

# Die funktionelle Rolle von PD-L1 und PD-L2 in der Pathogenese der chronisch lymphatischen Leukämie - eine *in vivo* Analyse

Inaugural-Dissertation von Sebastian Reinartz

## Abstract

Die chronische lymphatische Leukämie (CLL) ist eine der häufigsten lymphatischen Malignome in der westlichen Welt, die durchschnittlich im Alter von 72 Jahren auftritt und einen sehr heterogenen Krankheitsverlauf aufweist. In den letzten Jahren hat sich die Behandlung von CLL-Patienten durch die Entwicklung niedermolekularer Inhibitoren, die auf wesentliche Effektor Moleküle des B-Zell-Rezeptor-Signalwegs (z.B. Ibrutinib) oder des Anti-Apoptose-Signalwegs (Venetoclax) abzielen, erheblich verbessert. Die Behandlungsmöglichkeiten können durch das vermehrte Auftreten von Therapieresistenzen jedoch stark eingeschränkt werden, was den Bedarf an neuen Strategien zur Behandlung dieser Erkrankung unterstreicht. Die Wiederherstellung körpereigener Anti-Tumor-Immunreaktionen durch die Blockade der Pd-1/Pd-1-Liganden-Immun-Checkpoint-Achse hat in der Vergangenheit zu einem Paradigmenwechsel in der Therapie verschiedener Krebsarten geführt und könnte auch für die CLL einen vielversprechenden Ansatz darstellen. Allerdings sprechen rezidierte/refraktäre CLL-Patienten bisher nicht auf eine Blockade dieser Immun-Checkpoint-Achse an, obwohl PD-1 und PD-L1 häufig überexprimiert sind. Dies unterstreicht die dringende Notwendigkeit, die funktionelle Rolle der PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoint-Achse bei der CLL besser zu verstehen, um mögliche Strategien zur Optimierung der Immun-Checkpoint-Blockade (ICB) zu identifizieren.

In dieser Studie haben wir zwei neue *Pd-1<sup>-/-</sup>* und *Pd-2<sup>-/-</sup>* Mauslinien mit einem reinem C57BL/6J Hintergrund generiert und diese mit dem *Eμ-TCL1<sup>tg</sup>*-Mausmodell gekreuzt, welches regelmäßig zur *in vivo* Untersuchung der CLL-Pathogenese verwendet wird. Durch eine umfassende Charakterisierung des Krankheitsverlaufs konnten wir eine funktionelle Rolle für Pd-1, aber nicht für Pd-2, in der Initiations- und frühen Progressionsphase der CLL-Entwicklung nachweisen. Im direkten Vergleich zu den *Eμ-TCL1<sup>tg/wt</sup>* Kontrolltieren, spiegelte sich dies in einem verzögerten Krankheitsausbruch mit einer signifikant reduzierten CLL-Belastung im peripheren Blut und lymphatischen Gewebe (Milz, Knochenmark und Leber) der *Eμ-TCL1<sup>tg/wt</sup>Pd-1<sup>-/-</sup>* Mäuse bis zu einem Alter von 8 Monaten wider. Die anfängliche Wachstumsblockade konnte später jedoch von den *Pd-1<sup>-/-</sup>* CLL-Zellen überwunden werden, was letztendlich zu einem ähnlichen Krankheitsverlauf zwischen *Eμ-TCL1<sup>tg/wt</sup>Pd-1<sup>-/-</sup>* und *Eμ-TCL1<sup>tg/wt</sup>*-Mäusen ohne Überlebensvorteil führte.

Um die immunologischen Veränderungen zu identifizieren, die es den *Pd-1<sup>-/-</sup>* CLL Zellen ermöglichen dem körpereigenen Immunsystem langfristig zu entkommen, haben wir eine longitudinale Charakterisierung der wichtigsten Immunzellpopulationen, einschließlich der

nicht transformierten B-Zellen, der CLL-Zellen, der Cd11b<sup>+</sup> myeloischen Zellen sowie der Cd4<sup>+</sup> und Cd8<sup>+</sup> T-Zellen, durchgeführt. Interessanterweise konnten wir keine signifikanten CLL-unabhängigen Unterschiede in der Gesamtzahl dieser Zelltypen zwischen den *Eμ-TCL1<sup>tg/wt</sup>Pd-1<sup>-/-</sup>* und den *Eμ-TCL1<sup>tg/wt</sup>*-Mäusen feststellen. Die einzige Ausnahme bildeten die nicht transformierten B-Zellen, deren Populationsgröße in den lymphatischen Geweben der *Eμ-TCL1<sup>tg/wt</sup>Pd-1<sup>-/-</sup>*-Mäuse deutlich geringer war als bei den Kontrolltieren. Außerdem konnte weder in den *Eμ-TCL1<sup>tg/wt</sup>Pd-1<sup>-/-</sup>* noch in den *Eμ-TCL1<sup>tg/wt</sup>Pd-12<sup>-/-</sup>* Mäusen eine kompensatorische Hochregulierung des verbleibenden Pd-1-Liganden beobachtet werden, was mit früheren Veröffentlichungen übereinstimmt. Im Gegensatz dazu konnten wir nach dem systemischen Verlust von Pd-1 sowohl im peripheren Blut als auch im lymphatischen Gewebe eine signifikante Zunahme des Pd-1-Rezeptors auf der Oberfläche der Cd4<sup>+</sup> als auch der Cd8<sup>+</sup> T-Zellen feststellen. Dementsprechend wurde bei den *Eμ-TCL1<sup>tg/wt</sup> Pd-1<sup>-/-</sup>* Mäusen im Alter von 3 Monaten eine geringere Oberflächenkonzentrationen von Cd69 beobachtet, was auf eine verminderte T-Zell-Aktivität hinweist.

Um die Mechanismen zu identifizieren, die dem Phänotyp der *Eμ-TCL1<sup>tg/wt</sup>Pd-1<sup>-/-</sup>*-Mäuse zugrunde liegen, führten wir sowohl bei den untransformierten B-Zellen, den CLL-Zellen, als auch bei den Cd4<sup>+</sup> und Cd8<sup>+</sup> T-Zellen eine Transkriptomanalyse durch. Die Zellen wurden dabei aus der Milz von 8 Monate alten *Eμ-TCL1<sup>tg/wt</sup>Pd-1<sup>-/-</sup>* und *Eμ-TCL1<sup>tg/wt</sup>*-Mäusen isoliert. Dieser Zeitpunkt stellte zum einen den signifikantesten Unterschied in der CLL-Belastung zwischen den beiden Genotypen dar und wurde zugleich als Wendepunkt für die Etablierung kompensatorischer Immunescape-Mechanismen angesehen. Insgesamt sind die Veränderungen des Transkriptom nach dem globalen Verlust von Pd-1 jedoch für jeden der untersuchten Zelltypen überraschend gering. Die Expressionssignatur der *Eμ-TCL1<sup>tg/wt</sup>Pd-1<sup>-/-</sup>* CLL-Zellen deutet jedoch auf einen aggressiveren Phänotyp hin, welcher das Ergebnis eines selektiven Drucks sein könnte, der durch eine verstärkte Anti-Tumor-Immunreaktion ausgelöst wurde. Dies spiegelt sich sowohl in der veränderten Expression mehrerer krebsassoziiertes Gene wider als auch in der Expression von Genen, die in zellulären Adhäsions- und Mobilisierungsprozessen involviert sind. Zusammengenommen könnten diese Anpassungen den CLL-Zellen nach dem Verlust der Pd-1-Expression zu einer besseren Fitness verhelfen. Besonders interessant ist, dass die Transkriptionsprofile der Cd4<sup>+</sup> und Cd8<sup>+</sup> T-Zellen in den *Eμ-TCL1<sup>tg/wt</sup>Pd-1<sup>-/-</sup>* Mäusen auf einen hochgradig reaktionsfähigen und aktivierten Phänotyp hindeuten, wobei die Cd8<sup>+</sup> T-Zellen gleichzeitig eine stark erhöhte Expression mehrerer Erschöpfungsmarker aufweisen, was auf den Erwerb eines dysfunktionalen Phänotyps hindeutet. Letzteres könnte die Ausbreitung der CLL-Zellen in den *Eμ-TCL1<sup>tg/wt</sup>Pd-1<sup>-/-</sup>* Mäusen zu einem fortgeschrittenem Krankheitsstadium erklären.

Parallel dazu haben wir außerdem die Rolle der Expression der Pd-1-Liganden im CLL-Tumormikromillieu (TME) untersucht. Dazu wurde ein adaptiver Transfer von *Eμ-TCL1<sup>tg/wt</sup>*

CLL-Zellen in *Pd-11<sup>-/-</sup>*, *Pd-12<sup>-/-</sup>* und WT-Empfängertiere durchgeführt. Bemerkenswerterweise konnten wir keine signifikanten Auswirkungen auf die Progression der CLL durch das Fehlen eines der beiden PD-1-Liganden in den Empfängertieren beobachten. Allerdings kam es bei einem beträchtlichen Anteil der *Pd-11<sup>-/-</sup>* (40 %) und *Pd-12<sup>-/-</sup>* (30 %) Empfänger zu einer T-Zell-vermittelten Transplantatabstoßung, was auf ein grundlegendes Potenzial zur Aktivierung zytotoxischer T-Zellen in diesen Mäusen hinweist.

Zusammengefasst stellt die *Eμ-TCL1<sup>tg/wt</sup>Pd-11<sup>-/-</sup>* Mauslinie ein geeignetes *in vivo* Modell zur Untersuchung kompensatorischer Immunescape-Mechanismen nach dem Verlust der Pd-1-Pd-11-vermittelten inhibitorischen Signalübertragung dar. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die *Pd-11<sup>-/-</sup>* CLL Zellen langfristig einen aggressiveren Phänotyp entwickeln und die zytotoxischen T-Zellen bereits zu einem früheren Zeitpunkt als bei den *Eμ-TCL1<sup>tg</sup>* Kontrolltieren erschöpft bzw. dysfunktional sind. Letzteres äußert sich vor allem durch die erhöhte Expression kompensatorischer Immun-Checkpoint-Moleküle wie Ctla4, Lag3 und Tim3. Weitere Untersuchungen der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen könnten langfristig dazu beitragen, neue Strategien zur Verbesserung der ICB-Therapie für CLL-Patienten zu entwickeln.