



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Innate immune responses of natural killer cells and macrophages against bone sarcomas : towards cellular immunotherapy**

Pahl, J.H.W.

### **Citation**

Pahl, J. H. W. (2014, January 9). *Innate immune responses of natural killer cells and macrophages against bone sarcomas : towards cellular immunotherapy*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/22975>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/22975>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/22975> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Pahl, Jens Heinz-Werner

**Title:** Innate immune responses of natural killer cells and macrophages against bone sarcomas : towards cellular immunotherapy

**Issue Date:** 2014-01-09

## ZUSAMMENFASSUNG DIESER DISSERTATION

### Einleitung

Das Osteosarkom und das Ewing-Sarkom sind Knochenkrebsarten, die am häufigsten bei Kindern und jungen Erwachsenen auftreten. Trotz fortschrittlicher Operationstechniken zur Entfernung von primärem Tumorgewebe und Tumormetastasen, sowie eines breiten Spektrums an chemotherapeutischen Substanzen bricht die Krebserkrankung bei einem Drittel der Patienten nach vielversprechender erster Behandlung erneut aus, was eine deutliche Verschlechterung der weiteren Prognose dieser Patienten nach sich zieht. Gleichmaßen ist die Lebenserwartung von Patienten, die bereits in einem frühen Stadium Tumormetastasen oder Therapie-resistente Tumore aufweisen, sehr eingeschränkt. Um die Perspektive dieser Patienten zu verbessern, werden daher neue Therapiemethoden benötigt, die Krebszellen gezielt angreifen, dabei jedoch gesundes Gewebe möglichst wenig beeinträchtigen.

In früheren Forschungsansätzen wurde gezeigt, dass Natürliche-Killerzellen (NK-Zellen) und Makrophagen, beides Zelltypen des sogenannten angeborenen Immunsystems, anti-Tumor-Aktivität gegenüber Sarkomzellen besitzen bzw. begünstigen. NK-Zellen sind in der Lage infizierte Zellen sowie Krebszellen zu lysieren und können Immunantworten des erworbenen Immunsystems unterstützen und modulieren. NK-Zellen erkennen Zielzellen, die im Vergleich zu gesunden Körperzellen meist eine verminderte Anzahl an deaktivierenden MHC-Klasse-I-Molekülen und zudem eine erhöhte Anzahl an aktivierenden Signalmolekülen exprimieren: dies trifft vor allem auf gestresste und transformierte Zellen zu. Daher können NK-Zellen auch die Tumorzellen bekämpfen, die sich der Kontrolle des erworbenen Immunsystems und somit T-Lymphozyten entziehen. Der Einsatz von NK-Zellen für immuntherapeutische Ansätze ist auch deshalb vielversprechend, da NK-Zellen keine gefährlichen Nebenwirkungen wie Graft-versus-Host Reaktionen hervorrufen, wenn NK-Zellen zu therapeutischen Zwecken in Patienten infundiert werden.

Es wird angenommen, dass im Laufe der Krebsentstehung, unter dem Selektionsdruck des Immunsystems, Tumorzellvarianten hervorgebracht werden, die in der Lage sind anti-Tumor-Immunantworten zu unterlaufen oder auch entgegenzuwirken. Dieser Prozess wird durch die immununterdrückenden Eigenschaften der Tumorzellen selbst aber auch durch das umliegende Gewebe der Tumorumgebung begünstigt, wodurch Immunantworten gegenüber Krebszellen gehemmt werden. Um folglich NK-Zellen und Makrophagen für immuntherapeutische Ansätze zu verwenden, muss das anti-Tumor-Potential dieser Immunzellen derart verstärkt werden, dass dieses in der Tumorumgebung nicht mehr gehemmt wird.

Im **einleitenden Kapitel 1** dieser Dissertation werden die klinischen und biologischen Eigenschaften des Osteosarkoms und Ewing-Sarkoms vorgestellt. Auf diesen Abschnitt folgt ein Überblick über das Feld der Tumorummunologie sowie verschiedener Immuntherapien. Die vorklinischen Forschungsergebnisse dieser Arbeit werden in den **Kapiteln 2–6** beschrieben und im **abschließenden Kapitel 7** übergreifend zusammengefasst; Schlussfolgerungen und Implikationen für die Verwendung von NK-Zellen und Makrophagen für Immuntherapien werden diskutiert.

## Ergebnisse

In **Kapitel 2** wird ein experimentelles Modell zum Messen der Aktivität von NK-Zellen als Antwort auf eine Virusinfektion durch den Adenovirus Subtyp 5 (HAdV5) und HAdV35 aufgestellt. Die Ergebnisse dieser Experimenten zeigen, dass eine Aktivierung von NK-Zellen durch Stimulierung mit HAdV5 – ermittelt anhand einer erhöhten Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf der Oberfläche von NK-Zellen als auch einer erhöhten zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen – nur in Gegenwart von T-Zellen und von dem durch T-Zellen produzierten Zytokin (Botenstoff) Interleukin-2 erfolgen konnte. Im Gegensatz hierzu konnten NK-Zellen durch HAdV35 ohne den Einfluss von T-Zellen aktiviert werden. Dies wurde durch die vermehrte Ausschüttung des Zytokins Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) durch Plasmazytoide Dendritische Zellen (pDC) vermittelt. Die vermehrte Ausschüttung von IFN- $\alpha$  durch mit HAdV35 infizierte pDC war abhängig von der Aktivierung des Toll-like Rezeptor-9 (Detektor für Virus-DNA) und wurde darüber hinaus durch die wechselseitige Interaktion zwischen NK-Zellen und pDC verstärkt.

In den folgenden Forschungsprojekten wird untersucht, auf welche Weise das anti-Tumor-Potential von NK-Zellen und auch Makrophagen gesteigert und zielgenauer auf Osteosarkom- und Ewing-Sarkomzellen gerichtet werden kann. In **Kapitel 3** wird gezeigt, dass die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen spezifischer auf Sarkomzelllinien gelenkt werden kann, wenn die Krebszellen mit bestimmten therapeutischen Antikörpern wie zum Beispiel Cetuximab bedeckt sind, welche in diesem Fall den Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGFR) auf der Oberfläche der Krebszellen binden. Cetuximab induziert die sogenannte Fc $\gamma$ RIII/CD16-vermittelte, Antikörper-abhängige Zytotoxizität von NK-Zellen. Dadurch wurde in Gegenwart von Cetuximab die Lyse von aus Osteosarkom-Patienten kultivierten Krebszellen durch autologe NK-Zellen vervielfacht: d.h. durch NK-Zellen, die ebenfalls aus diesen Patienten isoliert worden waren. Die durch Antikörper (Cetuximab) induzierte zytotoxische Aktivität der NK-Zellen war vergleichbar mit jener von IL-15-aktivierten NK-Zellen und war selbst bei geringer Expression von EGFR auf der Krebszelloberfläche wirkungsvoll. Diese Experimente legen dar, dass NK-Zellen in kurzzeitigen, vierstündigen Experimenten substantielle zytotoxische Aktivität gegenüber Osteosarkom- und Ewing-Sarkomzellen besitzen.

Wie jedoch in **Kapitel 4** veranschaulicht wird, sind längere, zwei Tage andauernde Interaktionen zwischen Sarkomzellen und NK-Zellen, wie sie potentiell eher den Bedingungen in der Tumorumgebung von Patienten entsprechen, in der Lage die Funktionalität von NK-Zellen zu beeinflussen. In diesem Abschnitt wird gezeigt, dass bestimmte Sarkomzelllinien nach Kultivierung mit NK-Zellen eine verminderte Expression von aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren wie z.B. von NKG2D, DNAM-1 und NKp30 bewirken können, und dies sogar wenn die NK-Zellen gleichzeitig mit dem aktivierenden Zytokin IL-15 behandelt wurden. Weiterhin wurde durch diesen negativen Effekt auch die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen und somit die Lyse von Sarkomzellen vermindert, da diese von der Funktionalität der oben genannten NK-Zellrezeptoren abhängt. Dieser hemmende Effekt beruhte auf dem physischen Kontakt zwischen Tumorzellen und NK-Zellen. Wenn die NK-Zellen allerdings vor der Interaktion mit Sarkomzellen über einen Zeitraum von fünf Tagen mit IL-15 aktiviert worden waren, wurden diese voraktivierten NK-Zellen nicht mehr durch die immununterdrückenden Eigenschaften der Sarkomzellen beeinträchtigt. Außerdem wurde die Fc $\gamma$ RIII/CD16-vermittelte, Antikörper (Cetuximab)-

abhängige Zytotoxizität von NK-Zellen durch die anhaltende Interaktion mit Sarkomzellen nicht gestört. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine Kombination von aktivierenden Zytokinen und therapeutischen Antikörpern die zytotoxische Kapazität von NK-Zellen aufrechterhalten und soweit verstärken könnte, dass NK-Zellen auch unter Einfluss von immununterdrückenden Faktoren in der Tumorumgebung die Eliminierung von Krebszellen unterstützen könnten.

Es ist bekannt, dass Makrophagen häufig solide Tumore infiltrieren. In einer früheren Studie an Osteosarkom-Patienten wurde festgestellt, dass Patienten mit einer höheren Anzahl an Makrophagen im Tumorgewebe eine bessere Prognose aufweisen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Makrophagen im Osteosarkom an anti-Tumor-Reaktionen beteiligt sind. In **Kapitel 5** wird dargestellt, dass humane M1-Typ Makrophagen in der Lage sind das Zellwachstum von Osteosarkomzellen zu hemmen, sofern diese Makrophagen zuvor mit bakteriellen Substanzen wie z.B. liposomalen Muramyltripeptiden (L-MTP-PE) aktiviert wurden. Die Induktion der anti-Tumor-Aktivität durch L-MTP-PE erforderte allerdings die gleichzeitige Zugabe von IFN- $\gamma$ , eine Beobachtung, die für die Optimierung der gegenwärtig angewendeten L-MTP-PE-Therapie bei Osteosarkom-Patienten relevant ist. Auch IL-10-polarisierte M2-Typ Makrophagen, welche die Entstehung und das Wachstum von Tumoren vermutlich begünstigen, konnten in die Lage versetzt werden, das Wachstum von Osteosarkomzellen zu hemmen, jedoch nur wenn die Krebszellen mit Antikörpern (Cetuximab) behandelt waren. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Tumor-infiltrierende Makrophagen möglicherweise auch in Patienten für anti-Tumor-Antworten mobilisiert werden könnten, durch Zugabe von Tumorzell-markierenden therapeutischen Antikörpern und/oder von aktivierenden Faktoren, die eine Infektion in der Tumorumgebung simulieren.

In **Kapitel 6** wird dokumentiert, dass das immunregulatorische Protein CD70 auf einer Mehrzahl von Osteosarkomzelllinien und aus Patienten gewonnenen Osteosarkomzellkulturen exprimiert wird, während CD70 nur auf wenigen Ewing-Sarkomzelllinien nachweisbar ist. Untersuchungen verschiedener Gewebeproben von primären und erneut auftretenden Osteosarkomtumoren ergaben, dass die Expression von CD70 in diesen Tumoren heterogen ist, auf Tumorzellen begrenzt und nicht assoziiert ist mit Tumor-infiltrierenden T-Zellen. CD27, der natürliche Rezeptor für CD70, wurde weder auf Krebszellen noch auf Tumor-infiltrierenden T-Zellen in CD70-positiven oder CD70-negativen Osteosarkomproben nachgewiesen. Die Genexpression von CD70 im Tumorgewebe hatte keinen Einfluss auf das Auftreten von Metastasen und somit auf die Überlebensrate dieser Patienten. Da die Expression von CD70 im gesunden Gewebe sehr eingeschränkt bzw. kurzlebig ist, könnte CD70 daher in Patienten mit CD70-positiven Tumoren ein neues, Krebszell-spezifischeres Zielprotein für Immuntherapien darstellen.

## Fazit

In dieser Arbeit wird dargelegt, dass humane NK-Zellen und auch Makrophagen das Potential für anti-Tumor-Antworten besitzen, wenn diese Immunzellen hinreichend mit immunstimulierenden Faktoren aktiviert und/oder mit therapeutischen Antikörpern auf Osteosarkom- und Ewing-Sarkomzellen gelenkt werden. Diese Ergebnisse mögen zur Verfeinerung derzeit angewendeter Therapien sowie zur Entwicklung neuer immuntherapeutischer Behandlungsansätze beitragen, die den immununterdrückenden Faktoren der Tumorumgebung entgegenwirken und die Eliminierung von Tumorzellen unterstützen.

