen bzw. MDS-Stammzellen erweitert werden, um zweifelsfrei zu bestätigen, dass insbesondere die T-Zell/MDS-Stammzell-Interaktion gestört ist. Nichtsdestotrotz ergeben die vorliegenden *ex vivo* Knochenmarksuntersuchungen eine erste Rationale für den Einsatz von ICIs im MDS, auch unabhängig des Therapiestatus.

Trotz der erfolgreichen Applikation von ICIs bei bestimmten Tumoren hat die ICI-Monotherapie mit Nivolumab (anti-PD1) in einer Phase II-Studie im MDS keine klinische Wirkung gezeigt. Diese konnte jedoch ein gutes Ansprechen mit einer Kombinationstherapie von Nivolumab mit dem HMA Azacytidin zeigen [166]. Dahingegen zeigte eine jüngst veröffentlichte Phase II-Studie im Hochrisiko-MDS keinen Überle-

bensvorteil in einer Kombinationstherapie aus Azacytidin mit Durvalumab (anti-PD-L1) gegenüber Azacytidin allein [201]. Das unterschiedliche Abschneiden der ICIs im MDS im Vergleich zu anderen Tumoren kann u.a. damit erklärt werden, dass mit den Begriffen MDS und AML höchst heterogene Krankheitsbilder zusammengefasst werden, die sich durch das gehäufte Vorkommen bestimmter Treibermutationen und/oder Chromosomenaberrationen auszeichnen, aber nur selten auf eine einzige spezifische Abnormalität zurückzuführen sind [68, 69, 202]. Die individuellen genetischen Besonderheiten können für den Erfolg einer Immuntherapie jedoch entscheidend sein. *TP53*-Mutationen werden beispielsweise mit einer erhöhten PD-L1-Expression in der AML in Verbindung gebracht und sind mit einem schlechteren Rezidiv-freien Überleben in MDS hSCT-Empfängern verbunden [158, 203]. Neben dem Auftreten isolierter Mutationen, die mit einem Anstieg von ICMs in Verbindung gebracht werden, hat sich gezeigt, dass die Tumormutationslast (*Tumour mutational burden*, TMB) bei verschiedenen Tumoren mit einem klinischen Nutzen der ICI-Therapie korreliert [204-206]. Interessanterweise scheint die PD-L1-Expression jedoch unabhängig von der TMB zu sein [207-209]. Auch in dieser Arbeit zeigte ein MDS-Patient keinerlei PD1-Expression auf seinen T-Zellen, sodass der Einsatz einer ICI-Therapie, die die PD1/PD-L1-Achse zum Ziel hat, in diesem Patienten nicht zielführend gewesen wäre. Folglich sollten mehr Kriterien für die Vorauswahl von Patienten diskutiert werden, die von ICIs profitieren könnten, um die Wirksamkeit zu verbessern und therapiebedingte Nebenwirkungen zu verringern.

Daher wurde die Frage untersucht, ob die Entscheidung für oder wider den Einsatz von ICIs anhand individueller therapiebegleitender Untersuchungen getroffen werden kann. Dazu wurden serielle Proben dreier MDS-EB II-Patienten mit klinischen Krankheitsparametern korreliert. Es zeigte sich, dass die Häufigkeit von PD1- und Tim-3-exprimierenden T-Zellen bei MDS-EB II-Patienten mit einem Rezidiv hochdynamisch ist und mit dem Fortschreiten der Krankheit insofern korreliert, als dass sie gleichzeitig mit weiteren Krankheitsparametern, wie u.a. Blastenfrequenz, Auftreten von dysplastischen Zellen und MRD-Markern, zu- bzw. abnimmt. Bemerkenswert ist, dass diese Fluktuationen nicht nur bei einem hämatologischen, sondern auch bei einem molekularen Rezidiv beobachtet werden konnten. Im Gegensatz dazu konnten bei einem Patienten in Remission relativ stabile PD1^{pos}-T-Zellfrequenzen festgestellt werden. Eine engmaschige Überwachung in Situationen, in denen der Anteil erschöpfter T-Zellen zunimmt, könnte zur schnelleren Identifizierung von Patienten beitragen, bei denen eine zusätzliche ICI-Therapie erfolgsversprechend wäre. Insbesondere Patienten, deren Rezidive mit HMAs behandelt werden, könnten von einer solchen engmaschigen Überwachung profitieren, da diese mit einer erhöhten PD-L1-Expression assoziiert sind [163-165].

Erfreulicherweise zeigte die vergleichende Untersuchung von PB- und BM-Proben keine signifikanten Unterschiede in den Anteilen erschöpfter T-Zellen. Folglich könnte ein Monitoring anhand leicht zu entnehmender Blutproben durchgeführt werden. Dies hätte den Vorteil, dass die Blutentnahme auch ambulant

durch den Hausarzt erfolgen kann. Auch Algorithmen, wie z.B. vi-SNE oder FlowSom, sollten bei der Analyse hochdimensionaler durchflusszytometrischer Daten im Zuge eines therapiebegleitenden Monitorings in Betracht gezogen werden, da diese auch verbliebende LSCs identifizieren können [210, 211].

Die Untersuchung der T-Zellsubsets der seriellen Proben wurde mangels Alternativen lediglich an Patienten mit dem Subtyp EB-II durchgeführt. Folglich sollten zukünftige Analysen auch Proben der übrigen MDS-Subtypen einschließen, um die Übertragbarkeit dieser Beobachtungen auf andere Subtypen gewährleisten zu können. Zudem sollten die Untersuchungen um einen longitudinalen Vergleich von gepaarten PB- und BM-Proben ergänzt werden. Hier sollte die Zusammenarbeit mit ambulanten Fachärzten gezielt gefördert werden, da die Behandlung von MDS mit geringerem Risiko meist durch diese erfolgt.

Letztlich muss zukünftig geklärt werden, wie eine Anwendung von ICIs auf der Grundlage einer therapiebegleitenden Überwachung gestaltet werden könnte. Traditionell werden ICIs einmal alle zwei bis vier Wochen verabreicht [212]. Aufgrund der relativ einfachen Überwachung von T-Zellen im PB ist eine kurzfristige Anwendung von ICIs bis zum Erreichen einer signifikanten Verringerung der Anzahl erschöpfter T-Zellen denkbar. Dies könnte auch die ICI-bedingten Therapieresistenzen und die sogenannten *immune-related adverse events*, wie u.a. Zytopenien, Hepatiden, Myokarditis und weitere Organschäden reduzieren, die zu einer wachsenden Besorgnis in onkologischen Fachkreisen führen (besprochen in [213-215]).

Daneben bleibt zu klären, ob die zielgerichtete Therapie gegen die PD1/PD-L1-Achse auch mit anderen Molekülen als Antikörpern erfolgen oder aber ergänzend zu diesen eingesetzt werden könnte. Zunächst sollte insbesondere bei einer verringerten Anzahl zytotoxischer Zellen darüber nachgedacht werden, beim Einsatz von anti-PD-L1 Antikörpern solche Antikörper zu nutzen, die von dem Fc-Rezeptor CD16 gebunden werden können, um sich auch die Immunantwort von NK-Zellen durch ADCC nutzbar zu machen. In der Regel wurden anti-PD-L1 Antikörper so verändert, dass sie ADCC nicht induzieren können, um PD-L1-exprimierende Immunzellen vor einem Angriff durch ADCC zu schützen. Der Antikörper Avelumab jedoch, der im Merkelzellkarzinom, chemoresistentem Eierstockkrebs, fortgeschrittenem nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom und Brustkrebs getestet wird, besitzt das Potential, ADCC zu induzieren und zeigte in der Studie von Hamilton *et al.* ein vergleichbares Sicherheitsprofil zu Antikörpern, die kein ADCC induzieren können (besprochen in [216]). Gu *et al.* diskutieren darüber hinaus den Einsatz von *peptide mimetics* und *small molecule compounds* [217]. Diese ahmen die Struktur der Proteine nach, die an der natürlichen Protein-Protein-Interaktion beteiligt sind oder sie sind dahingehend verändert, dass die Interaktion mit diesen stärker als mit den natürlichen Partnern ist und daher in Konkurrenz zu den natürlichen Interaktionspartnern steht. Dadurch kann je nach Bindungspartner und Struktur eine Reaktion verstärkt oder verhindert werden. So zeigte beispielsweise das *PD-L1 targeting peptide* im Xenograft Lungenzellkarzinom-Mausmodell eine um 56 % verringerte Tumorstadiumsrate [218]. Und auch die *small molecules* BMS-1001 und

BMS-1166 [219] haben bereits im *in vitro* Modell die PD1/PD-L1-Interaktion bei geringer Zytotoxizität blockieren können (besprochen in [217]).

Neben der direkten Interaktion lässt sich aber auch die Regulation der Genexpression von PD1/PD-L1 ansteuern. Beispielsweise könnte mit c-Myc ein Transkriptionsfaktor, der dafür bekannt ist, über S100A9 die PD-L1-Expression zu verstärken [220], inhibiert werden. Des Weiteren war der Transkriptionsfaktor *B Lymphocyte-induced maturation protein* (Blimp1) in PBMCs von AML-Patienten auf mRNA- und Proteinlevel in CD4 und CD8 T-Zellen erhöht, wodurch verschiedene inhibitorische Rezeptoren, wie z.B. PD1, TIGIT und Tim-3 (hier nur CD4 T-Zellen), vermehrt exprimiert wurden. Dabei zeigte sich, dass Blimp1 u.a. an die Promotorregion von PD1 bindet und eine Inhibition von Blimp1 durch *small interfering RNA* (siRNA) Knockdown einerseits funktionelle Defekte in CD8 T-Zellen wieder restauriert und andererseits zu einer geringeren PD1-Expression führt [221]. Darüber hinaus konnten Wang X. *et al.* zeigen, dass in AML-Proben die Expression der MicroRNA-34a (mirR-34a) invers mit der PD-L1-Expression korreliert, miR-34a vermutlich die PD-L1 mRNA bindet und sowohl die PD-L1-Expression in miR-34a transfizierten Zellen als auch der Anteil apoptotischer T-Zellen, die mit diesen Zellen inkubiert wurden, abnimmt [222]. Dies ließe sich möglicherweise therapeutisch nutzen, insbesondere in Patienten, die Epstein-Barr Virus (EBV) positiv sind, da sich gezeigt hat, dass die miR-34a von *EBV nuclear antigen 2* (EBNA2) in B-Zell-Lymphomen herunterreguliert wird [223]. Zwar konnte auch 14 Tage nach Infektion von primären Monozyten mit EBV kein EBNA2 nachgewiesen und auch keine Transformation von primären Monozyten beobachtet werden [224], es bleibt jedoch zu klären, ob dies so auch für LSCs von AML und MDS gilt.

Abschließend sollte beim Targeting der Genexpression in Form von siRNA, *peptide mimetics* und *small molecules*, über Trägersysteme nachgedacht werden, die therapeutische Agenzien gezielt zu PD-L1-exprimierenden Stamm- und Vorläuferzellen transportieren, um die Effizienz der Therapie zu erhöhen und Nebenwirkungen zu reduzieren. Dies ließe sich beispielsweise mit Nanopartikeln realisieren, an denen Antikörperfragmente gegen PD-L1 und CD34 gekoppelt sind (für CD8 gezeigt in [225]).

4.2. Untersuchungen zu dem verringerten AML-Rezidiv-Risiko in hSCT-Empfängern durch akute CMV-Reaktivierungen

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit dem Einfluss von NK-Zellen im Kontext von CMV und wie Phänomene, die während einer CMV-Replikation auftreten, zu einem verringerten Rezidiv-Risiko nach hSCT beitragen können, um auch hier neue Therapieansätze formulieren zu können.

Verschiedene Studien haben sich mit der Thematik eines geringeren Rezidiv-Risikos durch eine CMV-Reaktivierung im Kontext hämatologischer Erkrankungen nach erfolgter Stammzell- bzw. Nabelschnurblut-Transplantation befasst. Während die meisten Studien ein verringertes Rezidiv-Risiko für AML und teilweise auch für MDS durch eine CMV-Reaktivierung beobachteten [110, 111, 114, 226], gibt es jedoch auch widersprüchliche Studien, die kein reduziertes Rezidiv-Risiko in der AML feststellten [227, 228]. Gleichzeitig berichten jedoch fast ausnahmslos alle Studien über ein vermehrtes Auftreten von Organschäden bis hin zu einer erhöhten Mortalität, die nicht durch ein Rezidiv bedingt ist (*nonrelapse mortality*, NRM). Diese waren teils so gravierend, dass ein potentiell vorteilhafter Effekt einer CMV-Reaktivierung durch die NRM wieder aufgehoben wurde [110]. Gelegentlich konnten die positiven Effekte nur für bestimmte hSCT-Empfänger-Gruppen beobachtet werden, z.B. für solche, die lediglich eine myoablative Konditionierung erhalten haben [229] oder solche, die einen bestimmten KIR-Allotypen aufwiesen [112]. Weiterhin zeigte sich, dass eine CMV-Replikation und eine *GvHD* sich gegenseitig induzieren können und dass die vorteilhaften Effekte der CMV-Replikation durch eine *GvHD* verstärkt werden bzw. die Unterdrückung einer *GvHD* mittels ATG die positiven Effekte nivellieren können [185, 230, 231]. Daher sollte der Frage nachgegangen werden, welche Effekte, die mit einer CMV-Replikation einhergehen, für den positiven Einfluss auf das Rezidiv-Risiko verantwortlich sind.

Da das verbesserte Überleben bereits in Abhängigkeit des CMV-Serostatus ohne konkrete Reaktivierungs- bzw. Replikationsereignisse beobachtet werden konnte [232], könnten für die positiven Effekte grundsätzlich auch langanhaltende CMV-bedingte Veränderungen in Frage kommen. Wie eingangs erwähnt, geht eine CMV-Infektion auf zellulärer Ebene, neben der Expansion von CMV-spezifischen T-Zellen, mit einer Expansion von NKG2C^{pos} NK-Zellen einher, die über HLA-E, das u.a. von einem CMV-kodierten Peptid an der Zelloberfläche stabilisiert wird, aktiviert werden kann [49, 137]. Auch in hSCT-Empfängern zeigte sich, dass eine CMV-Reaktivierung zu einem anhaltenden Anstieg von NKG2C^{pos} NK-Zellen mit guter Zytotoxizität führt [233]. Da NK-Zellen nach einer hSCT am schnellsten rekonstituieren (besprochen in [234, 235]), sollte speziell der Frage nachgegangen werden, ob NKG2C^{pos} NK-Zellen zu dem beschriebenen reduzierten Rezidiv-Risiko in der AML beitragen können.

4.2.1. Untersuchungen von NK-Zellsubsets – CD8^{pos} NK-Zellen

Zunächst sollte untersucht werden, wie sich die NK-Zellen aus dem peripheren Blut von gesunden Probanden von denen an MDS und AML erkrankten Probanden unterscheiden. Hierzu wurden PB-Proben von MDS- und AML-Patienten mit denen von gesunden Probanden mittels t-SNE vergleichend untersucht. Da hier eine CMVneg PB-Probe von einem MDS-Patienten verfügbar war, konnte neben einem Vergleich von gesunden mit erkrankten Proben außerdem der CMV-Serostatus untersucht werden. Die Analyse zeigte, dass es vermutlich eine CMV-assoziierte verringerte Expression von CD8^{pos} NK-Zellen gibt. Diese Beobachtung konnte in gesunden Probanden bestätigt werden, und auch im BM zeigten CMVpos AML-Patienten im Vergleich zu CMVneg Patienten deutlich geringere CD8^{pos} NK-Zellfrequenzen. Mangels CMVneg MDS- und Vergleichsproben konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden, ob es weiterhin einen Zusammenhang mit MDS bzw. AML auf die Verteilung dieser NK-Zellsubpopulation gibt.

Bisher wurden nur wenige Untersuchungen zu diesem NK-Zellsubtyp durchgeführt. Es konnte jedoch bereits ein Zusammenhang mit einer verlangsamten Krankheitsprogression nach einer HIV-Infektion hergestellt werden [236]. Darüber hinaus konnte eine höhere Zytotoxizität gegenüber AML-Zellen durch CD8^{pos} NK-Zellen im Vergleich zu CD8^{neg} NK-Zellen nachgewiesen werden [186, 187]. Daher sollten CD8^{pos} NK-Zellen zunächst anhand gesunder Probanden näher charakterisiert werden. Dazu wurden auf der einen Seite CD8^{pos} sowie CD8^{neg} NK-Zellen sortiert und mittels RNA-Sequenzierung die Genexpression und auf der anderen Seite mittels eines „LEGENDScreen“ die Proteinexpression vergleichend analysiert. Dabei zeigten sich zusammenfassend Veränderungen in der Gen- und Proteinexpression, die mit der Zelladhäsion, Signaltransduktion und Reaktion auf verschiedene Stimuli assoziiert sind.

Proteine und deren Gene, die jeweils entweder signifikant hoch- oder herunterreguliert waren, wurden anhand 12 gesunder Probanden erneut untersucht. Von den untersuchten Proteinen konnten, mit Ausnahme von CD39, die Voranalysen bestätigt werden. Bei den bestätigten Proteinen handelte es sich in erster Linie um Zellrezeptoren bzw. Rezeptorbestandteile (CD119, NKG2D, CD31, Siglec-7, CD95 und CXCR4) und Zelladhäsionsmoleküle (CD43, CD47, CD49e und CD84). Die verstärkte Expression des aktivierenden Rezeptors NKG2D, des IFN γ -bindenden Teils des IFN γ -Rezeptors, CD119 [237] sowie des „iss-mich-nicht“-Signals durch CD47 [238] auf der einen Seite und die verringerte Expression des Apoptose-transduzierenden Rezeptors CD95 (FAS) [239] sowie des inhibierenden Rezeptors CD31 [240] auf der anderen Seite unterstützen die These einer verstärkten Aktivierbarkeit bei verringerter Suszeptibilität gegenüber Apoptose. Durch die gleichzeitige Hochregulation von Zelladhäsionsmolekülen, wie z.B. CD49e und CD84, die eine Bindung zu den Zielzellen sowohl zeitlich als auch in ihrer Stärke erhöhen können, könnte beispielsweise die Herunterregulation von aktivierenden Liganden, wie z.B. die im Kontext einer AML bekannte Herunterregulation von NKG2D-Liganden [241], kompensiert werden. Die verstärkte Expression

des Chemokinrezeptors CXCR4 könnte dabei entscheidend für die Eliminierung von verbliebenen MDS- und AML-Stammzellen in der BM-Nische sein, da CXCR4 u.a. als BM *Homing*-Rezeptor gilt [242, 243]. Nicht zuletzt das von den NK-Zellen exprimierte CD8 α an sich, das an die $\alpha 3$ -Domäne von HLA-I Molekülen bindet und auch als Homodimer die HLA-I/TCR-Bindung verstärkt [244, 245], könnte eine ähnliche Funktion auch in NK-Zellen übernehmen. Denkbar ist eine verstärkte Bindung zwischen einem KIR-Rezeptor auf NK-Zellseite mit HLA-I Molekülen auf der Zielzelle. Zugleich konnte bereits gezeigt werden, dass die Ligation mit HLA-I Molekülen CD8^{pos} NK-Zellen vor Apoptose schützt, sodass diese NK-Zellen ihre Effektorfunktion anhaltend ausüben können [187]. Nichtsdestotrotz sollte bei den anstehenden Untersuchungen beachtet werden, dass sich in T-Zellen gezeigt hat, dass der auf NK-Zellen ausschließlich auffindbare CD8 $\alpha\alpha$ Homorezeptor die Antigensensitivität des TCRs im Vergleich zum CD8 $\alpha\beta$ Heterorezeptor verringert hat. Es wird angenommen, dass CD8 $\alpha\alpha$ auf T-Zellen möglicherweise als Co-Repressor dient [246] und somit auch in NK-Zellen andere Funktionen ausüben könnte als nur den Kontakt zu HLA-I Molekülen zu verstärken. Hier wären Proteininteraktionsanalysen mit der „Duolink“ *Proximity Ligation Assay* Technologie interessant, die zeigen könnten, ob CD8 α in NK-Zellen tatsächlich mit KIR-Rezeptoren oder anderen Rezeptoren, die an HLA-I-/HLA-I-ähnlichen Molekülen binden, co-lokalisieren [247].

Da Einflüsse auf die Stärke einer Rezeptor/Liganden-Interaktion gleichermaßen aktivierende als auch inhibierende Interaktionen betreffen können, sollte in weiteren, vor allem funktionellen Untersuchungen, dieser NK-Zellsubtyp weiter charakterisiert werden, um sich die Effekte für eine mögliche NK-Zell-basierte Therapie nutzbar zu machen. Beispielsweise können die Zelladhäsion bzw. die aktivierenden Signale durch blockierende Antikörper verhindert und die Immunantwort gegenüber AML-Zelllinien und primären Blasten untersucht werden.

Oggleich die veränderte Proteinexpression der zuvor genannten Moleküle im Einklang mit einer erhöhten Funktionalität von CD8^{pos} NK-Zellen steht, scheint die erhöhte Expression des inhibitorischen Rezeptors Siglec-7 dieser zunächst zu widersprechen. Siglec-7 bindet sowohl in *cis* als auch in *trans* sialylierte Glykoproteine, wobei eine Bindung in *trans* mit einer inhibierenden Signaltransduktion einhergeht, während durch eine Bindung in *cis* ein inhibierendes Signal maskiert wird [248, 249]. Es wird angenommen, dass die Bindung in *trans* ein „selbst“-Signal vermittelt, wodurch Körperzellen vor NK-Zelllyse geschützt werden (zusammengefasst in [250]). Im Kontext von chronischen Viruserkrankungen, wie z.B. Infektionen mit HCV und HIV, konnte hierzu gezeigt werden, dass Siglec-7^{pos} NK-Zellen in reduzierter Zahl vorliegen und Siglec-7^{neg} NK-Zellen dysfunktionaler sind [251, 252]. Zudem werden Siglec-7-Liganden auf Tumorzellen, wie z.B. K562 und HeLa, aber auch AML-Zellen, häufig hochreguliert, wodurch die entsprechenden Zellen einer Immunantwort durch Siglec-7^{pos} NK-Zellen entgehen können [253-255].

In der vorliegenden Analyse wurde des Weiteren ein Siglec-7-Ligand, CD43 [256], auf CD8^{pos} NK-Zellen hochreguliert. Die Bindung von Antikörpern gegen CD43 (MEM-59) führte zu einer Proliferation, Aktivierung und erhöhten Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber K562-Zellen [257]. Folglich könnte durch die Bindung von CD43 durch andere Immunzellen grundsätzlich ein aktivierendes Signal an NK-Zellen transduziert werden. Obgleich bisher nur bekannt ist, dass CD43 die Maskierung von Siglec-7 durch *cis*-Liganden aufheben kann [256], könnte zukünftig untersucht werden, ob eine Bindung von CD43 an Siglec-7 ebenfalls in *cis* erfolgt und ob durch diese Bindung inhibitorische Signale verhindert und damit die entsprechenden NK-Zellen empfänglicher für aktivierende Signale werden. Ein solcher Mechanismus könnte die verstärkte Lyse von LSCs durch CD8^{pos} NK-Zellen erklären und ein Ansatzpunkt sein, solche Stammzellen in der BM-Nische abzutöten, die vermehrt Siglec-7-Liganden exprimieren. Ob CD43 in *cis* inhibierende Signale verhindert, könnte durch die Blockierung von CD43 auf NK-Zellen in funktionalen Assays mit Siglec-7-Liganden-exprimierenden K562 und HeLa-Zellen überprüft werden. Hier könnte auch mit Sialidasen gearbeitet werden, die die Sialinsäure von Glykoproteinen abspalten und somit die Maskierung von Siglec-7 durch *cis*-Liganden aufheben [249]. Ergänzend könnten die funktionalen Untersuchungen mit AML-Zellen (MM6-, HL-60-, THP-1-Zellen) durchgeführt werden, die zuvor hypersialyliert wurden [258]. Je nach Ergebnis könnten sich hieraus auch neue Therapieansätze durch das Targeting von CD43, Siglec-7 oder hypersialylierte Zielzellen zur Verbesserung der NK-Zellfunktionalität ergeben. Dass dies ein vielversprechender Ansatz sein kann, konnten Untersuchungen zu *human epidermal growth factor receptor 2* (HER2)^{pos} Brustkrebs zeigen. Hier wurde der HER2-bindende Antikörper Trastuzumab an eine Sialidase konjugiert und die Immunantwort gegen HER2^{pos}-Brustkrebslinien untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Siglec-7- und Siglec-9-Liganden auf den HER2^{pos}-Zellen abnahmen und die Bindung an NKG2D dadurch verbessert wurde [259]. Weiterhin wurden bereits hochaffine Siglec-7-Liganden synthetisiert, die sich möglicherweise therapeutisch einsetzen ließen, falls inhibitorische Signale von Siglec-7-Liganden auf LSCs von AML und MDS einen signifikanten, inhibitorischen Einfluss auf die potentiell verstärkt zytotoxischen CD8^{pos} NK-Zellen haben sollten [260].

Schließlich bleibt zu evaluieren, inwiefern CMV dazu beiträgt, dass sich das Verhältnis von CD8^{pos} und CD8^{neg} NK-Zellen verändert. Dabei kommt sowohl ein direkter Einfluss, z.B. durch CMV-kodierte Proteine, als auch ein indirekter Einfluss durch die Immunantwort gegenüber CMV, z.B. durch Zytokine, infrage. Im Falle eines direkten Zusammenhangs wäre die Expression von CMV-kodierten HLA-I *Decoy* Rezeptoren denkbar. Diese besitzen ebenfalls eine $\alpha 3$ -Domäne [261], wodurch CD8 α an diese bindet und durch einen unbekanntem Mechanismus herunterreguliert werden könnte. Ferner sollte in einem größeren Kollektiv abschließend geklärt werden, inwiefern Alter und eine MDS- bzw. AML-Erkrankung zu diesem Phänotyp

beitragen. Zusammenfassend besteht in dem Feld von CD8^{pos} NK-Zellen weiterhin ein großer Forschungsbedarf, obgleich dieser NK-Zellsubtyp ein vielversprechender Ansatzpunkt für eine individualisierte NK-Zelltherapie im MDS und in der AML sein könnte.

4.2.2. Einfluss einer CMV-Replikation auf die NK-Zellfunktionalität in AML hSCT-Empfängern

Zunächst sei hier zu erwähnen, dass die im folgenden Teil diskutierten Untersuchungen zu den Mechanismen, die zu dem verringerten Rezidiv-Risiko beitragen, teilweise zeitlich vor den Untersuchungen zu den CD8^{pos} NK-Zellen stattgefunden haben. Dadurch wurde eine Unterscheidung von CD8^{pos} und CD8^{neg} NK-Zellen in den nachfolgenden Analysen nicht vorgenommen. Dies sollte jedoch bei zukünftigen Untersuchungen von NK-Zellen im Kontext von AML und MDS in Betracht gezogen werden.

Damit verbliebene LSCs entsprechend der Hypothese durch NKG2C^{pos} NK-Zellen abgetötet werden können und so zum reduzierten Rezidiv-Risiko beitragen, muss diese Subpopulation auch im BM, das eine bekannte AML-Stammzellnische darstellt (besprochen in [262, 263]), zu finden sein. In der Tat konnte in dieser Arbeit ein erhöhter Anteil NKG2C^{pos} NK-Zellen nicht nur im PB, sondern auch im BM von CMV^{pos} hSCT-Empfängern bestätigt werden. Dieser Zelltyp zeigte in den nachfolgenden Untersuchungen, besonders im Zusammenhang einer akuten CMV-Reaktivierung gegenüber NKG2C^{neg} NK-Zellen, erhöhte Granzym B-Level, die auf ein erhöhtes zytotoxisches Potential schließen lassen [264]. Zugleich exprimierten primäre Blasten aus dem BM höhere Level des NKG2C-Liganden HLA-E als Blasten aus dem PB, und auch die Expression von HLA-E konnte des Weiteren durch die Inkubation mit IFN γ , das durch ein CMV-Replikationsereignis unabhängig der tatsächlichen Viruslast vermehrt transient im Plasma nachgewiesen werden konnte, gesteigert werden. Die vermehrte Expression nach IFN γ -Stimulation und nach einer CMV-Infektion steht im Einklang mit der Literatur. Nguyen *et al.* wiesen ebenfalls erhöhte HLA-E-Level nach Stimulation mit IFN γ auf primären PB-Blasten von AML hSCT-Empfängern nach, wodurch diese *in vitro* vor NKG2A^{pos} NK-Zelllyse geschützt waren. Dieser Effekt ließ sich durch die Gabe von anti-NKG2A-Antikörper aufheben [265]. Auch die vermehrte Expression von HLA-E durch eine CMV-Infektion ist angesichts der bekannten Stabilisierung von HLA-E durch ein viruskodierte Peptid [137] nicht überraschend. Nichtsdestotrotz konnte hier die verstärkte HLA-E-Expression sowohl durch IFN γ als auch durch eine CMV-Infektion für HL-60- und MM6-Zellen und die erhöhte Expression durch IFN γ -Stimulation zusätzlich auch an primären Blasten bestätigt werden. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass der hier nachgewiesene

erhöhte Anteil an NKG2C^{pos} NK-Zellen im PB und BM von CMV^{pos} hSCT-Empfängern, die durch HLA-E aktiviert werden, eine NK-Zelllyse initiiert werden könnte.

Da die Grundvoraussetzung einer Beteiligung der NKG2C/HLA-E-Achse an der Abtötung verbliebener LSCs gegeben war, wurden im weiteren Verlauf die Immunantwort von NKG2C^{pos} NK-Zellen gegenüber AML-Zellen näher untersucht. Dazu wurden die AML-Zelllinien HL-60 und MM6 eingesetzt, die sich als suszeptibel gegenüber der Induktion von Apoptose durch angeborene Immunzellen erwiesen. Diese wurden zunächst zusammen mit den PBMCs gesunder Probanden, später auch mit den WBCs von Patienten mit einer hämatologischen Grunderkrankung, in funktionalen *in vitro* Assays eingesetzt. Dabei wurde die Zytotoxizität von NK-Zellen anhand der Granzym B- und Perforin-Induktion bzw. Freisetzung nach Inkubation mit AML-Zellen sowie der Anteil apoptotischer AML-Zellen analysiert. Die Vorstimulation von AML-Zellen mit IFN γ führte zur erhöhten Induktion von Apoptose, nachdem diese mit PBMCs von gesunden Spendern bzw. WBCs von hSCT-Empfängern mit hohen Anteilen NKG2C^{pos} NK-Zellen inkubiert wurden. Auch die Granzym B-Induktion in NKG2C^{pos} NK-Zellen bzw. die Freisetzung von Granzym B von NK-Zellen aus Patienten mit einer akuten Reaktivierung war durch eine IFN γ -Vorinkubation von MM6-Zellen verbessert. Zudem konnte hier gezeigt werden, dass eine Granzym B-Aufnahme mit einer Caspase 3/7-Aktivität und daher mit der Induktion von Apoptose in den Zielzellen korreliert.

Sowohl die erhöhten Anteile von NKG2C^{pos} NK-Zellen im BM und deren erhöhte Aktivität im Kontext einer CMV-Reaktivierung als auch die erhöhte Expression von dessen aktivierenden Liganden HLA-E sprechen dafür, dass die NKG2C/HLA-E-Achse einen Anteil zur Eradikation verbliebener LSCs beiträgt. Dafür spricht außerdem, dass insbesondere nach Inkubation mit IFN γ bzw. durch eine CMV-Infektion die Expressionsstärke von HLA-E auf AML-Zellen zunimmt. Ähnliche Untersuchungen wurden durch Bigley *et al.* bereits mit der CML-Zelllinie K562 und der Multiplen Melanom-Zelllinie U266 durchgeführt [266]. Hier zeigte sich eine erhöhte Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber K562 und U266, die stark von der HLA-E- und NKG2C-Expression abhingen. Ähnlich wie in der zuvor erwähnten Studie von Nguyen *et al.* zum HLA-E/NKG2A-Effekt gegenüber AML-Blasten konnte die erhöhte Toxizität gegenüber den suszeptiblen Zelllinien durch den Einsatz von anti-NKG2C-Antikörpern auf das Niveau von NKG2A^{pos} NK-Zellen reduziert werden.

Zukünftig müssten die vorliegenden Daten *in vivo* bestätigt werden, um eine ausreichende Rationale für den Einsatz einer NK-Zelltherapie zu haben. Es wurden bereits verschiedene AML-Mausmodelle entwickelt, in denen u.a. durch das Einbringen typischer AML-Treibermutationen ein AML-Phänotyp generiert werden konnte (besprochen in [267]). Da die AML jedoch sehr vielfältig in ihrem Erscheinungsbild und auch in ihren Ursachen ist, scheint der Einsatz dieser Mausmodelle zur Bestätigung der hiesigen Beobachtungen *in vivo* nur bedingt übertragbar bzw. sehr aufwendig, sollte die Mehrheit der Treibermutationen abgedeckt

werden. Ein humanisiertes Xenograft-Mausmodell weist ebenfalls gewisse Legitimationen in der Übertragbarkeit auf, wie z.B. veränderte Verhältnisse in den Immunzellpopulationen von humanisierten Mäusen im Vergleich zum menschlichen Spender. Dennoch bieten diese den Vorteil, dass tatsächliche, aus Patienten stammende LSCs für die sich entwickelnde AML ursächlich sind und nicht die artifiziell eingebrachten Treibermutationen, die die Realität der Krankheitsentwicklung, -Progression und -bekämpfung im Menschen möglicherweise nicht korrekt widerspiegeln (diskutiert in [268, 269]). Mit einem Xenograft-Modell könnten gezielt NK-Zell-Therapieoptionen evaluiert werden, die sich aus den hier gemachten Beobachtungen ergeben. Beispielsweise könnte der Transfer von NKG2C^{pos} NK-Zellen zur Steigerung der Eradikation verbliebener LSCs, entweder in Kombination mit dem anti-NKG2A-Antikörper Monalizumab [151] bzw. einem NKG2A-Proteinexpressionsblocker [270] oder unterstützt durch eine IFN γ -Applikation, untersucht werden. Gleichzeitig sollte nicht vernachlässigt werden, dass IFN γ die Expression anderer Moleküle, darunter die Expression von HLA-I und -II Molekülen, verbessert [271], von denen einige Liganden für KIR-Rezeptoren sind. So wurden in den hier durchgeführten Experimenten beispielsweise ebenfalls die Moleküle HLA-C und HLA-Bw4 auf HL-60- und MM6-Zellen durch IFN γ hochreguliert (nicht gezeigt), die u.a. Liganden für die inhibierenden KIR-Rezeptoren KIR2DL1, KIR2DL2 bzw. KIR2DL3 (jeweils HLA-C) und KIR3DL1 (Bw4) sind. Eine verstärkte Expression könnte sich somit auch nachteilig auf die Funktion von NK-Zellen auswirken, die die entsprechenden KIR-Rezeptoren exprimieren. Dies gilt es insbesondere hinsichtlich einer potentiellen NK-Zelltherapie zu berücksichtigen. So könnten z.B. gezielt NKG2C^{pos} NK-Zellen transferiert werden, deren inhibierende KIR-Rezeptoren mit den HLA-Molekülen des Empfängers nicht oder nur schlecht interagieren, sodass der durch die Alloreaktivität der NK-Zellen bedingte *Graft versus Leukemia* Effekt über die NKG2C/HLA-E-Achse verstärkt wird (besprochen in [272]). Eine andere Möglichkeit wäre die Transfusion von NKG2C^{pos} NK-Zellen, die zusätzlich mehrere aktivierende KIRs exprimieren, da sich in der AML gezeigt hat, dass sich dies günstig auf die Prognose für ein Rezidiv-freies Überleben auswirkt [273, 274]. Hier ist jedoch zu beachten, dass durch aktivierende Rezeptoren, wie z.B. KIR2DS4, die Gefahr einer *GvHD* zunimmt [275].

Abschließend wurde untersucht, welche pro- und anti-inflammatorischen Zytokine durch CMV-infizierte AML-Zellen selbst ausgeschüttet werden, da diese das Micromilieu und damit die direkte zytotoxische Immunantwort modulieren können. Dazu wurden MM6- und THP-1-Zellen mit CMV infiziert und der Zellkulturüberstand von infizierten und nicht infizierten Zellen ebenfalls systematisch untersucht. Hier konnte in dem Medium von infizierten MM6- und THP-1-Zellen ein Anstieg von IL-1 β -, MCP-1- und IL-8- sowie abhängig von der infizierten Zelllinie eine veränderte IL-6- (in MM6 erhöht), IL-10- (in MM6 erhöht) und IL-18- Konzentration (in MM6 erhöht, in THP-1 verringert) beobachtet werden.

Die Rolle für IL-1 β in der Immunmodulation ist als kontrovers zu betrachten. Zum einen zeigte sich, dass CD34^{pos}-Zellen aus Nabelschnurblut durch IL-1 β zur Differenzierung von maturierten NK-Zellen, die CD16, KIR-Rezeptoren und Effektormoleküle, wie z.B. Perforin, exprimierten, angeregt werden [276]. Zum anderen zeigt eine weitere Studie eine Hochregulation des aktivierenden Rezeptors NKp44 auf NK-Zellen durch IL-1 β [277], sodass insgesamt eine zusätzliche IL-1 β Ausschüttung durch eine CMV-Infektion den Anteil zytotoxischer NK-Zellen erhöhen könnte. Allerdings zeigt die gleiche Studie auch eine vermehrte Expression von NKG2A auf NK-Zellen, wodurch die IFN γ -bedingte verstärkte HLA-E-Expression während einer akuten CMV-Replikation auch einen inhibierenden Effekt haben könnte. Hinzu kommt, dass Carey *et al.* einen direkten wachstumsfördernden Effekt von IL-1 β in einem Teil der von ihnen untersuchten primären AML-Zellen beobachten konnten [278]. Nichtsdestotrotz zeigte sich, dass der direkte wachstumshemmende Effekt von IFN γ auch in Gegenwart von IL-1 β fortbesteht [279].

MCP-1 (bzw. CCL2) wirkt rekrutierend auf verschiedene Immunzellen, insbesondere jedoch auf Monozyten, die *in vitro* eine verstärkte Migration als Antwort auf eine MCP-1-Sekretion durch primäre AML-Blasten zeigten [280]. Die hier beobachtete verstärkte MCP-1-Freisetzung während einer CMV-Infektion und die damit einhergehende Monozytenmigration (inklusive Antigenpräsentation) könnten somit eine verstärkte tumorspezifische Lyse durch T- und NK-Zellen ergeben, die ebenfalls durch MCP-1 rekrutiert werden können [281, 282]. Jedoch zeigen sowohl THP-1-Zellen als auch primäre AML-Blasten ebenfalls eine verstärkte Migration als Antwort auf eine MCP-1-Stimulation. Im Falle einer CMV-Reaktivierung innerhalb des BMs könnten somit AML-Blasten aus der Peripherie in das BM rekrutiert werden, wodurch diese schwerer zugänglich für Immunzellen und Chemotherapien sein könnten. Des Weiteren scheint MCP-1 auf AML-Zellen auch einen verstärkenden Effekt auf deren Proliferation zu haben [283]. Die potentiell tumorfördernden Eigenschaften von MCP-1 konnten z.B. auch in Brustkrebs gezeigt werden [284].

Für THP-1-Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass IL-6 und IL-8 durch die frühen Genprodukte von CMV hochreguliert werden [285-287]. Beide Moleküle werden als proinflammatorisch eingestuft, wobei IL-6 vor allem die Differenzierung verschiedener Immunzellen, darunter B- und T-Zellen, und die Produktion von akuten Phase Proteinen stimuliert und IL-8 vor allem auf Neutrophile chemoattraktiv und aktivierend wirkt (zusammengefasst in [288, 289]), was insgesamt für ein aktiviertes Immunsystem spricht. Jedoch verbessert IL-8 überraschenderweise auch die Replikation verschiedener Viren, darunter CMV, und unterdrückt die antivirale Immunantwort durch die Inhibition von IFN α [290, 291]. Zudem zeigten sowohl IL-6 als auch IL-8 einen inhibierenden Einfluss auf die NK-Zellfunktion *in vitro* und in einem *in vivo* Xenograft-Modell des Ösophagus-Plattenepithelkarzinoms [292]. Somit könnten IL-6 und IL-8 trotz ihrer vorherrschenden Rolle als proinflammatorische Zytokine einen negativen Effekt auf die direkte und NK-Zellvermittelte antitumorale Immunantwort im Kontext einer CMV-Replikation haben.

Für NK-Zellen zeigte sich, dass IL-18 allein keine signifikante Änderung der Zytokin- oder Chemokininduktion in ruhenden NK-Zellen bewirkt, jedoch in Kombination mit IL-12 zu einer starken IFN γ -Induktion führt [39]. Allerdings wird durch die Kombination aus IL-12 bzw. IL-15 und IL-18 auch GM-CSF in NK-Zellen induziert, das in Kombination mit IL-3 und TNF α einen tumorfördernden Effekt auf AML-Zellen haben kann [39, 293]. Weaver *et al.* diskutieren darüber hinaus anhand eigener vorläufiger Daten einen synergistischen Effekt von IL-18 mit IL-23 bei der Induktion von IL-17 durch Th17-Zellen, das einen tumorfördernden Effekt auf AML-Zellen haben kann [294].

Diese Fälle zeigen, dass, obgleich jedes der besprochenen Zytokine eine vorherrschende Rolle in der Immunmodulation hat, aufgrund ihrer oft kontextabhängigen dualistischen Rolle dennoch zu klären bleibt, wie sich deren veränderte Zusammensetzung während einer CMV-Replikation im direkten Zusammenspiel auf Immunzellen und auf LSCs auswirkt. Hier kann zunächst mit einer Stimulation von PBMCs bzw. sortierten NK-, Stamm- und Vorläuferzellen mit verschiedenen Konzentrationen der Zytokine *in vitro* gearbeitet werden. Dabei bieten sich chemisch definierte, Serum-freie Medien an, die eine standardisierte Testumgebung gewährleisten können. Zugleich sollte dabei geklärt werden, ob und welche Zytokine langanhaltende Effekte auf die Immunzellpopulationen und LSCs haben oder ob diese, wie ihre Freisetzung, nur zeitlich begrenzt sind. Dies könnte bei der Einschätzung helfen, welches die vielversprechendsten Kandidaten für eine kombinierte Immunzelltherapie sind.

Schließlich sollte anhand retrospektiver Überlebenszeitanalysen überprüft werden, welche AML-Patienten von einer individuellen Therapie, die sich aus den hier erbrachten Erkenntnissen möglicherweise ableitet, profitieren können. Im Gegensatz der zu anfangs ausführlich diskutierten Literatur konnte im vorliegenden Probenkollektiv kein Vorteil einer CMV-Replikation auf das Rezidiv-Risiko als Ganzes festgestellt werden. Dies kann zum einen mit der unterschiedlichen Definition einer CMV-Reaktivierung bzw. Virämie erklärt werden. In den verschiedenen Studien wurde ein Virustiter von 1-200 pp65⁺ Zellen/400 000 WBCs bzw. von 100-5 000 Kopien/mL als Virämie definiert. In der vorliegenden Arbeit wurde bereits eine einmalig positive, CMV-spezifische PCR, unabhängig der tatsächlichen Viruslast, als CMV-Replikationsereignis gewertet. Zum anderen wird in der Hämatologie des Uniklinikums Düsseldorf bei einer CMV-Risikokonstellation standardmäßig Valaciclovir zur Prävention einer CMV-Reaktivierung verabreicht, wodurch eine CMV-Virämie seltener auftritt und meist eher schwach ausfällt [295]. Eine präventive, antivirale Therapie wurde in einigen der genannten Studien ebenfalls durchgeführt, jedoch nicht ausnahmslos in allen.

Nichtsdestotrotz konnte hier gezeigt werden, dass Patienten, die eine AML-assoziierte Treibermutation aufwiesen, einen Trend hin zu einem verbesserten RFS durch ein frühes CMV-Replikationsereignis hatten. Des Weiteren zeigte sich ein signifikant verbessertes Überleben durch eine CMV-Replikation in Patienten mit

einer *FLT3*-Mutation. Interessanterweise galt dies auch für Patienten mit einer *FLT3*-ITD^{high}-Mutation, die mit einer schlechten Prognose einhergeht [195]. *FLT3* kodiert für eine Transmembran-Rezeptortyrosinkinase, die in frühen Stadien von Stamm- und Vorläuferzellen exprimiert wird und u.a. Überlebens- und Proliferationssignale weiterleitet. Sowohl interne Tandemduplikationen (*FLT3*-ITD) als auch Mutationen in der Tyrosinkinasedomäne (*FLT3*-TKD) führen zu einer konstitutiven Aktivierung von *FLT3* (besprochen in [195]). Derzeit werden Patienten mit einer *FLT3*-Mutation mit verschiedenen Tyrosinkinase-Inhibitoren behandelt, durch die ein enormer Überlebensvorteil erzielt werden konnte. Nichtsdestotrotz kommt es auch hier immer wieder zu Resistenzen durch vorhandene oder während der Therapie erworbene Mutationen (zusammengefasst in [296]). Ob und wie die hier im Zusammenhang einer CMV-Replikation gezeigten Phänomene, wie die differentielle Zytokinexpression oder aber die verstärkte Zytotoxizität von NKG2C^{pos} NK-Zellen, zu einem reduzierten Risiko, insbesondere in *FLT3*-mutierten Patienten, beitragen, bleibt zukünftig zu klären. Denkbar wäre eine direkte Inhibition des Tumorwachstums durch IFN γ , da sich in Patienten mit einer akuten lymphatischen Leukämie gezeigt hat, dass IFN γ in Kombination mit der Aktivierung von *FLT3* mittels *FLT3*-Liganden das Tumorwachstum inhibiert [279]. Zwar war in AML-Patienten dieser Effekt nicht signifikant, die konstitutive Aktivierung von *FLT3* in entsprechend mutierten Zellen könnte jedoch zu einem ähnlichen Effekt führen. Weiterhin wäre beispielsweise auch eine durch *FLT3*-induzierte Reduktion des von CMV-infizierten Zellen sekretierten IL-10 [297] möglich. Dadurch könnte sich ein reduzierter Einfluss der IL-10 vermittelten Suppression von (tumorspezifischen) T-Zellen ergeben. Ob die Reduktion von IL-10 durch *FLT3* auch für das cmvIL-10 gilt, muss jedoch noch untersucht werden.

Im Gegensatz zu einer *FLT3*-Mutation zeigte sich ein gegenteiliger Effekt für Patienten mit einer Veränderung in *RUNX1*. Zwar war die Zahl der Patienten in der Analyse mit 2 Personen in der CMV-Reaktivierungsgruppe und 6 Personen in der Gruppe ohne Reaktivierung klein und zudem ungleich verteilt, dennoch beschreibt die Literatur Phänomene, die zu einem verschlechterten RFS durch CMV-Replikationsereignisse in Kombination mit mutiertem *RUNX1* beitragen könnten. *RUNX1* ist ein Transkriptionsfaktor, der an der Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen beteiligt ist. Sowohl die *RUNX1-RUNX1T1* Translokation als auch AML-typische Mutationen in der DNA-bindenden RUNT-Domäne von *RUNX1* führen über unterschiedliche Mechanismen u.a. zu einer verringerten bis unterdrückten DNA-Bindung und der damit einhergehenden veränderten Genregulation (besprochen in [298, 299]). So konnte gezeigt werden, dass *RUNX1*-Mutationen an der differentiellen Genexpression von 85 Genen beteiligt sind [300]. In stabil *RUNX1*-exprimierenden RAW264.7-Zellen wurde beispielsweise IL-6 nach Stimulation mit LPS induziert. Des Weiteren führte die Inhibition von *RUNX1* zu einer Reduktion der IL-6 mRNA-Level in AML-Zellen [301]. Folglich könnte die CMV-bedingte IL-6-Induktion, die wie oben

diskutiert grundsätzlich auch nachteilige Effekte auf die NK-Zellfunktionalität haben könnte, durch mutiertes oder transloziertes *RUNX1* an dem verschlechterten RFS in AML hSCT-Patienten mit CMV-Replikationen beteiligt sein. Darüber hinaus bindet *RUNX1* an drei verschiedene Promotoren/Enhancer von HLA-E (GeneHancer Identifier GH06J030678, GH06J030757 und GH06J030507, [302]), sodass die veränderte DNA-Bindung durch mutiertes *RUNX1* dazu führen könnte, dass HLA-E vergleichsweise gering exprimiert wird, wodurch die vorteilhafte NKG2C-HLA-E-Interaktion verschlechtert sein könnte.

Am Beispiel von *FLT3*- und *RUNX1*-Mutationen konnte hier somit gezeigt werden, dass der genetische Hintergrund möglicherweise entscheidend sein kann, ob ein CMV-Replikationsereignis sich positiv auf das RFS auswirkt. Wie die einzelnen Aspekte der angeborenen Immunität in Form der hier differentiell nachweisbaren Zytokine und verstärkt zytotoxischen NKG2C^{pos} NK-Zellen im Kontext einzelner Mutationen zum Tragen kommen, bleibt zukünftig anhand größerer, homogener Kohorten *in vitro* und *in vivo* zu evaluieren. Die daraus erhaltenen Erkenntnisse könnten maßgeblich dazu beitragen, eine individualisierte NK-Zelltherapie erfolgsversprechend einzusetzen.

Abschließend sollen hier noch einige Aspekte und Faktoren diskutiert werden, die zu dem reduzierten Rezidiv-Risiko unabhängig einer NK-Zellbeteiligung beitragen könnten. Im späteren Verlauf nach hSCT rekonstituieren schließlich auch die übrigen Immunzellpopulationen, darunter T-Zellen, die bei vorhandener Tumorantigenpräsentation eine tumorspezifische Immunantwort einleiten können. Findet eine CMV-Replikation zum Zeitpunkt rekonstituierter T-Zellen statt, kann auch hier der transiente Anstieg in den IFN γ -Leveln zur Steigerung einer Immunantwort gegen LSCs beitragen. Hier kommt außerdem zum Tragen, dass neben HLA-E auch die Expression von HLA-I und HLA-II Molekülen im Allgemeinen und die damit einhergehende Antigenpräsentation durch IFN γ hochreguliert wird [271]. Da mit einer CMV-Infektion auch eine Expansion von CMV-spezifischen T-Zellen einhergeht und CD34^{pos}-Zellen, neben Monozyten, ein CMV-Virusreservoir darstellen [3, 4], können CMV-infizierte LSCs direkt durch T-Zell-vermittelte Zytotoxizität abgetötet werden. Denn obgleich CMV für Proteine kodiert, die aktiv die HLA-Expression reduzieren [133-136], zeigte sich, dass eine IFN γ -induzierte HLA-I-Expression so stark ist, dass eine viral bedingte Reduktion der Antigenpräsentation eines CMV-Peptids über HLA-I kompensiert werden kann [303]. Daneben könnte prinzipiell die Reaktivierung von CMV und damit die Einleitung des lytischen Replikationszyklus in LSCs zur direkten Lyse dieser Zellen führen. Jedoch werden Stamm- und Vorläuferzellen als latentes Reservoir betrachtet, aus dem CMV erst bei zunehmender Differenzierung reaktiviert wird [3, 5]. Auch der mit 0,01-0,001 % liegende geringe Anteil an natürlich infizierten Vorläuferzellen lässt die Schlussfolgerung zu, dass ein lytischer Infektionszyklus nicht maßgeblich an der Eradikation verbliebener LSCs beteiligt ist [6].

Darüber hinaus führt eine CMV-Infektion zur vermehrten Expression von PD-L1 in myeloischen Zellen, wodurch diese potentiell T-Zellen und andere PD1-exprimierende Zellen inhibieren könnten. Gleichzeitig jedoch wird während der latenten Phase die Expression von S100A9 durch CMV reduziert [304]. Dieses Molekül wird in der Stammzellnische von *Myeloid Derived Suppressor Cells* exprimiert und ist assoziiert mit einer Überexpression von PD1 und PD-L1 im Kontext von MDS [220]. Auch in der AML konnte eine Überexpression von S100A9-Molekülen beobachtet werden [202]. Wenn CMV die Expression von S100A9 unterdrückt, könnte dies zur Restauration der Immunantwort auch ohne den Einsatz von ICIs führen. Diesem Gedankengang folgend konnte außerdem in einigen Tumorerkrankungen gezeigt werden, dass erhöhte IFN γ -Level mit einer verbesserten Antwort von ICIs und einem verbesserten Gesamtüberleben in einer ICI Therapie einhergehen (besprochen in [305]), sodass eine CMV-Reaktivierung/Infektion auch im Kontext einer ICI-Therapie vorteilhafte Aspekte haben kann.

4.3. Fazit

Zusammenfassend deuten die vorliegenden Daten darauf hin, dass neben der AML auch im MDS ein dysreguliertes Immunsystem in Form von veränderten Relationen von Effektorzellen, PD1- und Tim-3-exprimierenden T-Zellen sowie PD-L1-exprimierenden hämatopoetischen Stammzellen ein relevanter Mechanismus bei der Entstehung bzw. dem Progress von MDS sein könnte. Eine longitudinale Analyse der T-Zellpopulationen im peripheren Blut könnte dabei ein leicht anwendbarer Ansatz sein, um eine Vorauswahl von Patienten treffen zu können, die am ehesten von einer ICI-Therapie profitieren und um Patienten mit Rückfällen frühzeitig identifizieren zu können.

Zwar konnte zu einem möglichen Einfluss einer CMV-Infektion auf den Erschöpfungszustand in der vorliegenden Kohorte aufgrund der hohen Seroprävalenz und der damit fehlenden CMVneg Vergleichsgruppe keine Aussage getroffen werden, jedoch deuten die vorliegenden Daten zu NK-Zellen einen möglichen Zusammenhang einer veränderten CD8-Expression in Abhängigkeit des CMV-Status in AML-Patienten an. Diese NK-Zellpopulation, die sich in der Vergangenheit auch gegenüber AML-Zellen als potentiell hoch zytotoxisch erwies, konnte in der vorliegenden Arbeit nun näher charakterisiert werden, wodurch sich mögliche Ansatzpunkte für eine NK-Zelltherapie in der AML ergeben.

Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die mit einer CMV-Replikation einhergehende IFN γ -Ausschüttung eine verstärkte HLA-E-Expression sowie eine verbesserte Zytotoxizität von NKG2C^{pos} NK-Zellen zur Eradikation verbliebender LSCs im hSCT Setting bewirken könnten. Zudem konnten Zytokine identifiziert werden, die durch eine CMV-Infektion von MM6- und THP-1-Zellen verändert im Plasma und im Zellkulturüberstand vorliegen. Diese könnten an der Abtötung durch direkte Effekte auf LSCs oder aber durch die Modulation der NK- und T-Zellfunktion beteiligt sein. Somit könnte neben der Wiederherstellung der T-Zellfunktionalität durch ICIs eine zytokinunterstützte NK-Zell-basierte Therapie ebenfalls von Interesse für die Bekämpfung von zirkulierenden MDS- und AML-Stammzellen sein.

V. Anhang

5.1. Farbe-Panel für die phänotypische Untersuchung von diversen Blut- und Knochenmarkszellen mittels Durchflusszytometrie

Tabelle 6 Ex vivo Untersuchung von WBCs – „Stammzell-Panel“

Laser	λ	Filterset	Fluoreszenzfarbstoff	Spezifität	Volumen [x/100 μ L]
Violetter Laser	405 nm	450/50	eFlour 450	CD8	1,0 μ L
		525/50	eFluor 506	Viability Dye	1 zu 1000
		610/20	BV605	CD19	0,5 μ L
		660/20	BV650	CD3	0,5 μ L
		710/50	BV711	CD13	0,5 μ L
Blauer Laser	488 nm	530/30	FITC	CD56	1,0 μ L
		710/50	PerCP-eFlour 710	PD-L1	2,0 μ L
Gelb-Grüner Laser	561 nm	586/15	PE	CD123	1,0 μ L
		670/30	PE-Cy5	CD45	0,5 μ L
		780/60	PE-Cy7	CD45RA	0,5 μ L
Roter Laser	640 nm	670/14	APC	CD34	2,0 μ L
		730/45	Alexa Fluor 700	CD4	1,0 μ L
		780/60	APC-eFluor780	CD38	2,0 μ L

Für die Bestimmung von HLA-E auf primären Blasten wurde das Stammzell-Panel genutzt. Hier wurde PD-L1-PerCp-Cy5.5 durch HLA-E-PerCP-Cy5.5 ersetzt.

Tabelle 7 Ex vivo Untersuchung von WBCs – „T-Zell-Panel“

Laser	λ	Filterset	Fluoreszenz- farbstoff	Spezifität	Volumen [x/100 μ L]
Violetter Laser	405 nm	450/50	BV421	CCR7	1,0 μ L
		525/50	BV510	CD27	0,5 μ L
		610/20	BV605	CD16	2,0 μ L
		660/20	BV650	CD3	0,5 μ L
		710/50	Super Bright 702	CD56	2,0 μ L
		780/60	BV786	PD1	5,0 μ L
Blauer Laser	488 nm	530/30	FITC	CD8	1,0 μ L
		710/50	PerCP-Cy5.5	CTLA-4	2,0 μ L
Gelb-Grüner Laser	561 nm	586/15	PE	KLRG1	5,0 μ L
		610/20	PE-Dazzle 594	g/d TCR	2,0 μ L
		670/30	PE-Cy5	CD38	2,0 μ L
		780/60	PE-Cy7	Tim-3	2,0 μ L
Roter Laser	640 nm	670/14	APC	CD45RA	2,0 μ L
		730/45	Alexa Fluor 700	CD4	1,0 μ L
		780/60	eFluor780	Viability Dye	1 zu 5000

Tabelle 8 Panel: Bestimmung der NKG2C^{pos} NK-Zellen aus PB und BM

Laser	λ	Filterset	Fluoreszenz- farbstoff	Spezifität	Volumen [x/100 μ L]
Violetter Laser	405 nm	450/50	eFlour 450	CD3/CD19	Je 2,0 μ L
		525/50	eFlour 506	Viability Dye	1 zu 1000
		610/20	BV605	CD14	0,5 μ L
Blauer Laser	488 nm	530/30	FITC	NKG2A	2,0 μ L
Gelb-Grüner Laser	561 nm	780/60	PE-Cy7	CD56	2,0 μ L
Roter Laser	640 nm	780/60	APC-Cy7	CD16	2,0 μ L

Tabelle 9 Panel: Vergleichende Analyse von PB- und BM-Proben

Lasertyp	λ	Filterset	Fluoreszenzfarbstoff	Spezifität	Volumen [x/100 μ L]
Violetter Laser	405 nm	450/50	eFlour 450	CD8	1,0 μ L
		525/50	eFlour 506	Viability Dye	1 zu 1000
		660/20	BV650	CD3	0,5 μ L
Blauer Laser	488 nm	530/30	FITC	CD56	1,0 μ L
		710/50	PerCP-eFlour710	PD-L1	2,0 μ L
Gelb-Grüner Laser	561 nm	586/15	PE	CD123	1,0 μ L
		780/60	PE-Cy7	CD45RA	0,5 μ L
Roter Laser	640 nm	670/14	APC	CD34	2,0 μ L
		730/45	Alexa Fluor 700	CD4	1,0 μ L
		780/60	APC-eFluor780	CD38	2,0 μ L

Tabelle 10 Panel: Bestimmung der Anteile von CD8^{pos} NK-Zellen in PBMCs

Lasertyp	λ	Filterset	Fluoreszenzfarbstoff	Spezifität	Volumen [x/100 μ L]
Violetter Laser	405 nm	450/50	eFlour 450	CD3/CD14/CD19	Je 2,0 μ L
		610/20	BV605	CD16	2,0 μ L
		710/50	Super Bright 702	CD56	2,0 μ L
Blauer Laser	488 nm	710/50	PerCP-Cy5.5	CD8	0,25 μ L
Gelb-Grüner Laser	561 nm	586/15	PE	NKG2C	5,0 μ L
Roter Laser	640 nm	670/14	APC	NKG2A	5,0 μ L
		780/60	eFluor780	Viability Dye	1 zu 5000

5.2. Färbe-Panel für die Untersuchung von CD8^{pos} und CD8^{neg} NK-Zellen

Tabelle 11 Panel: Sortierung von CD8^{pos} und CD8^{neg} NK-Zellen mittels FACS (MoFloXDP)

Laser	λ	Filterset	Fluoreszenz-farbstoff	Spezifität	Volumen [x/100 μ L]
Blauer Laser	488 nm	530/30	FITC	CD8	1,0 μ L
		710/50	PerCP-Cy5.5	CD3/CD14/CD19	1,0/2,0/2,0 μ L
		610/20	ECD	CD16	2,0 μ L
		780/60	PE-Cy7	CD56	2,0 μ L
Roter Laser	640 nm	780/60	eFluor780	Viability Dye	1 zu 2500

Tabelle 12 Panel: Untersuchung von CD8^{pos} und CD8^{neg} NK-Zellen mit dem LEGENDScreen

Laser	λ	Filterset	Fluoreszenz-farbstoff	Spezifität	Volumen [x/100 μ L]
Violetter Laser	405 nm	450/50	BV421	NKG2C	0,25 μ L
		525/50	eFluor 506	CD14/CD19	0,5/0,5 μ L
				Viability	1 zu 1000
		660/20	BV650	CD8	0,2 μ L
		710/50	Super Bright 702	CD56	2,0 μ L
Blauer Laser	488 nm	530/30	FITC	NKG2A	2,0 μ L
Gelb-Grüner Laser	561 nm	586/15	PE	LEGENDScreen	
Roter Laser	640 nm	730/45	Alexa Fluor 700	CD3	0,1 μ L
		780/60	APC-Cy7	CD16	1,0 μ L

Tabelle 13

Panel: Bestätigung der LEGENDScreen und RNA-Sequenzierungsdaten – Zellaktivierung

Lasertyp	λ	Filterset	Fluoreszenzfarbstoff	Spezifität	Volumen [x/100 μ L]
Violetter Laser	405 nm	450/50	BV421	NKG2C	0,25 μ L
		525/50	BV510	CD3/CD14/CD19/ Viability (eF506)	1,0/2,0/0,25 μ L 1 zu 1000
		610/20	BV605	CXCR4	0,5 μ L
		660/20	BV650	CD56	2,0 μ L
		710/50	BV711	ICOS	1,0 μ L
		780/60	BV786	CD16	0,5 μ L
Blauer Laser	488 nm	530/30	Vio Bright B515	NKG2D	2,0 μ L
		710/50	PerCP-Cy5.5	CD328 (Siglec-7)	0,5 μ L
Gelb-Grüner Laser	561 nm	586/15	PE	CD38	0,125 μ L
		610/20	PE-Dazzle 594	CD95 (FAS)	1,0 μ L
		780/60	PE-Cy7	CD8	1 zu 32
Roter Laser	640 nm	670/14	APC	CD119	2,0 μ L
		730/45	Alexa Fluor 700	NKG2A	1,0 μ L
		780/60	eFluor780	Granzym B (intrazellulär)	1,0 μ L

Tabelle 14

Panel: Bestätigung der LEGENDScreen und RNA-Sequenzierungsdaten – Zell-Zellinteraktion

Lasertyp	λ	Filterset	Fluoreszenzfarbstoff	Spezifität	Volumen [x/100 μ L]
Violetter Laser	405 nm	450/50	BV421	NKG2C	0,25 μ L
		525/50	BV510	CD3/CD14/CD19/ Viability (eF506)	1,0/2,0/0,25 μ L 1 zu 1000
		610/20	BV605	CD56	2,0 μ L
		660/20	BV650	CD62L (SELL)	1,0 μ L
		710/50	BV711	CD39	0,25 μ L
		780/60	BV786	CD16	0,5 μ L
Blauer Laser	488 nm	530/30	FITC	CD49e	0,5 μ L
		710/50	PerCP-Cy5.5	CD47	1,0 μ L
Gelb-Grüner Laser	561 nm	586/15	PE	CD43	0,003 μ L
		610/20	PE-Dazzle 594	CD31	0,25 μ L
		780/60	PE-Cy7	CD258 (LIGHT)	1,0 μ L
Roter Laser	640 nm	670/14	APC	CD84	0,5 μ L
		730/45	Alexa Fluor 700	NKG2A	1,0 μ L
		780/60	eFluor780	CD8	0,25 μ L

5.3. Färbe-Panel für die funktionale Untersuchungen von Blutzellen mittels Durchflusszytometrie

Tabelle 15 Panel: Untersuchung des Einflusses von IFN γ auf die Funktionalität von NKG2C^{pos} und NKG2C^{neg} NK-Zellen – Induktion von Apoptose in AML-Zellen

Laser	λ	Filterset	Fluoreszenzfarbstoff	Spezifität	Volumen [x/100 μ L]
Violetter Laser	405 nm	450/50	(V450 Filterset)	Tag-it Violet™ Proliferation and Cell Tracking Dye	1 zu 2000
		610/20	BV605	CD16	2,0 μ L
Blauer Laser	488 nm	530/30	FITC	NKG2A	2,0 μ L
		710/50	PerCP-Cy5.5	HLA-E	1,0 μ L
Gelb-Grüner Laser	561 nm	586/15	PE	NKG2C	5,0 μ L
		670/30	PE-Cy5	CD3	1,0 μ L
		780/60	PE-Cy7	CD107a	2,0 μ L
Roter Laser	640 nm	670/14	APC	CD56	0,5 μ L
		730/45	Alexa Fluor 680	Annexin V	2,0 μ L
		780/60	eFluor780	Viability Dye	1 zu 5000

Tabelle 16 Panel: Untersuchung des Einflusses von IFN γ auf die Funktionalität von NKG2C^{pos} und NKG2C^{neg} NK-Zellen – NK-Zellfunktionalität

Laser	λ	Filterset	Fluoreszenzfarbstoff	Spezifität	Volumen [x/100 μ L]
Violetter Laser	405 nm	450/50	(V450 Filterset)	Tag-it Violet™ Proliferation and Cell Tracking Dye	1 zu 2000
		610/20	BV605	CD16	2,0 μ L
		710/50	BV711	Perforin	5,0 μ L
Blauer Laser	488 nm	530/30	FITC	NKG2A	2,0 μ L
		710/50	PerCP-Cy5.5	IFN γ	3,0 μ L
Gelb-Grüner Laser	561 nm	586/15	PE	NKG2C	5,0 μ L
		610/20	PE-Dazzle594	Granzym B	5,0 μ L
		670/30	PE-Cy5	CD3	1,0 μ L
		780/60	PE-Cy7	CD107a	2,0 μ L
Roter Laser	640 nm	670/14	APC	CD56	0,5 μ L
		780/60	eFluor780	Viability Dye	1 zu 5000

Tabelle 17 Untersuchung des Einflusses einer CMV-Reaktivierung auf die NK-Zellfunktionalität

Laser	λ	Filterset	Fluoreszenzfarbstoff	Spezifität	Volumen [x/100 μ L]
Violetter Laser	405 nm	450/50	(V450 Filterset)	Tag-it Violet™ Proliferation and Cell Tracking Dye	1 zu 2000
		660/20	BV650	CD3	0,5 μ L
		710/50	BV711	Perforin	5,0 μ L
		780/60	BV786	CD16	0,5 μ L
Blauer Laser	488 nm	530/30	FITC	NKG2A	3,0 μ L
Gelb-Grüner Laser	561 nm	586/15	PE	NKG2C	5,0 μ L
		610/20	PE-Dazzle594	Granzym B	5,0 μ L
Roter Laser	640 nm	670/14	APC	CD56	0,5 μ L
		780/60	eFluor780	Viability Dye	1 zu 5000

Tabelle 18 Panel: Untersuchung des Einflusses einer CMV-Infektion auf die Oberflächenexpression ausgewählter Moleküle

Laser	λ	Filterset	Fluoreszenzfarbstoff	Spezifität	Volumen [x/100 μ L]
Violetter Laser	405 nm	780/60	BV786	HLA-C	2,0 μ L
Blauer Laser	488 nm	530/30	FITC	Bw4	1,0 μ L
		710/50	PerCP-Cy5.5	PD-L1	2,0 μ L
Gelb-Grüner Laser	561 nm	780/60	PE-Cy7	HLA-E	2,0 μ L
Roter Laser	640 nm	670/14	APC	TRAIL-R2	10,0 μ L
		780/60	eFluor780	Viability Dye	1 zu 5000

Tabelle 19 Panel: Untersuchung der Induktion von Apoptose in AML-Zellen durch Stimulation mit PBMCs aus CMVpos und CMVneg Individuen

Laser	λ	Filterset	Fluoreszenzfarbstoff	Spezifität	Volumen [x/100 μ L]
Violetter Laser	405 nm	450/50	(V450 Filterset)	Tag-it Violet™ Proliferation and Cell Tracking Dye	1 zu 2000
Blauer Laser	488 nm	530/30	(FITC Filterset)	Caspase 3/7	0,2 μ L
Gelb-Grüner Laser	561 nm	586/15	PE-Cy5	SYTOX AADvanced live dead	0,1 μ L
		780/60	PE-Cy7	HLA-E	2,0 μ L

5.4. Patienten

Tabelle 20 Vollständige Probenliste der im ersten Teil der Arbeit untersuchten Probanden

ID	m/w/d	Alter	Probe	AML/ MDS	Subtyp	Risiko*	Therapie	Status	Ein- schluss	Ausschlussgrund
MDS 001	m	69	PB	sMDS	MLD	intermediär	naiv	aktiv	nein	kein Pellett
MDS 001-2	m	72	KM	sMDS	MLD	intermediär	hSCT	Rem.	nein	unkl. Status
MDS 002	w	61	KM+PB	MDS	EB II	sehr hoch	hSCT	Rem.	nein	FACS
MDS 002-2	w	62	KM	MDS	EB II	sehr hoch	hSCT	Rez.	ja	/
MDS 002-3	w	64	KM	MDS	EB II	sehr hoch	hSCT	Rem.	nein	unkl. Status
MDS 003	m	53	KM+PB	MDS/MPN		n.A.	Therapie	Rem.	nein	FACS
MDS 003-02	m	53	KM	MDS/MPN		n.A.	hSCT	Rem.	nein	FACS
MDS 004	m	79	KM	MDS	RS MLD	niedrig	Therapie	aktiv	nein	FACS
MDS 005	m	55	KM	MDS	EB II	hoch	Therapie	aktiv	ja	/
MDS 006-1	w	50	KM	MDS	EB II	sehr hoch	hSCT	Rez.	ja	/
MDS 006-2	w	50	KM	MDS	EB II	sehr hoch	hSCT	aktiv	(ja)	nur Verlauf
MDS 007	m	59	KM+PB	MDS	EB II	hoch	hSCT	Rem.	nein	FACS
MDS 008	m	77	KM	CMML	CMML Typ II	/	naiv	aktiv	nein	Grunderkrankung
MDS 009	m	57	KM	CML	atypisch	/	naiv	aktiv	nein	Grunderkrankung
MDS 010	w	55	KM	AML	n.A.	günstig	Therapie	aktiv	ja	/
MDS 011	m	72	KM	MDS	RS-MLD	n.A.	naiv	aktiv	ja	/
MDS 012	m	57	KM+PB	AML	FAB M1	günstig	naiv	aktiv	ja	/
MDS 013	m	39	KM+PB	AML	FAB M1/M2	günstig	naiv	aktiv	ja	/
MDS 013-02	m	39	KM	AML	FAB M1/M2	günstig	Therapie	Rem.	(ja)	nur Verlauf
MDS 013-03	m	39	KM	AML	FAB M1/M2	günstig	Therapie	Rem.	(ja)	nur Verlauf
MDS 013-04	m	39	KM	AML	FAB M1/M2	günstig	Therapie	Rem.	(ja)	nur Verlauf
MDS 014	m	39	KM	sMDS	EB II	intermediär	naiv	aktiv	ja	/
MDS 014-2	m	39	KM	sMDS	EB II	intermediär	hSCT	aktiv	(ja)	nur Verlauf
MDS 014-3	m	40	KM	sMDS	EB II	intermediär	hSCT	Rez.	(ja)	nur Verlauf
MDS 014-4	m	40	KM	sMDS	EB II	intermediär	hSCT	Rem.	(ja)	nur Verlauf
MDS 015	w	60	PB	AML	FAB M4	n.A.	hSCT	Rem.	nein	unkl. Status
MDS 016	m	54	PB	MDS	EB II	intermediär	Therapie	n.A.	nein	kein Pellett
MDS 017	w	61	KM	MDS	RS-SLD	n.A.	Therapie	aktiv	ja	/
MDS 017-2	w	62	PB	MDS	RS-MLD	/	Therapie	n.A.	nein	unkl. Status
MDS 018	w	27	KM+PB	AML	FAB M2	intermediär	naiv	aktiv	ja	/
MDS 018-02	w	28	KM	AML	FAB M2	intermediär	hSCT	Rem.	(ja)	nur Verlauf
MDS 019	w	62	KM	AML	FAB M1	intermediär	Therapie	Rem.	ja	/
MDS 019-2	w	63	KM	AML	FAB M1	intermediär	Therapie	n.A.	(ja)	nur Verlauf
MDS 019-3	w	63	KM	AML	FAB M1	intermediär	Therapie	Rez.	(ja)	nur Verlauf

Fortsetzung Tabelle 20

ID	m/w/d	Alter	Probe	AML/ MDS	Subtyp	Risiko*	Therapie	Status	Ein- schluss	Ausschlussgrund
MDS 020	w	63	KM	ALL	B-ALL	/	Therapie	Rem.	nein	Grunderkrankung
MDS 021	w	35	KM+PB	AML	n.A.	günstig	naiv	aktiv	ja	/
MDS 022	w	74	PB	MDS	n.A.	/	/	n.A.	nein	unkl. Status
MDS 023	m	74	PB	MDS	SLD	/	/	n.A.	nein	unkl. Status
MDS 024	w	39	PB	MDS	del(5q)	sehr hoch	/	n.A.	nein	unkl. Status
MDS 025	m	77	PB	MDS	RS-MLD	/	naiv	aktiv	nein	unkl. Status
MDS 026	m	61	KM	MDS	EB II	intermediär	Therapie	aktiv	ja	/
MDS 026-2	m	61	KM	MDS	EB II	intermediär	hSCT	Rez.	(ja)	nur Verlauf
MDS 026-3	m	61	KM	MDS	EB II	intermediär	hSCT	Rez.	(ja)	nur Verlauf
MDS 026-4	m	61	KM	MDS	EB II	intermediär	hSCT + Therapie	Rez.	(ja)	nur Verlauf
MDS 027	m	86	PB	MDS	U	n.A.	n.A.	n.A.	nein	unkl. Status
MDS 028	m	87	PB	MDS	EB II	n.A.	naiv	n.A.	nein	unkl. Status
MDS 029	m	81	PB	MDS	/	/	naiv	n.A.	nein	unkl. Status
MDS 030	m	71	PB	AML	sekundär	/	Therapie	n.A.	nein	unkl. Status
MDS 031	m	49	PB	MDS	RS-MLD	/	Therapie	aktiv	ja	/
MDS 032	w	64	PB	sAML	FAB M0	hoch	naiv	aktiv	ja	/
MDS 032-2	w	65	KM	sAML	FAB M0	hoch	hSCT	Rem.	(ja)	nur Verlauf
MDS 032-3	w	65	KM	sAML	FAB M0	hoch	hSCT	Rem.	(ja)	nur Verlauf
MDS 033	m	54	PB	AML	/	/	hSCT	n.A.	nein	unkl. Status
MDS 034	m	60	PB	sAML	/	n.A.	hSCT	aktiv	ja	/
MDS 034-2	m	60	KM	sAML	/	n.A.	hSCT	aktiv	(ja)	nur Verlauf
MDS 035	m	68	KM	CMML	n.A.	/	n.A.	n.A.	nein	Grunderkrankung
MDS 036	w	60	KM	AML	FAB M0	intermediär	hSCT	Rez.	ja	/
MDS 036-2	w	60	KM	AML	FAB M0	intermediär	hSCT + Therapie	Rez.	(ja)	nur Verlauf
MDS 036-3	w	61	KM	AML	FAB M0	intermediär	hSCT + Therapie	Rez.	(ja)	nur Verlauf
MDS 037	w	64	KM	MDS	EB II	hoch	hSCT	Rem.	ja	/
MDS 038	m	66	KM	AML	FAB M0	hoch	Therapie	Rem.	nein	unkl. Status
MDS 038-2	m	66	KM	AML	FAB M0	hoch	hSCT	Rem.	nein	unkl. Status
MDS 038-3	m	66	KM	AML	FAB M0	hoch	hSCT	Rem.	nein	unkl. Status
MDS 039	w	58	KM	MDS	EB II	n.A.	hSCT	Rem.	nein	Differenz Aufreinigung
MDS 040	w	39	PB	AML	FAM M1	hoch	naiv	aktiv	ja	/
MDS 040-2	w	39	KM	AML	FAB M1	hoch	Therapie	Rem.	(ja)	nur Verlauf
MDS 040-3	w	40	KM	AML	FAB M1	hoch	hSCT	Rem.	nein	unkl. Status
MDS 041	m	34	KM	AML	FAM M1/M2	/	hSCT	Rem.	nein	HIVpos
MDS 042	m	43	KM	AML	FAB M0	intermediär	hSCT	Rem.	nein	FACS
MDS 043	m	49	KM	MDS	EB II	hoch	hSCT	Rez.	nein	FACS

Fortsetzung Tabelle 20

ID	m/w/d	Alter	Probe	AML/ MDS	Subtyp	Risiko*	Therapie	Status	Ein- schluss	Ausschlussgrund
MDS 043-2	m	50	KM	MDS	EB II	hoch	hSCT	Rem.	nein	unkl. Status
MDS 044	w	50	KM	CML	/	/	n.A.	n.A.	nein	Grunderkrankung
MDS 044-2	w	50	KM	CML	/	/	hSCT	Rem.	nein	Grunderkrankung
MDS 045	m	62	KM	CMML	/	/	/	/	nein	Grunderkrankung
MDS 046	m	76	KM	MDS	EB II	hoch	hSCT	Rem.	ja	/
MDS 047	m	59	KM	PMF	/	/	hSCT	/	nein	Grunderkrankung
MDS 048	w	49	KM	AML	FAB M2	intermediär	hSCT	Rem.	nein	unkl. Status
MDS 048-2	w	49	KM	AML	FAB M2	intermediär	hSCT	Rem.	nein	unkl. Status
MDS 048-3	w	50	KM	AML	FAB M2	intermediär	hSCT	Rem.	nein	unkl. Status
MDS 049	w	52	KM	AML	FAB M1	hoch	hSCT	Rem.	nein	hSCT < 6 Monate
MDS 050	w	67	KM	CMML	CMML-1	/	hSCT	Rem.	nein	Grunderkrankung
MDS 051	w	67	KM	AML	FAB M2	günstig	hSCT	Rem.	ja	/
MDS 052	m	68	KM	sAML	/	n.A.	hSCT	Rem.	nein	hSCT < 6 Monate
MDS 052-2	m	0	KM	sAML	/	/	hSCT	Rem.	nein	unkl. Status
MDS 053	w	58	KM	AML	FAB M5a	intermediär	hSCT	Rem.	nein	hSCT < 6 Monate
MDS 053-2	w	58	KM	AML	FAB M5a	intermediär	hSCT	Rez.	(ja)	nur Verlauf
MDS 054	w	56	KM	AML	FAB M2	intermediär	Therapie	Rem.	ja	/
MDS 055	m	48	KM	CLL	B-CLL.	/	n.A.	n.A.	nein	Grunderkrankung
MDS 056	w	56	KM	AML	FAB M2	günstig	hSCT	Rem.	nein	hSCT < 6 Monate
MDS 056-2	w	56	KM	AML	FAB M2	günstig	hSCT	Rem.	(ja)	nur Verlauf
MDS 056-3	w	57	KM	AML	FAB M2	günstig	hSCT	Rem.	nein	unkl. Status
MDS 057	m	66	KM	MDS	EB II	hoch	hSCT	Rem.	nein	hSCT < 6 Monate
MDS 058	m	41	KM	AML	FAB M2	hoch	Therapie	Rem.	ja	/
MDS 058-2	m	41	KM	AML	FAB M5	hoch	hSCT	Rem.	(ja)	nur Verlauf
MDS 059	w	54	KM	AML	FAB M4	günstig	hSCT	Rem.	ja	/
MDS 060	w	55	KM	PMF	MF-2	/	naiv	aktiv	nein	Grunderkrankung
MDS 061	m	69	KM	MDS	EB I	hoch	naiv	aktiv	nein	weitere Krankheit
MDS 061-2	m	70	KM	MDS	EB I	hoch	hSCT	Rem.	(ja)	nur Verlauf
MDS 062	m	73	KM+PB	AML	FAB M0/M1	intermediär	hSCT	Rem.	nein	hSCT < 6 Monate
MDS 063	m	51	KM	MDS/MPN	RS-T	intermediär	hSCT + Therapie	Rem.	ja	/
MDS 064	w	64	PB	sAML	n.A.	/	hSCT + Therapie	Rez.	ja	/
MDS 065	m	56	KM	AML	FAB M1	n.A.	hSCT	Rem.	nein	unkl. Status
MDS 066	w	67	KM	AML	FAB M4	n.A.	hSCT	Rem.	ja	/
MDS 067	m	58	KM	MDS	EB II	hoch	hSCT	Rez.	ja	/
MDS 067-2	m	58	KM	MDS	EB II	hoch	hSCT	Rez.	(ja)	nur Verlauf
MDS 068	m	62	KM	PMF	n.A.	/	n.A.	n.A.	nein	Grunderkrankung
MDS 069	w	24	KM	B-ALL	n.A.	/	hSCT	n.A.	nein	Grunderkrankung

Fortsetzung Tabelle 20

ID	m/w/d	Alter	Probe	AML/ MDS	Subtyp	Risiko*	Therapie	Status	Ein- schluss	Ausschlussgrund
MDS 070	w	57	KM	CMML	n.A.	/	hSCT	Rem.	nein	Grunderkrankung
MDS 071	w	62	KM	MDS	EB II	sehr hoch	hSCT	Rem.	nein	hSCT < 6 Monate
MDS 071-2	w	62	KM	MDS	EB II	sehr hoch	hSCT	Rem.	(ja)	nur Verlauf
MDS 071-3	w	62	KM	MDS	EB II	sehr hoch	hSCT	Rem.	nein	unkl. Status
MDS 072	m	67	KM	AML	FAB M5	hoch	Therapie	Rez.	ja	/
MDS 073	m	27	KM	AML	n.A.	intermediär	hSCT + Therapie	Rem.	nein	hSCT < 6 Monate
MDS 073-2	m	27	KM	AML	n.A.	intermediär	hSCT + Therapie	Rem.	nein	unkl. Status
MDS 074	w	65	KM	sAML	n.A.	n.A.	hSCT (2 x)	Rez.	ja	/
MDS 075	m	49	KM	AML	FAB M4	günstig	hSCT	Rem.	nein	unkl. Status
MDS 075-2	m	50	KM	AML	FAB M4	günstig	hSCT	Rem.	nein	unkl. Status
MDS 076	m	31	KM	AML	FAB M1	hoch	hSCT (2 x)	Rem.	nein	hSCT < 6 Monate
MDS 076-2	m	31	KM	AML	FAB M1	hoch	hSCT (2 x)	Rem.	nein	unkl. Status
MDS 077	m	43	KM	AML	n.A.	intermediär	hSCT	Rem.	nein	unkl. Status
MDS 078	w	59	KM	sAML	FAB M2	/	hSCT	Rem.	nein	hSCT < 6 Monate
MDS 078-2	w	60	KM	sAML	FAB M2	/	hSCT	Rem.	nein	unkl. Status
MDS 079	m	60	KM	AML	n.A.	n.A.	naiv	aktiv	ja	/
MDS 080	w	65	KM	AML	sAML	n.A.	hSCT	Rem.	nein	hSCT < 6 Monate
MDS 081	w	52	KM	MDS	EB II	sehr hoch	hSCT	Rem.	nein	hSCT < 6 Monate
MDS 082	m	56	KM	AML	n.A.	intermediär	hSCT	Rem.	nein	unkl. Status
MDS 083	w	58	KM	AML	FAB M2	hoch	hSCT	Rem.	nein	unkl. Status
MDS 084	w	69	KM	AML	sAML	n.A.	hSCT	Rez.	ja	/
MDS 085	w	63	KM	AML	FAB M2	günstig	hSCT	Rem.	nein	/
MDS 086	w	61	KM	CMML	CMML-2	/	hSCT	Rem.	nein	unkl. Status
MDS 087	w	61	KM	AML	FAB M2	hoch	hSCT + Therapie	Rem.	nein	unkl. Status
MDS 088	w	66	KM	AML	FAB M1	hoch	hSCT	Rem.	nein	hSCT < 6 Monate
MDS 089	w	54	KM	AML	FAB M5	günstig	Therapie	n.A.	nein	unkl. Status
MDS 090	m	73	KM	AML	n.A.	n.A.	hSCT	Rem.	nein	unkl. Status
MDS 091	m	30	KM	AML	FAB M1	günstig	Therapie	n.A.	nein	unkl. Status
MDS 092	w	50	KM	MDS	EB I/II	/	hSCT	n.A.	nein	unkl. Status
MDS 093	w	72	KM	AML	FAB M4	ungünstig	hSCT (2 x)	n.A.	nein	unkl. Status
MDS 094	m	75	KM	MDS	EB II	/	hSCT	Rem.	nein	unkl. Status
MDS 095	w	21	KM	AML	FAB M4/5	hoch	hSCT	Rem.	nein	hSCT < 6 Monate

MPN: Myeloproliferative Neoplasien (darunter fällt z.B. die primäre Myelofibrose), CML: Chronisch Myeloische Leukämie, B-CLL: Chronisch Lymphatische Leukämie der B-Zelllinie,

n.A.: nicht verfügbar, FACS: FACS-Gerät am Tag der Messung defekt, Rem.: Remission, Rez.: Rezidiv, unkl. Status: Remissions-/Krankheitsstatus ist unklar, z.B. noch nicht vollständig rekonstituiertes BM

* Risikobewertung entsprechend der Grunderkrankung nach ELN (AML) bzw. IPSS-R (MDS)

5.5. Ergebnisse der vergleichenden Untersuchung von CD8^{pos} und CD8^{neg} NK-Zellen

5.5.1. RNA-Sequenzierung

Tabelle 21 Liste der differentiell exprimierten Gene (RNA-Sequenzierung) in CD8^{pos} NK-Zellen

baseMean	log2FoldChange	lfcSE	stat	p-Wert	adj. p-Wert	Gencode
3925,71	6,5477	0,3558	18,4012	1,29 * 10 ⁻⁷⁵	1,54 * 10 ⁻⁷¹	CD8A
187,89	1,8672	0,3660	5,1018	3,36 * 10 ⁻⁰⁷	4,04 * 10 ⁻⁰⁴	PRR4
214,83	1,3197	0,2576	5,1229	3,01 * 10 ⁻⁰⁷	4,01 * 10 ⁻⁰⁴	ZNF248
258,47	1,3001	0,3281	3,9630	7,40 * 10 ⁻⁰⁵	3,17 * 10 ⁻⁰²	AFDN
168,12	1,0214	0,2434	4,1973	2,70 * 10 ⁻⁰⁵	1,54 * 10 ⁻⁰²	COL13A1
312,62	0,9982	0,2563	3,8941	9,86 * 10 ⁻⁰⁵	3,70 * 10 ⁻⁰²	SLC25A16
1060,46	0,9881	0,1991	4,9623	6,97 * 10 ⁻⁰⁷	7,60 * 10 ⁻⁰⁴	TRIM27
430,50	0,8977	0,1834	4,8939	9,89 * 10 ⁻⁰⁷	9,89 * 10 ⁻⁰⁴	LDLRAD4
265,17	0,8813	0,2030	4,3418	1,41 * 10 ⁻⁰⁵	9,98 * 10 ⁻⁰³	KRT72
717,82	0,8345	0,2182	3,8235	1,32 * 10 ⁻⁰⁴	4,16 * 10 ⁻⁰²	CHD7
423,64	0,6907	0,1820	3,7959	1,47 * 10 ⁻⁰⁴	4,53 * 10 ⁻⁰²	PDP2
3340,55	0,4825	0,1252	3,8549	1,16 * 10 ⁻⁰⁴	3,94 * 10 ⁻⁰²	CD3E
621,70	0,4716	0,1138	4,1455	3,39 * 10 ⁻⁰⁵	1,85 * 10 ⁻⁰²	THEM4
6129,13	0,4329	0,0769	5,6253	1,85 * 10 ⁻⁰⁸	4,45 * 10 ⁻⁰⁵	SELL
19893,05	0,4093	0,0792	5,1685	2,36 * 10 ⁻⁰⁷	3,54 * 10 ⁻⁰⁴	CXCR4
2965,57	0,3666	0,0914	4,0116	6,03 * 10 ⁻⁰⁵	2,68 * 10 ⁻⁰²	VPS13D
7683,05	-0,2832	0,0734	-3,8582	1,14 * 10 ⁻⁰⁴	3,94 * 10 ⁻⁰²	CCL4
2355,62	-0,3207	0,0783	-4,0943	4,24 * 10 ⁻⁰⁵	2,12 * 10 ⁻⁰²	TOX
10283,28	-0,4113	0,1056	-3,8953	9,81 * 10 ⁻⁰⁵	3,70 * 10 ⁻⁰²	ADGRG1
1078,52	-0,4296	0,1139	-3,7714	1,62 * 10 ⁻⁰⁴	4,80 * 10 ⁻⁰²	EIF4E2
2362,21	-0,4735	0,1028	-4,6061	4,10 * 10 ⁻⁰⁶	3,79 * 10 ⁻⁰³	HSPA1B
4864,52	-0,4864	0,0836	-5,8202	5,88 * 10 ⁻⁰⁹	1,76 * 10 ⁻⁰⁵	GZMH
557,72	-0,4940	0,1225	-4,0335	5,50 * 10 ⁻⁰⁵	2,54 * 10 ⁻⁰²	DCPS
2612,54	-0,5292	0,1167	-4,5347	5,77 * 10 ⁻⁰⁶	4,95 * 10 ⁻⁰³	AFF4
1302,18	-0,5587	0,1429	-3,9083	9,30 * 10 ⁻⁰⁵	3,70 * 10 ⁻⁰²	HSPB1
1726,64	-0,5614	0,1371	-4,0944	4,23 * 10 ⁻⁰⁵	2,12 * 10 ⁻⁰²	ADIPOR2
2736,17	-0,5696	0,1063	-5,3603	8,31 * 10 ⁻⁰⁸	1,42 * 10 ⁻⁰⁴	HSPH1
452,04	-0,6514	0,1731	-3,7627	1,68 * 10 ⁻⁰⁴	4,80 * 10 ⁻⁰²	ULK2

Fortsetzung Tabelle 21

baseMean	log2FoldChange	lfcSE	stat	p-Wert	adj. p-Wert	Genname
1899,02	-0,7017	0,1599	-4,3888	1,14 * 10 ⁻⁰⁵	8,55 * 10 ⁻⁰³	IGF1R
223,06	-0,7813	0,1993	-3,9208	8,83 * 10 ⁻⁰⁵	3,65 * 10 ⁻⁰²	DAPK2
305,63	-0,8347	0,1859	-4,4897	7,13 * 10 ⁻⁰⁶	5,71 * 10 ⁻⁰³	FRY
134,74	-0,8687	0,2308	-3,7636	1,67 * 10 ⁻⁰⁴	4,80 * 10 ⁻⁰²	HMOX1
184,70	-0,8944	0,2308	-3,8758	1,06 * 10 ⁻⁰⁴	3,87 * 10 ⁻⁰²	IMPACT
480,83	-0,9584	0,2246	-4,2671	1,98 * 10 ⁻⁰⁵	1,19 * 10 ⁻⁰²	DGKK
183,69	-1,0468	0,2721	-3,8478	1,19 * 10 ⁻⁰⁴	3,94 * 10 ⁻⁰²	CD84
1628,84	-1,0653	0,1800	-5,9182	3,25 * 10 ⁻⁰⁹	1,30 * 10 ⁻⁰⁵	TP53
280,63	-1,2367	0,2883	-4,2891	1,79 * 10 ⁻⁰⁵	1,13 * 10 ⁻⁰²	ENTPD1
144,56	-1,6112	0,4192	-3,8434	1,21 * 10 ⁻⁰⁴	3,94 * 10 ⁻⁰²	BAHCC1
214,91	-2,1938	0,5071	-4,3266	1,51 * 10 ⁻⁰⁵	1,01 * 10 ⁻⁰²	GAREM2

baseMean: mittlere Genexpression über alle 12 Proben, log2FoldChange: Log₂ der Genexpressionsänderung, bei negativen Werten ist die Expression in CD8^{pos} NK-Zellen geringer als in CD8^{neg} NK-Zellen, lfcSE: Standardfehler des log2FoldChange, stat: Walt Teststatistik, p-Wert: p-Wert des Walt Tests, adj. p-Wert: adjustierter p-Wert des Walt Tests

Tabelle 22 *GO-Term Enrichment* Analyse aller differentiell exprimierter Gene in CD8^{pos} NK-Zellen

GO-Term	Beschreibung	p-Wert	FDR q-Wert	Anreicherung (N, B, n, b)	Gene
0007155	Zelladhäsion	3,03 * 10 ⁻⁶	4,06 * 10 ⁻²	4,13 (10642,365,106,15)	ENTPD1, CXCR3, CCL4, CD84, MYO1G, HSPB1, SLC39A8, PTPN6, LIMS1, CELSR2, PRKX, NUAK1, ITGA6, SELL, COL13A1
0022610	biologische Adhäsion	3,35 * 10 ⁻⁶	2,25 * 10 ⁻²	4,09 (10642,368,106,15)	ENTPD1, CXCR3, CCL4, CD84, MYO1G, HSPB1, SLC39A8, PTPN6, LIMS1, CELSR2, PRKX, NUAK1, ITGA6, SELL, COL13A1
0050793	Regulation von Entwicklungsprozessen	6,53 * 10 ⁻⁵	2,92 * 10 ⁻¹	2,09 (10642,1393,106,29)	HSPA1A, HSPA1B, ZMYM6, CXCR4, LDLRAD4, RNF10, TP53, HLA-DRA, RASSF2, DICER1, PRKX, CELSR2, CD3E, MYO9A, TOX, ST7, PSMA5, ZHX3, CHD7, GPR137, HSPB1, PKN1, PTPN6, IMPACT, LIMS1, MBD5, NUAK1, HMOX1, ITGA6
0050900	Leukozytenmigration	7,87 * 10 ⁻⁵	2,63 * 10 ⁻¹	5,70 (10642,141,106,8)	PTPN6, CXCR4, CXCR3, CCL4, ITGA6, CD84, SELL, MYO1G

Fortsetzung Tabelle 22

GO-Term	Beschreibung	p-Wert	FDR q-Wert	Anreicherung (N, B, n, b)	Gene
0098609	Zell-Zelladhäsion	1,54 * 10 ⁻⁴	4,13 * 10 ⁻¹	4,56 (10642,198,106,9)	HSPB1, SLC39A8, PTPN6, CELSR2, LIMS1, ITGA6, CD84, SELL, COL13A1
0072717	Zelluläre Antwort auf Actinomycin D	2,93 * 10 ⁻⁴	6,54 * 10 ⁻¹	66,93 (10642,3,106,2)	TP53, MDM2
1902533	Positive Regulation der intrazellulären Signaltransduktion	4,9 * 10 ⁻⁴	9,37 * 10 ⁻¹	2,54 (10642,632,106,16)	HSPA1A, HSPA1B, TRIM27, S100B, IGF1R, CXCR4, CCL4, GPR137, PKN1, TP53, PTPN6, RASSF2, LPAR6, LIMS1, CD3E, HMOX1
1902531	Regulation der intrazellulären Signaltransduktion	5,69 * 10 ⁻⁴	9,52 * 10 ⁻¹	2,01 (10642,1196,106,24)	MYO9A, HSPA1A, TRIM27, HSPA1B, S100B, IGF1R, CXCR4, DAPK2, CCL4, THEM4, RASGRF2, GPR137, MDM2, TP53, PKN1, HSPB1, PTPN6, DUSP16, RASSF2, LPAR6, LIMS1, CD3E, NUA1, HMOX1
0043305	Negative Regulation der Mastzell-degranulation	5,82 * 10 ⁻⁴	8,66 * 10 ⁻¹	50,20 (10642,4,106,2)	HMOX1, CD84
0070434	Positive Regulation von Signalwegen mit nukleotidbindender Oligomerisierungs-2-Domäne	5,82 * 10 ⁻⁴	7,79 * 10 ⁻¹	50,20 (10642,4,106,2)	HSPA1A, HSPA1B
0070426	Positive Regulation von Signalwegen mit nukleotidbindender Oligomerisierungsdomäne	5,82 * 10 ⁻⁴	7,09 * 10 ⁻¹	50,20 (10642,4,106,2)	HSPA1A, HSPA1B
0072716	Antwort auf Aktinomycin D	5,82 * 10 ⁻⁴	6,5 * 10 ⁻¹	50,20 (10642,4,106,2)	TP53, MDM2
0072719	Zelluläre Antwort auf Cisplatin	5,82 * 10 ⁻⁴	6,00 * 10 ⁻¹	50,20 (10642,4,106,2)	SLC31A1, HMOX1
0045595	Regulation der Zelldifferenzierung	6,85 * 10 ⁻⁴	6,55 * 10 ⁻¹	2,12 (10642,993,106,21)	MYO9A, HSPA1A, HSPA1B, TOX, ST7, CXCR4, PSMA5, ZHX3, RNF10, LDLRAD4, CHD7, GPR137, TP53, PTPN6, HLA-DRA, IMPACT, RASSF2, DICER1, PRKX, LIMS1, ITGA6
0051924	Regulation des Calciumionentransports	7,85 * 10 ⁻⁴	7,01 * 10 ⁻¹	5,48 (10642,110,106,6)	TRIM27, PTPN6, CXCR4, CCL4, CHD7, CD84

Fortsetzung Tabelle 22

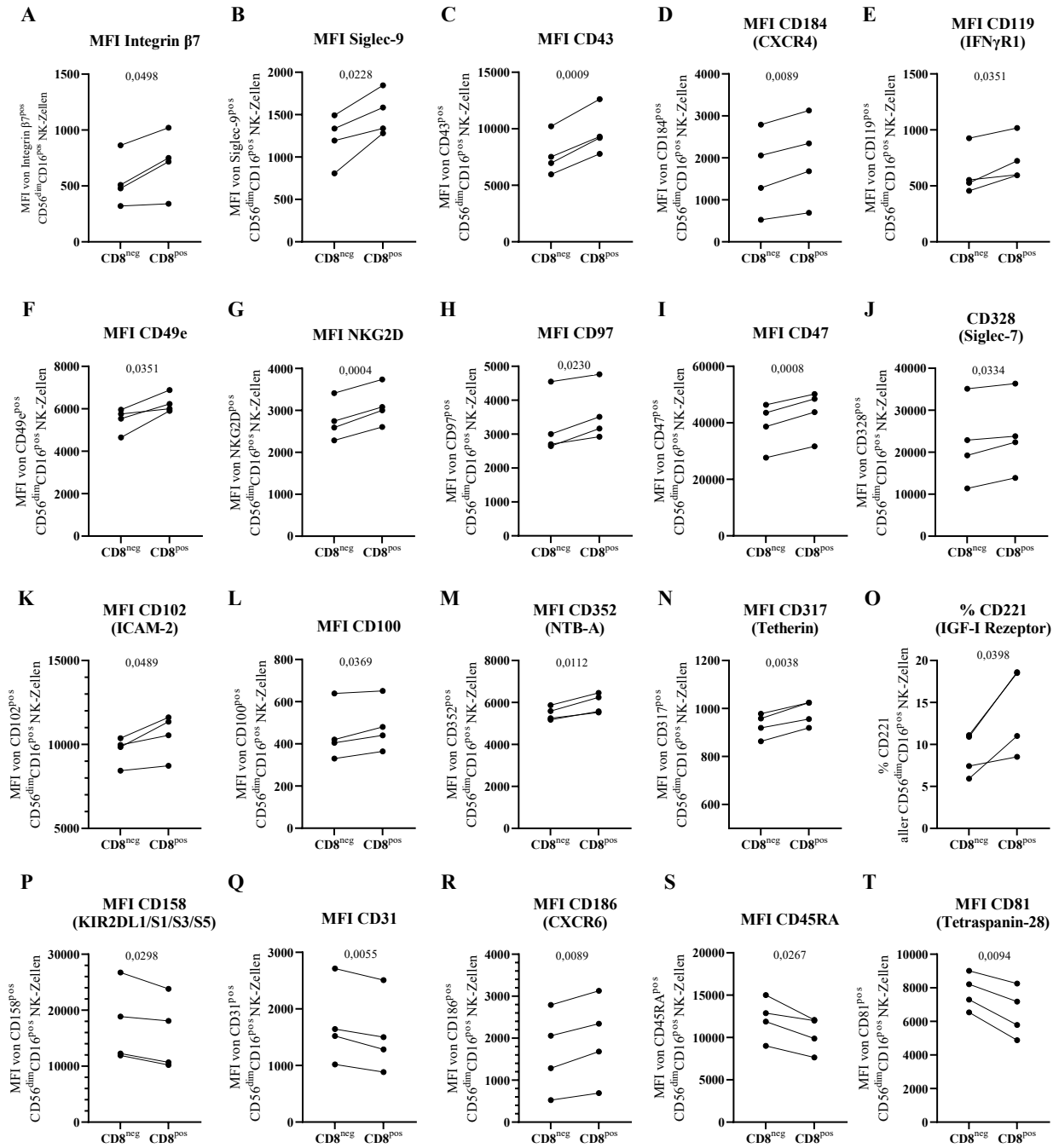
GO-Term	Beschreibung	p-Wert	FDR q-Wert	Anreicherung (N, B, n, b)	Gene
2000026	Regulation der Entwicklung mehrzelliger Organismen	$7,99 * 10^{-4}$	$6,68 * 10^{-1}$	2,05 (10642,1077,106,22)	MYO9A, HSPA1A, HSPA1B, TOX, CXCR4, PSMA5, RNF10, LDLRAD4, CHD7, GPR137, TP53, HSPB1, PTPN6, HLA-DRA, IMPACT, RASSF2, DICER1, CELSR2, PRKX, CD3E, HMOX1, ITGA6
0002376	Immunsystemprozess	$8,01 * 10^{-4}$	$6,31 * 10^{-1}$	1,90 (10642,1376,106,26)	HSPA1A, TRIM27, HSPA1B, CXCR4, HMG2, CD8A, TP53, HLA-DRA, CD3E, CKAP4, SELL, S100B, TOX, IGF1R, PSMA5, CXCR3, CCL4, CHD7, CD84, MYO1G, PKN1, RAB37, PTPN6, HMOX1, ITGA6, NDUFC2
0019221	Zytokin-vermittelter Signalweg	$9,15 * 10^{-4}$	$6,81 * 10^{-1}$	2,88 (10642,419,106,12)	TP53, ADIPOR2, TNFRSF9, TNFRSF25, PTPN6, HLA-DRA, PSMA5, CXCR4, CXCR3, LIMS1, HMOX1, CCL4
0007186	G-Protein-gekoppelter Rezeptorsignalweg	$9,27 * 10^{-4}$	$6,53 * 10^{-1}$	3,28 (10642,306,106,10)	PTPN6, CXCR4, LPAR6, CXCR3, CELSR2, DGKK, CD3E, CCL4, RASGRF2, GLP1R
0071494	Zelluläre Antwort auf UV-C	$9,64 * 10^{-4}$	$6,45 * 10^{-1}$	40,16 (10642,5,106,2)	TP53, IMPACT
0010286	Hitzeakklimatisierung	$9,64 * 10^{-4}$	$6,15 * 10^{-1}$	40,16 (10642,5,106,2)	HSPA1A, HSPA1B
0010626	Negative Regulation der Schwann-Zellproliferation	$9,64 * 10^{-4}$	$5,87 * 10^{-1}$	40,16 (10642,5,106,2)	DICER1, RNF10
0010624	Regulation der Schwann-Zellproliferation	$9,64 * 10^{-4}$	$5,87 * 10^{-1}$	40,16 (10642,5,106,2)	DICER1, RNF10
0070370	Zelluläre Hitzeakklimatisierung	$9,64 * 10^{-4}$	$5,38 * 10^{-1}$	40,16 (10642,5,106,2)	HSPA1A, HSPA1B
0002887	Negative Regulation der durch myeloische Leukozyten vermittelten Immunität	$9,64 * 10^{-4}$	$5,16 * 10^{-1}$	40,16 (10642,5,106,2)	HMOX1, CD84
0090063	Positive Regulation der Mikrotubuli-Nukleation	$9,64 * 10^{-4}$	$4,96 * 10^{-1}$	40,16 (10642,5,106,2)	HSPA1A, HSPA1B

Gene-Ontology-Term Enrichment Analyse biologischer Prozesse von allen in der RNA-Sequenzierung differentiell exprimierten Gene in CD8^{pos} NK-Zellen im Vergleich zu CD8^{neg} NK-Zellen mittels des Onlinetools Gorilla (<http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il/>). Schwach exprimierte Gene mit einer mittleren normierten Expression von unter 100 über alle Proben hinweg oder einem adjustierten p-Wert von über 0,2 wurden hierfür ausgeschlossen. Der p-Wert entspricht dem unkorrigierten Anreicherungs-p-Wert, berechnet nach dem mHG oder HG Modell. Der FDR q-Wert ist der korrigierte p-Wert nach der Benjamini und Hochberg Methode. Eine

Anreicherung ist definiert durch N (Anzahl aller untersuchten Gene), B (Anzahl dieser Gene, die mit dem spezifischen *GO-Term* assoziiert sind), n (Anzahl der differentiell exprimierten Gene) und b (Anzahl der differentiell exprimierten Gene, die dem entsprechenden *GO-Term* zugeordnet werden können).

Die Anreicherung wird berechnet nach: $Anreicherung = \left(\frac{b/n}{B/N} \right)$.

5.5.2. LEGENDScreen



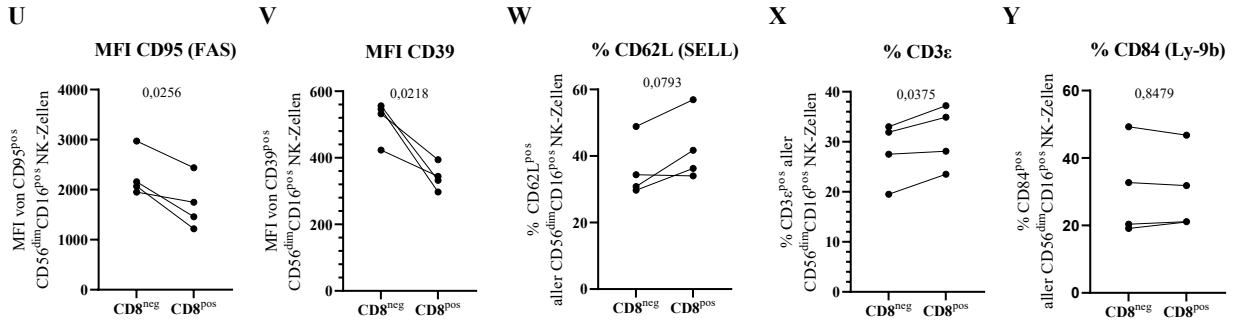


Abbildung 19 Untersuchung der differentiellen Proteinexpression (LEGENDScreen) von CD8^{pos} und CD8^{neg} NK-Zellen

Die Proteinexpression von 316 Oberflächenmolekülen auf CD8^{pos} und CD8^{neg} NK-Zellen wurde mittels LEGENDScreen untersucht. Die hier unter A-V aufgeführten Proteine zeigten eine signifikant differentielle Proteineexpression. Die unter W-Y aufgeführten Proteine waren in der RNA-Sequenzierung differentiell exprimiert, zeigten aber keine signifikanten Unterschiede, wemgleich CD62L(SELL) einen zur RNA-Sequenzierung passenden Trend aufwies.

Tabelle 23

Liste der differentiell exprimierten Proteine (LEGENDScreen) in CD8^{pos} NK-Zellen

Protein	Gene-Cards Genname	Anteil (%) an CD8 ^{pos} oder CD8 ^{neg} NK-Zellen				Proteinexpression (MFI) auf Protein ^{pos} CD8 ^{pos} oder CD8 ^{neg} NK-Zellen				RNA-Sequenzierung		
		\bar{X} CD8 ^{neg}	\bar{X} CD8 ^{pos}	Δ	p-Wert %	\bar{X} CD8 ^{neg}	\bar{X} CD8 ^{pos}	rel. Δ	p-Wert (MFI)	log2 FC	p-Wert	adj. p-Wert
Integrin β 7	<i>ITGB7</i>	77,45	86,98	9,52	3,43*10 ⁻²	542,50	707,25	30,55	4,98*10 ⁻²	-0,06	5,49*10 ⁻¹	9,70*10 ⁻¹
Siglec-9	<i>SIGLEC9</i>	68,90	72,93	4,02	2,24*10 ⁻²	1207,50	1512,00	28,21	2,28*10 ⁻²	0,35	2,36*10 ⁻¹	9,18*10 ⁻¹
CD43	SPN	100,00	100,00	0,00		7669,00	9725,50	27,38	9,17*10 ⁻⁴	0,05	5,18*10 ⁻¹	9,66*10 ⁻¹
CD184	<i>CXCR4</i>	86,05	90,15	4,10	2,27*10 ⁻¹	1665,25	1961,50	22,16	8,88*10 ⁻³	0,41	2,36*10 ⁻⁷	3,54*10 ⁻⁴
CD119	<i>IFNGR1</i>	88,30	93,35	5,05	4,27*10 ⁻²	615,25	733,25	21,47	3,51*10 ⁻²	0,27	4,08*10 ⁻³	2,62*10 ⁻¹
CD49e	<i>ITGA5</i>	96,78	98,63	1,85	2,38*10 ⁻¹	5476,50	6253,50	14,77	3,51*10 ⁻²	0,18	3,30*10 ⁻²	6,48*10 ⁻¹
NKG2D	<i>KLRK1</i>	99,90	99,95	0,05	3,91*10 ⁻¹	2758,50	3106,50	12,90	4,30*10 ⁻⁴	0,07	6,28*10 ⁻¹	9,81*10 ⁻¹
CD97	<i>ADGRE5</i>	99,98	100,00	0,03	3,91*10 ⁻¹	3224,75	3590,00	12,34	2,30*10 ⁻²	0,00	9,61*10 ⁻¹	9,97*10 ⁻¹
CD47	CD47	100,00	100,00	0,00		39076,00	43524,75	11,75	8,34*10 ⁻⁴	-0,07	6,32*10 ⁻¹	9,81*10 ⁻¹
CD328	<i>SIGLEC7</i>	92,85	96,83	3,97	1,83*10 ⁻¹	22160,50	24113,25	11,48	3,34*10 ⁻²	0,25	2,47*10 ⁻²	5,87*10 ⁻¹
CD102	<i>ICAM2</i>	100,00	100,00	0,00		9654,50	10561,25	9,16	4,89*10 ⁻²	-0,08	4,61*10 ⁻¹	9,59*10 ⁻¹
CD100	<i>SEMA4D</i>	46,55	51,58	5,03	1,17*10 ⁻²	448,50	483,75	8,78	3,69*10 ⁻²	-1,26	2,08*10 ⁻¹	9,09*10 ⁻¹
CD352	<i>SLAMF6</i>	100,00	100,00	0,00		5472,50	5951,25	8,66	1,12*10 ⁻²	-0,04	6,40*10 ⁻¹	9,82*10 ⁻¹
CD317	<i>BST2</i>	99,68	99,80	0,12	7,96*10 ⁻²	929,50	980,75	5,53	3,82*10 ⁻³	-0,01	8,78*10 ⁻¹	9,97*10 ⁻¹
CD221	IGF1R	8,84	14,16	5,32	3,98*10 ⁻²	259,00	256,75	-0,74	6,24*10 ⁻¹	-0,70	1,14*10 ⁻⁵	8,55*10 ⁻³
CD158	<i>KIR2DL1</i>	27,78	30,93	3,15	1,93*10 ⁻²	17444,50	15701,00	-10,53	2,98*10 ⁻²	-0,07	4,04*10 ⁻¹	9,58*10 ⁻¹
CD31	<i>PECAMI</i>	72,18	77,68	5,50	3,94*10 ⁻¹	1724,75	1544,00	-11,31	5,51*10 ⁻³	-0,45	6,99*10 ⁻²	7,68*10 ⁻¹
CD186	CXCR6	8,59	5,41	-3,18	1,56*10 ⁻¹	607,00	535,25	-12,26	1,05*10 ⁻²	-1,24	7,34*10 ⁻³	3,43*10 ⁻¹
CD45RA	<i>PTPRC</i>	99,98	100,00	0,03	3,91*10 ⁻¹	12190,50	10396,00	-14,60	2,67*10 ⁻²	-0,06	4,61*10 ⁻¹	9,59*10 ⁻¹
CD81	<i>CD81</i>	100,00	100,00	0,00		7765,75	6523,50	-16,79	9,43*10 ⁻³	0,03	7,22*10 ⁻¹	9,86*10 ⁻¹
CD95	FAS	99,88	99,85	-0,03	7,18*10 ⁻¹	2288,00	1715,25	-25,52	2,56*10 ⁻²	-0,12	5,82*10 ⁻¹	9,73*10 ⁻¹
CD39	<i>ENTPDI</i>	7,54	4,96	-2,58	1,18*10 ⁻¹	514,25	341,75	-32,63	2,18*10 ⁻²	-1,24	1,79*10 ⁻⁵	1,13*10 ⁻²
<i>In der RNA-Sequenzierung signifikant differentiell exprimiert</i>												
CD62L	<i>SELL</i>	35,95	42,23	6,28	7,93*10 ⁻²	2683,50	3318,25	16,10	3,14*10 ⁻¹	0,43	1,85*10 ⁻⁸	4,45*10 ⁻⁵
CD3e	<i>CD3E</i>	27,98	30,93	2,95	3,75*10 ⁻²	346,50	353,00	1,85	4,01*10 ⁻¹	0,48	1,16*10 ⁻⁴	3,94*10 ⁻²
CD84	<i>SLAMF5</i>	30,38	30,18	-0,20	8,48*10 ⁻¹	500,00	531,25	5,77	4,01*10 ⁻¹	-1,05	1,19*10 ⁻⁴	3,94*10 ⁻²

Mittels LEGENDScreen wurden CD8^{pos} und CD8^{neg} NK-Zellen hinsichtlich der differentiellen Expression von 361 Proteinen untersucht. Proteine, die im Schnitt von weniger als 5 % der NK-Zellen exprimiert wurden und deren Expressionsunterschiede weniger als 5 % (% bzw. MFI) ausmachten, wurden von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen. Von den übrigen Proteinen wurde der Anteil der jeweiligen Protein^{pos} CD8^{neg} bzw. CD8^{pos} NK-Zellen sowie die MFI der Protein^{pos} NK-Zellen bestimmt. Von Proteinen, die im Schnitt von mehr als 90 % aller NK-Zellen exprimiert wurden, wurde nur die MFI näher analysiert. Signifikante Unterschiede wurden mittels gepaarten t-Test mit GraphPad Prism bestimmt. Zum Vergleich wurden für die signifikanten Proteine die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung des entsprechenden Gens mit aufgeführt. Zusätzlich wurden die LEGENDScreen-Ergebnisse der Proteine aufgeführt, die in der RNA-Sequenzierung signifikante Expressionsunterschiede zeigten. Grün unterlegte Moleküle zeigten sowohl im LEGENDScreen als auch in der RNA-Sequenzierung (adjustierter p-Wert) signifikante Expressionsunterschiede.

log2 FC: log2 FoldChange (Log2 der Genexpressionsänderung).

KIR2DL1 (orange unterlegt) wurde von den vier möglichen kodierten Proteinen (KIR2DL1, KIR2DS1, KIR2DS3 und KIR2DS5) ausgewählt, da das KIR2DL1-Gen die stärkste Genexpression in der RNA-Sequenzierung zeigte.

PTPRC (karminrot unterlegt) kodiert für CD45, von dem es unterschiedliche Spleißvarianten, u.a. CD45RA, gibt.

Tabelle 24

GO-Term Enrichment Analyse der differentiell exprimierten Proteine in CD8^{pos} NK-Zellen (LEGEND-Screen)

Hochregulierte Proteine		CD8a	Integrin β 7	Siglec-9	CD43	CXCR4	CD119	CD49e	NKG2D	CD97	CD47	Siglec-7	CD102	CD100	CD352	CD317	CD221
GO-Term	Beschreibung																
0002376	Immunsystemprozess																
0006955	Immunantwort																
0002682	Regulation von Immunsystemprozessen																
0050776	Regulation der Immunantwort																
0002252	Immuneffektorprozess																
0002443	Leukozyten-vermittelte Immunität																
0006952	Abwehrreaktion																
0051707	Antwort auf andere Organismen																
0050896	Antwort auf Stimuli																
0048583	Regulation der Antwort auf Stimuli																
0032101	Regulation der Antwort auf externe Stimuli																
0032103	Positive Regulation der Antwort auf externe Stimuli																
0009607	Reaktion auf biotische Stimuli																
0022610	biologische Adhäsion																
0098609	Zell-Zelladhäsion																
0034113	heterotype Zell-Zelladhäsion																
0007159	Leukozyten Zell-Zelladhäsion																
0040011	Fortbewegung																
0016477	Zellmigration																
0071674	Mononukleäre Zellmigration																
0051674	Lokalisierung von Zellen																
0044419	biologischer Prozess, der an der Interaktion zwischen Organismen verschiedener Arten beteiligt ist																
0007165	Signaltransduktion																
0007229	Integrin-vermittelter Signalweg																
0007166	Oberflächenrezeptor-Signalweg																
0001775	Zellaktivierung																
0046649	Lymphozytenaktivierung																
0046718	Eintritt des Virus in die Wirtszelle																

Fortsetzung Tabelle 24

Herunterregulierte Proteine								
<i>GO-Term</i>	Beschreibung	CD39	CD95	CD81	CD45	CXCR6	CD31	KIR2DL1
0007166	Oberflächenrezeptor-Signalweg							
0050731	Positive Regulation der Peptidyl-Tyrosin-Phosphorylierung							
0050857	Positive Regulation von Antigenrezeptor-vermittelten Signalwegen							
0046633	alpha-beta T-Zellproliferation							
0046640	Regulation der alpha-beta T-Zellproliferation							

Die differentiell hoch- bzw. herunterregulierten Proteine aus dem LEGENDScreen ($p \leq 0,05$) wurden zunächst nach ihrer relativen Änderung der MFI sortiert und mittels g:Profiler/ghost analysiert. Anschließend wurden die bei dieser Analyse erhaltenen redundanten *GO-Terms* mittels REVIGO entfernt. CD221 wurde bei den hochregulierten Genen in der sortierten Liste an letzter Stelle angegeben, da die Änderung von 5,32 % geringer war als die relative Änderung von CD317. Alle hier aufgeführten *GO-Terme* haben einen p -Wert $\leq 0,05$, wenngleich die Reihenfolge keine Aussage über das Signifikanzniveau zulässt, da diese nach zusammengehörenden Prozessen sortiert ist (z.B. nach „Adhäsion“). Grün hinterlegt sind die Gene, die zu dem entsprechenden *GO-Term* gehören.

5.6. Ereigniszeitanalysen zum Rezidiv-Risiko in der AML

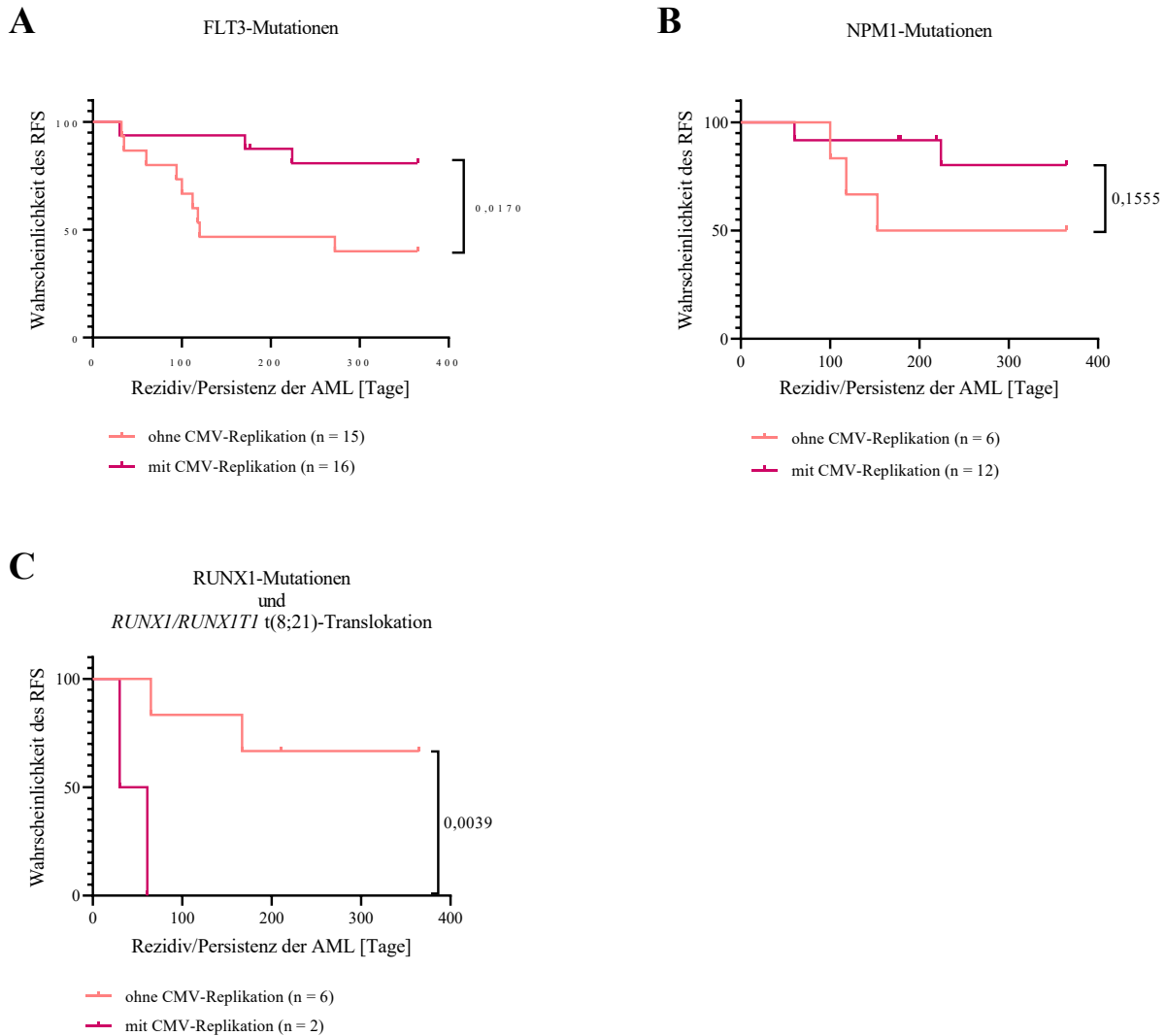


Abbildung 20 Patienten mit einer FLT3-Mutation, nicht aber mit einer RUNX1-Genveränderung, profitieren von einem CMV-Replikationsereignis

Die Wahrscheinlichkeit des Rezidiv-freien Überlebens (RFS) wurde für AML-Patienten, die eine hSCT erhielten, für den Zeitraum von bis zu einem Jahr nach der hSCT ermittelt. Zu den "Rezidiven" gehörte sowohl das Wiederauftreten als auch die Persistenz der zugrunde liegenden AML. **A** Die Wahrscheinlichkeit des RFS wurde für 31 Patienten, die eine FLT3-Mutation aufwiesen, in Abhängigkeit von einer CMV-Replikation innerhalb des ersten Jahres nach der hSCT ermittelt. **B** Die Wahrscheinlichkeit des RFS wurde für 18 Patienten mit NPM1-Mutation in Abhängigkeit von einer CMV-Replikation innerhalb des ersten Jahres nach der hSCT ermittelt. **C** Die Wahrscheinlichkeit des RFS wurde für 8 Patienten, die eine Veränderung in RUNX1 durch Mutation oder durch die charakteristische t(8;21) Translokation aufwiesen, in Abhängigkeit von einer CMV-Replikation innerhalb des ersten Jahres nach der hSCT ermittelt. Die Ereigniszeitanalysen wurden mit dem Log-rank-Test (Mantel-Cox) durchgeführt. Als signifikant wurden p-Werte < 0,05 erachtet.

VI. Literatur

1. Cannon, M.J., D.S. Schmid, and T.B. Hyde, *Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection*. Rev Med Virol, 2010. **20**(4): p. 202-13.
2. Dioverti, M.V. and R.R. Razonable, *Cytomegalovirus*. Microbiol Spectr, 2016. **4**(4).
3. Mendelson, M., et al., *Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34+ bone marrow progenitors*. J Gen Virol, 1996. **77** (Pt **12**): p. 3099-102.
4. von Laer, D., et al., *Detection of cytomegalovirus DNA in CD34+ cells from blood and bone marrow*. Blood, 1995. **86**(11): p. 4086-90.
5. Khaiboullina, S.F., et al., *Human cytomegalovirus persists in myeloid progenitors and is passed to the myeloid progeny in a latent form*. Br J Haematol, 2004. **126**(3): p. 410-7.
6. Hahn, G., R. Jores, and E.S. Mocarski, *Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(7): p. 3937-3942.
7. Wen, K.W., et al., *Cancers associated with human gammaherpesviruses*. Febs j, 2021.
8. Murphy, K., *Janeway Immunologie*. 9. Aufl. 2018 ed, ed. K. Murphy and C. Weaver. 2018, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
9. Becker, A.J., C.E. Mc, and J.E. Till, *Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells*. Nature, 1963. **197**: p. 452-4.
10. Wu, A.M., et al., *Cytological evidence for a relationship between normal hemotopoietic colony-forming cells and cells of the lymphoid system*. J Exp Med, 1968. **127**(3): p. 455-64.
11. Siminovitch, L., E.A. McCulloch, and J.E. Till, *The Distribution of Colony-Forming Cells among Spleen Colonies*. J Cell Comp Physiol, 1963. **62**: p. 327-36.
12. Kirshenbaum, A.S., et al., *Demonstration of the origin of human mast cells from CD34+ bone marrow progenitor cells*. J Immunol, 1991. **146**(5): p. 1410-5.
13. Amon, L., et al., *The ontogenetic path of human dendritic cells*. Mol Immunol, 2020. **120**: p. 122-129.
14. Galy, A., et al., *Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset*. Immunity, 1995. **3**(4): p. 459-73.
15. Sanchez, M.J., et al., *Identification of a common T/natural killer cell progenitor in human fetal thymus*. J Exp Med, 1994. **180**(2): p. 569-76.
16. Marquez, C., et al., *The development of T and non-T cell lineages from CD34+ human thymic precursors can be traced by the differential expression of CD44*. J Exp Med, 1995. **181**(2): p. 475-83.
17. Manz, M.G., et al., *Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(18): p. 11872-7.
18. Franco, C.B., et al., *Distinguishing mast cell and granulocyte differentiation at the single-cell level*. Cell Stem Cell, 2010. **6**(4): p. 361-8.
19. Rieger, M.A. and T. Schroeder, *Hematopoiesis*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(12).

20. Abul K. Abbas, A.H.L., Shiv Pillai, *Basic Immunology Functions and Disorders of the Immune System*. 4th ed. 2012, Philadelphia: Elsevier Health Sciences.
21. Montaldo, E., et al., *Human NK cell receptors/markers: a tool to analyze NK cell development, subsets and function*. *Cytometry A*, 2013. **83**(8): p. 702-13.
22. LeBien, T.W. and T.F. Tedder, *B lymphocytes: how they develop and function*. *Blood*, 2008. **112**(5): p. 1570-80.
23. Takeuchi, O. and S. Akira, *Pattern recognition receptors and inflammation*. *Cell*, 2010. **140**(6): p. 805-20.
24. Tay, M.Z., K. Wiehe, and J. Pollara, *Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis in Antiviral Immune Responses*. *Front Immunol*, 2019. **10**: p. 332.
25. Gómez Román, V.R., J.C. Murray, and L.M. Weiner, *Chapter 1 - Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC)*, in *Antibody Fc*, M.E. Ackerman and F. Nimmerjahn, Editors. 2014, Academic Press: Boston. p. 1-27.
26. Nielsen, S.C.A. and S.D. Boyd, *Human adaptive immune receptor repertoire analysis-Past, present, and future*. *Immunol Rev*, 2018. **284**(1): p. 9-23.
27. Orange, J.S., *Natural killer cell deficiency*. *J Allergy Clin Immunol*, 2013. **132**(3): p. 515-525.
28. Poggi, A. and M.R. Zocchi, *NK cell autoreactivity and autoimmune diseases*. *Front Immunol*, 2014. **5**: p. 27.
29. Elder, M.E., *T-cell immunodeficiencies*. *Pediatr Clin North Am*, 2000. **47**(6): p. 1253-74.
30. Morvan, M.G. and L.L. Lanier, *NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks*. *Nat Rev Cancer*, 2016. **16**(1): p. 7-19.
31. Sivori, S., et al., *CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(27): p. 10116-21.
32. Hart, O.M., et al., *TLR7/8-mediated activation of human NK cells results in accessory cell-dependent IFN-gamma production*. *J Immunol*, 2005. **175**(3): p. 1636-42.
33. Chalifour, A., et al., *Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production*. *Blood*, 2004. **104**(6): p. 1778-83.
34. Athie-Morales, V., G.M. O'Connor, and C.M. Gardiner, *Activation of human NK cells by the bacterial pathogen-associated molecular pattern muramyl dipeptide*. *J Immunol*, 2008. **180**(6): p. 4082-9.
35. Perrot, I., et al., *TLR3 and Rig-like receptor on myeloid dendritic cells and Rig-like receptor on human NK cells are both mandatory for production of IFN-gamma in response to double-stranded RNA*. *J Immunol*, 2010. **185**(4): p. 2080-8.
36. Carrillo-Bustamante, P., C. Kesmir, and R.J. de Boer, *The evolution of natural killer cell receptors*. *Immunogenetics*, 2016. **68**(1): p. 3-18.
37. Barrow, A.D., C.J. Martin, and M. Colonna, *The Natural Cytotoxicity Receptors in Health and Disease*. *Front Immunol*, 2019. **10**: p. 909.
38. Middleton, D. and F. Gonzelez, *The extensive polymorphism of KIR genes*. *Immunology*, 2010. **129**(1): p. 8-19.

39. Fehniger, T.A., et al., *Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response*. J Immunol, 1999. **162**(8): p. 4511-20.
40. Abel, A.M., et al., *Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization*. Frontiers in Immunology, 2018. **9**(1869).
41. Cooper, M.A., et al., *Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset*. Blood, 2001. **97**(10): p. 3146-51.
42. Fauriat, C., et al., *Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition*. Blood, 2010. **115**(11): p. 2167-76.
43. Wei, H., et al., *Interleukin-10 Family Cytokines Immunobiology and Structure*. Adv Exp Med Biol, 2019. **1172**: p. 79-96.
44. Lieschke, G.J. and A.W. Burgess, *Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (1)*. N Engl J Med, 1992. **327**(1): p. 28-35.
45. Idriss, H.T. and J.H. Naismith, *TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s)*. Microsc Res Tech, 2000. **50**(3): p. 184-95.
46. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri, *The biology of human natural killer-cell subsets*. Trends Immunol, 2001. **22**(11): p. 633-40.
47. Fellows, E., et al., *Natural killer cell-derived human granzyme H induces an alternative, caspase-independent cell-death program*. Blood, 2007. **110**(2): p. 544-52.
48. Voskoboinik, I., J.C. Whisstock, and J.A. Trapani, *Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(6): p. 388-400.
49. Guma, M., et al., *Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire*. Blood, 2004. **104**(12): p. 3664-71.
50. Houchins, J.P., et al., *Natural killer cell cytolytic activity is inhibited by NKG2-A and activated by NKG2-C*. J Immunol, 1997. **158**(8): p. 3603-9.
51. Braud, V.M., et al., *HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C*. Nature, 1998. **391**(6669): p. 795-9.
52. Mosmann, T.R., L. Li, and S. Sad, *Functions of CD8 T-cell subsets secreting different cytokine patterns*. Semin Immunol, 1997. **9**(2): p. 87-92.
53. Mittrucker, H.W., A. Visekruna, and M. Huber, *Heterogeneity in the differentiation and function of CD8(+) T cells*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2014. **62**(6): p. 449-58.
54. Kaech, S.M. and W. Cui, *Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(11): p. 749-61.
55. Castellino, F. and R.N. Germain, *Cooperation between CD4+ and CD8+ T cells: when, where, and how*. Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 519-40.
56. Mirandola, P., et al., *Activated human NK and CD8+ T cells express both TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptors but are resistant to TRAIL-mediated cytotoxicity*. Blood, 2004. **104**(8): p. 2418-24.
57. Herr, I., et al., *Monitoring of CD95 (APO-1/Fas) ligand expression in human T cells by quantitative RT-PCR*. Cell Death Differ, 1996. **3**(3): p. 299-305.

58. Brincks, E.L., et al., *CD8 T cells utilize TRAIL to control influenza virus infection*. J Immunol, 2008. **181**(7): p. 4918-25.
59. Kägi, D., et al., *Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity*. Science, 1994. **265**(5171): p. 528-30.
60. Bassing, C.H., W. Swat, and F.W. Alt, *The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination*. Cell, 2002. **109** Suppl: p. S45-55.
61. Klein, L., et al., *Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see)*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(6): p. 377-91.
62. Sallusto, F., J. Geginat, and A. Lanzavecchia, *Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 745-63.
63. Verma, K., et al., *Human CD8+ CD57- TEMRA cells: Too young to be called "old"*. PLoS One, 2017. **12**(5): p. e0177405.
64. Jacobs, A., *Myelodysplastic syndromes: pathogenesis, functional abnormalities, and clinical implications*. J Clin Pathol, 1985. **38**(11): p. 1201-17.
65. Tefferi, A. and J.W. Vardiman, *Myelodysplastic syndromes*. N Engl J Med, 2009. **361**(19): p. 1872-85.
66. Ades, L., R. Itzykson, and P. Fenaux, *Myelodysplastic syndromes*. Lancet, 2014. **383**(9936): p. 2239-52.
67. Gadji, M. and A.R. Pozzo, *From cellular morphology to molecular and epigenetic anomalies of myelodysplastic syndromes*. Genes Chromosomes Cancer, 2019. **58**(7): p. 474-483.
68. Haferlach, T., et al., *Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes*. Leukemia, 2014. **28**(2): p. 241-7.
69. Papaemmanuil, E., et al., *Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes*. Blood, 2013. **122**(22): p. 3616-27; quiz 3699.
70. Strom, S.S., et al., *Risk factors of myelodysplastic syndromes: a case-control study*. Leukemia, 2005. **19**(11): p. 1912-8.
71. Kantarjian, H.M., et al., *Therapy-related leukemia and myelodysplastic syndrome: clinical, cytogenetic, and prognostic features*. J Clin Oncol, 1986. **4**(12): p. 1748-57.
72. Michels, S.D., et al., *Therapy-related acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome: a clinical and morphologic study of 65 cases*. Blood, 1985. **65**(6): p. 1364-72.
73. Ma, X., *Epidemiology of myelodysplastic syndromes*. Am J Med, 2012. **125**(7 Suppl): p. S2-5.
74. Ye, X., et al., *The incidence, risk factors, and survival of acute myeloid leukemia secondary to myelodysplastic syndrome: A population-based study*. Hematol Oncol, 2019. **37**(4): p. 438-446.
75. Arber, D.A., et al., *The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia*. Blood, 2016. **127**(20): p. 2391-405.
76. Cazzola, M., *Myelodysplastic Syndromes*. N Engl J Med, 2020. **383**(14): p. 1358-1374.
77. Khwaja, A., et al., *Acute myeloid leukaemia*. Nat Rev Dis Primers, 2016. **2**: p. 16010.
78. Short, N.J., M.E. Rytting, and J.E. Cortes, *Acute myeloid leukaemia*. Lancet, 2018. **392**(10147): p. 593-606.

79. Döhner, H., D.J. Weisdorf, and C.D. Bloomfield, *Acute Myeloid Leukemia*. N Engl J Med, 2015. **373**(12): p. 1136-52.
80. Lowenberg, B., J.R. Downing, and A. Burnett, *Acute myeloid leukemia*. N Engl J Med, 1999. **341**(14): p. 1051-62.
81. Bennett, J.M., et al., *Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group*. Br J Haematol, 1976. **33**(4): p. 451-8.
82. Döhner, H., et al., *Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel*. Blood, 2017. **129**(4): p. 424-447.
83. Shallis, R.M., et al., *Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges*. Blood Rev, 2019. **36**: p. 70-87.
84. Juliusson, G., et al., *Acute myeloid leukemia in the real world: why population-based registries are needed*. Blood, 2012. **119**(17): p. 3890-9.
85. Platzbecker, U., *Treatment of MDS*. Blood, 2019. **133**(10): p. 1096-1107.
86. Steensma, D.P., *Myelodysplastic syndromes current treatment algorithm 2018*. Blood Cancer J, 2018. **8**(5): p. 47.
87. Nagata, Y. and J.P. Maciejewski, *The functional mechanisms of mutations in myelodysplastic syndrome*. Leukemia, 2019. **33**(12): p. 2779-2794.
88. Molldrem, J.J., et al., *Haematological response of patients with myelodysplastic syndrome to antithymocyte globulin is associated with a loss of lymphocyte-mediated inhibition of CFU-GM and alterations in T-cell receptor Vbeta profiles*. Br J Haematol, 1998. **102**(5): p. 1314-22.
89. Silverman, L.R., *Targeting hypomethylation of DNA to achieve cellular differentiation in myelodysplastic syndromes (MDS)*. Oncologist, 2001. **6 Suppl 5**: p. 8-14.
90. Quesnel, B. and P. Fenaux, *P15INK4b gene methylation and myelodysplastic syndromes*. Leuk Lymphoma, 1999. **35**(5-6): p. 437-43.
91. Rollig, C., *[Diagnosis and treatment of acute myeloid leukemia : The updated 2018 Onkopedia Guideline]*. Internist (Berl), 2019. **60**(3): p. 257-272.
92. Young, R.C., R.F. Ozols, and C.E. Myers, *The anthracycline antineoplastic drugs*. N Engl J Med, 1981. **305**(3): p. 139-53.
93. Bodley, A., et al., *DNA topoisomerase II-mediated interaction of doxorubicin and daunorubicin congeners with DNA*. Cancer Res, 1989. **49**(21): p. 5969-78.
94. Aubel-Sadron, G. and D. Londos-Gagliardi, *Daunorubicin and doxorubicin, anthracycline antibiotics, a physicochemical and biological review*. Biochimie, 1984. **66**(5): p. 333-52.
95. Kufe, D.W., et al., *Correlation of cytotoxicity with incorporation of ara-C into DNA*. J Biol Chem, 1980. **255**(19): p. 8997-900.
96. Graham, F.L. and G.F. Whitmore, *The effect of-beta-D-arabinofuranosylcytosine on growth, viability, and DNA synthesis of mouse L-cells*. Cancer Res, 1970. **30**(11): p. 2627-35.
97. Yeshurun, M. and O. Wolach, *When should patients receive consolidation chemotherapy before allogeneic hematopoietic cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission?* Curr Opin Hematol, 2018. **25**(2): p. 75-80.
98. Gyurkocza, B. and B.M. Sandmaier, *Conditioning regimens for hematopoietic cell transplantation: one size does not fit all*. Blood, 2014. **124**(3): p. 344-353.

99. Adkins, D.R. and J.F. DiPersio, *Total body irradiation before an allogeneic stem cell transplantation: is there a magic dose?* *Curr Opin Hematol*, 2008. **15**(6): p. 555-60.
100. Valcarcel, D. and R. Martino, *Reduced intensity conditioning for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in myelodysplastic syndromes and acute myelogenous leukemia.* *Curr Opin Oncol*, 2007. **19**(6): p. 660-6.
101. Schattenberg, A.V. and T.H. Levenska, *Differences between the different conditioning regimens for allogeneic stem cell transplantation.* *Curr Opin Oncol*, 2006. **18**(6): p. 667-70.
102. Festuccia, M., et al., *Hematopoietic Cell Transplantation in Myelodysplastic Syndromes after Treatment with Hypomethylating Agents.* *Biol Blood Marrow Transplant*, 2017. **23**(9): p. 1509-1514.
103. Shimoni, A., et al., *Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation in AML and MDS using myeloablative versus reduced-intensity conditioning: the role of dose intensity.* *Leukemia*, 2006. **20**(2): p. 322-8.
104. Potter, V.T., et al., *Comparison of Intensive Chemotherapy and Hypomethylating Agents before Allogeneic Stem Cell Transplantation for Advanced Myelodysplastic Syndromes: A Study of the Myelodysplastic Syndrome Subcommittee of the Chronic Malignancies Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplant Research.* *Biol Blood Marrow Transplant*, 2016. **22**(9): p. 1615-1620.
105. Reichle, A., et al., *Transplant characteristics: minimal residual disease and impaired megakaryocytic colony growth as sensitive parameters for predicting relapse in acute myeloid leukemia.* *Leukemia*, 1999. **13**(8): p. 1227-34.
106. Heuser, M., et al., *Individual outcome prediction for myelodysplastic syndrome (MDS) and secondary acute myeloid leukemia from MDS after allogeneic hematopoietic cell transplantation.* *Ann Hematol*, 2017. **96**(8): p. 1361-1372.
107. Della Porta, M.G., et al., *Predictive factors for the outcome of allogeneic transplantation in patients with MDS stratified according to the revised IPSS-R.* *Blood*, 2014. **123**(15): p. 2333-42.
108. Michelis, F.V., et al., *Cytogenetic risk determines outcomes after allogeneic transplantation in older patients with acute myeloid leukemia in their second complete remission: A Center for International Blood and Marrow Transplant Research cohort analysis.* *Cancer*, 2017. **123**(11): p. 2035-2042.
109. Rashidi, A. and A.F. Cashen, *A cytogenetic model predicts relapse risk and survival in patients with acute myeloid leukemia undergoing hematopoietic stem cell transplantation in morphologic complete remission.* *Leuk Res*, 2015. **39**(1): p. 77-81.
110. Takenaka, K., et al., *Cytomegalovirus Reactivation after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation is Associated with a Reduced Risk of Relapse in Patients with Acute Myeloid Leukemia Who Survived to Day 100 after Transplantation: The Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation Transplantation-related Complication Working Group.* *Biol Blood Marrow Transplant*, 2015. **21**(11): p. 2008-16.
111. Green, M.L., et al., *CMV reactivation after allogeneic HCT and relapse risk: evidence for early protection in acute myeloid leukemia.* *Blood*, 2013. **122**(7): p. 1316-24.
112. Nakamura, R., et al., *Influence of donor KIR genotypes on reduced relapse risk in acute myelogenous leukemia after hematopoietic stem cell transplantation in patients with CMV reactivation.* *Leuk Res*, 2019. **87**: p. 106230.

113. Peric, Z., et al., *Early human cytomegalovirus reactivation is associated with lower incidence of relapse of myeloproliferative disorders after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Bone Marrow Transplant, 2018. **53**(11): p. 1450-1456.
114. Elmaagacli, A.H., et al., *Early human cytomegalovirus replication after transplantation is associated with a decreased relapse risk: evidence for a putative virus-versus-leukemia effect in acute myeloid leukemia patients*. Blood, 2011. **118**(5): p. 1402-12.
115. Schirmacher, V., *From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review)*. Int J Oncol, 2019. **54**(2): p. 407-419.
116. Sever, R. and J.S. Brugge, *Signal transduction in cancer*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2015. **5**(4).
117. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
118. Chen, D.S. and I. Mellman, *Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle*. Immunity, 2013. **39**(1): p. 1-10.
119. Feola, S., et al., *Uncovering the Tumor Antigen Landscape: What to Know about the Discovery Process*. Cancers (Basel), 2020. **12**(6).
120. Annibaldi, O., et al., *PD-1 /PD-L1 checkpoint in hematological malignancies*. Leukemia Research, 2018. **67**: p. 45-55.
121. Wu, P., et al., *PD-L1 and Survival in Solid Tumors: A Meta-Analysis*. PLoS One, 2015. **10**(6): p. e0131403.
122. Thommen, D.S. and T.N. Schumacher, *T Cell Dysfunction in Cancer*. Cancer Cell, 2018. **33**(4): p. 547-562.
123. Farhood, B., M. Najafi, and K. Mortezaee, *CD8+ cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review*. Journal of Cellular Physiology, 2019. **234**(6): p. 8509-8521.
124. Blank, C.U., et al., *Defining 'T cell exhaustion'*. Nat Rev Immunol, 2019. **19**(11): p. 665-674.
125. Day, C.L., et al., *PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression*. Nature, 2006. **443**(7109): p. 350-4.
126. Jones, R.B., et al., *Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection*. J Exp Med, 2008. **205**(12): p. 2763-79.
127. Kaufmann, D.E., et al., *Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction*. Nat Immunol, 2007. **8**(11): p. 1246-54.
128. Nakamoto, N., et al., *Synergistic reversal of intrahepatic HCV-specific CD8 T cell exhaustion by combined PD-1/CTLA-4 blockade*. PLoS Pathog, 2009. **5**(2): p. e1000313.
129. Golden-Mason, L., 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*. J Virol, 2009. **83**(18): p. 9122-30.
130. Das, S., et al., *Expression of B7-H1 on gastric epithelial cells: its potential role in regulating T cells during Helicobacter pylori infection*. J Immunol, 2006. **176**(5): p. 3000-9.
131. Jayaraman, P., et al., *TIM3 Mediates T Cell Exhaustion during Mycobacterium tuberculosis Infection*. PLoS Pathog, 2016. **12**(3): p. e1005490.

132. Jurado, J.O., et al., *Programmed death (PD)-1:PD-ligand 1/PD-ligand 2 pathway inhibits T cell effector functions during human tuberculosis*. J Immunol, 2008. **181**(1): p. 116-25.
133. Tomazin, R., et al., *Cytomegalovirus US2 destroys two components of the MHC class II pathway, preventing recognition by CD4+ T cells*. Nat Med, 1999. **5**(9): p. 1039-43.
134. Wiertz, E.J., et al., *Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction*. Nature, 1996. **384**(6608): p. 432-8.
135. Jun, Y., et al., *Human cytomegalovirus gene products US3 and US6 down-regulate trophoblast class I MHC molecules*. J Immunol, 2000. **164**(2): p. 805-11.
136. Wiertz, E.J., et al., *The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol*. Cell, 1996. **84**(5): p. 769-79.
137. Tomasec, P., et al., *Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40*. Science, 2000. **287**(5455): p. 1031.
138. Falk, C.S., et al., *NK cell activity during human cytomegalovirus infection is dominated by US2-11-mediated HLA class I down-regulation*. J Immunol, 2002. **169**(6): p. 3257-66.
139. Buchbinder, E.I. and A. Desai, *CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition*. Am J Clin Oncol, 2016. **39**(1): p. 98-106.
140. Chikuma, S., *CTLA-4, an Essential Immune-Checkpoint for T-Cell Activation*. Curr Top Microbiol Immunol, 2017. **410**: p. 99-126.
141. Menter, T., et al., *Evaluation of the diagnostic and prognostic value of PDL1 expression in Hodgkin and B-cell lymphomas*. Hum Pathol, 2016. **54**: p. 17-24.
142. Liu, J., et al., *Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN- γ and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway*. Blood, 2007. **110**(1): p. 296-304.
143. Huang, W., et al., *Prognostic and clinicopathological value of PD-L1 expression in primary breast cancer: a meta-analysis*. Breast Cancer Res Treat, 2019. **178**(1): p. 17-33.
144. Hoos, A., *Development of immuno-oncology drugs — from CTLA4 to PD1 to the next generations*. Nature Reviews Drug Discovery, 2016. **15**(4): p. 235-247.
145. Xu, C., et al., *Comparative safety of immune checkpoint inhibitors in cancer: systematic review and network meta-analysis*. BMJ, 2018. **363**: p. k4226.
146. Robert, C., et al., *Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation*. N Engl J Med, 2015. **372**(4): p. 320-30.
147. Robert, C., et al., *Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma (KEYNOTE-006): post-hoc 5-year results from an open-label, multicentre, randomised, controlled, phase 3 study*. Lancet Oncol, 2019. **20**(9): p. 1239-1251.
148. Herbst, R.S., et al., *Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial*. Lancet, 2016. **387**(10027): p. 1540-1550.
149. Hodi, F.S., et al., *Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma*. N Engl J Med, 2010. **363**(8): p. 711-23.

150. Hodi, F.S., et al., *Nivolumab plus ipilimumab or nivolumab alone versus ipilimumab alone in advanced melanoma (CheckMate 067): 4-year outcomes of a multicentre, randomised, phase 3 trial*. *Lancet Oncol*, 2018. **19**(11): p. 1480-1492.
151. Andre, P., et al., *Anti-NKG2A mAb Is a Checkpoint Inhibitor that Promotes Anti-tumor Immunity by Unleashing Both T and NK Cells*. *Cell*, 2018. **175**(7): p. 1731-1743 e13.
152. Daste, A., et al., *Immune checkpoint inhibitors and elderly people: A review*. *Eur J Cancer*, 2017. **82**: p. 155-166.
153. Alkharabsheh, O., et al., *An overview of the toxicities of checkpoint inhibitors in older patients with cancer*. *J Geriatr Oncol*, 2018. **9**(5): p. 451-458.
154. Schnorfeil, F.M., et al., *T cells are functionally not impaired in AML: increased PD-1 expression is only seen at time of relapse and correlates with a shift towards the memory T cell compartment*. *J Hematol Oncol*, 2015. **8**: p. 93.
155. Li, C., et al., *Tim-3 is highly expressed in T cells in acute myeloid leukemia and associated with clinicopathological prognostic stratification*. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014. **7**(10): p. 6880-8.
156. Kong, Y., et al., *PD-1(hi)TIM-3(+) T cells associate with and predict leukemia relapse in AML patients post allogeneic stem cell transplantation*. *Blood Cancer J*, 2015. **5**: p. e330.
157. Jia, B., et al., *Bone marrow CD8 T cells express high frequency of PD-1 and exhibit reduced anti-leukemia response in newly diagnosed AML patients*. *Blood Cancer J*, 2018. **8**(3): p. 34.
158. Williams, P., et al., *The distribution of T-cell subsets and the expression of immune checkpoint receptors and ligands in patients with newly diagnosed and relapsed acute myeloid leukemia*. *Cancer*, 2019. **125**(9): p. 1470-1481.
159. Zhou, Q., et al., *Coexpression of Tim-3 and PD-1 identifies a CD8+ T-cell exhaustion phenotype in mice with disseminated acute myelogenous leukemia*. *Blood*, 2011. **117**(17): p. 4501-10.
160. Liu, Y., et al., *Immunotherapy in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes: The dawn of a new era?* *Blood Rev*, 2019. **34**: p. 67-83.
161. Daver, N., et al., *Hypomethylating agents in combination with immune checkpoint inhibitors in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes*. *Leukemia*, 2018. **32**(5): p. 1094-1105.
162. Boddu, P., et al., *The emerging role of immune checkpoint based approaches in AML and MDS*. *Leuk Lymphoma*, 2018. **59**(4): p. 790-802.
163. Yang, H., et al., *Expression of PD-L1, PD-L2, PD-1 and CTLA4 in myelodysplastic syndromes is enhanced by treatment with hypomethylating agents*. *Leukemia*, 2014. **28**(6): p. 1280-8.
164. Liu, H., et al., *Epigenetic treatment-mediated modulation of PD-L1 predicts potential therapy resistance over response markers in myeloid malignancies: A molecular mechanism involving effectors of PD-L1 reverse signaling*. *Oncol Lett*, 2019. **17**(2): p. 2543-2550.
165. Orskov, A.D., et al., *Hypomethylation and up-regulation of PD-1 in T cells by azacytidine in MDS/AML patients: A rationale for combined targeting of PD-1 and DNA methylation*. *Oncotarget*, 2015. **6**(11): p. 9612-26.
166. Garcia-Manero, G., et al., *A Phase II Study Evaluating the Combination of Nivolumab (Nivo) or Ipilimumab (Ipi) with Azacitidine in Pts with Previously Treated or Untreated Myelodysplastic Syndromes (MDS)*. *Blood*, 2016. **128**(22): p. 344-344.
167. Benedict, C.A., et al., *Dendritic Cell Programming by Cytomegalovirus Stunts Naive T Cell Responses via the PD-L1/PD-1 Pathway*. *The Journal of Immunology*, 2008. **180**(7): p. 4836.

168. Ziegler-Heitbrock, H.W., et al., *Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes*. *Int J Cancer*, 1988. **41**(3): p. 456-61.
169. Dalton, W.T., Jr., et al., *HL-60 cell line was derived from a patient with FAB-M2 and not FAB-M3*. *Blood*, 1988. **71**(1): p. 242-7.
170. Tsuchiya, S., et al., *Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)*. *Int J Cancer*, 1980. **26**(2): p. 171-6.
171. Lozzio, C.B. and B.B. Lozzio, *Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome*. *Blood*, 1975. **45**(3): p. 321-34.
172. Lozzio, B.B. and C.B. Lozzio, *Properties and usefulness of the original K-562 human myelogenous leukemia cell line*. *Leuk Res*, 1979. **3**(6): p. 363-70.
173. Sinzger, C., et al., *Cloning and sequencing of a highly productive, endotheliotropic virus strain derived from human cytomegalovirus TB40/E*. *J Gen Virol*, 2008. **89**(Pt 2): p. 359-368.
174. Eden, E., et al., *GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists*. *BMC Bioinformatics*, 2009. **10**: p. 48.
175. Eden, E., et al., *Discovering motifs in ranked lists of DNA sequences*. *PLoS Comput Biol*, 2007. **3**(3): p. e39.
176. Raudvere, U., et al., *g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update)*. *Nucleic Acids Res*, 2019. **47**(W1): p. W191-W198.
177. Supek, F., et al., *REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms*. *PLoS One*, 2011. **6**(7): p. e21800.
178. Boyum, A., *Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g*. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 1968. **97**: p. 77-89.
179. Liu, P., et al., *Recent Advances in Computer-Assisted Algorithms for Cell Subtype Identification of Cytometry Data*. *Front Cell Dev Biol*, 2020. **8**: p. 234.
180. Davies, O.G., et al., *The effects of cryopreservation on cells isolated from adipose, bone marrow and dental pulp tissues*. *Cryobiology*, 2014. **69**(2): p. 342-7.
181. Liang, W., et al., *Cryopreservation-Altered Expression of RNA and Protein Markers in Biological Specimens*. *Biopreserv Biobank*, 2017. **15**(3): p. 176-181.
182. Lapidot, T., et al., *A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice*. *Nature*, 1994. **367**(6464): p. 645-8.
183. Li, L.J., et al., *Increased CD34+CD38-CD123+ cells in myelodysplastic syndrome displaying malignant features similar to those in AML*. *International Journal of Hematology*, 2014. **100**(1): p. 60-69.
184. Dail, M., et al., *Distinct Patterns of PD-L1 and PD-L2 Expression By Tumor and Non-Tumor Cells in Patients with MM, MDS and AML*. *Blood*, 2016. **128**(22): p. 1340-1340.
185. Jang, J.E., et al., *Early CMV replication and subsequent chronic GVHD have a significant anti-leukemic effect after allogeneic HSCT in acute myeloid leukemia*. *Ann Hematol*, 2015. **94**(2): p. 275-82.
186. Lowdell, M.W., et al., *Evidence that continued remission in patients treated for acute leukaemia is dependent upon autologous natural killer cells*. *Br J Haematol*, 2002. **117**(4): p. 821-7.

187. Addison, E.G., et al., *Ligation of CD8alpha on human natural killer cells prevents activation-induced apoptosis and enhances cytolytic activity*. Immunology, 2005. **116**(3): p. 354-61.
188. Dienstbier, M.C., *Phänotypische und funktionelle Analyse von CD8pos natürlichen Killerzellen*. 2020, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: Düsseldorf.
189. Sylwester, A.W., et al., *Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects*. J Exp Med, 2005. **202**(5): p. 673-85.
190. Schroder, K., et al., *Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(2): p. 163-89.
191. Braud, V.M., et al., *TAP- and tapasin-dependent HLA-E surface expression correlates with the binding of an MHC class I leader peptide*. Curr Biol, 1998. **8**(1): p. 1-10.
192. Orange, J.S., et al., *Requirement for natural killer cell-produced interferon gamma in defense against murine cytomegalovirus infection and enhancement of this defense pathway by interleukin 12 administration*. J Exp Med, 1995. **182**(4): p. 1045-56.
193. van de Berg, P.J., et al., *Human cytomegalovirus induces systemic immune activation characterized by a type 1 cytokine signature*. J Infect Dis, 2010. **202**(5): p. 690-9.
194. Ossenkoppele, G.J., J.J. Janssen, and A.A. van de Loosdrecht, *Risk factors for relapse after allogeneic transplantation in acute myeloid leukemia*. Haematologica, 2016. **101**(1): p. 20-5.
195. Kottaridis, P.D., R.E. Gale, and D.C. Linch, *Flt3 mutations and leukaemia*. Br J Haematol, 2003. **122**(4): p. 523-38.
196. Zemek, R.M., et al., *Sensitization to immune checkpoint blockade through activation of a STAT1/NK axis in the tumor microenvironment*. Sci Transl Med, 2019. **11**(501).
197. Epling-Burnette, P.K., et al., *Reduced natural killer (NK) function associated with high-risk myelodysplastic syndrome (MDS) and reduced expression of activating NK receptors*. Blood, 2007. **109**(11): p. 4816-4824.
198. Lion, E., et al., *Natural killer cell immune escape in acute myeloid leukemia*. Leukemia, 2012. **26**(9): p. 2019-26.
199. Montes, P., et al., *Tumor genetic alterations and features of the immune microenvironment drive myelodysplastic syndrome escape and progression*. Cancer Immunol Immunother, 2019. **68**(12): p. 2015-2027.
200. Borish, L.C. and J.W. Steinke, 2. *Cytokines and chemokines*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **111**(2 Suppl): p. S460-75.
201. Zeidan, A.M., et al., *A Randomized Phase 2 Trial of Azacitidine ± Durvalumab as First-line Therapy for Higher-Risk Myelodysplastic Syndromes*. Blood Advances, 2021: p. bloodadvances.2021005487.
202. Cancer Genome Atlas Research, N., et al., *Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia*. N Engl J Med, 2013. **368**(22): p. 2059-74.
203. Zajac, M., et al., *Expression of CD274 (PD-L1) is associated with unfavourable recurrent mutations in AML*. Br J Haematol, 2018. **183**(5): p. 822-825.
204. Schrock, A.B., et al., *Tumor mutational burden is predictive of response to immune checkpoint inhibitors in MSI-high metastatic colorectal cancer*. Ann Oncol, 2019.

205. Rizvi, N.A., et al., *Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer*. *Science*, 2015. **348**(6230): p. 124-8.
206. Hellmann, M.D., et al., *Tumor Mutational Burden and Efficacy of Nivolumab Monotherapy and in Combination with Ipilimumab in Small-Cell Lung Cancer*. *Cancer Cell*, 2018. **33**(5): p. 853-861 e4.
207. Van Allen, E.M., et al., *Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma*. *Science*, 2015. **350**(6257): p. 207-211.
208. Hodges, T.R., et al., *Mutational burden, immune checkpoint expression, and mismatch repair in glioma: implications for immune checkpoint immunotherapy*. *Neuro Oncol*, 2017. **19**(8): p. 1047-1057.
209. Yu, H., et al., *Correlation of PD-L1 Expression with Tumor Mutation Burden and Gene Signatures for Prognosis in Early-Stage Squamous Cell Lung Carcinoma*. *J Thorac Oncol*, 2019. **14**(1): p. 25-36.
210. Lacombe, F., et al., *New Concepts of Flow Cytometry Analysis in Oncohematology: Application to Diagnosis and Follow up (Minimal Residual Disease) in AML, ALL and MDS*. *Blood*, 2017. **130**(Supplement 1): p. 1421-1421.
211. Amir el, A.D., et al., *viSNE enables visualization of high dimensional single-cell data and reveals phenotypic heterogeneity of leukemia*. *Nat Biotechnol*, 2013. **31**(6): p. 545-52.
212. Renner, A., M. Burotto, and C. Rojas, *Immune Checkpoint Inhibitor Dosing: Can We Go Lower Without Compromising Clinical Efficacy?* *J Glob Oncol*, 2019. **5**: p. 1-5.
213. Michot, J.M., et al., *Haematological immune-related adverse events with immune checkpoint inhibitors, how to manage?* *Eur J Cancer*, 2019. **122**: p. 72-90.
214. Calvo, R., *Hematological Side Effects of Immune Checkpoint Inhibitors: The Example of Immune-Related Thrombocytopenia*. *Front Pharmacol*, 2019. **10**: p. 454.
215. Bajwa, R., et al., *Adverse Effects of Immune Checkpoint Inhibitors (Programmed Death-1 Inhibitors and Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein-4 Inhibitors): Results of a Retrospective Study*. *J Clin Med Res*, 2019. **11**(4): p. 225-236.
216. Hamilton, G. and B. Rath, *Avelumab: combining immune checkpoint inhibition and antibody-dependent cytotoxicity*. *Expert Opin Biol Ther*, 2017. **17**(4): p. 515-523.
217. Gu, W., et al., *Undo the brake of tumour immune tolerance with antibodies, peptide mimetics and small molecule compounds targeting PD-1/PD-L1 checkpoint at different locations for acceleration of cytotoxic immunity to cancer cells*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2019. **46**(2): p. 105-115.
218. Li, C., et al., *Peptide Blocking of PD-1/PD-L1 Interaction for Cancer Immunotherapy*. *Cancer Immunol Res*, 2018. **6**(2): p. 178-188.
219. Skalniak, L., et al., *Small-molecule inhibitors of PD-1/PD-L1 immune checkpoint alleviate the PD-L1-induced exhaustion of T-cells*. *Oncotarget*, 2017. **8**(42): p. 72167-72181.
220. Cheng, P., et al., *S100A9-induced overexpression of PD-1/PD-L1 contributes to ineffective hematopoiesis in myelodysplastic syndromes*. *Leukemia*, 2019.
221. Zhu, L., et al., *Blimp-1 impairs T cell function via upregulation of TIGIT and PD-1 in patients with acute myeloid leukemia*. *J Hematol Oncol*, 2017. **10**(1): p. 124.
222. Wang, X., et al., *Tumor suppressor miR-34a targets PD-L1 and functions as a potential immunotherapeutic target in acute myeloid leukemia*. *Cell Signal*, 2015. **27**(3): p. 443-52.

223. Anastasiadou, E., et al., *Epstein-Barr virus-encoded EBNA2 alters immune checkpoint PD-L1 expression by downregulating miR-34a in B-cell lymphomas*. *Leukemia*, 2019. **33**(1): p. 132-147.
224. Meijer, E., et al., *Active Epstein-Barr virus infection after allogeneic stem cell transplantation: re-infection or reactivation?* *Transpl Infect Dis*, 2005. **7**(1): p. 4-10.
225. Lee, N.K., et al., *Impact of the conjugation of antibodies to the surfaces of polymer nanoparticles on the immune cell targeting abilities*. *Nano Convergence*, 2021. **8**(1): p. 24.
226. Yokoyama, H., et al., *Favorable Effect of Cytomegalovirus Reactivation on Outcomes in Cord Blood Transplant and Its Differences Among Disease Risk or Type*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2020. **26**(7): p. 1363-1370.
227. Ramanathan, M., et al., *Impact of early CMV reactivation in cord blood stem cell recipients in the current era*. *Bone Marrow Transplant*, 2016. **51**(8): p. 1113-20.
228. Vaezi, M., et al., *How Do Donor-Recipient CMV Serostatus and Post-Hematopoietic Stem Cell Transplantation CMV Reactivation Affect Outcomes in Acute Leukemia Patients?* *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res*, 2017. **11**(3): p. 199-208.
229. Manjappa, S., et al., *Protective effect of cytomegalovirus reactivation on relapse after allogeneic hematopoietic cell transplantation in acute myeloid leukemia patients is influenced by conditioning regimen*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2014. **20**(1): p. 46-52.
230. Busca, A., et al., *The use of ATG abrogates the antileukemic effect of cytomegalovirus reactivation in patients with acute myeloid leukemia receiving grafts from unrelated donors*. *Am J Hematol*, 2015. **90**(6): p. E117-21.
231. Cantoni, N., et al., *Evidence for a bidirectional relationship between cytomegalovirus replication and acute graft-versus-host disease*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2010. **16**(9): p. 1309-14.
232. Warlick, E.D., et al., *Reduced-Intensity Conditioning Followed by Related and Unrelated Allografts for Hematologic Malignancies: Expanded Analysis and Long-Term Follow-Up*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2019. **25**(1): p. 56-62.
233. Foley, B., et al., *Cytomegalovirus reactivation after allogeneic transplantation promotes a lasting increase in educated NKG2C⁺ natural killer cells with potent function*. *Blood*, 2012. **119**(11): p. 2665-74.
234. Ogonek, J., et al., *Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation*. *Front Immunol*, 2016. **7**: p. 507.
235. Talekar, M.K. and T. Olson, *Immune Reconstitution After Hematopoietic Stem Cell Transplantation*, in *Hematopoietic Stem Cell Transplantation for the Pediatric Hematologist/Oncologist*, V.I. Brown, Editor. 2018, Springer International Publishing: Cham. p. 371-383.
236. Ahmad, F., et al., *High frequencies of polyfunctional CD8⁺ NK cells in chronic HIV-1 infection are associated with slower disease progression*. *J Virol*, 2014. **88**(21): p. 12397-408.
237. Kotenko, S.V., et al., *Interaction between the components of the interferon gamma receptor complex*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(36): p. 20915-21.
238. Barclay, A.N. and T.K. Van den Berg, *The interaction between signal regulatory protein alpha (SIRP α) and CD47: structure, function, and therapeutic target*. *Annu Rev Immunol*, 2014. **32**: p. 25-50.

239. Trauth, B.C., et al., *Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis*. Science, 1989. **245**(4915): p. 301-5.
240. Newman, P.J., *Switched at birth: a new family for PECAM-1*. The Journal of clinical investigation, 1999. **103**(1): p. 5-9.
241. Paczulla, A.M., et al., *Absence of NKG2D ligands defines leukaemia stem cells and mediates their immune evasion*. Nature, 2019. **572**(7768): p. 254-259.
242. Burger, J.A. and A. Burkle, *The CXCR4 chemokine receptor in acute and chronic leukaemia: a marrow homing receptor and potential therapeutic target*. Br J Haematol, 2007. **137**(4): p. 288-96.
243. Levy, E., et al., *Enhanced Bone Marrow Homing of Natural Killer Cells Following mRNA Transfection With Gain-of-Function Variant CXCR4(R334X)*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 1262.
244. Renard, V., et al., *CD8 beta increases CD8 coreceptor function and participation in TCR-ligand binding*. The Journal of experimental medicine, 1996. **184**(6): p. 2439-2444.
245. Gao, G.F., et al., *Crystal structure of the complex between human CD8 $\alpha\alpha$ and HLA-A2*. Nature, 1997. **387**(6633): p. 630-634.
246. Cheroutre, H. and F. Lambolez, *Doubting the TCR coreceptor function of CD8 $\alpha\alpha$* . Immunity, 2008. **28**(2): p. 149-59.
247. Fredriksson, S., et al., *Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays*. Nat Biotechnol, 2002. **20**(5): p. 473-7.
248. Nicoll, G., et al., *Ganglioside GD3 expression on target cells can modulate NK cell cytotoxicity via siglec-7-dependent and -independent mechanisms*. Eur J Immunol, 2003. **33**(6): p. 1642-8.
249. Razi, N. and A. Varki, *Cryptic sialic acid binding lectins on human blood leukocytes can be unmasked by sialidase treatment or cellular activation*. Glycobiology, 1999. **9**(11): p. 1225-34.
250. Varki, A., *Since there are PAMPs and DAMPs, there must be SAMPs? Glycan "self-associated molecular patterns" dampen innate immunity, but pathogens can mimic them*. Glycobiology, 2011. **21**(9): p. 1121-1124.
251. Varchetta, S., et al., *Lack of Siglec-7 expression identifies a dysfunctional natural killer cell subset associated with liver inflammation and fibrosis in chronic HCV infection*. Gut, 2016. **65**(12): p. 1998-2006.
252. Brunetta, E., et al., *The decreased expression of Siglec-7 represents an early marker of dysfunctional natural killer-cell subsets associated with high levels of HIV-1 viremia*. Blood, 2009. **114**(18): p. 3822-30.
253. Jandus, C., et al., *Interactions between Siglec-7/9 receptors and ligands influence NK cell-dependent tumor immunosurveillance*. J Clin Invest, 2014. **124**(4): p. 1810-20.
254. Hudak, J.E., S.M. Canham, and C.R. Bertozzi, *Glycocalyx engineering reveals a Siglec-based mechanism for NK cell immunoevasion*. Nature chemical biology, 2014. **10**(1): p. 69-75.
255. Kawasaki, Y., et al., *Ganglioside DSGb5, preferred ligand for Siglec-7, inhibits NK cell cytotoxicity against renal cell carcinoma cells*. Glycobiology, 2010. **20**(11): p. 1373-9.
256. Yoshimura, A., et al., *Identification and functional characterization of a Siglec-7 counter-receptor on K562 cells*. Journal of Biological Chemistry, 2021. **296**: p. 100477.
257. Aguado, E., et al., *Functional expression of CD43 on human natural killer cells*. J Leukoc Biol, 1999. **66**(6): p. 923-9.

258. Rabuka, D., et al., *Noncovalent cell surface engineering: incorporation of bioactive synthetic glycopolymers into cellular membranes*. Journal of the American Chemical Society, 2008. **130**(18): p. 5947-5953.
259. Xiao, H., et al., *Precision glycocalyx editing as a strategy for cancer immunotherapy*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2016. **113**(37): p. 10304-10309.
260. Prescher, H., et al., *Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Small, High-Affinity Siglec-7 Ligands: Toward Novel Inhibitors of Cancer Immune Evasion*. J Med Chem, 2017. **60**(3): p. 941-956.
261. Beck, S. and B.G. Barrell, *Human cytomegalovirus encodes a glycoprotein homologous to MHC class-I antigens*. Nature, 1988. **331**(6153): p. 269-72.
262. Villatoro, A., et al., *Leukemia Stem Cell Release From the Stem Cell Niche to Treat Acute Myeloid Leukemia*. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2020. **8**(607).
263. Schepers, K., T.B. Campbell, and E. Passegue, *Normal and leukemic stem cell niches: insights and therapeutic opportunities*. Cell Stem Cell, 2015. **16**(3): p. 254-67.
264. Hejazi, M., et al., *Impaired cytotoxicity associated with defective natural killer cell differentiation in myelodysplastic syndromes*. Haematologica, 2015. **100**(5): p. 643-52.
265. Nguyen, S., et al., *HLA-E upregulation on IFN-gamma-activated AML blasts impairs CD94/NKG2A-dependent NK cytotoxicity after haplo-mismatched hematopoietic SCT*. Bone Marrow Transplant, 2009. **43**(9): p. 693-9.
266. Bigley, A.B., et al., *Latent cytomegalovirus infection enhances anti-tumour cytotoxicity through accumulation of NKG2C+ NK cells in healthy humans*. Clin Exp Immunol, 2016. **185**(2): p. 239-51.
267. Almosailleakh, M. and J. Schwaller, *Murine Models of Acute Myeloid Leukaemia*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(2).
268. Choi, Y., et al., *Studying cancer immunotherapy using patient-derived xenografts (PDXs) in humanized mice*. Experimental & Molecular Medicine, 2018. **50**(8): p. 1-9.
269. Saito, Y., L.D. Shultz, and F. Ishikawa, *Understanding Normal and Malignant Human Hematopoiesis Using Next-Generation Humanized Mice*. Trends in immunology, 2020. **41**(8): p. 706-720.
270. Kamiya, T., et al., *Blocking expression of inhibitory receptor NKG2A overcomes tumor resistance to NK cells*. J Clin Invest, 2019. **129**(5): p. 2094-2106.
271. Keskinen, P., et al., *Regulation of HLA class I and II expression by interferons and influenza A virus in human peripheral blood mononuclear cells*. Immunology, 1997. **91**(3): p. 421-429.
272. Ruggeri, L., et al., *Allogeneic hematopoietic transplantation and natural killer cell recognition of missing self*. Immunol Rev, 2006. **214**: p. 202-18.
273. Cooley, S., et al., *Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia*. Blood, 2009. **113**(3): p. 726-32.
274. Heatley, S.L., et al., *Activating KIR Haplotype Influences Clinical Outcome Following HLA-Matched Sibling Hematopoietic Stem Cell Transplantation*. HLA, 2018.
275. An, K., et al., *The impact of donor full-length KIR2DS4 in the development of acute and chronic GVHD after unrelated allogeneic HSCT*. Pediatr Transplant, 2020. **24**(6): p. e13728.

276. Ambrosini, P., et al., *IL-1 β inhibits ILC3 while favoring NK-cell maturation of umbilical cord blood CD34+ precursors*. European Journal of Immunology, 2015. **45**(7): p. 2061-2071.
277. Mattiola, I., et al., *Priming of Human Resting NK Cells by Autologous M1 Macrophages via the Engagement of IL-1 β , IFN- β , and IL-15 Pathways*. J Immunol, 2015. **195**(6): p. 2818-28.
278. Carey, A., et al., *Identification of Interleukin-1 by Functional Screening as a Key Mediator of Cellular Expansion and Disease Progression in Acute Myeloid Leukemia*. Cell reports, 2017. **18**(13): p. 3204-3218.
279. Ersvaer, E., et al., *Effects of interferon gamma on native human acute myelogenous leukaemia cells*. Cancer Immunol Immunother, 2007. **56**(1): p. 13-24.
280. Legdeur, M.C.J.C., et al., *Monocyte-chemoattractant-protein-1-mediated migration of human monocytes towards blasts from patients with acute myeloid leukemia*. Cancer Immunology, Immunotherapy, 2001. **50**(1): p. 16-22.
281. Taub, D.D., et al., *Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), -2, and -3 are chemotactic for human T lymphocytes*. The Journal of clinical investigation, 1995. **95**(3): p. 1370-1376.
282. Taub, D.D., et al., *Alpha and beta chemokines induce NK cell migration and enhance NK-mediated cytotoxicity*. The Journal of Immunology, 1995. **155**(8): p. 3877-3888.
283. Macanas-Pirard, P., et al., *The CCL2/CCR2 Axis Affects Transmigration and Proliferation but Not Resistance to Chemotherapy of Acute Myeloid Leukemia Cells*. PloS one, 2017. **12**(1): p. e0168888-e0168888.
284. Ueno, T., et al., *Significance of Macrophage Chemoattractant Protein-1 in Macrophage Recruitment, Angiogenesis, and Survival in Human Breast Cancer*. Clinical Cancer Research, 2000. **6**(8): p. 3282-3289.
285. Murayama, T., et al., *The immediate early gene 1 product of human cytomegalovirus is sufficient for up-regulation of interleukin-8 gene expression*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **279**(1): p. 298-304.
286. Iwamoto, G.K. and S.A. Konicek, *Cytomegalovirus immediate early genes upregulate interleukin-6 gene expression*. J Investig Med, 1997. **45**(4): p. 175-82.
287. Murayama, T., et al., *Human cytomegalovirus induces interleukin-8 production by a human monocytic cell line, THP-1, through acting concurrently on AP-1- and NF-kappaB-binding sites of the interleukin-8 gene*. J Virol, 1997. **71**(7): p. 5692-5.
288. Tanaka, T., M. Narazaki, and T. Kishimoto, *IL-6 in inflammation, immunity, and disease*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2014. **6**(10): p. a016295-a016295.
289. Baggiolini, M. and I. Clark-Lewis, *Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine*. FEBS Lett, 1992. **307**(1): p. 97-101.
290. Khabar, K.S., et al., *The alpha chemokine, interleukin 8, inhibits the antiviral action of interferon alpha*. The Journal of experimental medicine, 1997. **186**(7): p. 1077-1085.
291. Murayama, T., et al., *Enhancement human cytomegalovirus replication in a human lung fibroblast cell line by interleukin-8*. J Virol, 1994. **68**(11): p. 7582-5.
292. Wu, J., et al., *IL-6 and IL-8 secreted by tumour cells impair the function of NK cells via the STAT3 pathway in oesophageal squamous cell carcinoma*. Journal of experimental & clinical cancer research : CR, 2019. **38**(1): p. 321-321.

293. Elbaz, O. and L.A. Mahmoud, *Tumor necrosis factor and human acute leukemia*. Leuk Lymphoma, 1994. **12**(3-4): p. 191-5.
294. Weaver, C.T., et al., *Th17: An Effector CD4 T Cell Lineage with Regulatory T Cell Ties*. Immunity, 2006. **24**(6): p. 677-688.
295. Lam, S., et al., *High dose valaciclovir to prevent cytomegalovirus infection in allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients*. Transpl Infect Dis, 2021. **23**(4): p. e13633.
296. Daver, N., et al., *Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence*. Leukemia, 2019. **33**(2): p. 299-312.
297. Astier, A.L., et al., *RNA interference screen in primary human T cells reveals FLT3 as a modulator of IL-10 levels*. J Immunol, 2010. **184**(2): p. 685-93.
298. Al-Harbi, S., et al., *An update on the molecular pathogenesis and potential therapeutic targeting of AML with t(8;21)(q22;q22.1);RUNX1-RUNX1T1*. Blood Advances, 2020. **4**(1): p. 229-238.
299. Bellissimo, D.C. and N.A. Speck, *RUNX1 Mutations in Inherited and Sporadic Leukemia*. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2017. **5**.
300. Greif, P.A., et al., *RUNX1 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia are associated with a poor prognosis and up-regulation of lymphoid genes*. Haematologica, 2012. **97**(12): p. 1909-15.
301. Luo, M.-C., et al., *Runt-related Transcription Factor 1 (RUNX1) Binds to p50 in Macrophages and Enhances TLR4-triggered Inflammation and Septic Shock*. Journal of Biological Chemistry, 2016. **291**(42): p. 22011-22020.
302. Safran, M.R., Naomi; Twik, Michal; BarShir, Ruth; Iny Stein, Tsippi; Dahary, Dvir; Fishilevich, Simon; Lancet, Doron, *GeneCard - the human gene database*.
303. Hengel, H., et al., *Restoration of cytomegalovirus antigen presentation by gamma interferon combats viral escape*. J Virol, 1994. **68**(1): p. 289-97.
304. Elder, E., et al., *Monocytes Latently Infected with Human Cytomegalovirus Evade Neutrophil Killing*. iScience, 2019. **12**: p. 13-26.
305. Wang, M., et al., *The Role of Cytokines in Predicting the Response and Adverse Events Related to Immune Checkpoint Inhibitors*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 670391.