

**Die Rolle von RANK und seinem Liganden
bei Immunevasion und Chemotherapie-Resistenz
von Tumorzellen**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Kim Larissa Clar
aus Nürtingen

Tübingen
2022

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation: 27.07.2022

Dekan: Prof. Dr. Thilo Stehle

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Helmut R. Salih

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	5
2	Einleitung	7
2.1	Immunsystem	7
2.1.1	Angeborene Immunität.....	7
2.1.2	Adaptive Immunität	8
2.1.3	Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)	9
2.1.4	Thrombozyten	14
2.2	Immunreaktion gegen Tumore und Tumor-Immunevasion	16
2.3	Tumornekrosefaktor (TNF)/TNF-Rezeptor (TNFR)-Superfamilie.....	19
2.3.1	<i>Receptor activator of NF-κB</i> (RANK) und sein Ligand	22
2.4	Mamma- und kolorektales Karzinom als Beispiele solider Tumore	24
2.4.1	Mammakarzinom	24
2.4.2	Kolorektales Karzinom	25
2.5	Akute myeloische Leukämie (AML)	26
3	Zusammenfassung der Ergebnisse	31
3.1	Die Rolle von thrombozytärem RANKL bei der NK-Zell-Reaktivität gegen solide Tumore	31
3.2	Die Rolle von RANK bei der Chemotherapie-Resistenz in der AML und ihrem Krankheitsverlauf.....	33
4	Diskussion	36
5	Ausblick	43
6	Literaturverzeichnis	45
7	Abkürzungsverzeichnis	63
8	Tabellenverzeichnis	66
9	Eigene Publikationen	67
10	Eigenanteil	68
11	Danksagung	70
12	Anhang	71
12.1	Publikationen als Dissertation.....	71

1 Zusammenfassung

Die Tumornekrosefaktor (TNF)/TNF-Rezeptor (TNFR)-Familienmitglieder *receptor activator of nuclear factor (NF)- κ B* (RANK) und sein Ligand (RANKL) spielen eine Schlüsselrolle im Knochenmetabolismus. RANK ist auf Progenitoren der Osteoklasten exprimiert und kann RANKL binden, der in membrangebundener Form auf Osteoblasten exprimiert ist und von deren Oberfläche abgespalten wird. Interaktion von RANK und RANKL führt zur Differenzierung der Progenitoren in aktive Osteoklasten, welche folglich Knochensubstanz resorbieren. Neben seiner Bedeutung im Knochenstoffwechsel konnte für das RANK/RANKL-Molekülsystem mittlerweile zudem eine Involvierung bei verschiedenen anderen zellulären Funktionen einschließlich der Pathophysiologie von Tumorerkrankungen nachgewiesen werden.

Basierend auf vorliegenden Daten und Erkenntnissen wurde in dieser Arbeit die Rolle von RANK und seinem Liganden bei der Metastasierung von soliden Tumoren am Beispiel des Mamma- und kolorektalen Karzinoms untersucht. Metastasierte Tumore stellen eine große therapeutische Herausforderung dar und sind häufig mit einer schlechten Prognose und einem geringen Überleben der Patienten verbunden. Metastasierende Tumorzellen weisen die Fähigkeit auf, sich aus dem Primärtumorherd kommend über den Blutkreislauf im Körper auszubreiten und so in entfernten Organen Sekundärherde zu bilden. Mittlerweile ist bekannt, dass Thrombozyten eine wichtige Rolle bei der Metastasierung spielen: Sie bilden mit im Blutkreislauf zirkulierenden Tumorzellen Aggregate, werden dabei aktiviert, setzen Wachstumsfaktoren frei, begünstigen die Transmigration und Extravasation von Tumorzellen und induzieren einen mit der Metastasierung assoziierten mesenchymalen Phänotyp.

In dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass RANKL auf Thrombozyten von Patienten mit Mamma- und kolorektalem Karzinom exprimiert ist und durch Aktivierung der Thrombozyten hochreguliert wird. Thrombozytärer RANKL wird von RANK gebunden, welcher weiter auf Natürlichen Killer (NK)-Zellen der Patienten nachgewiesen werden konnte. Die Interaktion von aus Thrombozyten stammendem RANKL mit auf NK-Zellen exprimiertem RANK führt schließlich zu einer Inhibition der NK-Zell-vermittelten Immunreaktion gegen die Tumorzellen, und durch

Blockade der Interaktion mit dem RANKL-neutralisierenden Antikörper Denosumab kann die NK-Zell-Reaktivität deutlich verstärkt werden.

Zu den Herausforderungen bei der Tumorthherapie zählt neben metastasierten Erkrankungen auch Therapieresistenz. Letztere resultiert häufig in Rückfällen, was insbesondere bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) häufig zu beobachten ist. Die AML ist die häufigste akute Leukämie bei Erwachsenen. Obwohl sich die Behandlungsmöglichkeiten in den letzten Jahren verbessert haben, bleibt die Prognose von AML-Patienten schlecht. Ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen, welche in der AML pathophysiologisch relevant sind, ist daher wichtig, um die Wirksamkeit von Behandlungen vorherzusagen und idealerweise den Therapieerfolg zu verbessern.

In dieser Arbeit konnte RANK als Regulator von Resistenzmechanismen von AML-Zellen gegen konventionelle Chemotherapeutika identifiziert werden. Auf der Oberfläche der leukämischen Zellen von AML-Patienten wurde eine substantielle Expression von RANK detektiert. Eine Stimulation von RANK führte zu einer Resistenz der AML-Zellen gegenüber den in der AML-Therapie zentralen Chemotherapeutika Doxorubicin und Cytarabin. Zudem konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der RANK-Expression und dem Krankheitsverlauf der in diese *ex vivo* Studie aufgenommenen Patienten festgestellt und somit RANK als potenzieller prognostischer Marker in der AML charakterisiert werden.

Zusammenfassend wurde in dieser Dissertation gezeigt, dass das RANK/RANKL-Molekülsystem als Target dienen könnte, um eine Metastasierung bei soliden Tumoren zu verhindern sowie bei der AML eine Sensibilisierung der leukämischen Zellen gegenüber Chemotherapeutika zu erreichen und dadurch das Therapieansprechen und den Erfolg einer Behandlung positiv zu beeinflussen. Basierend auf den Ergebnissen dieser Doktorarbeit erscheinen weitere Untersuchungen gerechtfertigt, um die hier dargestellten Daten zu validieren und letztlich eine breite Basis für eine Modulation von RANK und RANKL für die Tumorthherapie zu schaffen. Zukünftige Studien sollten dabei insbesondere auf die Möglichkeit fokussieren, die RANK/RANKL-Interaktion z.B. durch *drug repurposing* des klinisch verfügbaren neutralisierenden Antikörpers Denosumab zu durchbrechen.

2 Einleitung

2.1 Immunsystem

Das biologische Abwehrsystem höherer Lebewesen zur Eliminierung von Mikroorganismen, Fremdstoffen und darüber hinaus auch von malignen Körperzellen wird Immunsystem (lat. *immunis* = rein, frei, unberührt) genannt. Das Immunsystem ist ein komplexes Netzwerk aus verschiedenen Organellen, Zellen und löslichen Faktoren. Seine Wirkungsweise setzt zum einen die Fähigkeit voraus, zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen differenzieren zu können. Zum anderen muss das Immunsystem vier Hauptaufgaben erfüllen, um den Organismus wirksam zu schützen: Immunologische Erkennung, immunologische Effektorfunktionen, Immunregulation und immunologisches Gedächtnis. Das Immunsystem der Wirbeltiere wird in die angeborene und die adaptive Immunabwehr untergliedert, welche sich jeweils aus zellulären und humoralen Komponenten zusammensetzen. Zelluläre Bestandteile des Immunsystems sind die aus hämatopoetischen Stammzellen hervorgehenden Leukozyten. Dabei differenzieren die pluripotenten Stammzellen zu myeloischen und lymphatischen Progenitorzellen, aus welchen dann Granulozyten, Monozyten bzw. Makrophagen, Dendritische Zellen (DC) und Mastzellen (myeloische Reihe) sowie B-Zellen, T-Zellen und Natürliche Killer (NK)-Zellen (lymphatische Reihe) hervorgehen. Humorale Bestandteile des Immunsystems sind verschiedene lösliche Faktoren wie das Komplementsystem, Zytokine, Lysozyme und von B-Zellen produzierte Antikörper.¹⁻⁵

2.1.1 Angeborene Immunität

Die erste Verteidigungslinie des Immunsystems wird von der angeborenen Immunität gebildet. Dabei handelt es sich um eine Immunantwort, welche der Früherkennung von Pathogenen dient, wenn diese die physikalischen, chemischen und natürlichen Schutzbarrieren des Körpers überwunden haben.^{1,6} Die angeborene Immunität findet innerhalb der ersten Minuten und Stunden statt und kontrolliert die Infektion bis zum Einsatz der adaptiven Immunantwort. Sie nutzt verschiedene Mechanismen zur Identifizierung von Pathogenen, welche sich in drei Strategien unterteilen lassen: Erkennung eines „fehlenden Selbst“, eines

mikrobiellen „nicht-Selbst“ und eines „veränderten Selbst“.² Die angeborene Immunität setzt sich aus zellulären und humoralen Bestandteilen zusammen. Letztere umfassen beispielsweise das bakterizid wirkende Lysozym sowie Proteine des Komplementsystems und Zytokine, welche Krankheitserreger nach Aktivierung entweder direkt angreifen oder für eine immunologische Erkennung opsonieren und zudem Immunzellen rekrutieren und aktivieren.^{1, 7, 8} Zu den zellulären Komponenten des angeborenen Immunsystems gehören phagozytierende Granulozyten, Monozyten bzw. Makrophagen und DC sowie die NK-Zellen.³ Die Aktivierung von Phagozyten erfolgt vor allem durch Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRR) wie Toll-like-Rezeptoren (TLR), welche in der Lage sind, Moleküle zu erkennen, die häufig auf Krankheitserregern vorkommen (*pathogen-associated molecule patterns*, PAMP) oder von geschädigten Zellen freigesetzt werden (*damage-associated molecule patterns*, DAMP).⁹⁻¹² Nach der Erkennung von Mikroorganismen werden diese aufgenommen und enzymatisch abgebaut. Zudem werden inflammatorische Zytokine freigesetzt, welche eine Entzündungsreaktion hervorrufen und so zelluläre Bestandteile des adaptiven Immunsystems aktivieren und zum Infektionsort locken.¹³ Eine Sonderrolle zwischen der angeborenen und adaptiven Immunität spielen die DC als sogenannte Antigen-präsentierenden Zellen (*antigen-presenting cells*, APC): Sie prozessieren Antigene, präsentieren diese zusammen mit kostimulatorischen Molekülen auf ihrer Oberfläche und bewirken so eine Stimulation des adaptiven Immunsystems.^{2, 14, 15} Die Rolle und Funktion der NK-Zellen werden in späteren Kapiteln ausführlich beschrieben.

2.1.2 Adaptive Immunität

Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem handelt es sich bei der adaptiven Immunität um eine spezifische Immunreaktion gegen Pathogene, welche zeitverzögert einsetzt. Ihre Erkennung von Krankheitserregern beruht auf einer Vielzahl verschiedener Antigen-Rezeptoren mit einzigartiger Spezifität. Diese T-Zell- und B-Zell-Rezeptoren bzw. von Letzteren produzierte Antikörper gehören zur Superfamilie der Immunglobuline (Ig) und entstehen durch Rekombination keimbahnkodierter Genfragmente.^{1, 16-18} Bei der klonalen Selektion werden sich entwickelnde Immunzellen des erworbenen Immunsystems durch kontinuierliche

Wechselwirkung mit anderen Zellen auf „Selbst“ und „nicht-Selbst“ überprüft und so eine Autoimmunreaktion der Immunzellen vermieden.^{2, 19, 20} Eine Besonderheit des adaptiven Immunsystems stellt das immunologische Gedächtnis dar: Es schützt den Organismus vor erneuter Erkrankung durch ein Pathogen und ermöglicht andauernde Immunität.^{3, 21} Der angeborenen Immunität gleich besteht auch die adaptive Immunität aus humoralen und zellulären Abwehrmechanismen.¹ Zellulärer Bestandteil sind zum einen die T-Zellen, die auf *major histocompatibility complex* (MHC)-Molekülen exprimiert auf APC Antigene über ihren T-Zell-Rezeptor (*T cell receptor*, TCR) erkennen (MHC-Restriktion). Durch einen weiteren Stimulus (Kostimulation) wird die Differenzierung naiver T-Zellen zu Effektor-T-Zellen induziert.^{2, 22} T-Zellen werden aufgrund der auf ihrer Oberfläche exprimierten Moleküle und ihrer Funktion in zwei verschiedene Zelltypen unterteilt: *Cluster of differentiation* (CD)⁸⁺ zytotoxische T-Zellen, welche auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentierte Antigene erkennen und maligne entartete oder infizierte Körperzellen lysieren können, und CD⁴⁺ T-Zellen, welche sich durch eine Erkennung von Antigenen im Komplex mit MHC-Klasse-II-Molekülen auszeichnen und zu T-Helferzellen differenzieren.²³⁻²⁵ Zudem ist bereits bekannt, dass T-Zellen immunmodulatorische Lymphokine ausschütten, welche die zelluläre Immunantwort steigern und eine Stimulation der B-Zellen bewirken. B-Zellen als zweite zelluläre Komponente der adaptiven Immunität sind für die Produktion von Antikörpern verantwortlich, welche die humorale Komponente des adaptiven Immunsystems bilden.² Sie besitzen die Fähigkeit, freie Antigene über den B-Zell-Rezeptor aufzunehmen und sie nach Prozessierung über MHC-Klasse-II-Moleküle den T-Helferzellen zu präsentieren.^{1, 26} B-Zellen werden durch T-Helferzellen aktiviert und differenzieren dann zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen.¹

2.1.3 Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)

NK-Zellen wurden aufgrund ihrer Fähigkeit, Tumorzellen ohne vorherige Sensibilisierung lysieren zu können, 1975 erstmals als zytotoxische Lymphozyten beschrieben.^{1, 27-29} Aufgrund dieser unspezifischen Aktivierung auf der einen Seite, und der Tatsache, dass NK-, T- und B-Zellen aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle entstehen, auf der anderen Seite, war die Zuordnung von NK-Zellen zunächst unklar.¹ Auch wenn NK-Zellen mittlerweile der angeborenen Immunität

zugeordnet werden, konnte gezeigt werden, dass sie weitere Eigenschaften wie ein immunologisches Gedächtnis besitzen und zudem Einfluss auf das adaptive Immunsystem haben.³⁰⁻³³ Somit agieren NK-Zellen an der Schnittstelle zwischen den beiden Teilen der Immunantwort.^{31, 34} Im Menschen machen NK-Zellen etwa 5-10% der mononukleären Zellen im peripheren Blut aus und kommen zudem in weiteren Geweben und Organen wie Knochenmark und Milz vor. Sie werden durch Vorhandensein von CD56 und Abwesenheit des T-Zell-Markers CD3 auf ihrer Oberfläche charakterisiert.² Anhand der Expression von CD56 werden zwei NK-Subpopulationen unterschieden: Zellen mit einer schwachen (CD56^{dim}) und Zellen mit einer hohen Expression (CD56^{bright}). Klassischerweise wurden CD56^{bright} NK-Zellen, welche etwa 10% der NK-Zellen ausmachen, als immunmodulatorisch beschrieben, während der CD56^{dim} Population vorwiegend zytotoxische Aktivität zugeschrieben wurde.^{3, 35} Heute ist bekannt, dass der Kontakt Letzterer mit Targetzellen im Vergleich zu CD56^{bright} NK-Zellen eine höhere Freisetzung von Zytokinen wie Interferon (IFN)- γ bewirkt.³⁶ CD56^{dim} NK-Zellen weisen zudem eine höhere Expression des *fragment crystallizable (Fc)* γ -Rezeptors CD16 auf ihrer Oberfläche auf, welcher Antikörper-vermittelte Zytotoxizität (*antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC*) vermittelt.^{3, 37} CD56^{bright} NK-Zellen werden heute eher als Progenitoren der CD56^{dim} Population angesehen.³⁸

Als Folge von Entzündungsreaktionen wandern NK-Zellen vermittelt durch Zytokine aus der Blutbahn in betroffene Gewebe ein und vermitteln dort zwei bedeutende Wirkmechanismen: Lyse von Targetzellen durch Ausschüttung von membranschädigendem Perforin und proteolytischem Granzym aus zytotoxischen Granula sowie Produktion von IFN- γ in der frühen Phase einer Immunantwort (*early source of IFN- γ*).^{3, 30, 39-41} Die Freisetzung von IFN- γ führt zum einen zu einer direkten Hemmung der Proliferation von Targetzellen. Zum anderen werden Zielzellen durch Induktion von Apoptose eliminiert und vor allem das adaptive Immunsystem stimuliert.^{34, 40, 42, 43} Neben IFN- γ produzieren NK-Zellen noch eine Reihe weiterer pro- und antiinflammatorischer Faktoren wie die Zytokine Interleukin (IL)-8, IL-10 und TNF.^{36, 44, 45} Eine Apoptose-Induktion kann auch über von NK-Zellen exprimierte Todesliganden der Tumornekrosefaktor (TNF)/TNF-Rezeptor (TNFR)-Superfamilie, z.B. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*

(TRAIL) und Fas Ligand (FasL), erfolgen, welche an Todesrezeptoren auf Targetzellen binden.⁴⁶⁻⁴⁹ Die TNF/TNFR-Superfamilie und speziell die Familienmitglieder *receptor activator of nuclear factor (NF)-κB* (RANK) und sein Ligand (RANKL) werden in späteren Kapiteln noch detaillierter beschrieben.

NK-Zellen besitzen keine Antigen-spezifischen Rezeptoren. Ihre Aktivierung wird über ein komplexes Zusammenspiel von aktivierenden und inhibitorischen Signalen reguliert, die über eine Vielzahl verschiedener Rezeptoren in die Zellen übertragen werden. Die Reaktivität von NK-Zellen kann dabei durch zwei Hypothesen beschrieben werden: die *missing-self*- und die *induced-self*-Hypothese.³¹ Der *missing-self*-Hypothese nach werden NK-Zellen aktiviert, wenn diese keine MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Oberfläche von infizierten oder maligne transformierten Zellen erkennen können oder die Expression dieser Moleküle reduziert ist.^{50, 51} Bei einer suffizienten MHC-Klasse-I-Expression, welche das „Selbst“ vermittelt, werden inhibitorische Signale z.B. über *killer cell immunoglobulin-like receptor* (KIR) in die NK-Zellen übertragen und es erfolgt keine Lyse der Targetzellen.^{1, 52} Durch Prozesse wie Infektion oder Entartung kommt es zu einer Herunterregulierung von MHC-Klasse-I-Molekülen, was dazu führt, dass hemmende Signale ausbleiben und die Zelllyse ausgelöst wird.³¹ Die komplementäre *induced-self*-Hypothese postuliert, dass die Stimulation von NK-Zellen durch aktivierende Liganden auf Targetzellen moduliert wird. Diese stress-induzierten Liganden stimulieren aktivierende NK-Zell-Rezeptoren und bewirken so eine NK-Zell-Reaktivität, welche durch lösliche Faktoren wie Interferone (z.B. IFN-β und -γ) und Zytokine (z.B. IL-2, -12 und -15) zusätzlich gesteigert wird.^{2, 53, 54}

2.1.3.1 Aktivierende NK-Zell-Rezeptoren

Die meisten der bekannten Mitglieder der Natürlichen Zytotoxizitäts-Rezeptoren (*natural cytotoxicity receptors*, NCR) gehören zu den aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren. *Natural killer protein* (NKp)46 und NKp30 sind dabei auf ruhenden und aktivierten NK-Zellen exprimiert und ihre Expression korreliert mit der NK-Zell-Zytotoxizität. NKp44 kann lediglich auf der Oberfläche von aktivierten NK-Zellen nachgewiesen werden.^{1, 55-57} Aktivierende Signale in NK-Zellen werden bei NCR über sogenannte *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs* (ITAM) der entsprechenden Adapterproteine (CD3ζ-Kette für NKp30, DAP12 für NKp44

und CD3 ζ - und Fc ϵ RI γ -Kette für NKp46) vermittelt.^{3, 58} Mittlerweile ist gesichert, dass die NCR eine wichtige Rolle bei der anti-Tumor Reaktivität spielen.² NKp30 interagiert mit den Proteinen *B cell lymphoma (Bcl)2-associated anthogene 6* (BAG6) und B7-H6, welche auf Tumorzellen, nicht jedoch auf der Oberfläche gesunder Zellen vorkommen.^{3, 59} NKp44 Ligand (NKp44L), eine Isoform des *mixed lineage leukemia 5* (MLL5)-Proteins, ist aktivierender Ligand für NKp44.^{2, 60} NKp46 bindet Heparansulfat-Proteoglykane, Vimentin-haltige Filamente des Zytoskeletts (Typ III) und verschiedene virale Proteine.^{2, 6} Neben den oben genannten aktivierenden Interaktionspartnern der NCR sind heute auch inhibitorische Liganden wie Hämagglutinin-Glykoproteine verschiedener Viren bekannt.⁶¹

Von zentraler Bedeutung bei der Aktivierung von NK-Zellen ist auch CD16: Die Stimulation von CD16 alleine reicht aus, um eine starke NK-Zell-Reaktivität auszulösen.^{3, 62} CD16 ist ein Mitglied der Ig-Superfamilie und bindet hochspezifisch, aber mit niedriger Affinität an Fc-Teile von IgG1 und IgG3. Aktivierende Signale über CD16, einem multimeren Komplex aus einer ligandenbindenden α -Kette und einem Homo- oder Heterodimer aus CD3 ζ - und Fc ϵ RI γ -Ketten, resultieren in Phosphorylierung von ITAM der Adapterproteine durch Src-Kinasen und der Signalweiterleitung in die Zelle. Hierdurch werden Zytokine ausgeschüttet und ADCC ausgelöst. CD16 spielt daher eine wichtige Rolle bei der Wirkung von therapeutischen Antikörpern gegen Tumore.^{3, 63, 64}

Weiter zählen einige Mitglieder der KIR-Familie zu den aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren. Beispielsweise werden NK-Zellen durch KIR2DS1 nach Interaktion mit seinem Liganden *human leukocyte antigen (HLA)-C* aktiviert.^{65, 66} Die Ig-Superfamilienmitglieder 2B4, CD2 und *DNAX accessory molecule (DNAM)-1* sowie TLR gehören ebenfalls zu den aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren.^{3, 67, 68} Das Heterodimer CD94/NKG2C (*natural killer group 2 member C*) als Beispiel C-Typ-Lektin-ähnlicher Rezeptoren transduziert aktivierende Signale in NK-Zellen über seine Transmembrandomäne und ITAM seines Adapterproteins DAP12 nach Bindung von HLA-E.^{3, 40, 69}

Einen der am besten charakterisierten aktivierenden Rezeptoren auf NK-Zellen stellt NKG2D dar, welcher außer auf NK-Zellen auch auf T-Zellen vorhanden ist.² NKG2D ist ein Homodimer und bildet mit seinem Adapterprotein DAP10 einen Immunrezeptorkomplex, über welchen Signale in die Zelle vermittelt werden.⁷⁰

Die Bindung seiner Liganden (NKG2DL) führt zur Phosphorylierung des Tyrosin-Isoleucin-Asparagin-Methionin-Motives der zytoplasmatischen Domäne von DAP10 und schließlich zur Induktion des Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*)-Vav- und PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase)-Signalwegs. Zusätzlich sind auch weitere Proteine wie GTPasen (Rho- und Rac-Familie) oder Phospholipase-Cy2 in die Signalweiterleitung durch NKG2D in NK-Zellen involviert.^{3, 71-73} Bei NK-Zellen findet die Aktivierung durch NKG2D unmittelbar statt, was bedeutet, dass Effektorfunktionen trotz inhibitorischer Signale durch MHC-Klasse-I-Moleküle aktiviert werden können.^{74, 75} NKG2D interagiert mit MHC-ähnlichen Molekülen (MICA, MICB) und *UL16-binding proteins* (ULBP1-6). Diese Liganden sind, mit Ausnahme einiger gesunder Gewebe und Zellen (z.B. Epithelzellen des Gastrointestinaltrakts), vor allem auf epithelialen und hämatopoetischen Tumorzellen und -zelllinien sowie infizierten Zellen vorhanden.^{1, 75-80}

2.1.3.2 Inhibitorische NK-Zell-Rezeptoren

Im Menschen gehören die Mitglieder der KIR-Familie zu den inhibitorischen NK-Zell-Rezeptoren. Dabei erkennen KIR-Moleküle die Abwesenheit oder Reduktion von MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Oberfläche von Zielzellen.¹ Sie weisen eine Spezifität gegen allelische HLA-A, -B und -C Varianten auf: Während KIR2DL1 beispielsweise mit der Gruppe der HLA-C interagiert, erkennt KIR3DL1 HLA-B-Moleküle.^{1, 81-83} NK-Zellen tragen meist nur ein oder zwei selbst-restringierte KIR-Moleküle auf ihrer Oberfläche, die Koexpression mehrerer dieser Moleküle tritt hingegen selten auf.^{2, 67} Eine hemmende Wirkung auf NK-Zellen hat auch das Heterodimer CD94/NKG2A. Es wird von den meisten NK-Zellen exprimiert und erkennt das nicht-klassische MHC-Klasse-I-Molekül HLA-E und sein Homologon Qa-1b.^{2, 84}

Inhibitorische NK-Zell-Rezeptoren weisen sogenannte *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs* (ITIM) auf. Die Anzahl der ITIM variiert je nach Rezeptor.⁸¹ Bei Interaktion mit einem Liganden kommt es zur Phosphorylierung der ITIM durch Src-Kinasen und folglich zur Rekrutierung von *SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase* (SHP)-1 und SHP-2. Diese Phosphatasen können dephosphoryliert und so aktiviert werden, wodurch eine Hemmung von

Signalmolekülen, welche bei der Aktivierung von NK-Zellen eine Rolle spielen, und schließlich der NK-Zell-Reaktivität resultiert.^{3, 44, 85}

Zu den inhibitorischen NK-Zell-Rezeptoren gehört auch der Leukozyten-Immunglobulin-ähnliche Rezeptor (LIR)-1, der eine Vielzahl von MHC-Klasse-I-Allelen und zudem das humane Cytomegalovirus MHC-Klasse-I-Homologon UL18 binden kann, sowie Mitglieder der B7-Familie wie B7-H3.^{86, 87} *Programmed cell death protein 1* (PD-1) ist ein Transmembranprotein der CD28-Familie.⁸⁸ Neben der Expression auf T- und B-Zellen wurde PD-1 in jüngster Zeit auch auf NK-Zellen beschrieben.⁸⁹ PD-1 interagiert mit den beiden Liganden PD-L1 und PD-L2 (B7-Familie), welche z.B. auf hämatopoetischen Zellen und auch Tumorzellen vorhanden sind.⁹⁰ Während die PD-1/PD-L Achse in gesundem Gewebe die periphere Toleranz reguliert, stellt sie im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen einen Mechanismus der Immunevasion dar.⁹¹ Die Blockade der PD-1/PD-L1-Interaktion zur Verstärkung der Immunantwort insbesondere von T-Zellen, z.B. durch therapeutische Antikörper, gilt als großer Durchbruch in der Onkologie und zeigt beeindruckende klinische Erfolge bei der Behandlung verschiedener Tumorentitäten.^{92, 93} Auf die Immunreaktion gegen Tumore und Tumor-Immunevasion im Allgemeinen wird in einem späteren Kapitel detailliert eingegangen.

Interessanterweise haben auch verschiedene Mitglieder der TNF/TNFR-Superfamilie eine inhibitorische Wirkung auf die NK-Zell-Reaktivität. Beispielsweise konnten wir und andere bereits zeigen, dass *glucocorticoid-induced TNF receptor-related* (GITR) Protein und auch 4-1BB auf NK-Zellen vorhanden sind und eine Interaktion von Rezeptor und Ligand (GITRL bzw. 4-1BBL) zu einer Hemmung der NK-Zell-Reaktivität gegen leukämische Zellen führt.⁹⁴⁻⁹⁷ Die TNF/TNFR-Superfamilie und speziell die Familienmitglieder RANK und RANKL werden in späteren Kapiteln detailliert beschrieben.

2.1.4 Thrombozyten

Thrombozyten, auch (Blut-) Plättchen genannt, sind Zellfragmente ohne Nukleus und spielen eine zentrale Rolle bei der Hämostase.⁶ Sie entstehen aus Megakaryozyten, die ihrerseits aus myeloischen Progenitorzellen differenzieren. Die Entstehung von Megakaryozyten wird durch Thrombopoietin reguliert, welches

als wichtigster hämatopoetischer Wachstumsfaktor für Thrombozyten gilt.^{98, 99} Reife Megakaryozyten bilden abgebrochene, hochverzweigte Zytoplasmateile, die sogenannten Proplättchen, welche in den Verzweigungen der Sinusoide des Knochenmarks freigesetzt werden.^{6, 100} Durch Scherkräfte entstehen schließlich Thrombozyten, wobei aus einem Megakaryozyten etwa 1000 bis 3000 Thrombozyten hervorgehen.^{101, 102} Insgesamt entstehen etwa 10^{11} Thrombozyten täglich mit einer Zellzahl von 150.000 bis 350.000 pro μL Blut.^{98, 103} Thrombozyten sind 2-3 μm groß und haben eine Lebensdauer von bis zu zehn Tagen. Ihr Abbau findet in der Leber und Milz statt.^{6, 104}

Auch wenn Thrombozyten keinen Nukleus besitzen, sind sie in geringem Maße zur Proteinbiosynthese fähig, da bei ihrer Entwicklung Ribosomen und RNA (*ribonucleic acid*) ins Zellinnere gelangen.¹⁰⁵ Die Hämostase wird von Thrombozyten über verschiedene Oberflächenmoleküle und in Granula gespeicherten löslichen Faktoren vermittelt.⁶ Zudem sind Thrombozyten an pathologischen Prozessen wie Gefäßverschluss und Metastasierung beteiligt.^{106, 107}

Metastasierung ist ein komplexer Prozess, bei dem Tumorzellen die Fähigkeit erlangen, sich aus dem Primärtumorherd kommend über den Blutkreislauf im Körper auszubreiten und so in entfernten Organen Sekundärherde zu bilden. Als finaler Status bei der Progression einer Tumorerkrankung kategorisiert, sind Metastasen mit einer schlechten Prognose und verringertem Überleben von Patienten assoziiert.^{108, 109} Metastasierung hängt stark von der Interaktion zwischen Tumorzelle und Mikroumgebung ab.¹⁰⁷ Bei Eintritt von Tumorzellen in den Blutkreislauf adhären Thrombozyten an Tumorzellen und werden durch Interaktion (z.B. zwischen thrombozytärem Gerinnungsfaktor VII und *tissue factor* auf Tumorzellen) aktiviert (*tumor cell-induced platelet aggregation*, TCIPA).^{6, 110, 111} Während man ursprünglich davon ausging, dass Thrombozyten die Tumorzellen lediglich vor Scherkräften schützen, weiß man mittlerweile, dass ihre Aktivierung auch zur Freisetzung von löslichen Faktoren wie *transforming growth factor* (TGF)- β und *epidermal growth factor* (EGF) führt. Diese Faktoren fördern das Überleben und die Proliferation von Tumorzellen. Sekretiertes Adenosintriphosphat (ATP) öffnet zudem die endotheliale Barriere und begünstigt so die Transmigration und Extravasation der Tumorzellen. Ebenfalls beteiligt an diesen Prozessen sind das thrombozytäre P-Selektin sowie Glykoprotein IIb/IIIa.^{6, 107} Thrombozyten sind in der

Lage, eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) zu induzieren, bei der Tumorzellen einen mesenchymalen Phänotypen annehmen, der in einer erhöhten Fähigkeit zur Migration, Invasion und Apoptose-Resistenz resultiert.¹¹² Beispielsweise konnte bereits gezeigt werden, dass von Thrombozyten ausgeschüttetes TGF- β EMT bei Tumorzellen im Mamma- und Kolorektalkarzinom auslöst.¹¹³ Mamma- und kolorektale Karzinome als Beispiele solider Tumore werden in späteren Kapiteln detailliert beschrieben.

2.2 Immunreaktion gegen Tumore und Tumor-Immunevasion

Nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind Tumorerkrankungen die zweithäufigste Todesursache in westlichen Industrienationen.³ Zudem ist eine Zunahme der Inzidenz von Tumorerkrankungen wie dem malignen Melanom zu beobachten.^{1, 114} Die Behandlung dieser Erkrankungen erfolgt meist durch Resektion von krankhaftem Gewebe und mittels Bestrahlung sowie einer Vielzahl von Chemotherapien. Obwohl sich die Behandlungsoptionen in den letzten Jahren deutlich verbessert haben, treten weiter starke Nebenwirkungen auf und die Therapien sind in ihrer Wirksamkeit limitiert. Ein vielversprechender Ansatz zur Verbesserung der Therapieoptionen zur Behandlung von Tumoren ist die Induktion einer Immunreaktion gegen maligne Zellen.³ Das Konzept einer solchen Reaktion des Immunsystems wurde bereits 1909 von Paul Ehrlich als ständige Kontrolle des Körpers auf die Anwesenheit aberranter Keime beschrieben.^{3, 115} Der Begriff der Immunüberwachung (*immune surveillance*) wurde allerdings erst 50 Jahre später von Burnet und Thomas geprägt.^{3, 116, 117} Die Immunüberwachung beschreibt die Fähigkeit des Immunsystems, entartete Zellen zu detektieren und zu eliminieren und gilt heute als eines der *hallmarks of cancer*.^{1, 118} Zunächst wurde die Hypothese der Immunüberwachung angezweifelt, nicht zuletzt da in immundefizienten Mäusen keine erhöhte Tumorzinzidenz beobachtet wurde.² Syngene Mausmodelle lieferten schließlich den Nachweis für die Immunogenität von Tumorzellen: So wurde z.B. die Proliferation von Tumorzellen nach vorheriger Vakzinierung mit Zellen derselben Herkunft gehemmt und gleichzeitig tumorspezifische zytotoxische T-Zellen angereichert. Tumorwachstum und Metastasierung sind abhängig von der Immunüberwachung.^{3, 6} Verfehlt das Immunsystem die Erkennung oder Abwehr von Tumorzellen, können apparente Tumore auftreten.¹¹⁹

Eine mögliche Erklärung einer Toleranz des Immunsystems gegenüber Tumorzellen liefert das *danger model*. Es geht von einer „verträglichen“ Koexistenz der Immun- und malignen Zellen aus, eine Reaktion des Immunsystems wird nur als Folge von Gewebestress (*danger*-Signal) wie der Freisetzung von immunmodulatorischen Zytokinen induziert, welche in Tumoren fehlen, wodurch eine Toleranz entsteht.^{6, 120} Auf dieser Grundlage könnte eine Aktivierung des Immunsystems z.B. durch therapeutische Intervention dazu beitragen, eine Tumorregression zu erwirken.

Neben der Tumor-Toleranz, bei der Tumorzellen der Kontrolle des Immunsystems nicht aktiv entgehen, werden auch Mechanismen der aktiven Immunevasion (*immune escape*) diskutiert.^{1, 119, 121, 122} Ein möglicher Mechanismus ist die Reduktion von MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Oberfläche von Tumorzellen.¹²³⁻¹²⁶ Zwar ist eine Aktivierung von T-Zellen auch bei einer reduzierten Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen möglich, aber im Zellinneren konkurrieren eine Vielzahl verschiedener Peptide um die Bindung an MHC-Klasse-I. Infolgedessen ist es möglich, dass maligne Zellen dem Immunsystem entkommen können, wenn nicht alle endogenen Epitope in ausreichender Menge präsentiert werden und die T-Zell-Reaktivität folglich vermindert ist.³ Weiter ist bekannt, dass die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf verschiedenen Tumoren variabel ist oder z.B. durch Mutation von β 2-Mikrotubulin gänzlich fehlen kann.^{2, 127-129} Im Zusammenhang mit *immune escape* ist die reduzierte Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen mit einer schlechteren Prognose assoziiert.^{3, 130-134}

Die Interaktion zwischen Tumor- und Immunzellen wird auch durch lösliche Faktoren beeinflusst, beispielsweise durch direkte Effekte auf Immunzellen. Lösliche Faktoren regulieren außerdem die Produktion und Funktion anderer Zytokine und modulieren die Expression von Adhäsions- oder kostimulatorischen Molekülen.^{1, 135-140} Tumorzellen sekretieren z.B. die Botenstoffe TGF- β und IL-10, welche immunsuppressive Wirkungen haben.^{3, 141, 142} Neben der reduzierten Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen und löslichen Faktoren kann eine Immunevasion auch durch veränderte Oberflächenexpression immunregulatorischer Moleküle erfolgen.³ Ein bedeutender Mechanismus dabei ist das sogenannte *shedding*, bei dem Moleküle wie die Liganden des aktivierenden Rezeptors NKG2D durch Abschneiden von der Oberfläche von Tumorzellen in

löslicher Form freigesetzt werden.^{3, 143-148} Dies führt zum einen zu einer reduzierten Expression stimulierender Moleküle. Zum anderen werden entsprechende Rezeptoren auf Immunzellen blockiert oder herabreguliert und so deren Reaktivität negativ beeinflusst.^{2, 149, 150} Tumorzellen können sich der Kontrolle des Immunsystems auch durch vermehrte Expression inhibitorischer Moleküle wie Liganden des Immuncheckpoints PD-1 entziehen.^{3, 151} Wie bereits in vorangegangenen Kapiteln beschreiben, wird PD-1 unter anderem von T-Zellen exprimiert und kann durch Interaktion mit seinen Liganden, die auf malignen Zellen vorhanden sind, die T-Zell-Reaktivität hemmen.^{89, 90} Mittlerweile wurden verschiedene Ansätze zur Therapie von Tumoren entwickelt, welche darauf abzielen, eine Tumor-Immunevasion durch Inhibition von *Checkpoints* zu verhindern. Prominente Beispiele hierfür sind die beiden blockierenden Antikörper Nivolumab und Pembrolizumab, welche sich gegen PD-1 richten.

Neben den T-Zellen spielen auch NK-Zellen eine wichtige Rolle bei der Immunüberwachung.³ Bereits in den 1980er Jahren wurde die Wichtigkeit von NK-Zellen bei Studien zu genetischen Erkrankungen wie dem Chédiak-Higashi Syndrom deutlich: Gekennzeichnet durch eine verringerte Funktion der NK-Zellen, konnte eine erhöhte Tumorzinzidenz festgestellt werden.^{31, 152, 153} Gleichzeitig wurde auch in verschiedenen Tumorerkrankungen eine reduzierte NK-Zell-Funktion beobachtet.¹⁵⁴⁻¹⁵⁷ Zudem konnte unter anderem gezeigt werden, dass eine defiziente Aktivität der NK-Zellen mit einem höheren Risiko, an verschiedenen Tumorarten zu erkranken, verbunden ist.¹⁵⁸ Bei soliden Tumoren sind NK-Zellen insbesondere zur Verhinderung von Metastasen wichtig.¹⁵⁹⁻¹⁶¹ Ihre Bedeutung bei der Immunüberwachung wurde auch in Mausmodellen demonstriert: Nach Depletion von NK-Zellen konnte so ein gesteigertes Tumorzwachstum und Metastasierung beobachtet werden.^{31, 162, 163} Überdies belegen klinische Daten die Relevanz von NK-Zellen bei der Immunüberwachung bei hämatopoetischen Erkrankungen.¹ Bei der haploidenten Stammzelltransplantation kommt es beispielsweise zu einer Alloreaktivität durch *mismatch* von MHC-Klasse-I-Molekülen auf leukämischen Zellen und den entsprechenden Rezeptoren auf NK-Zellen des Spenders.^{3, 164} Im Vergleich zu gesunden Spendern konnte eine verringerte Anzahl und Aktivität von NK-Zellen im peripheren Blut von Leukämiepatienten nachgewiesen werden. Diese reduzierte Aktivität korrelierte

zudem mit dem Rückfall der Patienten.^{3, 165-167} Die Erforschung von Molekülen, welche die NK-Zell-Reaktivität gegen Tumorzellen regulieren, ist daher von klinischer Bedeutung und unter anderem Fokus dieser Arbeit, um die Immunreaktion modulieren zu können.

Dabei ist jedoch nicht zu vernachlässigen, dass auch Thrombozyten die NK-Zell-vermittelte Immunüberwachung beeinflussen können. Moleküle auf der Oberfläche von Thrombozyten können durch sogenannte Trogozytose auf Tumorzellen übertragen werden.⁶ Dieser Prozess wurde unter anderem von uns beispielsweise für MHC-Klasse-I-Moleküle und den Liganden des inhibitorischen NK-Zell-Rezeptors GITR beschrieben.^{168, 169} Auch lösliche Faktoren von Thrombozyten haben immunmodulatorische Wirkungen. Thrombozyten sekretieren beispielsweise *platelet-derived growth factor* (PDGF), welcher die Interaktion zwischen Immun- und Tumorzellen und folglich die Lyse Letzterer verhindert.^{170, 171} Die Freisetzung von thrombozytärem TGF- β führt weiter dazu, dass NKG2D auf NK-Zellen herunterreguliert wird.¹⁷² Dadurch werden *induced-self* Signale reduziert und Tumorzellen umgehen die Erkennung durch NK-Zellen.⁶

2.3 Tumornekrosefaktor (TNF)/TNF-Rezeptor (TNFR)-Superfamilie

Die TNF/TNFR-Superfamilie ist eine Protein-Familie, die aus insgesamt 29 Rezeptoren und 21 Liganden besteht.^{173, 174} Ihr Name entstammt dem Liganden TNF und seinen beiden Rezeptoren TNFR1 und TNFR2. Rezeptoren dieser Superfamilie gehören zu den Typ-I-Transmembranproteinen (extrazellulärer N-Terminus) und zeichnen sich durch Cystein-reiche Domänen aus. Einige Rezeptoren (z.B. TNFR1 und Fas) besitzen zudem eine sogenannte *death domain* (DD), welche eine Sequenzhomologie in einem etwa 80 Aminosäuren großen Bereich der intrazellulären Domäne aufweist.¹ Viele TNFR-Mitglieder sind in der Lage, eine direkte Bindung mit den Adapterproteinen *TNF receptor-associated factor* (TRAF) einzugehen, über die Signale ins Zellinnere transduziert werden.¹⁷⁵ Dabei fungieren TRAF als eine Art Steuerung zwischen Apoptose-induzierenden und anti-apoptotischen Effekten durch TNFR-Mitglieder.¹ Die Liganden der TNF/TNFR-Superfamilie sind Typ-II-Transmembranproteine (extrazellulärer C-Terminus) und besitzen eine charakteristische konservierte C-terminale Domäne, die *TNF homology domain* (THD), welche für die Bindung an die entsprechenden

Rezeptoren verantwortlich ist.¹⁷³ In ihrer biologisch aktiven Form liegen sie typischerweise als Homotrimer vor und sind sowohl auf der Zelloberfläche als auch in intrazellulären Kompartimenten vorhanden.^{1, 174, 176-178}

Membrangebundene TNF-Mitglieder sind in der Lage, mit entsprechenden Rezeptoren der Superfamilie zu interagieren. Ihre Expression kann durch Zellaktivierung gesteigert werden. Außerdem werden diese Liganden durch *shedding*, z.B. durch Metalloproteasen wie ADAM, von der Zelloberfläche freigesetzt.¹⁷⁴ Entsprechend den Liganden können auch einige Rezeptoren abgeschnitten werden und kompetitieren folglich mit Ligandenwirkung auf Zellen, welche die entsprechenden Rezeptoren ebenfalls exprimieren.^{174, 179} Interessanterweise kann es bei der TNF/TNFR-Superfamilie auch zu Überschneidungen (*crosstalk*) bei verwandten Rezeptor-Liganden-Paaren kommen: So bindet FasL beispielsweise nicht nur an seinen Rezeptor Fas, sondern interagiert zusätzlich mit *decoy receptor 3* (DcR3). Letzterer bindet außerdem LIGHT, ein Ligand für *herpes virus entry mediator* (HVEM) und *lymphotoxin- β receptor* (LT β R).^{149, 174} Eine Übersicht über alle Familienmitglieder sowie mögliche Interaktionen ist in Tabelle 1 dargestellt.

TNF/TNFR-Familienmitglieder sind auf vielen verschiedenen Immunzellen, z.B. APC wie DC, T-Zellen und auch auf malignen Zellen vorhanden.¹⁴⁹ Sie regulieren die Aktivierung, Differenzierung, Proliferation, Apoptose und Überleben dieser Zellen.¹ Dies geschieht hauptsächlich über die Aktivierung von Signalwegen, welche NF- κ B, *JUN N-terminal kinase* (JNK), p42/p44 *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) und p38 MAPK involvieren.¹⁴⁹ Je nach Zelltyp und Kontext kann ein Molekül dabei zum Teil kontroverse Effekte vermitteln: Während CD95 Ligand (CD95L) beispielsweise kostimulatorische Effekte auf CD8⁺ T-Zellen hat und ihre Proliferation fördert, induzieren seine Signale in CD4⁺ T-Zellen hingegen Apoptose.^{1, 180} Auch für CD30 Ligand (CD30L) konnten kostimulatorische Effekte auf T-Zellen beobachtet werden, die im Kontrast zu Signalen über CD30L stehen, welche dieselben Zellen negativ beeinflussen können.^{181, 182} Mittlerweile ist bekannt, dass eine Interaktion von Rezeptor und Ligand zu Signalen führen kann, die über den Rezeptor (*forward signaling*) und über den Liganden (*reverse signaling*) in die Zelle weitergegeben werden.¹⁷⁴

Tabelle 1: Mitglieder der TNF/TNFR-Superfamilie und ihre Interaktionspartner nach Bodmer, 2002 (modifiziert).¹⁷³

Rezeptor	Ligand
?	VEGI
TRAILR1	TRAIL
TRAILR2	TRAIL
TRAILR3	TRAIL
TRAILR4	TRAIL
OPG	TRAIL, RANKL
RANK	RANKL
TRAMP	?
Fn14	TWEAK
DR6	?
NGFR	?
TNFR1	TNF, LT α
TNFR2	TNF, LT α
LT β R	LT $\alpha\beta$ 2, LIGHT
HVEM	LT α , LIGHT
DcR3	LIGHT, FasL
Fas	FasL
CD40	CD40L
CD30	CD30L
CD27	CD27L
4-1BB	4-1BBL
OX40	OX40L
GITR	GITRL
BCMA	APRIL, BAFF
TACI	APRIL, BAFF
BAFFR	BAFF
EDAR	EDA-A1
XEDAR	EDA-A2
TROY	?
RELT	?

Die TNF/TNFR-Superfamilie und ihre Rolle bei der Immunität sowie Pathologie von Tumoren ist Gegenstand intensiver Forschung. Trotzdem sind einzelne Interaktionspartner sowie Funktionen verschiedener Rezeptoren und Liganden noch immer ungesichert. Die TNF/TNFR-Superfamilie und im Speziellen RANK und

sein Ligand stehen auch im Fokus dieser Doktorarbeit. Im ersten Teil der Arbeit wurde die Rolle von RANK und seinem Liganden bei Mechanismen der Metastasierung von soliden Tumoren untersucht. Der zweite Teil adressiert den Einfluss der RANK/RANKL-Achse auf Resistenzmechanismen gegen konventionelle Chemotherapeutika in der akuten myeloischen Leukämie (AML).

2.3.1 **Receptor activator of NF- κ B (RANK) und sein Ligand**

RANK und sein Ligand (RANKL) sind Mitglieder der TNF/TNFR-Superfamilie. Sie spielen eine zentrale Rolle im Knochenmetabolismus und sind an Prozessen der Resorption und Formation von Knochen (*bone remodeling*) beteiligt.^{1, 183} RANKL ist unter anderem auf der Oberfläche von Osteoblasten vorhanden und kann an den Rezeptor RANK binden, der vor allem von Progenitoren der Osteoklasten exprimiert wird. Das führt zu einer Differenzierung Letzterer in aktive Osteoklasten und folglich zu einem Abbau von Knochensubstanz.^{184, 185} RANKL ist ein Homotrimer, das vor allem auf der Membran von Zellen vorkommt.¹ Prozesse wie *shedding* durch Proteasen wie die Matrix Metalloproteinase 14 (MMP14) führen jedoch auch zu einer Freisetzung von löslichem RANKL von der Zelloberfläche.¹⁸⁶ Eine Induktion der Expression wird bei RANKL unter anderem durch Zytokine wie IL-1 und IL-6 sowie Glukokortikoide hervorgerufen.¹

Neben der Bindung an RANK kann RANKL auch mit dem *decoy receptor* Osteoprotegerin (OPG) interagieren, der ebenfalls zur TNF/TNFR-Superfamilie gehört und wie RANKL von Osteoblasten produziert wird.¹⁸⁷ OPG besitzt, anders als die meisten anderen TNFR-Mitglieder, keine Transmembrandomäne und wird als Homodimer löslich freigesetzt. Neben RANKL kann OPG auch mit TRAIL interagieren.¹ OPG ist in der Lage, die Differenzierung von Progenitoren der Osteoklasten zu hemmen. Zudem wird die Aktivierung Letzterer durch OPG unterdrückt und Apoptose gefördert.^{1, 185, 188} In Mausmodellen konnte so gezeigt werden, dass eine Überexpression von OPG in transgenen Tieren sowie die Gabe von rekombinantem OPG in gesunden Mäusen zu Osteopetrose führt.^{1, 189, 190} Mäuse mit OPG-Defizit entwickelten hingegen manifeste Osteoporosen.¹⁹¹

Mittlerweile ist noch ein weiterer Interaktionspartner von RANKL, der *leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 4* (LGR4), bekannt.¹⁹² LGR4 ist in einer Vielzahl verschiedener Gewebe exprimiert und spielt im gesunden System

eine Rolle bei der Entwicklung von physiologischen und entwicklungsbezogenen Prozessen.^{193, 194} Neuere Beobachtungen weisen zudem darauf hin, dass LGR4 in Tumoren hochreguliert und an der Entstehung, der Progression und der Metastasierung von Tumoren beteiligt ist.¹⁹³ RANKL kann die extrazelluläre Domäne von LGR4 binden und durch Aktivierung eines Gαq-Proteins den *glycogen synthase kinase-3β* (GSK3β)-Signalweg hemmen. Dadurch wird die Expression von *nuclear factor of activated T cells 1* (NFATc1), ein zentraler Transkriptionsfaktor der Osteoklastogenese, unterdrückt. Interessanterweise ist LGR4 ein dem RANK/RANKL-Signalweg nachgeschaltetes Target, was darauf hindeutet, dass LGR4 als eine Art Rückkopplungsschleife fungiert, welche die Aktivitäten von RANKL kontrolliert.^{192, 193} OPG und LGR4 kompetieren somit um die Bindung von RANK und RANKL und beeinflussen die aus der Interaktion resultierenden Effekte. Insgesamt wird *bone remodeling* von der Balance zwischen den Interaktionspartnern RANK, RANKL, LGR4 und OPG bestimmt.

RANK besitzt eine zytoplasmatische Domäne, die Bindungsstellen für die Adapterproteine TRAF2, TRAF5 und TRAF6 aufweist.¹⁹⁵⁻¹⁹⁷ Eine Signalübertragung über diese TRAF beeinflusst verschiedene Signalwege und führt z.B. zur Aktivierung von NF-κB und JNK. Während TRAF6 von Bedeutung bei der Osteoklastogenese ist, wurde für TRAF2 und TRAF5 keine zentrale Rolle im Knochenmetabolismus gefunden.¹⁸⁷ Dies deutet auf eine Funktion von RANK und seinem Liganden außerhalb des Knochenstoffwechsels hin. Inzwischen ist bekannt, dass RANK neben Osteoklasten auf einer Vielzahl weiterer Zellen, z.B. Immunzellen wie DC und Tumorzellen vorhanden ist.^{1, 185, 188} Beim Multiplen Myelom ist die Balance zwischen RANKL und OPG zu RANKL verschoben, was eine gesteigerte Osteoklastenaktivierung und Knochenabbau zur Folge hat. In Mausmodellen gelang es, dieses Gleichgewicht durch Behandlung mit RANK-Fc und OPG-Fc, zwei Fusionsproteine zur Neutralisierung von RANKL, wiederherzustellen und so das Fortschreiten der Erkrankung zu hemmen.¹⁹⁸ Weiter ist bekannt, dass leukämische Zellen bei der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) und AML RANKL exprimieren. Dabei kommt es zu *reverse signaling* über RANKL in die Zellen, was beispielsweise zur Freisetzung von Zytokinen wie IL-6, IL-8, TNF und IL-10 führt.^{199, 200} Diese Zytokine dienen als autokrine/parakrine Überlebens- und Wachstumsfaktoren und fördern die Pathophysiologie von

Leukämien.²⁰¹⁻²⁰⁴ Das RANK/RANKL-Molekülsystem beeinflusst auch verschiedene zelluläre Komponente des Immunsystems: Beispielsweise stimuliert RANKL die Funktionen und Überleben von RANK-exprimierenden DC und deren Interaktion mit RANKL-exprimierenden T-Zellen, welche durch DC aktiviert werden.²⁰⁵

Entsprechend der Schlüsselrolle von RANK und RANKL im Knochenmetabolismus wurde ein RANKL-neutralisierender Antikörper, Denosumab, zur Behandlung benigner und maligner Osteolysen entwickelt. Denosumab ist ein humaner monoklonaler Antikörper mit einem IgG2 Teil, durch den toxische Effekte wie Komplementaktivierung und ADCC vermieden werden. Er imitiert die neutralisierenden Effekte von OPG.^{1, 206} Seine Zulassung erfolgte 2010 durch die *United States (U.S.) Food and Drug Administration* (FDA) und 2011 durch die *European Commission* (EC).¹ Interessanterweise konnte in einer Studie mit postmenopausalen Frauen, die an Brustkrebs litten, gezeigt werden, dass Denosumab nicht nur Frakturen verhindert, sondern auch das krankheitsfreie Überleben signifikant verlängert.²⁰⁷ Die Verwendung von Denosumab bei RANK/RANKL modulierten Erkrankungen außerhalb des Knochenstoffwechsels (*drug repurposing*) könnte demnach ein vielversprechender therapeutischer Ansatz sein und steht auch im Fokus dieser Doktorarbeit.

2.4 Mamma- und kolorektales Karzinom als Beispiele solider Tumore

In den nachfolgenden Kapiteln werden das Mammakarzinom sowie das kolorektale Karzinom beschrieben. Beide maligne Erkrankungen sind Gegenstand der Untersuchungen in dieser Doktorarbeit und dienen als Beispiele für häufig auftretende solide Tumore, bei denen Metastasen auftreten.

2.4.1 Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist eine solide Tumorart und die häufigste maligne Tumorerkrankung bei Frauen (23% aller malignen Tumorerkrankungen bei Frauen, etwa 1,3 Millionen Neuerkrankungen jährlich), Männer sind hingegen selten betroffen. 14% der Frauen, welche die Diagnose Mammakarzinom erhalten, sterben jedes Jahr an dieser Erkrankung.²⁰⁸ Auch wenn das Mammakarzinom mittlerweile gut behandelbar ist, treten in etwa 30% der Fälle Tumormetastasen auf, welche

größtenteils verantwortlich für das Versterben der Patienten sind.²⁰⁹ Das Mammakarzinom wird entsprechend der Tumorgröße (T0 bis T4), dem Befall von Lymphknoten (Nx bis N3) und dem Vorliegen von Metastasen (Mx bis M1) in fünf Stadien (Stadium 0 bis IV) eingeteilt, wobei die Therapieerfolgschancen mit zunehmendem Stadium abnehmen.²¹⁰ Die Behandlung erfolgt meist durch Resektion des krankhaften Gewebes, Strahlentherapie sowie systemisch mittels Chemotherapeutika wie Alkylantien und Anthrazyklinen. Auch Hormontherapien und Kombinationen aus verschiedenen Therapien und Therapeutika (z.B. Polychemotherapie) sind möglich.²¹¹

Beim Mammakarzinom handelt es sich um eine komplexe heterogene Erkrankung, welche in die Klassen luminal, basal (*basal-like*) und HER2/neu-überexprimierend eingeteilt wird.⁶ Das Protoonkogen HER2/neu gehört zur Familie der epithelialen Wachstumsfaktoren (*human epidermal growth factor receptor*, HER), welche zelluläre Prozesse wie Überleben, Differenzierung, Proliferation, Adhäsion und Migration regulieren.^{6, 212} Im Gegensatz zu HER1, HER3 und HER4 ist HER2 auf Zellen des Mammakarzinoms bereits pseudo-aktiviert, kann so dimerisieren und Signale in die Zellen transduzieren.^{6, 213} In gesunden Zellen erfolgt keine Signalweiterleitung, da die Rezeptordichte auf der Oberfläche gering ist und keine Mutationen vorhanden sind. HER2/neu vermittelt pro-proliferative bzw. und anti-apoptotische Effekte über den *rat sarcoma* (RAS)/MAPK- bzw. PI3K/AKT/mTOR-Signalweg.⁶ Hohe HER2/neu-Expressionslevel korrelieren mit einem schlechten Krankheitsverlauf.²¹⁴ Dennoch macht HER2/neu die Therapie mit dem humanen monoklonalen Antikörper Trastuzumab möglich, welcher einen Zellzyklusarrest der krankhaften Zellen auslöst, indem er an die juxtamembranäre Domäne von HER2/neu bindet und folglich die Weiterleitung von Signalen verhindert.^{2, 215-217} Trastuzumab kann zudem ADCC induzieren.²¹⁸ Zu bemerken ist, dass Trastuzumab kardiotoxische Effekte haben kann, welche vermutlich auf Herzgewebe zurückzuführen sind, die wie das Mammakarzinom HER2/neu exprimieren.²¹⁵

2.4.2 Kolorektales Karzinom

Wie das Mammakarzinom gehört auch das kolorektale Karzinom zu den soliden Tumoren. Es umfasst maligne Tumore des Dickdarms (Kolon) und des Mastdarms (Rektum). Bei Frauen steht es an zweiter Stelle der häufigsten bösartigen

Tumorerkrankungen, bei Männern an dritter Stelle, wobei Männer absolut häufiger betroffen sind. Das kolorektale Karzinom weist eine erhöhte Inzidenz mit zunehmendem Alter auf: Mehr als die Hälfte aller Patienten ist über 70 Jahre alt.²¹⁹ Dabei entsteht diese Erkrankung meist sporadisch, nur etwa 25% der Fälle hat eine familiäre Ursache. Von besonderer Bedeutung bei der Entstehung des kolorektalen Karzinoms sind auch der Lebensstil sowie Vorerkrankungen des Darms.²²⁰ Das kolorektale Karzinom wird wie das Mammakarzinom in die Stadien 0 bis IV entsprechend der TNM-Kriterien eingeteilt (siehe auch vorherige Kapitel).²¹⁰ Eine Therapie sieht klassischerweise die Entfernung des malignen Gewebes, Bestrahlung und Chemotherapie (z.B. Oxaliplatin und Fluoropyrimidine) sowie Kombinationen daraus vor. Neuere Methoden, welche beispielsweise Gebrauch von monoklonalen Antikörpern wie Cetuximab, Panitumumab und Bevacizumab machen, haben nicht nur die Behandlungsoptionen erweitert, sondern auch das Überleben der betroffenen Patienten deutlich verbessert.²²⁰ Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt heute bei über 60%.²²¹ Dennoch ist zu beobachten, dass sie mit zunehmendem Stadium stark abnimmt, nicht zuletzt wegen der häufig auftretenden Streuung von Tumorzellen z.B. in die Leber und das Peritoneum.^{221, 222} Die Verhinderung von Metastasen ist ein entscheidender Faktor, um solide Tumore erfolgreich therapieren zu können. Entsprechend besteht die Notwendigkeit, die Mechanismen, welche Metastasierung induzieren und begünstigen, besser zu verstehen und auf dieser Grundlage neue, den Prozess der Metastasierung hemmende Therapien zu entwickeln. Untersuchungen zugrundeliegender Mechanismen der Metastasierung sind auch ein Teil dieser Arbeit. Zudem werden mögliche Behandlungen diskutiert, um diese Mechanismen zu blockieren und folglich Metastasen beim Mamma- und kolorektalen Karzinom als Beispiele für solide Tumore zu verhindern.

2.5 Akute myeloische Leukämie (AML)

Die AML ist eine bösartige Erkrankung der Myelopoese und die häufigste akute Leukämie bei Erwachsenen.^{3, 223} Sie tritt zumeist in einem Alter zwischen 60 und 65 Jahren auf.²²⁴ Die AML entsteht in einem ersten Schritt durch die klonale Expansion myeloider Vorläuferzellen, den sogenannten leukämischen Stammzellen, die in einem weiteren Schritt in Akkumulierung von reifungsgestörten, funktionsunfähigen

leukämischen Zellen im Knochenmark resultiert.^{3, 225} Die oft mehr als 100.000 Leukozyten pro μL Blut verdrängen gesunde Zellen der Hämatopoese und können eine Knochenmarkinsuffizienz, Anämie, Granulozytopenie und Thrombozytopenie zur Folge haben.³ Leukämiezellen werden zudem oft ins periphere Blut und Organe außerhalb des Knochenmarks ausgeschwemmt.²²⁶

Der primäre Schritt bei der Diagnose einer AML ist die Abgrenzung von der akuten lymphatischen Leukämie (ALL). Dabei werden die medullären Zellen in einem Lichtmikroskop und ebenfalls Ausstriche aus dem Blut von Patienten untersucht. Nach der Weltgesundheitsorganisation (WHO) liegt eine Leukämie bei mehr als 20% leukämischen Zellen im peripheren Blut oder Knochenmark vor. Davon abgesehen ist von einer Leukämie auszugehen, wenn für die Krankheit typische chromosomale Aberrationen nachgewiesen werden.³ Traditionell erfolgt die Klassifizierung von AML-Zellen nach der *French-American-British (FAB) Cooperative Group*, welche die malignen Zellen anhand morphologischer und zytochemischer Eigenschaften in die Subtypen M0 bis M7 untergliedert (siehe Tabelle 2).^{3, 227, 228} Die FAB-Klassifizierung wurde 2001 von einer neueren Klassifizierung der WHO abgelöst (Aktualisierungen 2008 und 2016), welche zusätzlich immunologische und genetische Beobachtungen mit einbezieht (siehe Tabelle 3). Die Primärdiagnostik bei der AML schließt auch eine Immunphänotypisierung mittels Durchflusszytometrie mit ein.³ Dabei wird die Expression von Oberflächenantigenen wie CD13, CD33 und CD117 ermittelt und myeloische Blasten nach Kriterien der *European Group for the Immunological Characterization of Leukemias* (EGIL) identifiziert.^{3, 229} Die Einteilung in immunologische Subtypen gestaltet sich dabei oft schwierig, da die AML eine sehr heterogene Erkrankung mit einer großen Variabilität an exprimierten Markern ist. Chromosomale Aberrationen werden in weiteren Untersuchungen mithilfe von zytologischen Analysen beurteilt.³ Gemäß der Klassifizierung des *European LeukemiaNet* (ELN) von 2017 kann die AML schließlich in drei prognostische Risikogruppen eingeteilt werden: günstige Prognose, intermediäres Risiko und ungünstige Prognose.²³⁰

Die Behandlung der AML besteht aus zwei Stufen: der Induktionstherapie und Konsolidierungstherapie. Die Induktionstherapie zielt auf eine komplette Remission (*complete remission*, CR) im Sinne einer morphologischen Eliminierung aller

leukämischen Zellen und der Regeneration der gesunden Hämatopoese ab. Bei der Konsolidierungstherapie soll dieser Zustand aufrechterhalten werden. Die heute gängigen Chemotherapeutika zur Behandlung einer AML sind das Pyrimidinanalogon Cytarabin (Ara-C) sowie Anthrazykline wie Doxorubicin und Daunorubicin.^{3, 231} Routinemäßig wird die Induktion nach dem Schema 3+7 durchgeführt, d.h. einer dreitägigen Gabe von Anthrazyklinen kombiniert mit einer siebentägigen Behandlung mit Ara-C. Liegt eine primär refraktäre Erkrankung vor, d.h. es besteht kein Therapieansprechen nach ein bis zwei Zyklen, werden Salvagetherapien (z.B. Ara-C in hoher Dosis) durchgeführt. Einzig die Promyelozyten-Leukämie kann heute chemotherapiefrei mit einer Kombination aus All-Trans-Retinoinsäure (ATRA) und Arsentrioxid (ATO) behandelt werden.²³² Zur Erhaltung der kompletten Remission werden Strategien eingesetzt, die sich nach Alter und körperlicher Verfassung, der Erkrankung (Klassifikation und Risiko) sowie der Möglichkeit einer Stammzelltransplantation unterscheiden. So kann z.B. eine Stammzelltransplantation nach Therapie mit hochdosiertem Ara-C durchgeführt werden.³

Tabelle 2: FAB-Klassifizierung der AML, übernommen von Rothfelder, 2018 (modifiziert).³

FAB-Typ	Differenzierungsstadium
M0	Undifferenzierte Leukämie
M1	Myeloblasten-Leukämie ohne Ausreifung
M2	Myeloblasten-Leukämie mit Ausreifung
M2baso	Basophilen-Leukämie
M3	Promyelozyten-Leukämie
M3v	Variante der Promyelozyten-Leukämie
M4	Myelomonozytäre Leukämie
M4eo	Myelomonozytäre Leukämie mit abnormen Eosinophilen
M5a	Monoblasten-Leukämie
M5b	Monozyten-Leukämie
M6	Erythroblasten-Leukämie
M7	Megakaryoblasten-Leukämie

Tabelle 3: WHO-Klassifizierung der AML, übernommen von Rothfelder, 2018 (modifiziert).³

Kategorie	Leukämieformen
AML mit wiederkehrenden zytogenetischen Anomalien	AML mit t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
	AML mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
	Akute Promyelozyten-Leukämie – mit <i>PML-RARA</i>
	AML mit t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i>
	AML mit t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>
	AML mit inv(3)(q21.3q26.2) oder t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM</i>
	AML (megakaryoblastisch) mit t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15-MKL1</i>
	Provisorische Entitäten:
	AML mit <i>BCR-ABL1</i>
	AML mit mutiertem <i>NPM1</i>
AML mit biallelischen Mutationen von <i>CEBPA</i>	
AML mit mutiertem <i>RUNX1</i>	
AML mit multilineärer Dysplasie	
Therapieinduzierte AML	
AML nicht anderweitig klassifizierbar (<i>not otherwise specified</i> (NOS))	AML, undifferenziert (FAB M0)
	AML ohne Ausreifung (FAB M1)
	AML mit Ausreifung (FAB M2)
	Akute myelomonozytäre Leukämie (FAB M4)
	Akute monoblastische und monozytäre Leukämie (FAB M5a, b)
	Akute Erythroblasten-Leukämie (FAB M6)
	Akute Megakaryoblasten-Leukämie (FAB M7)
	Akute Basophilen-Leukämie (M2baso)
Akute Panmyelose mit Myelofibrose	
Myeloisches Sarkom	
Myeloische Proliferationen bei Down-Syndrom	Transient abnormale Myelopoesen Myeloische Leukämie assoziiert mit Down-Syndrom
Blastische plasmazytoide dendritische Zell-Neoplasien	

Die heute verfügbaren Therapeutika haben die AML weitestgehend behandelbar gemacht, wobei der Therapieerfolg (*patient outcome*) mit dem Ansprechen auf die Behandlungen korreliert.^{233, 234} Dennoch treten Komplikationen wie refraktäre Fälle und behandlungsresistente Leukämiezellen auf, welche die Prognose verschlechtern und zu einer 5-Jahres-Überlebensrate von lediglich 30% führen.^{235, 236} Mögliche Mechanismen, die zu Chemotherapie-Resistenzen führen, werden in dieser Arbeit diskutiert. Auch wenn in den letzten Jahren vielversprechende neue Therapien entwickelt und zugelassen wurden (z.B. die Kombinationstherapie mit dem Bcl2-Inhibitor Venetoclax), besteht die Notwendigkeit zur Entwicklung besserer Behandlungsmethoden, welche die Entdeckung neuer Targets in der AML voraussetzt.²³⁷⁻²³⁹

3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Folgenden sind die Ergebnisse zweier Publikationen, die dieser kumulativen Doktorarbeit zu Grunde liegen, zusammenfassend dargestellt. Beide Publikationen sind im Anhang beigefügt.^{240, 241}

3.1 Die Rolle von thrombozytärem RANKL bei der NK-Zell-Reaktivität gegen solide Tumore

Thrombozyten spielen eine zentrale Rolle bei der Tumorprogression und Metastasierung.^{106, 107} Sie adhären an im Blutstrom zirkulierende Tumorzellen und bilden mit diesen Aggregate, setzen dabei Wachstumsfaktoren frei, erleichtern die Adhäsion der Tumorzellen an die endotheliale Barriere und induzieren beispielsweise EMT.^{6, 107, 110-112} Zudem begünstigen Thrombozyten die Immunevasion von Tumorzellen.⁶ Studien in Mäusen zeigten, dass Thrombozyten hierbei die malignen Zellen vor der Eliminierung durch NK-Zellen schützen.^{168, 169} Die NK-Zell-Effektorfunktion kontrolliert Prozesse wie Metastasierung über eine Vielzahl inhibitorischer und aktivierender Signale, welche über immunmodulatorische Oberflächenmoleküle transduziert werden.³¹ So exprimieren sie verschiedene TNF/TNFR-Familienmitglieder.⁹⁴⁻⁹⁷ Beobachtungen von uns in hämatologischen Erkrankungen zeigten bereits, dass das TNFR-Mitglied RANK auf NK-Zellen vorhanden ist und Signale über RANK deren anti-Tumor Reaktivität inhibieren.^{199, 200} Interessanterweise konnte sein Ligand weiter auf TRAP-6-aktivierten Thrombozyten nachgewiesen werden, wo RANKL die Funktion von DC modulierte.²⁴²

Aufgrund dieser Beobachtungen entwickelten wir die Hypothese, dass thrombozytärer RANKL an RANK-exprimierende NK-Zellen binden und deren Reaktivität gegen maligne Zellen inhibieren könnte. So könnte die RANK/RANKL-Achse zur Tumorevasion beispielsweise beim Mammakarzinom und kolorektalen Karzinom beitragen. Ziel des Projektes war entsprechend die Analyse der Expressionslevel von RANK auf NK-Zellen und thrombozytärem RANKL von Patienten mit Mamma (BC)- oder kolorektalem Karzinom (CC) im Vergleich zu gesunden Spendern (HD). Schließlich sollte auch der Einfluss von aus Thrombozyten stammendem RANKL (pRANKL) auf die NK-Zell-Reaktivität gegen diese beiden Tumorarten untersucht werden.

In einem ersten Schritt analysierten wir die Expression verschiedener TNFR-Mitglieder (CD40, GITR, HVEM, OX40, RANK) auf Lymphozyten aus dem peripheren Blut von BC, CC und gesunden Spendern (HD). Die Expressionsmuster variierten zwischen den einzelnen Patienten und Spendern. Auffällig waren hierbei vor allem die RANK-Expressionslevel auf NK-Zellen: Wir konnten im Vergleich zu den HD eine substantielle Expression von RANK auf den NK-Zellen von BC und CC detektieren, wobei die Expression auf der CD56^{dim} Population signifikant höher war als auf CD56^{bright} NK-Zellen.

Als Nächstes untersuchten wir daher die funktionelle Relevanz von RANK auf NK-Zellen im Bezug auf deren Reaktivität gegen solide Tumore. Hierfür wurden polyklonale NK-Zellen (pNKC) mit vergleichbaren RANK-Expressionslevels wie NK-Zellen von BC und CC verwendet. Als Zielzellen dienten die beiden Zelllinien MCF-7 (Mammakarzinom) und HCT 116 (Kolorektalkarzinom). Eine Analyse von Kulturüberständen zeigte, dass die Anwesenheit von Tumorzellen wie erwartet die IFN- γ -Produktion durch NK-Zellen stimuliert. Die Stimulation von RANK mit rekombinantem RANKL reduzierte diese Produktion deutlich, wenn RANK⁺ Effektorzellen verwendet wurden, nicht jedoch bei der RANK⁻ NK92-Zelllinie. Wir stellten außerdem fest, dass die Proliferation von Tumorzellen in Anwesenheit von NK-Zellen erhöht war, wenn Letztere im Vergleich zu unbehandelten NK-Zellen einen RANK-Stimulus erhielten. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Stimulation von RANK Tumorzellen vor dem Angriff der NK-Zellen schützt.

Weiter untersuchten wir das Expressionsmuster verschiedener Liganden aus der TNF-Familie (CD40L, GITRL, LIGHT, OX40L, RANKL) auf Thrombozyten von BC, CC und HD und stellten eine starke interindividuelle Variabilität fest. Interessanterweise waren die Expressionslevel der analysierten Liganden auf den Thrombozyten von HD zumeist höher als von BC und CC und konnten durch Aktivierung der Thrombozyten weiter gesteigert werden.

Basierend auf den Expressionsdaten sowie der RANK-vermittelten Inhibierung von NK-Zell-Effektorfunktionen aus vorangegangenen Versuchen untersuchten wir schließlich die funktionelle Rolle von pRANKL bei der NK-Zell-Reaktivität gegen BC- und CC-Zellen. Hierfür koinkubierten wir RANK⁺ pNKC mit MCF-7- und HCT 116-Zellen in der Anwesenheit oder Abwesenheit RANKL-exprimierender Thrombozyten und analysierten die Ausschüttung von IFN- γ durch NK-Zellen in den

Kulturüberstand sowie die Proliferation der Tumorzellen. Zum einen konnten wir beobachten, dass die Tumorzellen RANKL pseudo-exprimierten, was auf Trogozytose hindeutet. Zum anderen waren die Freisetzung von IFN- γ und Proliferation reduziert, wenn die Tumorzellen mit Thrombozyten vorinkubiert worden waren. Um die Relevanz von pRANKL nachzuweisen, blockierten wir die RANK/RANKL-Interaktion mit dem RANKL-neutralisierenden Antikörper Denosumab, wodurch die NK-Zell-Funktion wiederhergestellt werden konnte. Die Wirkung von Denosumab war tatsächlich auf die Blockade der pRANKL/RANK-Achse zurückzuführen, da bei der Verwendung von RANK⁻ NK92-Zellen kein Einfluss auf die NK-Zell-Reaktivität beobachtet wurde.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass der Rezeptor RANK auf NK-Zellen und sein Ligand auf Thrombozyten von BC und CC exprimiert ist und dass deren Interaktion die anti-Tumor Reaktivität von NK-Zellen hemmt. Letztere kann durch Denosumab gesteigert werden, was klinisch dazu dienen könnte, eine Metastasierung zu verhindern.

3.2 Die Rolle von RANK bei der Chemotherapie-Resistenz in der AML und ihrem Krankheitsverlauf

Trotz intensiver Bemühungen ist die Prognose von Patienten mit AML immer noch schlecht. Dies liegt wesentlich am Auftreten von refraktären Erkrankungen und Rückfällen durch therapieresistente leukämische Zellen.^{235, 236} Daher besteht die Notwendigkeit, neue Therapien zu entwickeln, was die Entdeckung neuer Targets voraussetzt.^{238, 239} Hierfür ist es wichtig, die molekularen Mechanismen zu verstehen, welche die Wirksamkeit einer Behandlung beeinflussen und potenziell auch vorhersagen lassen, um so den Therapieerfolg zu verbessern. Das RANK/RANKL-Molekülsystem ist wesentlich für seine zentrale Bedeutung beim Knochenmetabolismus bekannt, spielt jedoch auch eine Rolle bei anderen zellulären Mechanismen, beispielsweise bei Erkrankungen des hämatopoetischen Systems wie der CLL.^{1, 183, 199}

Auf dieser Basis stellten wir die Hypothese auf, dass die RANK/RANKL-Achse auch bei Therapieresistenzen in der AML involviert sein könnte. Im ersten Schritt analysierten wir die Expression von RANK auf AML-Zelllinien und Primärmaterial von AML-Patienten und verglichen diese Expressionsdaten mit durchflusszyto-

metrischen Analysen von CD34⁺ Progenitorzellen von HD. Wir stellten eine substantielle, wenn auch variable Expression von RANK sowohl auf den Zelllinien als auch dem Primärmaterial fest, wobei Patienten der FAB-Typen M4 und M5 eine höhere Expression als M0- bis M2-Subtypen aufwiesen. Eine Analyse von RANK auf RNA-Ebene bestätigte diese Expression von RANK auf AML-Zellen, auch wenn Protein- und *messenger* (m)RNA-Level nicht miteinander korrelierten. Bei den CD34⁺ Progenitorzellen aus HD konnten keine relevanten RANK-Proteinlevel detektiert werden.

Um die Funktionalität von RANK in der AML zu überprüfen, untersuchten wir als Nächstes die Effekte einer Stimulation von RANK auf primären Leukämiezellen hinsichtlich der Freisetzung von Zytokinen, die mit der Pathophysiologie der Erkrankung assoziiert sind. Hierfür verwendeten wir das multimere Fusionsprotein Fc-hRANKL. Die Signalweiterleitung über RANK in AML-Zellen zeigte eine substantielle Sekretion von IL-6, IL-8, TNF und IL-10 mit hoher interindividueller Varianz. Mittels intrazellulärer Durchflusszytometrie konnten wir zudem nachweisen, dass tatsächlich die leukämischen Zellen selbst diese Zytokine produzieren. Außerdem stellten wir fest, dass die Stimulation von RANK die metabolische Aktivität als Indikator der Zellproliferation und Viabilität in den primären AML-Zellen erhöhte. Dies deutet darauf hin, dass der RANK-Signalweg aktivierende Signale in Leukämiezellen überträgt.

Basierend auf der Beobachtung, dass RANK die Zellviabilität beeinflusst, wurde schließlich analysiert, ob Signale über RANK in AML-Zellen eine Resistenz gegenüber Chemotherapeutika vermitteln. Wir inkubierten primäre AML-Zellen mit oder ohne Fc-hRANKL gefolgt von einer Behandlung mit Ara-C oder Doxorubicin und analysierten die ATP-Level, das mitochondriale Membranpotential und die intrazelluläre Caspaseaktivität (Caspase 3) als Messgrößen für Apoptose. Alle Analysen zeigten, dass Signalübertragung über RANK die leukämischen Zellen vor einem medikamenten-induzierten Zelltod schützt und somit eine Resistenz gegen Chemotherapie vermittelt. Zu bemerken ist dabei, dass die Effekte bei einer Behandlung mit trimerem RANKL ähnlich, wenn auch weniger stark ausgeprägt zu beobachten waren als mit Fc-hRANKL.

Zuletzt untersuchten wir, ob die Expression von RANK auf den Leukämiezellen der jeweiligen Patienten mit klinischen Charakteristika und dem Überleben korreliert.

Obwohl wir keinen Zusammenhang mit dem Alter, der Einteilung der AML in primäre versus sekundäre Fälle, prognostische Risikogruppen, Leukozytenzahl und genetischen Aberrationen feststellen konnten, korrelierte die Expression deutlich mit dem Überleben: Hohe RANK-Level gingen mit einem deutlich kürzeren Überleben der AML-Patienten einher und umgekehrt. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der funktionellen Rolle von RANK, die wir in unseren vorangegangenen Versuchen beobachteten, und legen eine prognostische Bedeutung von RANK bei der AML nahe.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass RANK auf AML-Zellen exprimiert ist und eine bisher unbekannte Rolle in Bezug auf die Pathophysiologie der Erkrankung sowie Chemotherapie-Resistenz spielt. RANK könnte somit ein neues Target für die Behandlung der AML sein. Korrelationen mit dem Überleben identifizierten RANK zudem als prognostischen Marker.

4 Diskussion

Die Immunüberwachung ist eine essentielle Fähigkeit des Immunsystems, entartete Zellen zu detektieren und zu eliminieren und gilt als ein *hallmark of cancers*.^{1, 118} Dabei ist die Interaktion zwischen Immun- und Tumorzellen von zentraler Bedeutung: Sie entscheidet über die Eliminierung bzw. den Ausbruch einer Erkrankung. Versagt die Überwachung, können Tumorzellen der Kontrolle durch das Immunsystem entgehen und es entstehen apparente Tumore.¹¹⁹ Auch wenn heute eine Vielzahl an Therapien zur Behandlung von Tumorerkrankungen zur Verfügung steht, sind die Prognosen oftmals weiterhin schlecht. Eine bei soliden Tumoren häufig auftretende Problematik ist zudem der Prozess der Metastasierung. Dabei erlangen Tumorzellen die Fähigkeit, sich aus dem Primärtumorherd kommend über den Blutkreislauf im Körper auszubreiten und so in entfernten Organen Sekundärherde zu bilden.^{108, 109} Mittlerweile ist bekannt, dass Thrombozyten eine wichtige Rolle bei der Metastasierung spielen.¹⁰⁷ Sie adhären an Tumorzellen im Blutkreislauf und werden durch diese Interaktion aktiviert.^{6, 110, 111} Dies führt zur Freisetzung der Faktoren EGF und TGF- β aus den Thrombozyten, wodurch das Überleben und die Proliferation von Tumorzellen begünstigt wird. Zudem begünstigen Thrombozyten die Transmigration und Extravasation von Tumorzellen.^{6, 107} Die Interaktion mit Thrombozyten führt dazu, dass Tumorzellen einen mesenchymalen Phänotypen annehmen, der in einer erhöhten Fähigkeit zur Migration und Invasion sowie Apoptose-Resistenz resultiert.¹¹² Auch NK-Zellen sind von zentraler Bedeutung bei der Entstehung von Metastasen.¹⁵⁹⁻¹⁶¹ Mausmodelle mit soliden Tumoren zeigten, dass eine Depletion von NK-Zellen nicht nur zu einem gesteigerten Tumorwachstum führt, sondern zudem Metastasierung beobachtet werden kann.^{31, 162, 163} Im Allgemeinen überwachen NK-Zellen Prozesse wie Metastasierung unter dem Einfluss einer Vielzahl inhibitorischer und aktivierender Signale, welche über immunmodulatorische Oberflächenmoleküle transduziert werden.

Im Mittelpunkt dieser Doktorarbeit stand der für NK-Zellen inhibitorische Rezeptor RANK und sein Ligand (RANKL). RANK und RANKL gehören zur TNF/TNFR-Superfamilie, deren Mitglieder zelluläre Prozesse wie Aktivierung, Differenzierung, Proliferation, Apoptose und Überleben regulieren.¹ Das RANK/RANKL-Molekülsystem ist vor allem für seine Schlüsselrolle im Knochenmetabolismus

bekannt.^{1, 183} Dabei führt die Bindung von RANKL an seinen Rezeptor zur Differenzierung von RANK-exprimierenden Progenitoren der Osteoklasten und folglich zur Resorption von Knochensubstanz.^{184, 185} Inzwischen weiß man, dass die RANK/RANKL-Achse auch bei verschiedenen anderen zellulären Funktionen und der Pathophysiologie verschiedener Krankheiten, z.B. im hämatopoetischen System, eine wichtige Rolle spielt.^{199, 200, 243}

Im ersten Teil dieser Arbeit untersuchten wir die Effekte von thrombozytärem RANKL auf die NK-Zell-Reaktivität gegen das Mamma- und kolorektale Karzinom, zwei solide Tumorarten, welche Metastasen bilden. Bei einer Analyse verschiedener Mitglieder der TNFR-Familie stellten wir fest, dass RANK auf NK-Zellen von BC und CC Patienten im Vergleich zu HD deutlich hochreguliert ist. Dies steht im Einklang mit früheren Daten, dass verschiedene TNF/TNFR-Familienmitglieder auf NK-Zellen im Zusammenhang mit bösartigen Erkrankungen hochreguliert werden, wo sie die anti-Tumor Reaktivität durch Interaktion mit ihrem entsprechenden Gegenpart auf Tumorzellen modulieren.^{96, 144}

RANKL wurde kürzlich auf TRAP-6-aktivierten Thrombozyten nachgewiesen.²⁴² Dies veranlasste uns, die Expression dieses und anderer Mitglieder der TNF-Familie auf den Thrombozyten von BC, CC und HD zu untersuchen. Es zeigte sich ein stark variables Expressionsprofil der untersuchten Liganden bei den untersuchten Proben der Patienten und Spender, und selbiges galt für ihre entsprechenden Rezeptoren auf Lymphozyten. Diese Untersuchung erweitert die verfügbaren Daten über die Expression von Molekülen der TNF/TNFR-Familie auf Thrombozyten und Lymphozyten.^{94-97, 244-246} Interessanterweise konnten wir bei den HD höhere Expressionslevel der Liganden der TNF-Familie beobachten als bei den Tumorpatienten, welche durch Aktivierung der Thrombozyten gesteigert werden konnten. Eine mögliche Erklärung für diesen scheinbar kontraintuitiven Befund könnte eine umprogrammierte Megakaryopoese sein, die bei Tumorpatienten auftritt.²⁴⁷ Darüber hinaus werden viele Mitglieder der TNF-Familie nach der Interaktion mit ihrem Rezeptor von ligandenexprimierenden Zellen durch *shedding* abgeschnitten. Dies könnte durch die höheren Konzentrationen proteolytischer Matrix-Metalloproteasen begünstigt werden, welche auf Thrombozyten von Patienten mit metastasierten malignen Erkrankungen im Vergleich zu gesunden Kontrollen vorliegen.^{248, 249} Zusammenhänge zwischen den Expressionen von

RANK auf NK-Zellen und RANKL auf Thrombozyten mit dem Krankheitsstadium konnten nicht hergestellt werden, was vermutlich auf die relativ geringe Zahl der Fälle in unserer untersuchten Kohorte zurückzuführen ist. Die Untersuchung einer größeren Patientenkohorte könnte auch zur Etablierung von TNF/TNFR-Mitgliedern als „immunologischer Phänotyp“ und prognostischer Marker im Mamma- und kolorektalen Karzinom dienen.

Weiter konnten wir beobachten, dass die Stimulation von RANK auf NK-Zellen durch aus Thrombozyten stammendem RANKL zu einer Inhibition der NK-Zell-Effektorfunktion gegen maligne Zellen solider Tumore führt. Diese Beobachtungen erweitern Daten zur Rolle von RANK und seinem Liganden bei der Immunüberwachung.^{199, 200, 243} Die Tumorzellen müssen RANKL dabei nicht selbst exprimieren, um sich der Überwachung durch NK-Zellen zu entziehen.²⁵⁰ Vielmehr erhalten sie dieses RANKL-vermittelte Immunprivileg durch Ummantelung mit Thrombozyten, welche dadurch aktiviert werden und die Expression von RANKL weiter hochregulieren. Zu bemerken war, dass die Interaktion von pRANKL und RANK die Produktion von IFN- γ stärker beeinflusste als die Zytotoxizität der NK-Zellen, was sich wiederum mit vorliegenden Beobachtungen zur unterschiedlichen Wirkung der RANK/RANKL-Interaktion auf die NK-Reaktivität gegen Leukämiezellen deckt.²⁰⁰ In Anbetracht der Hemmung der Immunantwort durch RANK/RANKL-Interaktion ist von besonderem Interesse, die Interaktion möglichst therapeutisch zu blockieren. In unserem experimentellen Setting verwendeten wir hierfür den monoklonalen Antikörper Denosumab. Denosumab ist ein humaner IgG2 Antikörper, welcher zur Behandlung benigner und maligner Osteolysen zugelassen ist und RANKL-neutralisierende Effekte von OPG imitiert.^{1, 206} Die Zugabe von Denosumab zu Kokulturen aus Tumorzellen, RANKL⁺ Thrombozyten und RANK⁺ NK-Zellen stellte die durch Thrombozyten-vermittelte Unterdrückung der NK-Zell-Reaktivität wieder her. Dies bestätigte die spezifische Beteiligung von RANK und seinem Liganden bei der Hemmung der NK-Zell-Reaktivität. Zudem könnte diese Beobachtung eine Erklärung für Ergebnisse einer Studie mit postmenopausalen Frauen, die an Brustkrebs litten, sein, bei denen Denosumab nicht nur Frakturen verhinderte, sondern auch das krankheitsfreie Überleben signifikant verlängerte.²⁰⁷ Auch wenn unsere Ergebnisse und Daten sicherlich weitere Untersuchungen erfordern, ist die Verwendung von Denosumab im Sinne

eines *drug repurposing* zur Vorbeugung von Metastasen bei soliden Tumoren wie dem Mamma- und kolorektalen Karzinom attraktiv, da der Antikörper aufgrund seiner Zulassung und somit Verfügbarkeit rasch klinisch evaluiert werden kann. Weiterhin interessant sind unsere Ergebnisse im Lichte von gegenwärtig laufenden Untersuchungen zur klinischen Anwendung von *ex vivo* expandierten bzw. aktivierten NK-Zellen beispielsweise zur Behandlung von Leukämien.^{251, 252} Hier könnte Denosumab die NK-Zell-Effektorfunktionen zusätzlich verstärken, nicht zuletzt, da wir festgestellt haben, dass *ex vivo* expandierte pNKC eine hohe RANK Expression aufweisen, welche bei Interaktion mit RANKL ihre Reaktivität hemmen würde.

Zusammenfassend zeigt der erste Teil dieser Arbeit eine neue Modalität, durch welche Thrombozyten die Immunevasion solider Tumore ermöglichen und legt zudem *repurposing* von Denosumab außerhalb seines zugelassenen Anwendungsbereichs, z.B. zur Vorbeugung von Metastasen, nahe.

Wie bereits beschrieben, wurde nachgewiesen, dass das RANK/RANKL-Molekülsystem unter anderem auch bei zellulären Funktionen und der Pathophysiologie von Erkrankungen des hämatopoetischen Systems involviert ist.^{199, 200, 243} Entsprechend untersuchten wir in einem zweiten Teil der Arbeit, ob der Rezeptor RANK eine Rolle in der AML spielt. Die AML ist die häufigste akute Leukämie bei Erwachsenen und trotz zahlreicher neuer Therapieoptionen wie mutationsspezifischer zielgerichteter Therapien (z.B. *FMS-like tyrosine kinase 3* (FLT3)-Inhibitoren), Apoptose-kontrollierender Therapien (z.B. Bcl2-Inhibitoren) und immunbasierter Therapien (z.B. Checkpoint-Inhibitoren) mit einer schlechten Prognose und einem geringen Überleben der Betroffenen behaftet. Problematisch sind vor allem refraktäre Fälle sowie Fälle mit therapieresistenten Leukämiezellen, die zu Rückfällen führen.^{223, 235, 236, 239}

Bei einer durchflusszytometrischen Analyse von insgesamt 54 AML-Patientenproben konnten wir eine substantielle, wenn auch variable Expression von RANK auf der Oberfläche der leukämischen Zellen detektieren, wobei Patienten mit differenzierteren Leukämien (FAB-Typen M4 und M5) eine höhere Expression als Patienten mit undifferenzierterer AML (M0 bis M2) aufwiesen. Interessanterweise konnten wir keine Korrelation zwischen den RANK-mRNA-Levels und der Oberflächenexpression feststellen, was auf posttranskriptionelle/posttranslationale

Mechanismen, welche die Oberflächenexpression beeinflussen, hinweist. Dieses Phänomen konnten wir und andere auch bereits bei weiteren Mitgliedern der TNF/TNFR-Superfamilie wie RANKL, GITR/L, OX40 und *B cell activating factor* (BAFF) beobachten.^{95, 199, 253, 254}

Unsere *ex vivo* Studie identifizierte RANK zudem als wichtigen Regulator zellulärer Funktionen und damit als potenzielles Ziel für therapeutische Ansätze: Nach RANK-Stimulation beobachteten wir eine gesteigerte Freisetzung der Zytokine IL-6, IL-8, TNF und IL-10, die bei der AML als autokrine/parakrine Wachstums- und Überlebensfaktoren fungieren und zur Pathophysiologie der Erkrankung beitragen.^{202-204, 255} So wurde beispielsweise gezeigt, dass ein Knockout von IL-6 in Stromazellen des Knochenmarks die Chemotherapiesensitivität von AML-Zellen erhöht.²⁵⁶ Ebenso wurde bereits beschrieben, dass IL-8 die Proliferation und Chemotherapie-Resistenz fördert.²⁵⁷ IL-10 steuert das Überleben von AML-Zellen über autokrine Mechanismen und die Hochregulierung von E-Cadherin, das als Überlebensfaktor wirkt.²⁵⁸ Für TNF wird angenommen, dass es eine positive Rückkopplungsschleife mit NF- κ B bildet, die zu einem verstärkten Fortschreiten der Leukämie führt.²⁵⁹ Zudem konnte nachgewiesen werden, dass hohe TNF-Level im Serum von AML-Patienten mit einem schlechteren ereignisfreien sowie gesamten Überleben einhergehen.²⁰¹ In Übereinstimmung mit diesen Daten konnten wir in unserer Studie zeigen, dass die Stimulation von RANK auf leukämischen Zellen die Zellviabilität steigert und vor Apoptose schützt. Dies war auch der Fall, wenn die Zellen mit Doxorubicin oder Cytarabin, zwei gängigen Chemotherapeutika zur Behandlung der AML, inkubiert wurden: Wir beobachteten eine Erhöhung der ATP-Level, des mitochondrialen Membranpotentials sowie eine vermehrte Aktivierung von intrazellulärer Caspase 3 bei AML-Zellen mit RANK-Stimulus im Vergleich zu unstimulierten Zellen.

Die Relevanz von RANK in der AML konnte weiterhin durch die Beobachtung untermauert werden, dass die Oberflächenexpression von RANK mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf korreliert: Wir beobachteten einen klaren Zusammenhang zwischen RANK-Positivität und kürzerem Überleben der untersuchten Patienten, was die RANK-Oberflächenexpression als potenziellen neuen prognostischen Marker in der AML identifiziert. Interessanterweise war die Korrelation mit dem Krankheitsverlauf eindeutig signifikant, obwohl die Kohorte von

54 Patienten, die in unsere Studie aufgenommen wurden, relativ klein war. Dennoch sind weitere Analysen in größeren Kohorten erforderlich, um unsere Ergebnisse zu bestätigen und die Verwendbarkeit von RANK als prognostischen Marker in der AML zu validieren. Zu bemerken ist, dass wir zuzüglich zu unseren Oberflächenexpressionsdaten auch die Genexpression von RANK in der AML aus Datensätzen von cBioPortal für Krebsgenomik mit dem Überleben von AML-Patienten analysierten und keinen Zusammenhang beobachten konnten. In Anbetracht dessen, dass die RANK-mRNA- und Proteinspiegel in AML-Zellen nicht korrelieren, erklärt sich nicht nur diese scheinbare Diskrepanz, sondern auch die Relevanz einer tatsächlichen Analyse der Oberflächenexpression, wie wir sie in unserer Studie durchgeführt haben.

RANK interagiert mit verschiedenen TRAF-Molekülen, z.B. TRAF6, die unter anderem mit der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B verbunden sind.²⁶⁰ NF- κ B wird im Allgemeinen eine überlebensfördernde Rolle zugeschrieben, z.B. durch die Induktion der Expression von Caspase-Inhibitoren (*inhibitors of apoptosis*, IAP) und Mitochondrien-vermittelter Zelltod-Inhibitoren wie *Bcl-extra large* (Bcl-xL).^{261, 262} Zudem weiß man, dass NF- κ B eine die Onkogenese fördernde Eigenschaft bei Säugetieren besitzt.²⁶³ Die Verhinderung von Zelltod durch die Induktion von Inhibitoren bei der Aktivierung von NF- κ B könnte auch ein möglicher Signalweg für die in unserer Studie beobachteten schützenden Effekte von RANK in der AML sein. Neuere Erkenntnisse über die Resistenz von AML-Zellen, z.B. bei der Testung neuer Multikinase-Inhibitoren zur Behandlung der AML, weisen ebenfalls auf Mechanismen im Zusammenhang mit NF- κ B hin.²⁶⁴ Zusammen mit unseren Ergebnissen unterstreichen diese Daten weiter das Potenzial der therapeutischen RANK-Modulation, um leukämische Zellen für eine Behandlung zu sensibilisieren. Beispielsweise könnte die Interaktion von RANK und RANKL und somit die RANK-Signalweiterleitung durch den Einsatz des RANKL-neutralisierenden Antikörpers Denosumab gehemmt werden. Dies ist umso wichtiger, wenn man bedenkt, dass die AML im Knochenmark entsteht, wo verschiedene Zelltypen zum Teil hohe RANKL Expressionslevel aufweisen.^{184, 199, 200} Die Kontrolle der Tumormikroumgebung ist weiterhin attraktiv, da diese nachgewiesenermaßen eine wichtige Rolle bei der Transformation und Entwicklung

maligner Erkrankungen des hämatopoetischen Systems sowie der Chemotherapie-Resistenz spielt.^{265, 266}

Zusammenfassend liefert dieser Teil der Arbeit die ersten Belege dafür, dass RANK auf AML-Zellen vorhanden ist und Chemotherapie-Resistenz in der AML vermittelt. Darüber hinaus identifiziert die Assoziation der Expression mit dem Krankheitsverlauf den Rezeptor als potenziellen "funktionellen" Prognosemarker und Target für therapeutische Interventionen, um das Therapieansprechen der Patienten zu verbessern.

5 Ausblick

Die Ergebnisse aus dem ersten Teil dieser Arbeit zeigen einen neuen Mechanismus auf, über welchen solide Tumore der NK-Zell-vermittelten Immunüberwachung entgehen können: Thrombozytärer RANKL inhibiert die NK-Zell-Reaktivität gegen das Mamma- und kolorektale Karzinom, welche durch Blockade der RANK/RANKL-Achse mittels Denosumab wiederhergestellt werden kann. Dabei verwendeten wir die beiden Zelllinien MCF-7 und HCT 116, um pRANKL funktionell zu untersuchen. Zukünftige Studien mit Primärmaterial aus BC bzw. CC wären hilfreich und erforderlich, um den hier entdeckten Mechanismus weiter zu validieren und schließlich eine gezielte Translation in die Klinik zu ermöglichen. Von Interesse könnte auch die Analyse der Rolle von thrombozytärem RANKL in weiteren soliden Tumorentitäten wie dem kleinzelligen Lungenkarzinom (*small cell lung cancer*, SCLC), einer sehr aggressiven Tumorart mit der Neigung zur frühen Bildung von Metastasen, sein, um die Erkenntnisse aus dieser Arbeit zu erweitern. Die von uns analysierten TNF/TNFR-Familienmitglieder wiesen ein stark variierendes Expressionsprofil auf den Thrombozyten und Lymphozyten der Patienten und Spender auf. Wir hypothesierten daher, dass diese TNF/TNFR-Mitglieder als eine Art „immunologischer Phänotyp“ die Pathophysiologie der Erkrankungen widerspiegeln und folglich als prognostischer Marker beim Mamma- und kolorektalen Karzinom dienen könnten. Um diese Hypothese zu bestätigen, ist es ebenfalls notwendig, eine größere Patientenkohorte zu untersuchen.

Auch im Rahmen des zweiten Teils dieser Arbeit wäre die Untersuchung einer größeren Kohorte hilfreich, um in diesem Falle RANK als Prognosemarker in der AML zu etablieren. Insgesamt konnten wir in unserer *ex vivo* Studie nicht nur zeigen, dass RANK auf leukämischen Zellen von AML-Patienten exprimiert und seine Expression mit einem schlechten Krankheitsverlauf assoziiert ist, sondern auch dass *forward signaling* über diesen Rezeptor Chemotherapie-Resistenz vermittelt. Eine therapeutische Modulation der Resistenz gegen gängige Chemotherapeutika wie Doxorubicin und Ara-C ist Gegenstand gegenwärtig laufender Arbeiten. So wird untersucht, ob die Stimulation von RANK auf AML-Zellen verhindert werden kann, indem sein Interaktionspartner RANKL durch den monoklonalen Antikörper Denosumab neutralisiert wird. Die Anwendung von Denosumab ist besonders

attraktiv, da Denosumab bereits zugelassen ist und rasch für eine klinische Evaluation zur Verfügung stünde. Zudem sind potenzielle Nebenwirkungen bei der Einnahme von Denosumab gut abschätzbar. In vorläufigen Versuchen konnten wir den resensibilisierenden Effekt von Denosumab bereits beobachten. Dennoch sind weitere Untersuchungen notwendig, um die Wirkung von Denosumab in der AML umfassend zu bestätigen. Interessanterweise konnten wir bereits zeigen, dass AML-Zellen neben RANK, wie in dieser Arbeit beobachtet, außerdem seinen Liganden exprimieren. Auf dieser Grundlage sind auch weitere Analysen nötig und werden gegenwärtig in dieser Arbeitsgruppe durchgeführt, um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Expression und autokrinen/parakrinen Funktion der beiden Moleküle in der AML zu evaluieren.

6 Literaturverzeichnis

1. Schmiedel BJ. Expression, Funktion und therapeutische Modulation von RANKL in der Immunüberwachung von malignen hämatopoetischen Neoplasien durch Natürliche Killerzellen. Dissertation Universität Tübingen 2011.
2. Steinbacher J. Expression, Freisetzung und therapeutische Modulation von Natural killer group 2 member D (NKG2D)-Liganden bei Leukämien: Konsequenzen für die NK-Zell-Reaktivität. Dissertation Universität Tübingen 2014.
3. Rothfelder K. Die Abwesenheit von NKG2D-Liganden auf leukämieinduzierenden Zellen vereint Stammzeleigenschaften und Immunevasion in der akuten myeloischen Leukämie. Dissertation Universität Tübingen 2018.
4. Blom B, Spits H. Development of human lymphoid cells. *Annu Rev Immunol* 2006; 24:287-320.
5. Fey MF. Normal and malignant hematopoiesis. *Ann Oncol* 2007; 18 Suppl 1:i9-i13.
6. Maurer S. Expression, Freisetzung und therapeutische Modulation von NKG2D-Liganden bei metastasierenden Tumorzellen: Konsequenzen für die NK-Zell-Reaktivität. Dissertation Universität Tübingen 2018.
7. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 2010; 11:785-97.
8. Trouw LA, Daha MR. Role of complement in innate immunity and host defense. *Immunol Lett* 2011; 138:35-7.
9. Janeway CA, Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989; 54 Pt 1:1-13.
10. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 1997; 9:4-9.
11. Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:593-623.
12. Amarante-Mendes GP, Adjemian S, Branco LM, Zanetti LC, Weinlich R, Bortoluci KR. Pattern Recognition Receptors and the Host Cell Death Molecular Machinery. *Front Immunol* 2018; 9:2379.
13. Underhill DM, Bassetti M, Rudensky A, Aderem A. Dynamic interactions of macrophages with T cells during antigen presentation. *J Exp Med* 1999; 190:1909-14.
14. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:197-216.
15. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:767-811.
16. Tonegawa S. Somatic generation of immune diversity. *Biosci Rep* 1988; 8:3-26.

17. Tonegawa S. Antibody and T-cell receptors. *JAMA* 1988; 259:1845-7.
18. Davis MM, Bjorkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 1988; 334:395-402.
19. Nemazee D. Receptor selection in B and T lymphocytes. *Annual Review of Immunology* 2000; 18:19-51.
20. Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:139-76.
21. Zinkernagel RM. On immunological memory. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 2000; 355:369-71.
22. Zinkernagel RM, Doherty PC. Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature* 1974; 251:547-8.
23. O'Rourke AM, Mescher MF. Cytotoxic T-lymphocyte activation involves a cascade of signalling and adhesion events. *Nature* 1992; 358:253-5.
24. Squier MK, Cohen JJ. Cell-mediated cytotoxic mechanisms. *Curr Opin Immunol* 1994; 6:447-52.
25. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996; 383:787-93.
26. Parker DC. The functions of antigen recognition in T cell-dependent B cell activation. *Semin Immunol* 1993; 5:413-20.
27. Kiessling R, Klein E, Wigzell H. "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol* 1975; 5:112-7.
28. Kiessling R, Klein E, Pross H, Wigzell H. "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol* 1975; 5:117-21.
29. Herberman RB, Holden HT, Ting CC, Lavrin DL, Kirchner H. Cell-mediated immunity to leukemia virus- and tumor-associated antigens in mice. *Cancer Res* 1976; 36:615-21.
30. Yoon SR, Chung JW, Choi I. Development of natural killer cells from hematopoietic stem cells. *Mol Cells* 2007; 24:1-8.
31. Schmied BJ. Fc-optimized antibodies for the treatment of B-cell acute lymphoblastic leukemia and colorectal cancer. Dissertation Universität Tübingen 2020.
32. Paust S, von Andrian UH. Natural killer cell memory. *Nat Immunol* 2011; 12:500-8.
33. Sun JC, Beilke JN, Lanier LL. Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature* 2009; 457:557-61.
34. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 2011; 331:44-9.

35. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaeheri BA, Ghayur T, et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* 2001; 97:3146-51.
36. Fauriat C, Long EO, Ljunggren HG, Bryceson YT. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* 2010; 115:2167-76.
37. Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 1986; 136:4480-6.
38. Cichocki F, Grzywacz B, Miller JS. Human NK Cell Development: One Road or Many? *Front Immunol* 2019; 10:2078.
39. Moretta A. Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:957-64.
40. Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 2005; 23:225-74.
41. Moretta L, Bottino C, Cantoni C, Mingari MC, Moretta A. Human natural killer cell function and receptors. *Curr Opin Pharmacol* 2001; 1:387-91.
42. Ljunggren HG, Malmberg KJ. Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:329-39.
43. Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:836-48.
44. Lanier LL. Natural killer cell receptor signaling. *Curr Opin Immunol* 2003; 15:308-14.
45. Dorner BG, Smith HRC, French AR, Kim S, Poursine-Laurent J, Beckman DL, et al. Coordinate expression of cytokines and chemokines by NK cells during murine cytomegalovirus infection. *Journal of Immunology* 2004; 172:3119-31.
46. Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:850-61.
47. Voskoboinik I, Smyth MJ, Trapani JA. Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:940-52.
48. Screpanti V, Wallin RP, Grandien A, Ljunggren HG. Impact of FASL-induced apoptosis in the elimination of tumor cells by NK cells. *Mol Immunol* 2005; 42:495-9.
49. Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SE, Yagita H, et al. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol* 2005; 42:501-10.
50. Karre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 1986; 319:675-8.
51. Ljunggren HG, Karre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 1990; 11:237-44.

52. Yokoyama WM, Seaman WE. The Ly-49 and NKR-P1 gene families encoding lectin-like receptors on natural killer cells: the NK gene complex. *Annu Rev Immunol* 1993; 11:613-35.
53. Chester C, Fritsch K, Kohrt HE. Natural Killer Cell Immunomodulation: Targeting Activating, Inhibitory, and Co-stimulatory Receptor Signaling for Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* 2015; 6:601.
54. Wu J, Lanier LL. Natural killer cells and cancer. *Adv Cancer Res* 2003; 90:127-56.
55. Pessino A, Sivori S, Bottino C, Malaspina A, Morelli L, Moretta L, et al. Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J Exp Med* 1998; 188:953-60.
56. Pende D, Parolini S, Pessino A, Sivori S, Augugliaro R, Morelli L, et al. Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med* 1999; 190:1505-16.
57. Vitale M, Bottino C, Sivori S, Sanseverino L, Castriconi R, Marcenaro E, et al. NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J Exp Med* 1998; 187:2065-72.
58. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, et al. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:197-223.
59. Brandt CS, Baratin M, Yi EC, Kennedy J, Gao Z, Fox B, et al. The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *J Exp Med* 2009; 206:1495-503.
60. Baychelier F, Sennepin A, Ermonval M, Dorgham K, Debre P, Vieillard V. Identification of a cellular ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. *Blood* 2013; 122:2935-42.
61. Pazina T, Shemesh A, Brusilovsky M, Porgador A, Campbell KS. Regulation of the Functions of Natural Cytotoxicity Receptors by Interactions with Diverse Ligands and Alterations in Splice Variant Expression. *Front Immunol* 2017; 8:369.
62. Bryceson YT, March ME, Barber DF, Ljunggren HG, Long EO. Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells. *J Exp Med* 2005; 202:1001-12.
63. Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 2008; 9:495-502.
64. Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood* 2006; 107:159-66.
65. Biassoni R, Cantoni C, Pende D, Sivori S, Parolini S, Vitale M, et al. Human natural killer cell receptors and co-receptors. *Immunol Rev* 2001; 181:203-14.

66. Mason LH, Anderson SK, Yokoyama WM, Smith HR, Winkler-Pickett R, Ortaldo JR. The Ly-49D receptor activates murine natural killer cells. *J Exp Med* 1996; 184:2119-28.
67. Moretta L, Moretta A. Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *EMBO J* 2004; 23:255-9.
68. Bryceson YT, Chiang SC, Darmanin S, Fauriat C, Schlums H, Theorell J, et al. Molecular mechanisms of natural killer cell activation. *J Innate Immun* 2011; 3:216-26.
69. Raulet DH, Vance RE, McMahon CW. Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:291-330.
70. Raulet DH. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:781-90.
71. Wu J, Song Y, Bakker AB, Bauer S, Spies T, Lanier LL, et al. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 1999; 285:730-2.
72. Billadeau DD, Upshaw JL, Schoon RA, Dick CJ, Leibson PJ. NKG2D-DAP10 triggers human NK cell-mediated killing via a Syk-independent regulatory pathway. *Nat Immunol* 2003; 4:557-64.
73. Upshaw JL, Arneson LN, Schoon RA, Dick CJ, Billadeau DD, Leibson PJ. NKG2D-mediated signaling requires a DAP10-bound Grb2-Vav1 intermediate and phosphatidylinositol-3-kinase in human natural killer cells. *Nat Immunol* 2006; 7:524-32.
74. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 1999; 285:727-9.
75. Cosman D, Mullberg J, Sutherland CL, Chin W, Armitage R, Fanslow W, et al. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 2001; 14:123-33.
76. Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:12445-50.
77. Groh V, Steinle A, Bauer S, Spies T. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science* 1998; 279:1737-40.
78. Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddell SR, Spies T. Costimulation of CD8alpha T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* 2001; 2:255-60.
79. Salih HR, Antropius H, Gieseke F, Lutz SZ, Kanz L, Rammensee HG, et al. Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood* 2003; 102:1389-96.

80. Steinle A, Li P, Morris DL, Groh V, Lanier LL, Strong RK, et al. Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics* 2001; 53:279-87.
81. Lanier LL. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:359-93.
82. Long EO, Burshtyn DN, Clark WP, Peruzzi M, Rajagopalan S, Rojo S, et al. Killer cell inhibitory receptors: diversity, specificity, and function. *Immunol Rev* 1997; 155:135-44.
83. Moretta L, Mingari MC, Pende D, Bottino C, Biassoni R, Moretta A. The molecular basis of natural killer (NK) cell recognition and function. *J Clin Immunol* 1996; 16:243-53.
84. Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Soderstrom K, D'Andrea A, Ogg GS, et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 1998; 391:795-9.
85. Long EO. Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:875-904.
86. Chapman TL, Heikema AP, Bjorkman PJ. The inhibitory receptor LIR-1 uses a common binding interaction to recognize class I MHC molecules and the viral homolog UL18. *Immunity* 1999; 11:603-13.
87. Castriconi R, Dondero A, Augugliaro R, Cantoni C, Carnemolla B, Sementa AR, et al. Identification of 41g-B7-H3 as a neuroblastoma-associated molecule that exerts a protective role from an NK cell-mediated lysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:12640-5.
88. Chamoto K, Al-Habsi M, Honjo T. Role of PD-1 in Immunity and Diseases. *Curr Top Microbiol Immunol* 2017; 410:75-97.
89. Pesce S, Greppi M, Tabellini G, Rampinelli F, Parolini S, Olive D, et al. Identification of a subset of human natural killer cells expressing high levels of programmed death 1: A phenotypic and functional characterization. *J Allergy Clin Immunol* 2017; 139:335-46 e3.
90. Sivori S, Della Chiesa M, Carlomagno S, Quatrini L, Munari E, Vacca P, et al. Inhibitory Receptors and Checkpoints in Human NK Cells, Implications for the Immunotherapy of Cancer. *Front Immunol* 2020; 11:2156.
91. Mariotti FR, Quatrini L, Munari E, Vacca P, Moretta L. Innate Lymphoid Cells: Expression of PD-1 and Other Checkpoints in Normal and Pathological Conditions. *Front Immunol* 2019; 10:910.
92. Mariotti FR, Quatrini L, Munari E, Vacca P, Tumino N, Pietra G, et al. Inhibitory checkpoints in human natural killer cells: IUPHAR Review 28. *Br J Pharmacol* 2020; 177:2889-903.
93. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2012; 12:252-64.
94. Bultz KM, Krusch M, Bringmann A, Brossart P, Mayer F, Kloss M, et al. Cancer immunoediting by GITR (glucocorticoid-induced TNF-related protein) ligand in humans: NK cell/tumor cell interactions. *FASEB J* 2007; 21:2442-54.

95. Buechele C, Baessler T, Wirths S, Schmohl JU, Schmiedel BJ, Salih HR. Glucocorticoid-induced TNFR-related protein (GITR) ligand modulates cytokine release and NK cell reactivity in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Leukemia* 2011; 26:991-1000.
96. Baessler T, Charton JE, Schmiedel BJ, Grunebach F, Krusch M, Wacker A, et al. CD137 ligand mediates opposite effects in human and mouse NK cells and impairs NK-cell reactivity against human acute myeloid leukemia cells. *Blood* 2010; 115:3058-69.
97. Buechele C, Baessler T, Schmiedel BJ, Schumacher CE, Grosse-Hovest L, Rittig K, et al. 4-1BB ligand modulates direct and Rituximab-induced NK-cell reactivity in chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Immunol* 2012; 42:737-48.
98. Kaushansky K. Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Blood* 2008; 111:981-6.
99. Kaushansky K. Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Blood* 1995; 86:419-31.
100. Becker RP, De Bruyn PP. The transmural passage of blood cells into myeloid sinusoids and the entry of platelets into the sinusoidal circulation; a scanning electron microscopic investigation. *Am J Anat* 1976; 145:183-205.
101. Behnke O, Forer A. From megakaryocytes to platelets: platelet morphogenesis takes place in the bloodstream. *Eur J Haematol Suppl* 1998; 61:3-23.
102. Stenberg PE, Levin J. Mechanisms of platelet production. *Blood Cells* 1989; 15:23-47.
103. George JN. Platelets. *Lancet* 2000; 355:1531-9.
104. Grozovsky R, Hoffmeister KM, Falet H. Novel clearance mechanisms of platelets. *Curr Opin Hematol* 2010; 17:585-9.
105. Schubert P, Devine DV. De novo protein synthesis in mature platelets: a consideration for transfusion medicine. *Vox Sang* 2010; 99:112-22.
106. Cassar K, Bachoo P, Brittenden J. The role of platelets in peripheral vascular disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2003; 25:6-15.
107. Gay LJ, Felding-Habermann B. Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer* 2011; 11:123-34.
108. Gui P, Bivona TG. Evolution of metastasis: new tools and insights. *Trends Cancer* 2022; 8:98-109.
109. Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell* 2017; 168:670-91.
110. Jurasz P, Alonso-Escolano D, Radomski MW. Platelet--cancer interactions: mechanisms and pharmacology of tumour cell-induced platelet aggregation. *Br J Pharmacol* 2004; 143:819-26.
111. Kakkar AK, DeRuvo N, Chinswangwatanakul V, Tebbutt S, Williamson RC. Extrinsic-pathway activation in cancer with high factor VIIa and tissue factor. *Lancet* 1995; 346:1004-5.

112. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; 119:1420-8.
113. Labelle M, Begum S, Hynes RO. Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. *Cancer Cell* 2011; 20:576-90.
114. Weinstock MA. Epidemiology, etiology, and control of melanoma. *Med Health R I* 2001; 84:234-6.
115. Ehrlich P. Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneesk* 1909; 5:273-90.
116. Burnet FM. Cancer - a biological approach. *Br Med J* 1957; 1:841-7.
117. Thomas L. Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States. New York: Hoeber-Harper, 1959.
118. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* 2022; 12:31-46.
119. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:715-27.
120. Matzinger P. An innate sense of danger. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 961:341-2.
121. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 2004; 21:137-48.
122. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100:57-70.
123. de Baetselier P, Katzav S, Gorelik E, Feldman M, Segal S. Differential expression of H-2 gene products in tumour cells is associated with their metastatic properties. *Nature* 1980; 288:179-81.
124. Garrido F, Festenstein H, Schirmacher V. Further evidence for depression of H-2 and Ia-like specificities of foreign haplotypes in mouse tumour cell lines. *Nature* 1976; 261:705-7.
125. Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Perez-Villar JJ, Lopez-Botet M, Duggan-Keen M, et al. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today* 1997; 18:89-95.
126. Hui K, Grosveld F, Festenstein H. Rejection of transplantable AKR leukaemia cells following MHC DNA-mediated cell transformation. *Nature* 1984; 311:750-2.
127. Algarra I, Gaforio JJ, Cabrera T, Collado A, Garrido F. The biological consequences of altered MHC class I expression in tumours. *J Biol Regul Homeost Agents* 1999; 13:90-6.
128. Bicknell DC, Rowan A, Bodmer WF. Beta 2-microglobulin gene mutations: a study of established colorectal cell lines and fresh tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:4751-5.
129. Garrido F, Algarra I. MHC antigens and tumor escape from immune surveillance. *Adv Cancer Res* 2001; 83:117-58.

130. Ogino T, Shigyo H, Ishii H, Katayama A, Miyokawa N, Harabuchi Y, et al. HLA class I antigen down-regulation in primary laryngeal squamous cell carcinoma lesions as a poor prognostic marker. *Cancer Res* 2006; 66:9281-9.
131. Kitamura H, Honma I, Torigoe T, Asanuma H, Sato N, Tsukamoto T. Down-regulation of HLA class I antigen is an independent prognostic factor for clear cell renal cell carcinoma. *J Urol* 2007; 177:1269-72.
132. Rolland P, Deen S, Scott I, Durrant L, Spendlove I. Human leukocyte antigen class I antigen expression is an independent prognostic factor in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13:3591-6.
133. Bijen CB, Bantema-Joppe EJ, de Jong RA, Leffers N, Mourits MJ, Eggink HF, et al. The prognostic role of classical and nonclassical MHC class I expression in endometrial cancer. *Int J Cancer* 2010; 126:1417-27.
134. Mizukami Y, Kono K, Maruyama T, Watanabe M, Kawaguchi Y, Kamimura K, et al. Downregulation of HLA Class I molecules in the tumour is associated with a poor prognosis in patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2008; 99:1462-7.
135. Wojtowicz-Praga S. Reversal of tumor-induced immunosuppression: a new approach to cancer therapy. *J Immunother* 1997; 20:165-77.
136. Chen JL, Hunt P, McElvain M, Black T, Kaufman S, Choi ES. Osteoblast precursor cells are found in CD34+ cells from human bone marrow. *Stem Cells* 1997; 15:368-77.
137. Evans DE, Weinberg AD. Boosting T cell costimulation in cancer: the possibilities seem endless. *Int Rev Immunol* 2003; 22:173-94.
138. Appleman LJ, Boussiotis VA. T cell anergy and costimulation. *Immunol Rev* 2003; 192:161-80.
139. Becker JC, Dummer R, Hartmann AA, Burg G, Schmidt RE. Shedding of ICAM-1 from human melanoma cell lines induced by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha. Functional consequences on cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 1991; 147:4398-401.
140. Dummer W, Bastian BC, Ernst N, Schanzle C, Schwaaf A, Brocker EB. Interleukin-10 production in malignant melanoma: preferential detection of IL-10-secreting tumor cells in metastatic lesions. *Int J Cancer* 1996; 66:607-10.
141. Yang L, Pang Y, Moses HL. TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol* 2010; 31:220-7.
142. Salazar-Onfray F. Interleukin-10: a cytokine used by tumors to escape immunosurveillance. *Med Oncol* 1999; 16:86-94.
143. Fernandez-Messina L, Ashiru O, Boutet P, Aguera-Gonzalez S, Skepper JN, Reyburn HT, et al. Differential mechanisms of shedding of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored NKG2D ligands. *J Biol Chem* 2010; 285:8543-51.

144. Baessler T, Krusch M, Schmiedel BJ, Kloss M, Baltz KM, Wacker A, et al. Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related protein ligand subverts immunosurveillance of acute myeloid leukemia in humans. *Cancer Res* 2009; 69:1037-45.
145. Baltz KM, Krusch M, Baessler T, Schmiedel BJ, Bringmann A, Brossart P, et al. Neutralization of tumor-derived soluble glucocorticoid-induced TNFR-related protein ligand increases NK cell anti-tumor reactivity. *Blood* 2008; 112:3735-43.
146. Salih HR, Schmetzer HM, Burke C, Starling GC, Dunn R, Pelka-Fleischer R, et al. Soluble CD137 (4-1BB) ligand is released following leukocyte activation and is found in sera of patients with hematological malignancies. *J Immunol* 2001; 167:4059-66.
147. Jeannin P, Magistrelli G, Aubry JP, Caron G, Gauchat JF, Renno T, et al. Soluble CD86 is a costimulatory molecule for human T lymphocytes. *Immunity* 2000; 13:303-12.
148. Schneider P, Holler N, Bodmer JL, Hahne M, Frei K, Fontana A, et al. Conversion of Membrane-bound Fas(CD95) Ligand to Its Soluble Form is Associated with Downregulation of Its Proapoptotic Activity and Loss of Liver Toxicity. *J Exp Med* 1998; 187:1205-13.
149. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:745-56.
150. Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 2002; 419:734-8.
151. Shin DS, Ribas A. The evolution of checkpoint blockade as a cancer therapy: what's here, what's next? *Curr Opin Immunol* 2015; 33:23-35.
152. Morvan MG, Lanier LL. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nat Rev Cancer* 2016; 16:7-19.
153. Roder JC, Haliotis T, Klein M, Korec S, Jett JR, Ortaldo J, et al. A new immunodeficiency disorder in humans involving NK cells. *Nature* 1980; 284:553-5.
154. Hersey P, Edwards A, Honeyman M, McCarthy WH. Low natural-killer-cell activity in familial melanoma patients and their relatives. *Br J Cancer* 1979; 40:113-22.
155. Nakajima T, Mizushima N, Nakamura J, Kanai K. Surface markers of NK cells in peripheral blood of patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Immunol Lett* 1986; 13:7-10.
156. Schantz SP, Shillitoe EJ, Brown B, Campbell B. Natural killer cell activity and head and neck cancer: a clinical assessment. *J Natl Cancer Inst* 1986; 77:869-75.
157. Pross HF, Lotzova E. Role of natural killer cells in cancer. *Nat Immun* 1993; 12:279-92.

158. Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* 2000; 356:1795-9.
159. Souza-Fonseca-Guimaraes F, Cursons J, Huntington ND. The Emergence of Natural Killer Cells as a Major Target in Cancer Immunotherapy. *Trends Immunol* 2019.
160. Lopez-Soto A, Gonzalez S, Smyth MJ, Galluzzi L. Control of Metastasis by NK Cells. *Cancer Cell* 2017; 32:135-54.
161. Chockley PJ, Chen J, Chen G, Beer DG, Standiford TJ, Keshamouni VG. Epithelial-mesenchymal transition leads to NK cell-mediated metastasis-specific immunosurveillance in lung cancer. *J Clin Invest* 2018; 128:1384-96.
162. Talmadge JE, Meyers KM, Prieur DJ, Starkey JR. Role of NK cells in tumour growth and metastasis in beige mice. *Nature* 1980; 284:622-4.
163. Gorelik E, Wiltrot RH, Okumura K, Habu S, Herberman RB. Role of NK cells in the control of metastatic spread and growth of tumor cells in mice. *Int J Cancer* 1982; 30:107-12.
164. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002; 295:2097-100.
165. Tajima F, Kawatani T, Endo A, Kawasaki H. Natural killer cell activity and cytokine production as prognostic factors in adult acute leukemia. *Leukemia* 1996; 10:478-82.
166. Pierson BA, Miller JS. CD56+bright and CD56+dim natural killer cells in patients with chronic myelogenous leukemia progressively decrease in number, respond less to stimuli that recruit clonogenic natural killer cells, and exhibit decreased proliferation on a per cell basis. *Blood* 1996; 88:2279-87.
167. Lowdell MW, Craston R, Samuel D, Wood ME, O'Neill E, Saha V, et al. Evidence that continued remission in patients treated for acute leukaemia is dependent upon autologous natural killer cells. *Br J Haematol* 2002; 117:821-7.
168. Placke T, Orgel M, Schaller M, Jung G, Rammensee HG, Kopp HG, et al. Platelet-derived MHC class I confers a pseudonormal phenotype to cancer cells that subverts the antitumor reactivity of natural killer immune cells. *Cancer Res* 2012; 72:440-8.
169. Placke T, Kopp HG, Salih HR. Glucocorticoid-induced TNFR-related (GITR) protein and its ligand in antitumor immunity: functional role and therapeutic modulation. *Clin Dev Immunol* 2010; 2010:239083.
170. Placke T, Kopp HG, Salih HR. Modulation of natural killer cell anti-tumor reactivity by platelets. *J Innate Immun* 2011; 3:374-82.
171. Gersuk GM, Westermark B, Mohabeer AJ, Challita PM, Pattamakom S, Pattengale PK. Inhibition of human natural killer cell activity by platelet-derived growth factor (PDGF). III. Membrane binding studies and differential biological effect of recombinant PDGF isoforms. *Scand J Immunol* 1991; 33:521-32.

172. Kopp HG, Placke T, Salih HR. Platelet-derived transforming growth factor-beta down-regulates NKG2D thereby inhibiting natural killer cell antitumor reactivity. *Cancer Res* 2009; 69:7775-83.
173. Bodmer JL, Schneider P, Tschopp J. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends in Biochemical Sciences* 2002; 27:19-26.
174. Lee WH, Seo D, Lim SG, Suk K. Reverse Signaling of Tumor Necrosis Factor Superfamily Proteins in Macrophages and Microglia: Superfamily Portrait in the Neuroimmune Interface. *Front Immunol* 2019; 10:262.
175. Wajant H, Grell M, Scheurich P. TNF receptor associated factors in cytokine signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 1999; 10:15-26.
176. Eck MJ, Sprang SR. The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 A resolution. Implications for receptor binding. *J Biol Chem* 1989; 264:17595-605.
177. Karpusas M, Hsu YM, Wang JH, Thompson J, Lederman S, Chess L, et al. 2 A crystal structure of an extracellular fragment of human CD40 ligand. *Structure* 1995; 3:1031-9.
178. Cha SS, Kim MS, Choi YH, Sung BJ, Shin NK, Shin HC, et al. 2.8 A resolution crystal structure of human TRAIL, a cytokine with selective antitumor activity. *Immunity* 1999; 11:253-61.
179. Sun M, Fink PJ. A new class of reverse signaling costimulators belongs to the TNF family. *J Immunol* 2007; 179:4307-12.
180. Suzuki I, Fink PJ. The dual functions of fas ligand in the regulation of peripheral CD8+ and CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:1707-12.
181. Wiley SR, Goodwin RG, Smith CA. Reverse signaling via CD30 ligand. *J Immunol* 1996; 157:3635-9.
182. Saraiva M, Smith P, Fallon PG, Alcami A. Inhibition of type 1 cytokine-mediated inflammation by a soluble CD30 homologue encoded by ectromelia (mousepox) virus. *J Exp Med* 2002; 196:829-39.
183. Schmiedel BJ, Grosse-Hovest L, Salih HR. A "vicious cycle" of NK-cell immune evasion in acute myeloid leukemia mediated by RANKL? *Oncoimmunology* 2013; 2.
184. Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:3540-5.
185. Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med* 2001; 79:243-53.
186. Hikita A, Yana I, Wakeyama H, Nakamura M, Kadono Y, Oshima Y, et al. Negative regulation of osteoclastogenesis by ectodomain shedding of receptor activator of NF-kappaB ligand. *J Biol Chem* 2006; 281:36846-55.

187. Leibbrandt A, Penninger JM. RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1143:123-50.
188. Wright HL, McCarthy HS, Middleton J, Marshall MJ. RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease. *Curr Rev Musculoskelet Med* 2009; 2:56-64.
189. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89:309-19.
190. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, et al. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 1998; 139:1329-37.
191. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, et al. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998; 12:1260-8.
192. Luo J, Yang Z, Ma Y, Yue Z, Lin H, Qu G, et al. LGR4 is a receptor for RANKL and negatively regulates osteoclast differentiation and bone resorption. *Nat Med* 2016; 22:539-46.
193. Ordaz-Ramos A, Rosales-Gallegos VH, Melendez-Zajgla J, Maldonado V, Vazquez-Santillan K. The Role of LGR4 (GPR48) in Normal and Cancer Processes. *Int J Mol Sci* 2021; 22.
194. Yi J, Xiong W, Gong X, Bellister S, Ellis LM, Liu Q. Analysis of LGR4 receptor distribution in human and mouse tissues. *PLoS One* 2013; 8:e78144.
195. Darnay BG, Haridas V, Ni J, Moore PA, Aggarwal BB. Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF-kappaB (RANK). Interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factors and activation of NF-kappab and c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* 1998; 273:20551-5.
196. Wong BR, Josien R, Lee SY, Vologodskiaia M, Steinman RM, Choi Y. The TRAF family of signal transducers mediates NF-kappaB activation by the TRANCE receptor. *J Biol Chem* 1998; 273:28355-9.
197. Wong BR, Josien R, Choi Y. TRANCE is a TNF family member that regulates dendritic cell and osteoclast function. *J Leukoc Biol* 1999; 65:715-24.
198. Roodman GD. Pathogenesis of myeloma bone disease. *Leukemia* 2009; 23:435-41.
199. Schmiedel BJ, Scheible CA, Nuebling T, Kopp HG, Wirths S, Azuma M, et al. RANKL Expression, Function, and Therapeutic Targeting in Multiple Myeloma and Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Res* 2013; 73:683-94.
200. Schmiedel BJ, Nuebling T, Steinbacher J, Malinowska A, Wende CM, Azuma M, et al. Receptor Activator for NF-kappaB Ligand in Acute Myeloid Leukemia: Expression, Function, and Modulation of NK Cell Immunosurveillance. *J Immunol* 2013; 190:821-31.
201. Tsimberidou AM, Estey E, Wen S, Pierce S, Kantarjian H, Albitar M, et al. The prognostic significance of cytokine levels in newly diagnosed acute

- myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndromes. *Cancer* 2008; 113:1605-13.
202. Kornblau SM, McCue D, Singh N, Chen W, Estrov Z, Coombes KR. Recurrent expression signatures of cytokines and chemokines are present and are independently prognostic in acute myelogenous leukemia and myelodysplasia. *Blood* 2010; 116:4251-61.
203. Binder S, Luciano M, Horejs-Hoeck J. The cytokine network in acute myeloid leukemia (AML): A focus on pro- and anti-inflammatory mediators. *Cytokine Growth Factor Rev* 2018; 43:8-15.
204. Sanchez-Correa B, Bergua JM, Campos C, Gayoso I, Arcos MJ, Banas H, et al. Cytokine profiles in acute myeloid leukemia patients at diagnosis: survival is inversely correlated with IL-6 and directly correlated with IL-10 levels. *Cytokine* 2013; 61:885-91.
205. Wong BR, Josien R, Lee SY, Sauter B, Li HL, Steinman RM, et al. TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *J Exp Med* 1997; 186:2075-80.
206. Schwarz EM, Ritchlin CT. Clinical development of anti-RANKL therapy. *Arthritis Res Ther* 2007; 9 Suppl 1:S7.
207. Gnant M, Pfeiler G, Steger GG, Egle D, Greil R, Fitzal F, et al. Adjuvant denosumab in postmenopausal patients with hormone receptor-positive breast cancer (ABCSG-18): disease-free survival results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2019; 20:339-51.
208. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61:69-90.
209. O'Shaughnessy J. Extending survival with chemotherapy in metastatic breast cancer. *Oncologist* 2005; 10 Suppl 3:20-9.
210. *AJCC Cancer Staging Manual*. Springer International Publishing, 2017.
211. Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Langversion 4.3. Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, 2020.
212. Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *European Journal of Cancer* 2001; 37:S3-S8.
213. Cho HS, Mason K, Ramyar KX, Stanley AM, Gabelli SB, Denney DW, et al. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* 2003; 421:756-60.
214. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, et al. Studies of the Her-2/Neu Proto-Oncogene in Human-Breast and Ovarian-Cancer. *Science* 1989; 244:707-12.

215. Hudis CA. Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med* 2007; 357:39-51.
216. Hung MC, Lau YK. Basic science of HER-2/neu: A review. *Seminars in Oncology* 1999; 26:51-9.
217. Lane HA, Motoyama AB, Beuvink I, Hynes NE. Modulation of p27/Cdk2 complex formation through 4D5-mediated inhibition of HER2 receptor signaling. *Ann Oncol* 2001; 12:21-2.
218. Gennari R, Menard S, Fagnoni F, Ponchio L, Scelsi M, Tagliabue E, et al. Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumors overexpressing HER2. *Clinical Cancer Research* 2004; 10:5650-5.
219. Robert Koch Institut GdeKiDeV. Krebs in Deutschland 2015/2016. 2020; 12.
220. Marmol I, Sanchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodriguez Yoldi MJ. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* 2017; 18.
221. SEER Cancer Stat Facts: Colorectal Cancer (Online: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/colorect.html>; Letzter Zugang 23.02.2022).
222. Pretzsch E, Bosch F, Neumann J, Ganschow P, Bazhin A, Guba M, et al. Mechanisms of Metastasis in Colorectal Cancer and Metastatic Organotropism: Hematogenous versus Peritoneal Spread. *J Oncol* 2019; 2019:7407190.
223. Shallis RM, Wang R, Davidoff A, Ma X, Zeidan AM. Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges. *Blood Rev* 2019; 36:70-87.
224. Dombret H, Raffoux E, Gardin C. Acute myeloid leukemia in the elderly. *Semin Oncol* 2008; 35:430-8.
225. Reilly JT. Pathogenesis of acute myeloid leukaemia and inv(16)(p13;q22): a paradigm for understanding leukaemogenesis? *Br J Haematol* 2005; 128:18-34.
226. Giles FJ, Keating A, Goldstone AH, Avivi I, Willman CL, Kantarjian HM. Acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2002:73-110.
227. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 1976; 33:451-8.
228. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 1985; 103:620-5.
229. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995; 9:1783-6.

230. Dohner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 2017; 129:424-47.
231. Schmoll HJ, Höffken K, Possinger K. *Kompendium Internistische Onkologie*. Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2006.
232. Lo-Coco F, Avvisati G, Vignetti M, Thiede C, Orlando SM, Iacobelli S, et al. Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med* 2013; 369:111-21.
233. Crowther D, Bateman CJ, Vartan CP, Whitehouse JM, Malpas JS, Fairley GH, et al. Combination chemotherapy using L-asparaginase, daunorubicin, and cytosine arabinoside in adults with acute myelogenous leukaemia. *Br Med J* 1970; 4:513-7.
234. Wheatley K, Burnett AK, Goldstone AH, Gray RG, Hann IM, Harrison CJ, et al. A simple, robust, validated and highly predictive index for the determination of risk-directed therapy in acute myeloid leukaemia derived from the MRC AML 10 trial. United Kingdom Medical Research Council's Adult and Childhood Leukaemia Working Parties. *Br J Haematol* 1999; 107:69-79.
235. Ganzel C, Sun Z, Cripe LD, Fernandez HF, Douer D, Rowe JM, et al. Very poor long-term survival in past and more recent studies for relapsed AML patients: The ECOG-ACRIN experience. *Am J Hematol* 2018.
236. SEER Cancer Stat Facts: Acute Myeloid Leukemia. 2011-2017 (Online: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html>; Letzter Zugang 23.02.2022).
237. Vazquez R, Breal C, Zalmai L, Friedrich C, Almire C, Contejean A, et al. Venetoclax combination therapy induces deep AML remission with eradication of leukemic stem cells and remodeling of clonal haematopoiesis. *Blood Cancer J* 2021; 11:62.
238. Liu H. Emerging agents and regimens for AML. *J Hematol Oncol* 2021; 14:49.
239. Short NJ, Konopleva M, Kadia TM, Borthakur G, Ravandi F, DiNardo CD, et al. Advances in the Treatment of Acute Myeloid Leukemia: New Drugs and New Challenges. *Cancer Discov* 2020; 10:506-25.
240. Clar KL, Hinterleitner C, Schneider P, Salih HR, Maurer S. Inhibition of NK Reactivity Against Solid Tumors by Platelet-Derived RANKL. *Cancers (Basel)* 2019; 11:277.
241. Clar KL, Weber LM, Schmied BJ, Heitmann JS, Marconato M, Tandler C, et al. Receptor Activator of NF-kappaB (RANK) Confers Resistance to Chemotherapy in AML and Associates with Dismal Disease Course. *Cancers (Basel)* 2021; 13:6122.
242. Nakanishi T, Inaba M, Inagaki-Katashiba N, Tanaka A, Vien PT, Kibata K, et al. Platelet-derived RANK ligand enhances CCL17 secretion from dendritic cells mediated by thymic stromal lymphopoietin. *Platelets* 2015; 26:425-31.

243. Rajakumar SA, Papp E, Lee KK, Grandal I, Merico D, Liu CC, et al. B cell acute lymphoblastic leukemia cells mediate RANK-RANKL-dependent bone destruction. *Sci Transl Med* 2020; 12.
244. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G, et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998; 391:591-4.
245. Ahmad R, Menezes J, Knafo L, Ahmad A. Activated human platelets express Fas-L and induce apoptosis in Fas-positive tumor cells. *J Leukoc Biol* 2001; 69:123-8.
246. Crist SA, Elzey BD, Ludwig AT, Griffith TS, Staack JB, Lentz SR, et al. Expression of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in megakaryocytes and platelets. *Exp Hematol* 2004; 32:1073-81.
247. Plantureux L, Mege D, Crescence L, Dignat-George F, Dubois C, Panicot-Dubois L. Impacts of Cancer on Platelet Production, Activation and Education and Mechanisms of Cancer-Associated Thrombosis. *Cancers (Basel)* 2018; 10:441.
248. Yacoub D, Benslimane N, Al-Zoobi L, Hassan G, Nadiri A, Mourad W. CD154 is released from T-cells by a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 (ADAM10) and ADAM17 in a CD40 protein-dependent manner. *J Biol Chem* 2013; 288:36083-93.
249. Maurer S, Kropp KN, Klein G, Steinle A, Haen SP, Walz JS, et al. Platelet-mediated shedding of NKG2D ligands impairs NK cell immune-surveillance of tumor cells. *Oncoimmunology* 2018; 7:e1364827.
250. Yamada T, Tsuda M, Takahashi T, Totsuka Y, Shindoh M, Ohba Y. RANKL expression specifically observed in vivo promotes epithelial mesenchymal transition and tumor progression. *Am J Pathol* 2011; 178:2845-56.
251. Handgretinger R, Lang P, Andre MC. Exploitation of natural killer cells for the treatment of acute leukemia. *Blood* 2016; 127:3341-9.
252. Zingoni A, Sornasse T, Cocks BG, Tanaka Y, Santoni A, Lanier LL. Cross-talk between activated human NK cells and CD4+ T cells via OX40-OX40 ligand interactions. *J Immunol* 2004; 173:3716-24.
253. Nuebling T, Schumacher CE, Hofmann M, Hagelstein I, Schmiedel BJ, Maurer S, et al. The Immune Checkpoint Modulator OX40 and Its Ligand OX40L in NK-Cell Immunosurveillance and Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Immunol Res* 2018; 6:209-21.
254. Mihalcik SA, Tschumper RC, Jelinek DF. Transcriptional and post-transcriptional mechanisms of BAFF-receptor dysregulation in human B lineage malignancies. *Cell Cycle* 2010; 9:4884-92.
255. Tsimberidou AM, Estey E, Wen S, Pierce S, Kantarjian H, Albitar M, et al. The prognostic significance of cytokine levels in newly diagnosed acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndromes. *Cancer* 2008; 113:1605-13.

256. Hou D, Wang B, You R, Wang X, Liu J, Zhan W, et al. Stromal cells promote chemoresistance of acute myeloid leukemia cells via activation of the IL-6/STAT3/OXPHOS axis. *Ann Transl Med* 2020; 8:1346.
257. Vijay V, Miller R, Vue GS, Pezeshkian MB, Maywood M, Ast AM, et al. Interleukin-8 blockade prevents activated endothelial cell mediated proliferation and chemoresistance of acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2019; 84:106180.
258. Nishioka C, Ikezoe T, Pan B, Xu K, Yokoyama A. MicroRNA-9 plays a role in interleukin-10-mediated expression of E-cadherin in acute myelogenous leukemia cells. *Cancer Sci* 2017; 108:685-95.
259. Kagoya Y, Yoshimi A, Kataoka K, Nakagawa M, Kumano K, Arai S, et al. Positive feedback between NF-kappaB and TNF-alpha promotes leukemia-initiating cell capacity. *J Clin Invest* 2014; 124:528-42.
260. Walsh MC, Choi Y. Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone, and Beyond. *Front Immunol* 2014; 5:511.
261. Gyrd-Hansen M, Meier P. IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer. *Nat Rev Cancer* 2010; 10:561-74.
262. Chen C, Edelstein LC, Gelinas C. The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L). *Mol Cell Biol* 2000; 20:2687-95.
263. Rayet B, Gelinas C. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene* 1999; 18:6938-47.
264. Melgar K, Walker MM, Jones LM, Bolanos LC, Hueneman K, Wunderlich M, et al. Overcoming adaptive therapy resistance in AML by targeting immune response pathways. *Sci Transl Med* 2019; 11.
265. Behrmann L, Wellbrock J, Fiedler W. Acute Myeloid Leukemia and the Bone Marrow Niche-Take a Closer Look. *Front Oncol* 2018; 8:444.
266. Meads MB, Gatenby RA, Dalton WS. Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nat Rev Cancer* 2009; 9:665-74.
267. Brand A, Allen, L., Altman, M., Hlava, M. and Scott, J. Beyond authorship: attribution, contribution, collaboration, and credit. *Learned Publishing* 2015; 28:151-5.

7 Abkürzungsverzeichnis

ADAM	<i>A disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein</i>
ADCC	<i>Antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>
AKT	Proteinkinase B
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	<i>Antigen-presenting cell</i>
Ara-C	Cytarabin
ATP	Adenosintriphosphat
BAFF	<i>B cell activating factor</i>
BAG6	<i>Bcl2-associated anthogene 6</i>
BC	Patient mit Mammakarzinom
Bcl	<i>B cell lymphoma</i>
CC	Patient mit kolorektalem Karzinom
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CR	<i>Complete remission</i>
DAMP	<i>Damage-associated molecule pattern</i>
DAP	<i>DNAX-activating protein</i>
DC	Dendritische Zelle
DcR3	<i>Decoy receptor 3</i>
DD	<i>Death domain</i>
EC	<i>European Comission</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGIL	<i>European Group for the Immunological Characterization of Leukemias</i>
ELN	<i>European LeukemiaNet</i>
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
FAB	<i>French-American-British</i>
Fc	<i>Fragment crystallizable</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FLT3	<i>FMS-like tyrosine kinase 3</i>
Gαq	<i>Guanine nucleotide-binding protein αq</i>

GITR	<i>Glucocorticoid-induced TNF receptor-related</i>
Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GSK3 β	<i>Glycogen synthase kinase-3β</i>
GTP	Guanosintriphosphat
GvHD	<i>Graft-versus-host-disease</i>
HD	Gesunder Spender
HER	<i>Human epidermal growth factor receptor</i>
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HVEM	<i>Herpes virus entry mediator</i>
IAP	<i>Inhibitor of apoptosis</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i>
JNK	<i>JUN N-terminal kinase</i>
KIR	<i>Killer cell immunoglobulin-like receptor</i>
L	Ligand
LGR4	<i>Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 4</i>
LIR-1	Leukozyten-Immunglobulin-ähnlicher Rezeptor
LT β R	<i>Lymphotoxin-β receptor</i>
M	Vorliegen von Metastasen
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MIC	<i>MHC class I chain-related protein</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MLL5	<i>Mixed lineage leukemia 5</i>
MMP14	Matrix Metalloproteinase 14
(m)RNA	<i>(Messenger) ribonucleid acid</i>
mTOR	<i>Mechanistic target of rapamycin</i>
N	Lymphknotenbefall
NF	<i>Nuclear factor</i>
NKG2C, NKG2D	<i>Natural killer group 2 member C/D</i>
NKp	<i>Natural killer protein</i>

NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
OPG	Osteoprotegerin
PAMP	<i>Pathogen-associated molecule pattern</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PD-1	<i>Death protein 1</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
pNKC	Polyklonale NK-Zelle
pRANKL	Aus Thrombozyten stammender RANKL
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
RANK	<i>Receptor activator of NF-κB</i>
RAS	<i>Rat sarcoma</i>
SCLC	<i>Small cell lung cancer</i>
SHP	<i>SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase</i>
T	Tumorgröße
TCIPA	<i>Tumor cell-induced platelet aggregation</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i>
THD	<i>TNF homology domain</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF(R)	Tumornekrosefaktor (Rezeptor)
TRAF	<i>TNF receptor-associated factor</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TRAP-6	<i>Thrombin receptor activator peptide 6</i>
ULBP	<i>UL16-binding proteins</i>
U.S.	United States
WHO	Weltgesundheitsorganisation
xL	<i>Extra large</i>

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mitglieder der TNF/TNFR-Superfamilie und ihre Interaktionspartner nach Bodmer, 2002 (modifiziert). ¹⁷³	21
Tabelle 2: FAB-Klassifizierung der AML, übernommen von Rothfelder, 2018 (modifiziert). ³	28
Tabelle 3: WHO-Klassifizierung der AML, übernommen von Rothfelder, 2018 (modifiziert). ³	29

9 Eigene Publikationen

Kropp KN*, Maurer S*, Rothfelder K, Schmied BJ, **Clar KL**, Schmidt M, Strunz B, Kopp HG, Steinle A, Grünebach F, Rittig SM, Salih HR, Dörfel D. The novel deubiquitinase inhibitor b-AP15 induces direct and NK cell-mediated antitumor effects in human mantle cell lymphoma. *Cancer Immunol Immunother* 2018; 67:935-47.

Clar KL, Hinterleitner C, Schneider P, Salih HR, Maurer S. Inhibition of NK Reactivity Against Solid Tumors by Platelet-Derived RANKL. *Cancers (Basel)* 2019; 11:277.

Holle AW, Govindan Kutty Devi N, **Clar K**, Fan A, Saif T, Kemkemer R, Spatz JP. Cancer Cells Invade Confined Microchannels via a Self-Directed Mesenchymal-to-Amoeboid Transition. *Nano Lett* 2019; 19:2280-90.

Zhou Y, Heitmann JS, **Clar KL**, Kropp KN, Hinterleitner M, Engler T, Koch A, Hartkopf AD, Zender L, Salih HR, Maurer S, Hinterleitner C. Platelet-expressed immune checkpoint regulator GITRL in breast cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2021; 70:2483-96.

Hagelstein I*, Lutz MS*, Schmidt M, Heitmann JS, Malenke E, Zhou Y, **Clar KL**, Kopp HG, Jung G, Salih HR, Märklin M, Hinterleitner C. Bispecific NKG2D-CD3 and NKG2D-CD16 Fusion Proteins as Novel Treatment Option in Advanced Soft Tissue Sarcomas. *Front Immunol* 2021; 12:653081.

Clar KL*, Weber LM*, Schmied BJ, Heitmann JS, Marconato M, Tandler C, Schneider P, Salih HR. Receptor Activator of NF- κ B (RANK) Confers Resistance to Chemotherapy in AML and Associates with Dismal Disease Course. *Cancers (Basel)* 2021; 13:6122.

* gleichwertiger Beitrag

10 Eigenanteil

Die Arbeiten, die zu den beiden Publikationen in dieser Doktorarbeit geführt haben, wurden nicht bzw. nicht ausschließlich von mir selbst durchgeführt. Die Beiträge von mir und den anderen Autoren sind im Folgenden gemäß den CRediT-Beitragstaxonomierichtlinien aufgeführt.²⁶⁷

Clar KL, Hinterleitner C, Schneider P, Salih HR, Maurer S. Inhibition of NK Reactivity Against Solid Tumors by Platelet-Derived RANKL. *Cancers (Basel)* 2019; 11:277.

Konzeptualisierung: Salih HR, Maurer S

Projektleitung: Clar KL, Maurer S

Supervision: Salih HR

Methodologie: Clar KL, Maurer S, Schneider P

Software: Clar KL, Maurer S

Durchführung der Forschungs- und Untersuchungsprozesse: Clar KL, Maurer S

Formelle Analyse: Clar KL, Maurer S, Hinterleitner C

Validierung: Maurer S, Clar KL

Datenkuratierung: Clar KL, Maurer S

Visualisierung: Clar KL, Maurer S

Schreiben – Erstellung des Originalentwurfs: Clar KL, Maurer S

Schreiben – Revision und Editieren: Salih HR

Ressourcen: Salih HR, Hinterleitner C, Schneider P

Akquisition von Fördermitteln: Salih HR

Clar KL*, Weber LM*, Schmied BJ, Heitmann JS, Marconato M, Tandler C, Schneider P, Salih HR. Receptor Activator of NF- κ B (RANK) Confers Resistance to Chemotherapy in AML and Associates with Dismal Disease Course. *Cancers (Basel)* 2021; 13:6122.

* gleichwertiger Beitrag

Konzeptualisierung: Salih HR, Clar KL, Schmied BJ

Projektleitung: Clar KL

Supervision: Salih HR

Methodologie: Clar KL, Schmied BJ, Tandler C, Schneider P

Software: Clar KL, Weber LM, Heitmann JS

Durchführung der Forschungs- und Untersuchungsprozesse: Clar KL, Weber LM, Schmied BJ, Heitmann JS, Marconato M, Tandler C

Formelle Analyse: Clar KL, Weber LM, Heitmann JS

Validierung: Clar KL, Weber LM

Datenkuratierung: Clar KL, Weber LM, Heitmann JS, Schneider P

Visualisierung: Clar KL, Weber LM

Schreiben – Erstellung des Originalentwurfs: Clar KL, Weber LM

Schreiben – Revision und Editieren: Salih HR, Heitmann JS, Schneider P

Ressourcen: Salih HR, Heitmann JS, Schneider P

Akquisition von Fördermitteln: Salih HR, Schneider P

11 Danksagung

Mein größter Dank gilt allen voran meinem „Doktorvater“ Herrn Prof. Dr. Helmut R. Salih für die Ermöglichung dieser Arbeit, die Unterstützung und intensive Betreuung während meiner Zeit in der KKE Translationale Immunologie. Vielen Dank, Helmut, für dein Vertrauen in mich und die Möglichkeit, mich als Doktorandin in dieser einzigartigen Abteilung beweisen zu können. Deine Begeisterung für die Wissenschaft und deine Motivation, die Schwierigkeiten der Behandlung von Krebserkrankungen konsequent anzugehen, sind mir ein großes Vorbild und haben mich sowohl beruflich als auch persönlich sehr geprägt.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee für die Betreuung meiner Promotion und die Gutachtertätigkeit sowie den wissenschaftlichen Input. Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Frau Prof. Dr. Tassula Proikas-Cezanne und Herrn Prof. Dr. Friedrich Götz für ihre Bereitschaft, als mündliche Prüfer zu fungieren.

Danken möchte ich weiter meinen Kooperationspartnern für die jahrelange, erfolgreiche Zusammenarbeit und Unterstützung meiner Forschung, insbesondere Herrn Dr. Pascal Schneider von der Université de Lausanne in der Schweiz und der FACS-Core-Facility Berg unter der Leitung von Frau PD Dr. Stella Autenrieth und Frau Dr. Anna Stanger. An dieser Stelle bedanke ich mich außerdem beim Exzellenzcluster 2180 „Image-guided and Functionally Instructed Tumor Therapies“ (iFIT) für die ausgezeichnete wissenschaftliche und finanzielle Förderung.

Ein großes Dankeschön geht auch an alle gegenwärtigen und ehemaligen Kollegen der AG Salih, insbesondere an meine Kollegen aus dem Büro 507. Nicht vergessen möchte ich das klinische Team und alle Mitarbeiter der AG Walz, AG Jung und AG Schneidawind. Ich hatte eine super Zeit und viele schöne Momente mit euch, die ich mit Sicherheit lange in Erinnerung behalten werde.

Zu guter Letzt gebührt meiner Familie und meinen Freunden Dank, die mich immerwährend begleiten und stets in aller Herzlichkeit unterstützen. Besonders danken möchte ich dabei meinem Freund Carsten, der mich immer wieder ermutigt, meinen Weg zu gehen und ohne den Vieles mühsamer wäre. Von Herzen Danke.

12 Anhang

12.1 Publikationen als Dissertation

Publikation 1 (16 Seiten):

Clar KL, Hinterleitner C, Schneider P, Salih HR, Maurer S. Inhibition of NK Reactivity Against Solid Tumors by Platelet-Derived RANKL. *Cancers (Basel)* 2019; 11:277.


Publikation 2 (18 Seiten):

Clar KL*, Weber LM*, Schmied BJ, Heitmann JS, Marconato M, Tandler C, Schneider P, Salih HR. Receptor Activator of NF- κ B (RANK) Confers Resistance to Chemotherapy in AML and Associates with Dismal Disease Course. *Cancers (Basel)* 2021; 13:6122.

* gleichwertiger Beitrag

Article

Inhibition of NK Reactivity Against Solid Tumors by Platelet-Derived RANKL

Kim L. Clar¹, Clemens Hinterleitner², Pascal Schneider³ , Helmut R. Salih^{1,*} and Stefanie Maurer¹

¹ Clinical Collaboration Unit Translational Immunology, German Cancer Consortium (DKTK) and German Cancer Research Center (DKFZ), Partner site Tuebingen 72076, Germany;

Kim-Larissa.Clar@med.uni-tuebingen.de (K.L.C.); Stefanie.Maurer@med.uni-tuebingen.de (S.M.)

² Department of Hematology and Oncology, Eberhard Karls University, Tuebingen 72076, Germany; Clemens.Hinterleitner@med.uni-tuebingen.de

³ Department of Biochemistry, University of Lausanne, Epalinges 1066, Switzerland; Pascal.Schneider@unil.ch

* Correspondence: Helmut.Salih@med.uni-tuebingen.de; Tel.: +49-7071/29-83275

Received: 29 January 2019; Accepted: 21 February 2019; Published: 26 February 2019



Abstract: NK cells play an important role in tumor immunosurveillance. Their reactivity is governed by various activating and inhibitory surface receptors, which include several members of the TNF/TNF receptor family. For more than 50 years, it has been recognized that tumor immunosurveillance and in particular NK cell antitumor reactivity is largely influenced by platelets, but the underlying mechanisms remain to be fully elucidated. Here we report that upon activation, which reportedly occurs following interaction with cancer cells, platelets upregulate the TNF family member RANKL. Comparative analysis of the expression of RANK among different NK cell subsets and RANKL on platelets in cancer patients and healthy volunteers revealed a distinct malignant phenotype, and platelet-derived RANKL was found to inhibit the activity of normal NK cells against cancer cells. Notably, NK cell antitumor reactivity could be partially restored by application of denosumab, a RANKL-neutralizing antibody approved for treatment of benign and malignant osteolysis. Together, our data not only unravel a novel mechanism of tumor immune evasion mediated by platelets, but they also provide a functional explanation for the clinical observation that denosumab, beyond protecting from bone loss, may prolong disease-free survival in patients with solid tumors.

Keywords: NK cells; platelets; cancer; immune evasion; metastasis; RANK/RANKL; denosumab

1. Introduction

The key role of platelets in tumor progression and metastasis has been recognized for more than 50 years [1]. Platelets interact with blood-borne tumor cells forming platelet-tumor cell aggregates, which enhance metastasis via multiple mechanisms. Beyond releasing growth factors/chemokines, facilitating endothelial adhesion and inducing epithelial-to-mesenchymal transition of tumor cells, platelets also contribute to immune evasion, another hallmark of cancer [2–4]. Nieswandt and colleagues observed an inhibition of metastasis formation in thrombopenic mice, while additional depletion of natural killer (NK) cells reverted this effect, suggesting that platelets guard tumor cells against elimination by NK cells [5].

NK cell effector function, which is regulated by integration of multiple inhibitory and activating signals mediated by various immunoregulatory molecules, plays a key role in controlling metastatic dissemination [6,7]. Among others, several TNF/TNF receptor (TNFR) family members influence the same [8–11]. In recent studies, we contributed to a better understanding of the mechanisms by which

platelets facilitate evasion of cancer cells from NK cell immunosurveillance. This comprised analyses showing that platelet-derived TGF- β downregulates the activating receptor NKG2D on NK cells [12] and that NKG2D ligands are shed from the tumor cell surface following tumor-platelet interaction [13], thereby facilitating evasion from the NK cell “induced self” recognition mode [14]. We also reported that platelets transfer non-malignant MHC class I to tumor cells, which inhibits antitumor immunity of NK cells expressing respective inhibitory KIR receptors, thereby also impairing “missing self” recognition of tumor cells [15]. Moreover, we provided first evidence for the involvement of members of the TNF family in platelet-mediated evasion of tumor cells from NK cell reactivity: we showed that platelets transfer glucocorticoid-induced TNFR-related ligand (GITRL) to tumor cells, which results in diminished antitumor immunity due to triggering the GITR receptor that is expressed on and inhibits reactivity of NK cells [16].

Recently, other investigators reported on the expression of receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) on TRAP6-activated platelets and its role in modulating dendritic cell function [17]. This triggered our interest since its cognate receptor RANK is expressed on NK cells and inhibits their antitumor reactivity in patients with hematologic malignancies [18,19]. Here we comparatively studied the expression of various TNF/TNFR family members on platelets and lymphocytes of cancer patients and healthy controls. We provide evidence that NK cells from patients with solid tumors display significantly enhanced RANK surface levels and that platelet-derived RANKL impairs NK effector functions against solid tumors, pointing to a role of platelet-derived RANKL in immune evasion of solid tumors from NK cell immunosurveillance.

2. Results

2.1. Expression of TNFR Family Molecules on PBMC Subpopulations

Members of the TNF/TNFR family are expressed on different lymphocyte subsets and influence activation, proliferation, and cell death of the respective cell types [20]. We comparatively analyzed the expression of several TNFR family molecules that reportedly influence antitumor immunity and for which antibodies with validated specificity were available, on lymphocyte populations among PBMC of patients with breast cancer (BC), colorectal carcinoma (CC) and healthy donors (HD). The clinical characteristics of the patients are given in Table 1. For CD40, no relevant expression was detected on B, T, and NK cells (Figure 1A). GITR and OX40 were expressed at intermediate levels and HVEM was expressed at high levels on all the analyzed cell populations. No profound differences were observed between patients and HD, even if biometrical analysis revealed a small statistically significant difference for HVEM in T cells of CC and OX40 in T cells of BC patients compared to HD (BC, $p = 0.0125$, ordinary one-way ANOVA with subsequent Dunnett’s multiple comparisons test; CC, $p = 0.0206$, Kruskal-Wallis test with subsequent Dunnett’s multiple comparisons test). In sharp contrast, RANK was expressed at intermediate (B and T cells) to high (NK cells) levels on all lymphocyte subsets from BC and CC patients, which differed significantly from HD who displayed only minimal RANK levels (B cells, BC $p = 0.0069$ and CC $p = 0.0008$; T cells, BC $p = 0.0062$ and CC $p = 0.0037$; NK cells, BC $p = 0.0003$ and CC $p = 0.0160$; all Kruskal-Wallis test with subsequent Dunnett’s multiple comparisons test).

To mimic the autocrine and paracrine signaling physiologically occurring among immune cells, we next determined how the TNFR expression profile of B, T, and NK cells among PBMC of HD was influenced upon culture (Figure 1B). Only minor effects on CD40, GITR, and OX40 expression were observed with all analyzed lymphocyte populations. For HVEM, a profound downmodulation was observed on B cells, while there was a slight upregulation in NK cells of some donors. Most pronounced results were again observed with RANK, for which a profound upregulation on NK cells was observed in this experimental setting.

As a next step, we investigated the specific expression patterns of the TNFR molecules on lymphocytes of patients and HD which we consider a phenotypic imprint (Figure 1C). Highly variable expression patterns among the different individuals were observed in both HD and in cancer patients.

Most pronounced expression levels were observed for HVEM and RANK. While HVEM was detectable on all lymphocyte populations of patients as well as HD, RANK levels appeared to be specifically upregulated on NK cells of BC and CC patients. Of note, RANK surface levels were significantly higher on CD56^{dim} as compared to CD56^{bright} NK cells, which exert at least partially differing roles and effector functions in antitumor immunity (Figure 1D; BC, $p = 0.0054$ and CC, $p < 0.0001$; both Student's t test).

Table 1. Patient characteristics.

Patient Characteristics	BC Patients		Patient Characteristics	CC Patients	
	Count	%		Count	%
total no. of patients	9	100	total no. of patients	11	100
age (years)			age (years)		
mean	66		mean	63	
range	58–81		range	47–79	
sex of patients			sex of patients		
female	9	100	female	4	36.4
male	0	0	male	7	63.6
UICC stage			UICC stage		
I	3	33.3	I	0	0
II	1	11.1	II	0	0
III	0	0	III	0	0
IV	5	55.6	IV	11	100
receptor status			cytogenetic		
Her2	5	55.6	Ras mutation	4	36.4
HR	6	66.7	MSI	0	0
			Her2	1	9
			PIK3C	1	9
			SMAD4	1	9
			TP53	2	18
			BRAF	1	9
no. treatment regimens exposed to			no. treatment regimens exposed to		
1	5	55.6	1	2	18.2
2	1	11.1	2	5	45.4
≥ 3	3	33.3	≥ 3	4	36.4
thromboembolic event	1	11.1	thromboembolic event	2	18.2

BC, breast cancer; no., number; UICC, Union Internationale Contre le Cancer; Her2, human epidermal growth factor receptor 2; HR, hormone receptor; CC, colorectal cancer; MSI, microsatellite instability; PIK3C, phosphatidylinositol 3-kinase; SMAD4, SMAD family member 4; TP53, tumor protein 53; BRAF, v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B.

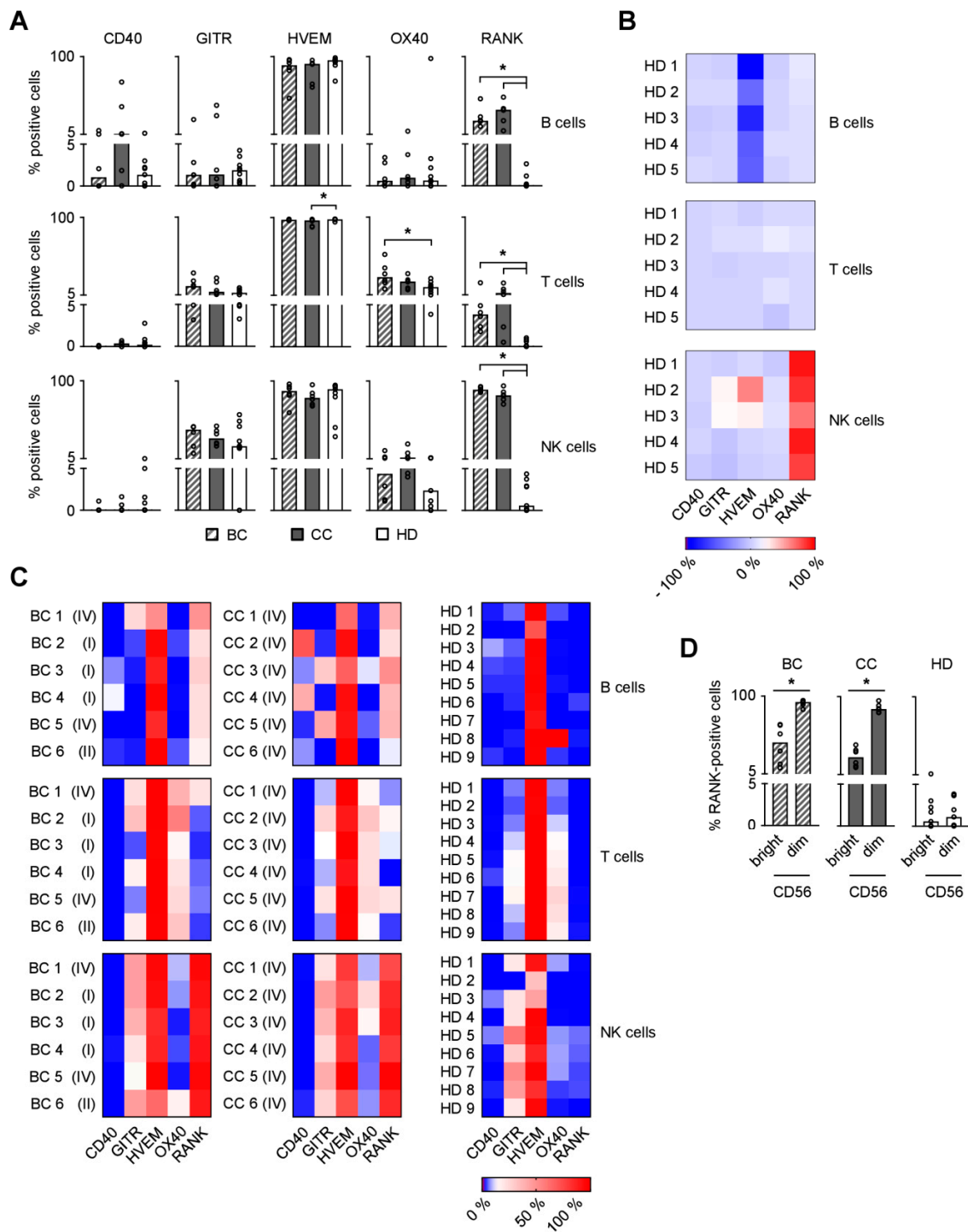


Figure 1. Expression of TNFR family molecules on PBMC subpopulations. (A,C,D) CD40, GITR, HVEM, OX40, and RANK surface expression on PBMC subpopulations from BC and CC patients and HD were investigated by flow cytometry ($n = 6, 6,$ and $9,$ respectively). (A) The percentage of surface expression is indicated. (B) PBMC from five HD were freshly isolated or cultured without treatment for three days and CD40, GITR, HVEM, OX40, and RANK surface expression was determined by flow cytometry. Results were comparatively analyzed as follows: “percent surface expression of cultured PBMC” – “percent surface expression of freshly isolated PBMC”. The net modulation is depicted as heatmap. (C) Heatmap analysis of the surface expression profiles among PBMC of individual patients (disease stage as described in Table 1) and HD investigated. (D) The percentage of RANK surface expression on CD56^{bright} and CD56^{dim} NK cell subsets is displayed. (A,D) Median values of the respective group are depicted. Statistically significantly different results ($p < 0.05$) are indicated by *.

2.2. Functional Effects of the RANK/RANKL Axis in NK Cell Reactivity Against Solid Tumors

The analyses described above point to a potential role of RANK in NK cell-mediated immunosurveillance of solid tumors. We thus assessed RANK expression on NK cells of the cancer patients and HD as well as the NK cell line NK92 and ex vivo preactivated polyclonal NK (pNK) cells that are presently evaluated for cancer treatment [21–23]. While NK cells from HD, alike NK92 cells, displayed no or only minimal percentage of RANK-positive cells, BC and CC patients were found to have more than 70% RANK-positive NK cells (Figure 2A). Substantial expression of RANK was also observed with pNK cells, which were used in subsequent functional experiments since access to primary cells from cancer patients is limited. Notably, since RANK levels on pNK cells from different donors varied substantially, assays were performed with pNK cells displaying expression levels comparable to those from BC and CC patients.

To elucidate the functional relevance of RANK, NK cells were cultured with breast (MCF-7) or colorectal (HCT 116) cancer cells in the presence or absence of recombinant human RANKL (rhRANKL) to facilitate RANK triggering (Figure 2B). Analysis of culture supernatants revealed that the presence of tumor cells markedly induced IFN γ production by NK cells, which constitutes an important effector mechanism by which NK cells shape adaptive immune responses and contribute to tumor immunosurveillance. RANK signaling significantly reduced cytokine release in this experimental setting when RANK-positive pNK cells were used as effectors (MCF-7, $p = 0.0003$; HCT 116, $p = 0.0047$; both Student's t test), while no effects were observed with the RANK-negative NK92 cells.

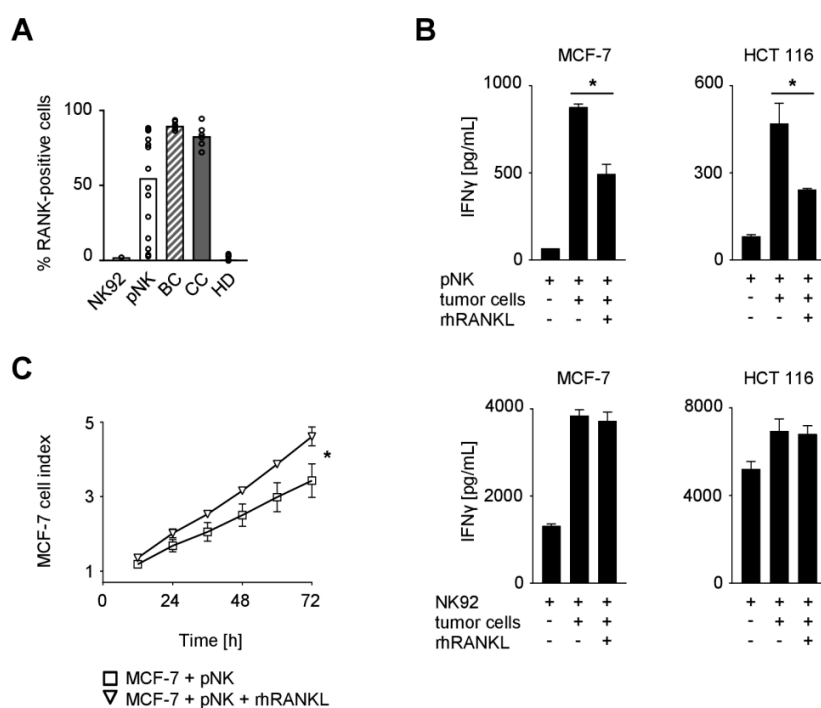


Figure 2. Expression of RANK and functional role of the RANK/RANKL axis in NK cell reactivity against solid tumors. (A) RANK surface expression on NK92 cells, pNK cells, and NK cells among PBMC from BC and CC patients and HD was investigated by flow cytometry ($n = 1, 14, 6, 6,$ and $9,$ respectively). Median values of the respective group are depicted. (B) pNK (upper panel) or NK92 cells (lower panel) were cultured in the presence or absence of the indicated tumor cells and rhRANKL (125 ng/mL). IFN γ levels in culture supernatants were determined by ELISA after 24 h. (C) pNK cells were co-cultured with MCF-7 cells in the presence or absence of rhRANKL (125 ng/mL). The effect of NK cell reactivity on tumor cell proliferation/survival was assessed by xCELLigence RTCA for 72 h. Results are shown as electrical impedance signal (given as cell index). (B,C) Representative data of one experiment from a total of at least three with similar results are shown. Statistically significantly different results ($p < 0.05$) are indicated by *.

Next we determined the effect of RANK signaling on cancer cell proliferation in the presence of NK cells. To this end, MCF-7 breast cancer cells were cultured with or without pNK cells in the presence or absence of rhRANKL, which revealed significantly more pronounced tumor cell proliferation upon RANK signaling (Figure 2C; $p < 0.0001$, Wilcoxon signed-rank test). Of note, treatment of MCF-7 cells with rhRANKL alone had no relevant effects on the survival/proliferation of the breast cancer cells (Supplementary Figure S1A). These data indicate that RANK triggering protects cancer cells from NK cell attack.

2.3. Expression of TNF Family Members on Platelets

As platelets protect tumor cells from NK cell attack and TNFR family members like the GITR/GITRL molecule system contribute to the same, we next assessed the expression pattern of the immunomodulatory TNF family members CD40L, GITRL, LIGHT, OX40L, and RANKL on platelets from BC and CC patients as well as HD. Exemplary results are shown in Figure 3A. Combined analysis of data obtained with platelets of ten HD revealed expression levels of CD40L, GITRL, OX40L, and RANKL (Figure 3B). No relevant LIGHT expression was detected on platelets, which indicates that the LIGHT/HVEM axis may not act as major mediator of platelet-mediated immune privilege despite the high HVEM expression observed on the lymphocyte populations from BC and CC patients (see Figure 1).

Analysis of the specific expression patterns of the TNF family molecules on platelets of the individual patients and HD, considered by us as specific phenotypic imprint, revealed, alike in the analyses of the lymphocyte populations, a profound inter-individual variability (Figure 3C). When the expression of the different TNF family molecules on platelets from BC and CC patients and HD was comparatively analyzed, we surprisingly found that, except for CD40L in CC, median relative expression of all analyzed molecules was slightly lower on platelets from BC and CC patients compared to median results obtained with HD (Figure 3D; BC, OX40L, $p = 0.0418$; Kruskal-Wallis test with subsequent Dunnett's multiple comparisons test). This is seemingly in contrast to available data that many TNF family members are upregulated on platelets following their stimulation including interaction with tumor cells [16].

To determine whether and how CD40L, GITRL, LIGHT, OX40L, and RANKL expression was influenced upon stimulation, platelets were either left untreated or were activated with thrombin (Figure 3E). Combined analysis of platelets from HD revealed no relevant induction of LIGHT and CD40L upon activation, while GITRL, RANKL and in particular OX40L appeared to be upregulated. These data point to an involvement of immunomodulatory TNF family members expressed by platelets in cancer pathophysiology.

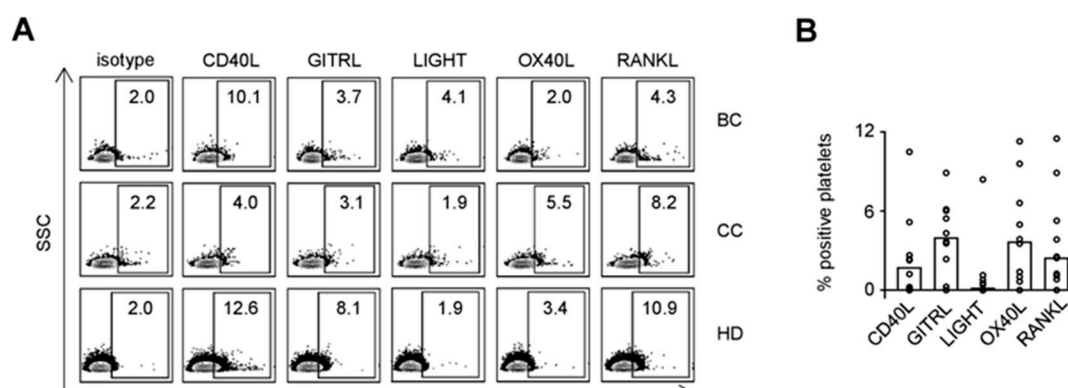


Figure 3. Cont.

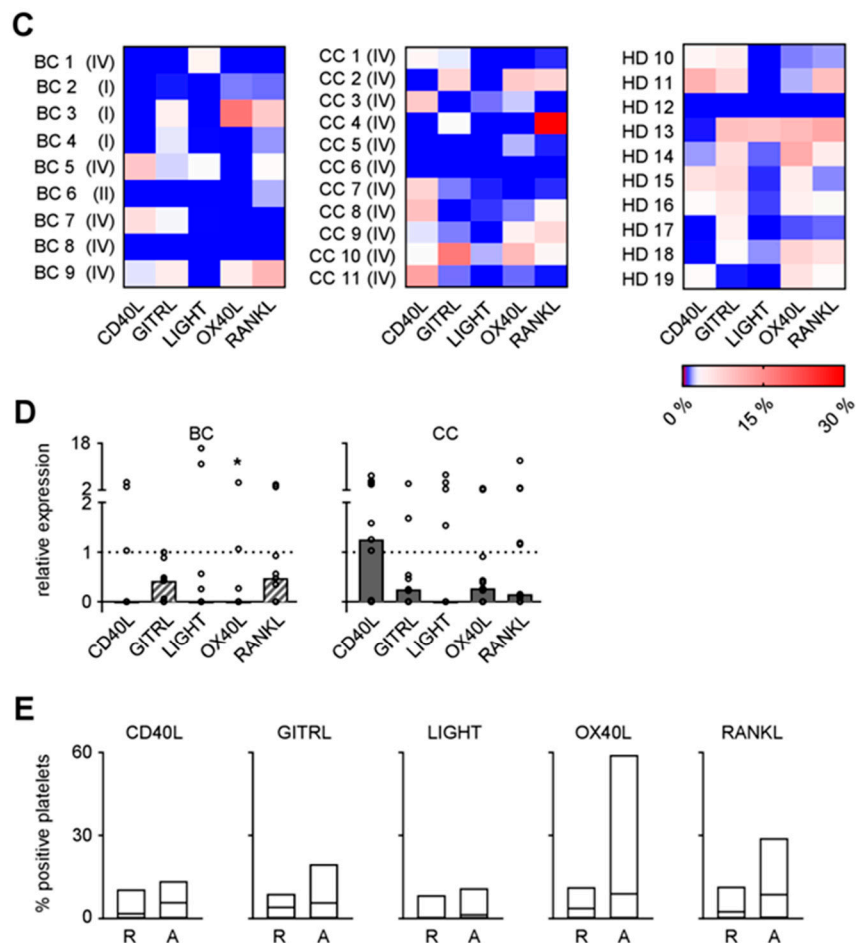


Figure 3. Expression of TNF family molecules on platelets. (A–D) CD40L, GITRL, LIGHT, OX40L, and RANKL surface expression on resting platelets from BC and CC patients and HD were investigated by flow cytometry after fixation with 2% paraformaldehyde ($n = 9, 11,$ and $10,$ respectively). (A) Representative results obtained from BC and CC patients and HD are shown. (B) The percentage of surface expression on platelets from HD is indicated. (C) Heatmap analysis of the expression profiles among the platelets of individual patients (disease stage as described in Table 1) and HD investigated. (D) Relative surface expression on platelets from BC and CC patients compared to HD is depicted. For combined analysis, the median percentage of positive platelets obtained from HD was set to 1 for each individual TNF family molecule analyzed (dotted lines). (E) The percentage of CD40L, GITRL, LIGHT, OX40L, and RANKL surface expression on resting (R) or activated (exposure to thrombin for 1 min, A) platelets from HD was analyzed by flow cytometry after fixation with 2% paraformaldehyde (R, $n = 10;$ A, $n = 6$). (B,D) Median values of the respective group are depicted. (D,E) Statistically significantly different results ($p < 0.05$) are indicated by *.

2.4. Functional Effect of Platelet-Derived RANKL on NK Reactivity

Based on the expression of RANK and RANKL on NK cells and platelets of cancer patients, respectively, and the observed impairment of NK reactivity upon RANK triggering, we reasoned that RANK/RANKL interaction may contribute to the escape of cancer cells from NK cell immunosurveillance. To elucidate the specific contribution of platelet-derived RANKL in this context, MCF-7 and HCT 116 cancer cells, which lacked relevant endogenous RANKL expression, were employed in functional analyses with NK cells in the presence or absence of platelets (Figure 4A). In line with previous data by us and others [2,12,15,16], both MCF-7 and HCT 116 tumor cells were rapidly coated upon the encounter of platelets. Moreover, substantial RANKL pseudo-expression was observed on tumor cells when they were platelet-coated (Figure 4B). The presence of tumor cells

induced production of IFN γ by NK cells, and this was significantly reduced when the malignant cells previously had encountered platelets (Figure 4C; MCF-7, $p = 0.0177$; HCT 116, $p = 0.0006$; both Student's t test). Similarly, a protective effect of the platelets was also observed with regard to tumor cell survival/proliferation (Figure 4D; $p < 0.0001$; Wilcoxon signed-rank test). Of note, NK cell/platelet co-culture supernatants and those from rhRANKL-treated NK cells were found not to have relevant effects on the growth of MCF-7 cells (Supplementary Figure S1B).

To determine the particular relevance of RANKL in platelet-mediated tumor immune privilege, we next conducted the functional analyses in the presence of the RANKL-neutralizing antibody denosumab [24,25] (Figure 4E,F). When the effect of blocking platelet-derived RANKL on tumor cell proliferation/survival was determined, a statistically significant albeit not relevant effect of denosumab was observed as compared to the application of a respective isotype control ($p < 0.0001$; Wilcoxon signed-rank test). This was in clear contrast to the pronounced effect of RANKL-blockade on NK cell IFN γ production, where denosumab treatment restored NK cell effector function as compared to the control (MCF-7, $p = 0.0195$; HCT 116, $p = 0.0058$; both Student's t test).

The effect of denosumab was in fact due to disruption of the platelet-derived RANKL/RANK axis, since no influence on NK cell reactivity was observed with the RANK-negative NK92 cells (Figure 4G). Of note, RANKL-blockade and not Fc part-mediated effects augmented NK reactivity against solid tumors as functional analyses in the presence of denosumab were found not to alter cytokine release when RANK-negative pNK cells were used in the co-culture (Supplementary Figure S2A,B). Altogether, our data demonstrate that platelet-derived RANKL impairs NK cell antitumor reactivity with a less pronounced effect on cytotoxicity compared to production of IFN γ as second major effector mechanism by which NK cells contribute to tumor immunosurveillance.

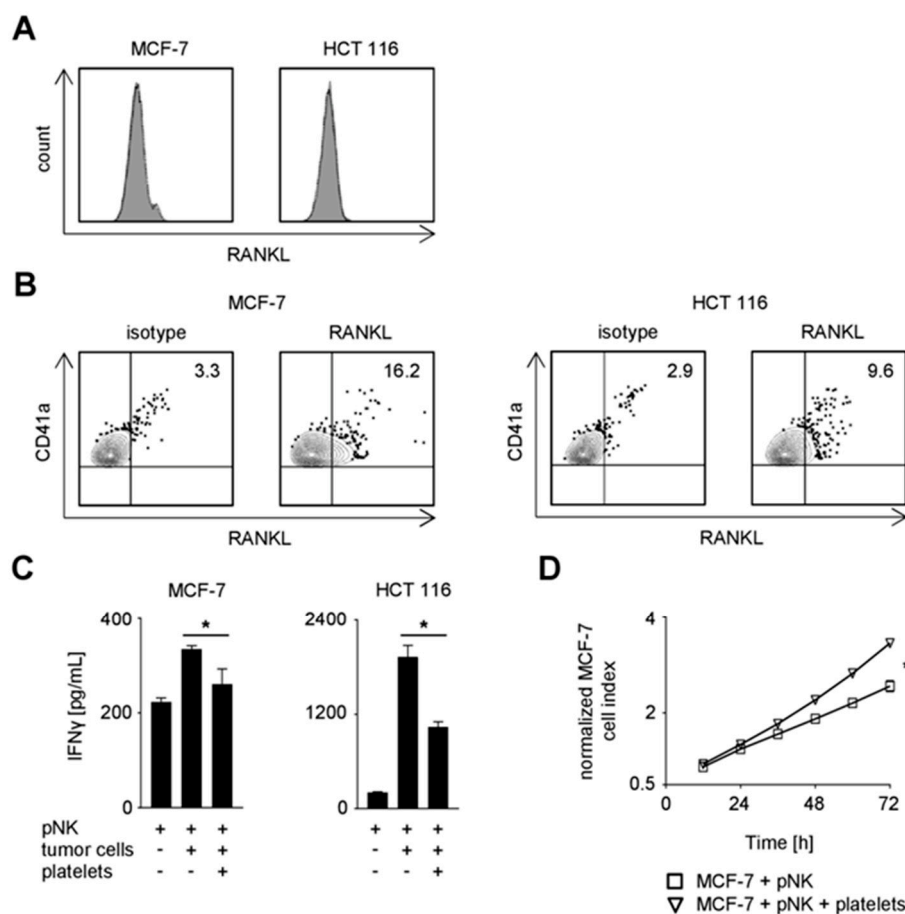


Figure 4. Cont.

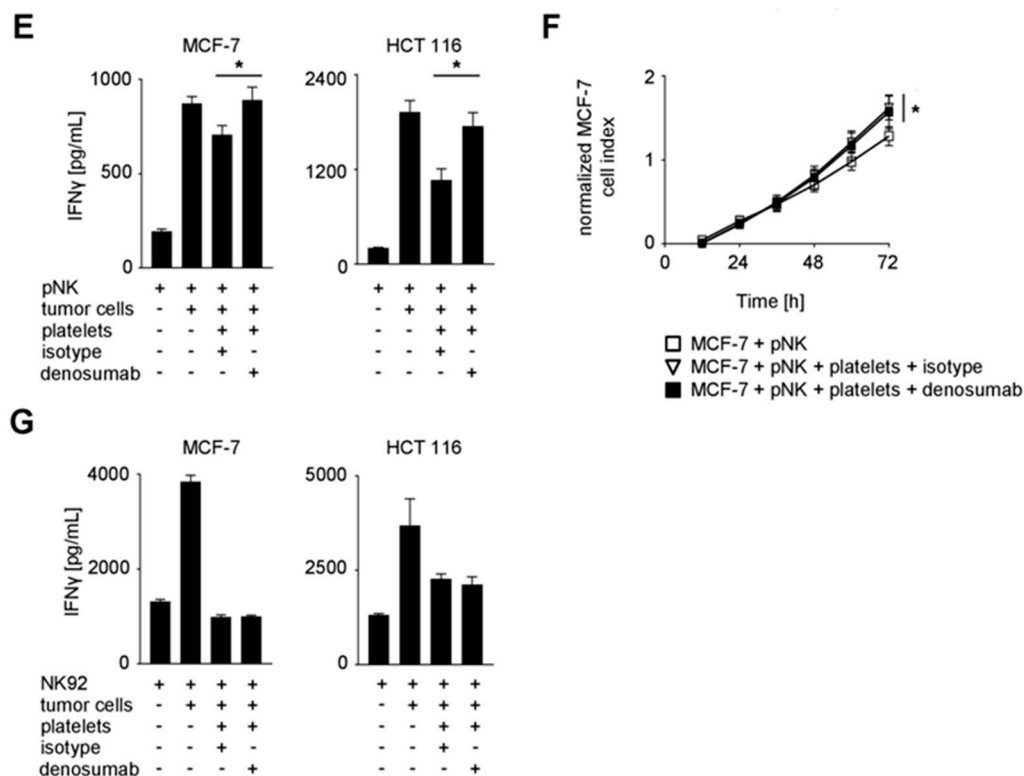


Figure 4. Functional role of platelet-derived RANKL in NK cell reactivity against solid tumors. (A) RANKL surface expression on the indicated tumor cells was investigated by flow cytometry. (B–G) The indicated tumor cells were incubated in the presence or absence of platelets from HD. Coating was performed as described in the Materials and Methods section. (B) RANKL and CD41a surface expression on the indicated platelet-coated tumor cells was investigated by flow cytometry. (C) pNK cells were cultured in the presence or absence of the indicated tumor cells and platelets from HD. IFN γ levels in the culture supernatants were determined by ELISA after 24 h. (D) pNK cells were co-cultured with MCF-7 cells in the presence or absence of platelets from HD. The effect of NK cell reactivity on tumor cell proliferation/survival was assessed by xCELLigence RTCA for 72 h. Results are shown as electrical impedance signal (given as normalized cell index). Cell index was normalized after addition of NK cells to the tumor cells. (E) pNK cells were cultured in the presence or absence of the indicated tumor cells and platelets from HD. Where denoted, denosumab (10 μ g/mL) or the respective isotype control was applied. IFN γ levels in the culture supernatants were determined by ELISA after 24 h. (F) pNK cells were treated as indicated in (E) and analyzed as in (D). (G) NK92 cells were treated and analyzed as described in (E). (C–G) Representative data of one experiment from a total of at least three with similar results are shown. Statistically significantly different results ($p < 0.05$) are indicated by *.

3. Discussion

RANKL and its cognate receptors RANK and osteoprotegerin play a key role in regulating bone metabolism [26]. Besides maintaining bone turnover in normal bone physiology, RANK also mediates osteolytic lesions in the context of metastatic cancer disease [27]. However, the RANK/RANKL axis affects cellular functions far beyond bone metabolism, among which the involvement in malignant disease, especially in solid tumors, is increasingly appreciated [19,28]. This is exemplified by the elegant work of Tan and coworkers, who showed that tumor-infiltrating regulatory T cells facilitate breast cancer metastasis via RANK/RANKL interaction [29]. Metastasis formation is a complex process which is largely influenced by various factors including the tumor microenvironment and cancer-cell-intrinsic processes, but also by platelets and immune cells including NK cells [6]. We report

here that the RANK/RANKL system may influence NK cell-mediated immunosurveillance of solid tumor cells following the interaction of the latter with platelets.

In a panel of TNFR family members, RANK was found to be specifically upregulated on NK cells of patients with solid tumors as compared to healthy individuals. This is in line with previous data that various TNF and TNFR family members are upregulated on NK cells in the context of malignant disease, where they modulate antitumor reactivity upon interaction with their cognate counterparts on tumor cells [30,31]. RANKL was recently reported to be expressed on platelets, prompting us to comparatively assess the expression of this and other TNF family members on platelets of cancer patients and healthy donors [17]. The expression profile of the investigated ligands varied a lot among different patients, alike that of their respective receptors on the lymphocytes. This extends available data on the expression of TNF family molecules on platelets [32–34]. No difference regarding the activation level of platelets *ex vivo* from patients with different stages of disease was observed which may be due to the relatively small number of cases in our cohort studied. Interestingly, platelets from cancer patients displayed lower levels of the TNF family ligands despite the fact that activation, which should occur upon interaction with malignant cells, generally results in enhanced surface expression. Potential explanations for this seemingly counterintuitive finding could be provided by a reprogrammed megakaryopoiesis that occurs in cancer patients [35]. In addition, TNF family members can be shed from the ligand expressing cells following interaction with their cognate receptor [36], and this may be facilitated by the reportedly higher levels of proteolytic matrix metalloproteases detectable on platelets from patients with metastasized disease compared to healthy controls [13]. While further work is required to unravel the mechanisms, based on our observation that cancer patients display a highly patient-specific phenotypic imprint, specific expression patterns of the investigated molecules and particularly RANK/RANKL on lymphocytes and platelets, it is tempting to speculate that this “immunologic phenotype” may influence disease pathophysiology and could serve as further prognostic factor when established and correlated with disease progression upon analysis of a larger patient cohort.

Our findings that RANK triggering impaired NK cell reactivity against solid tumor cells extend our previous data on the role of the RANK/RANKL axis in hematopoietic malignancies [19]. Notably, the solid cancer cells do not have to express RANKL themselves to evade NK cell immunity [37], but rather acquire RANKL-mediated immune privilege upon coating by platelets, which facilitates activation of the latter and thus leads to increased expression of platelet-derived RANKL levels. Platelet-derived RANKL then impairs NK antitumor reactivity with a more pronounced effect on IFN γ production as compared to cytotoxicity, which is again in line with observations on the differential effect of RANK/RANKL interaction on NK reactivity in hematological malignancies. Notably, release of IFN γ by NK cells in response to tumor cells that is reinforced by denosumab treatment not only may mediate direct antitumor effects but also stimulates subsequent adaptive immune responses. In this context it is of particular interest that effects of denosumab occur very early, as confirmed by our ELISA of supernatants obtained after 24 hours of co-culture. The fact that denosumab, which is approved for treatment of osteoporosis and skeletal-related events in cancer patients, restored platelet-mediated suppression of NK reactivity not only confirmed the specific involvement of RANKL; it also provides a potential explanation for recent clinical findings obtained upon application of denosumab for prevention of skeletal-related events in breast cancer patients, which suggest that denosumab treatment may influence disease-free survival [28]. While these findings and our data certainly require additional investigation, drug repurposing of denosumab for prevention of metastatic events is appealing since it can be readily translated to the clinic due to its availability. Considering that presently multiple approaches evaluate the clinical efficacy of *ex vivo* expanded/activated NK cells upon adoptive transfer [21,22] the possibility to reinforce NK reactivity by RANKL blockade is particularly attractive, since we found that *ex vivo* expanded pNK cells express high RANK levels that, upon interaction with RANKL, inhibit their reactivity.

Altogether, we provide evidence for a new modality of platelet-mediated immune escape of solid tumors. Our findings open up new roads to use denosumab, alone or in combination with NK cell transfer, for cancer therapy, even if substantial further preclinical work is required before cancer patients ultimately may benefit from our observations.

4. Materials and Methods

4.1. Reagents

Recombinant human RANKL (rhRANKL) was from PeproTech (Rocky Hill, NJ, USA). Paraformaldehyde was from Affymetrix (Santa Clara, CA, USA). Thrombin was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Denosumab was from Amgen (Thousand Oaks, CA, USA). The respective isotype control was purchased from Sigma-Aldrich. Anti-CD40L antibody was from BioLegend (San Diego, CA, USA), the anti-CD40-PE conjugate was from BD Pharmingen (San Diego, CA, USA). Anti-GITR, anti-GITRL, anti-HVEM, and anti-LIGHT antibodies were from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Anti-OX40 and anti-OX40L antibodies were from Ancell Corporation (Bayport, MN, USA). For staining of RANK, a recombinant Fc-RANKL was produced as described [38], the corresponding isotype control was purchased from R&D Systems and both were biotinylated with the One-step biotinylation kit according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Anti-RANKL antibody was from Acris Antibodies (Herford, Germany). The respective isotype controls were from BioLegend or BD Pharmingen. CD19-FITC, CD41a-PeCy5, and CD62P-FITC were from BD Pharmingen, CD3-APC/Fire and CD56-PECy7 were obtained from BioLegend. The goat anti-mouse PE conjugate was from Dako (Glostrup, Denmark), the streptavidin-PE conjugate was from BD Pharmingen. Dead cells were excluded using Fixable Aqua (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) after extracellular staining according to the manufacturer's instructions. KPL TMB Microwell Peroxidase Substrate System (2-C) was obtained from SeraCare Life Science (Milford, MA, USA), Streptavidin-Poly-HRP20 Conjugate was from Fitzgerald Industries International (North Acton, MA, USA). Bicol Separating Solution was purchased from Biochrom AG (Berlin, Germany).

4.2. Cell Lines

The tumor cell lines MCF-7 and HCT 116 were from German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Braunschweig, Germany). The NK cell line NK92MI2 (in the following named NK92) was kindly provided by K. Dennehy (Institute for Medical Virology, University Hospital Tuebingen, Tuebingen, Germany) [39,40].

4.3. Patients

Blood samples of patients with colorectal carcinoma or breast cancer were obtained after written informed consent in accordance with the Helsinki protocol, and the study was performed according to the guidelines of the local Ethics Committee. Patients comprised 9 cases of breast cancer and 11 cases of colorectal carcinoma. For further patient characteristics see Table 1. The study was approved by IRB (ethics committee of the Faculty of Medicine of the Eberhard Karls Universität Tuebingen) and of the University Hospital Tuebingen and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki; reference number 456/2017BO2, approval date was 21 September 2017.

4.4. Preparation of PBMC, NK Cells, and Platelets

PBMC were isolated by Ficoll/Bicoll density gradient centrifugation of blood from healthy volunteers and where indicated, cultured for three days in RPMI-1640 medium containing GlutaMAX and 25 mM HEPES supplemented with 10% FCS and 1% penicillin/streptomycin. pNK cells were generated by culturing non-plastic adherent PBMC from HD with K562-41BBL-IL15 feeder cells obtained from St. Jude's Children's Research Hospital (Memphis, TN, USA) as described

previously [41]. pNK cells with a RANK surface expression above 70% were used for functional experiments which were performed when purity of NK cells (CD56⁺CD3⁻) was >90%. Platelets were obtained as described previously [12]. For platelet activation, 0.2 IU/mL thrombin was added to washed platelets and the suspension was shaken gently for 1 min. Subsequent fixation with 2% paraformaldehyde for 10 min was followed by two washing steps with PBS containing 1% FCS. Platelets were obtained from HD not taking any medication for at least 10 d before blood collection.

4.5. Treatment of Tumor Cells with Platelets

Tumor cells lines were coated with platelets as described previously with slight modifications [3,16]. In brief, tumor cells were incubated with washed platelets at a total of 50,000 platelets/ μ L for 30 min at 37 °C. For investigation of NK cell cytotoxicity, tumor cells were washed afterwards to remove surplus platelets and soluble factors.

4.6. Flow Cytometry

Flow cytometry was performed using fluorescence-conjugates or unlabeled/biotinylated mAb at saturating concentrations followed by a goat anti-mouse PE conjugate or a streptavidin-PE conjugate (both 1:100) as secondary antibodies. Analysis was performed using a FACS Canto or a FACS Fortessa (both BD Biosciences, Heidelberg, Germany). Percent positive cells were calculated as follows: “percent surface expression obtained with specific antibody” – “percent surface expression obtained with isotype control”. B cells were characterized by CD19⁺, T cells by CD3⁺, and NK cells by CD56⁺CD3⁻. Platelets were selected by CD41a⁺ and CD62P⁻ (resting) or CD62P⁺ (activated).

4.7. Cytotoxicity Assay

Tumor cells were co-cultured with pNK cells in the presence or absence of the indicated compounds in 96-well plates (E-Plate 96, ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA) at 10,000 tumor cells/well. Effector to target cell ratio was 2.5:1. Real-time cell analysis was performed at 30 min intervals during a 72 h observation period using the xCELLigence RTCA system (Roche Applied Science, Penzberg, Germany). If not indicated otherwise, values are depicting means of technical triplicates with standard deviation.

4.8. Determination of IFN γ

IFN γ levels were analyzed by ELISA using the ELISA mAb set from Thermo Scientific (Rockford, IL, USA) according to manufacturer’s instructions. If not indicated otherwise, values are depicting means of technical triplicates with standard deviation.

4.9. Statistics

The 95% confidence level was used and *p*-values were calculated with a Student’s *t* test in the case of normally distributed data. Significance of not normally distributed data was calculated with a Wilcoxon signed-rank test. Multiple comparisons were performed using an ordinary one-way ANOVA for normally distributed data or a Kruskal-Wallis test for not normally distributed data with subsequent Dunnett’s multiple comparisons test.

5. Conclusions

Here we report on a novel mechanism of immune evasion mediated by platelets. Our data also provide a functional explanation for recent clinical observations that neutralization of RANKL by denosumab, beyond protection from bone loss, prolongs disease-free survival in patients with solid tumors as observed in breast cancer.

6. Patents

Helmut R. Salih and Stefanie Maurer are inventors on a patent from the University of Tuebingen that involves the role of platelet-derived RANKL in tumor immunity and its therapeutic modulation.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/11/3/277/s1>, Figure S1: rhRANKL and NK cell/platelet-derived factors do not affect survival/proliferation of tumor cells, Figure S2: Denosumab does not affect NK cell reactivity via its Fc part.

Author Contributions: Conceptualization, H.R.S. and S.M.; methodology, K.L.C., S.M., and P.S.; software, K.L.C. and S.M.; validation, S.M. and K.L.C.; formal analysis, K.L.C., S.M., and C.H.; investigation, K.L.C. and S.M.; resources, H.R.S., C.H., and P.S.; data curation, K.L.C. and S.M.; writing—original draft preparation, K.L.C. and S.M.; writing—review and editing, H.R.S.; visualization, K.L.C. and S.M.; supervision, H.R.S.; project administration, K.L.C. and S.M.; funding acquisition, H.R.S.

Funding: H.R.S. was funded by Deutsche Forschungsgemeinschaft, SA1360/7-3, Wilhelm Sander-Stiftung, 2007.115.3, and Deutsche Krebshilfe, 111828, 111134. S.M. is supported by the Institutional Strategy of the University of Tuebingen (Deutsche Forschungsgemeinschaft, ZUK 63). P.S. is supported by the Swiss National Science Foundation, 31003A-176256. We acknowledge support by Deutsche Forschungsgemeinschaft and Open Access Publishing Fund of University of Tübingen.

Acknowledgments: The authors thank Celine Reiss for excellent technical assistance, Ulrich Lauer for providing the xCELLigence system, and Kevin Dennehy for providing the NK cell line NK92MI2. Flow cytometry sample acquisition was performed on shared instruments of the Flow Cytometry Core Facility Tuebingen.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Gasic, G.J.; Gasic, T.B.; Stewart, C.C. Antimetastatic effects associated with platelet reduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1968**, *61*, 46–52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Gay, L.J.; Felding-Habermann, B. Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 123–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Labelle, M.; Begum, S.; Hynes, R.O. Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. *Cancer Cell* **2011**, *20*, 576–590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Placke, T.; Kopp, H.G.; Salih, H.R. Modulation of Natural Killer Cell Anti-Tumor Reactivity by Platelets. *J. Innate Immun.* **2011**, *4*, 374–382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Nieswandt, B.; Hafner, M.; Echtenacher, B.; Mannel, D.N. Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 1295–1300. [[PubMed](#)]
6. Lopez-Soto, A.; Gonzalez, S.; Smyth, M.J.; Galluzzi, L. Control of Metastasis by NK Cells. *Cancer Cell* **2017**, *32*, 135–154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Lanier, L.L. NK cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **2005**, *23*, 225–274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Locksley, R.M.; Killeen, N.; Lenardo, M.J. The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell* **2001**, *104*, 487–501. [[CrossRef](#)]
9. Wild, J.; Schmiedel, B.J.; Maurer, A.; Raab, S.; Prokop, L.; Stevanovic, S.; Dorfel, D.; Schneider, P.; Salih, H.R. Neutralization of (NK-cell-derived) B-cell activating factor by Belimumab restores sensitivity of chronic lymphoid leukemia cells to direct and Rituximab-induced NK lysis. *Leukemia* **2015**, *29*, 1676–1683. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Nuebling, T.; Schumacher, C.E.; Hofmann, M.; Hagelstein, I.; Schmiedel, B.J.; Maurer, S.; Federmann, B.; Rothfelder, K.; Roerden, M.; Dorfel, D.; et al. The Immune Checkpoint Modulator OX40 and Its Ligand OX40L in NK-Cell Immunosurveillance and Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Immunol. Res.* **2018**, *6*, 209–221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Liu, B.; Li, Z.; Mahesh, S.P.; Pantanelli, S.; Hwang, F.S.; Siu, W.O.; Nussenblatt, R.B. Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor negatively regulates activation of human primary natural killer (NK) cells by blocking proliferative signals and increasing NK cell apoptosis. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 8202–8210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

12. Kopp, H.G.; Placke, T.; Salih, H.R. Platelet-derived transforming growth factor-beta down-regulates NKG2D thereby inhibiting natural killer cell antitumor reactivity. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 7775–7783. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Maurer, S.; Kropp, K.N.; Klein, G.; Steinle, A.; Haen, S.P.; Walz, J.S.; Hinterleitner, C.; Marklin, M.; Kopp, H.G.; Salih, H.R. Platelet-mediated shedding of NKG2D ligands impairs NK cell immune-surveillance of tumor cells. *Oncoimmunology* **2018**, *7*, e1364827. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Gasser, S.; Rautlet, D.H. Activation and self-tolerance of natural killer cells. *Immunol. Rev.* **2006**, *214*, 130–142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Placke, T.; Oergel, M.; Schaller, M.; Jung, G.; Rammensee, H.G.; Kopp, H.G.; Salih, H.R. Platelet-derived MHC Class I confers a pseudo-normal phenotype to cancer cells that subverts the anti-tumor reactivity of natural killer immune cells. *Cancer Res.* **2011**, *72*, 440–448. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Placke, T.; Salih, H.R.; Kopp, H.G. GITR ligand provided by thrombopoietic cells inhibits NK cell antitumor activity. *J. Immunol.* **2012**, *189*, 154–160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Nakanishi, T.; Inaba, M.; Inagaki-Katashiba, N.; Tanaka, A.; Vien, P.T.; Kibata, K.; Ito, T.; Nomura, S. Platelet-derived RANK ligand enhances CCL17 secretion from dendritic cells mediated by thymic stromal lymphopoietin. *Platelets* **2015**, *26*, 425–431. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Schmiedel, B.J.; Grosse-Hovest, L.; Salih, H.R. A “vicious cycle” of NK-cell immune evasion in acute myeloid leukemia mediated by RANKL? *Oncoimmunology* **2013**, *2*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Schmiedel, B.J.; Nuebling, T.; Steinbacher, J.; Malinowska, A.; Wende, C.M.; Azuma, M.; Schneider, P.; Grosse-Hovest, L.; Salih, H.R. Receptor Activator for NF-kappaB Ligand in Acute Myeloid Leukemia: Expression, Function, and Modulation of NK Cell Immunosurveillance. *J. Immunol.* **2013**, *190*, 821–831. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Gruss, H.J.; Dower, S.K. Tumor necrosis factor ligand superfamily: Involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood* **1995**, *85*, 3378–3404. [[PubMed](#)]
21. Handgretinger, R.; Lang, P.; Andre, M.C. Exploitation of natural killer cells for the treatment of acute leukemia. *Blood* **2016**, *127*, 3341–3349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Zingoni, A.; Sornasse, T.; Cocks, B.G.; Tanaka, Y.; Santoni, A.; Lanier, L.L. Cross-talk between activated human NK cells and CD4+ T cells via OX40-OX40 ligand interactions. *J. Immunol.* **2004**, *173*, 3716–3724. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Suck, G.; Odendahl, M.; Nowakowska, P.; Seidl, C.; Wels, W.S.; Klingemann, H.G.; Tonn, T. NK-92: An ‘off-the-shelf therapeutic’ for adoptive natural killer cell-based cancer immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* **2016**, *65*, 485–492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Cummings, S.R.; San Martin, J.; McClung, M.R.; Siris, E.S.; Eastell, R.; Reid, I.R.; Delmas, P.; Zoog, H.B.; Austin, M.; Wang, A.; et al. Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361*, 756–765. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Smith, M.R.; Egerdie, B.; Hernandez, T.N.; Feldman, R.; Tammela, T.L.; Saad, F.; Heracek, J.; Szwedowski, M.; Ke, C.; Kupic, A.; et al. Denosumab in men receiving androgen-deprivation therapy for prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361*, 745–755. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Hofbauer, L.C.; Neubauer, A.; Heufelder, A.E. Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin: Potential implications for the pathogenesis and treatment of malignant bone diseases. *Cancer* **2001**, *92*, 460–470. [[CrossRef](#)]
27. Roodman, G.D.; Dougall, W.C. RANK ligand as a therapeutic target for bone metastases and multiple myeloma. *Cancer Treat. Rev.* **2008**, *34*, 92–101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Gnant, M.; Pfeiler, G.; Dubsky, P.C.; Hubalek, M.; Greil, R.; Jakesz, R.; Wette, V.; Balic, M.; Haslbauer, F.; Melbinger-Zeinitzer, E.; et al. The impact of adjuvant denosumab on disease-free survival: Results from 3,425 postmenopausal patients of the ABCSG-18 trial. *Cancer Res.* **2016**. [[CrossRef](#)]
29. Tan, W.; Zhang, W.; Strasner, A.; Grivennikov, S.; Cheng, J.Q.; Hoffman, R.M.; Karin, M. Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signalling. *Nature* **2011**, *470*, 548–553. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Baessler, T.; Krusch, M.; Schmiedel, B.J.; Kloss, M.; Baltz, K.M.; Wacker, A.; Schmetzer, H.M.; Salih, H.R. Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related protein ligand subverts immunosurveillance of acute myeloid leukemia in humans. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 1037–1045. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

31. Baessler, T.; Charton, J.E.; Schmiedel, B.J.; Grunebach, F.; Krusch, M.; Wacker, A.; Rammensee, H.G.; Salih, H.R. CD137 ligand mediates opposite effects in human and mouse NK cells and impairs NK-cell reactivity against human acute myeloid leukemia cells. *Blood* **2010**, *115*, 3058–3069. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Henn, V.; Slupsky, J.R.; Grafe, M.; Anagnostopoulos, I.; Forster, R.; Muller-Berghaus, G.; Kroczeck, R.A. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* **1998**, *391*, 591–594. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Ahmad, R.; Menezes, J.; Knafo, L.; Ahmad, A. Activated human platelets express Fas-L and induce apoptosis in Fas-positive tumor cells. *J. Leukoc. Biol.* **2001**, *69*, 123–128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Crist, S.A.; Elzey, B.D.; Ludwig, A.T.; Griffith, T.S.; Staack, J.B.; Lentz, S.R.; Ratliff, T.L. Expression of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in megakaryocytes and platelets. *Exp. Hematol.* **2004**, *32*, 1073–1081. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Plantureux, L.; Mege, D.; Crescence, L.; Dignat-George, F.; Dubois, C.; Panicot-Dubois, L. Impacts of Cancer on Platelet Production, Activation and Education and Mechanisms of Cancer-Associated Thrombosis. *Cancers* **2018**, *10*, 441. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Yacoub, D.; Benslimane, N.; Al-Zoobi, L.; Hassan, G.; Nadiri, A.; Mourad, W. CD154 is released from T-cells by a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 (ADAM10) and ADAM17 in a CD40 protein-dependent manner. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 36083–36093. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Yamada, T.; Tsuda, M.; Takahashi, T.; Totsuka, Y.; Shindoh, M.; Ohba, Y. RANKL expression specifically observed in vivo promotes epithelial mesenchymal transition and tumor progression. *Am. J. Pathol.* **2011**, *178*, 2845–2856. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Schneider, P.; Willen, L.; Smulski, C.R. Tools and techniques to study ligand-receptor interactions and receptor activation by TNF superfamily members. *Methods Enzymol.* **2014**, *545*, 103–125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Dennehy, K.M.; Klimosch, S.N.; Steinle, A. Cutting edge: NKp80 uses an atypical hemi-ITAM to trigger NK cytotoxicity. *J. Immunol.* **2011**, *186*, 657–661. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Tam, Y.K.; Maki, G.; Miyagawa, B.; Hennemann, B.; Tonn, T.; Klingemann, H.G. Characterization of genetically altered, interleukin 2-independent natural killer cell lines suitable for adoptive cellular immunotherapy. *Hum. Gene Ther.* **1999**, *10*, 1359–1373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Koerner, S.P.; Andre, M.C.; Leibold, J.S.; Kousis, P.C.; Kubler, A.; Pal, M.; Haen, S.P.; Buhning, H.J.; Grosse-Hovest, L.; Jung, G.; et al. An Fc-optimized CD133 antibody for induction of NK cell reactivity against myeloid leukemia. *Leukemia* **2016**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Supplementary Materials: Inhibition of NK Reactivity Against Solid Tumors by Platelet-Derived RANKL

Kim L. Clar, Clemens Hinterleitner, Pascal Schneider, Helmut R. Salih and Stefanie Maurer

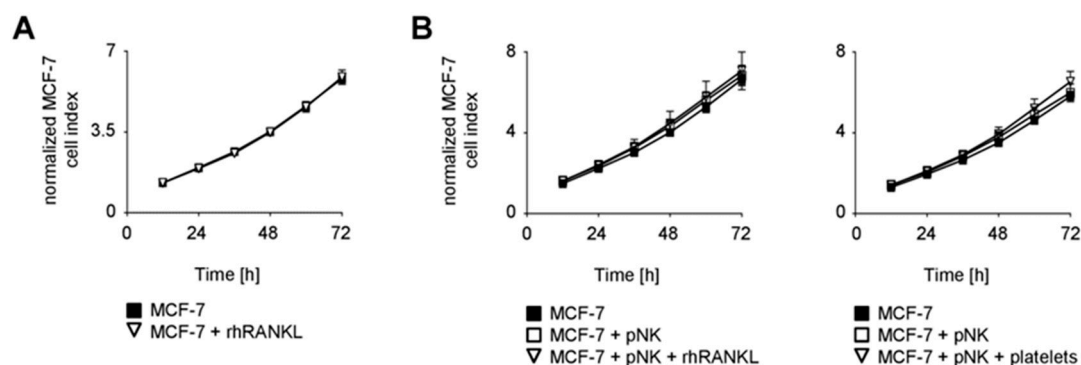


Figure S1. rhRANKL and NK cell/platelet-derived factors do not affect survival/proliferation of tumor cells. (A) MCF-7 cells were cultured in the presence or absence of rhRANKL (125 ng/mL). Tumor cell proliferation/survival was assessed by xCELLigence RTCA over 72 h. Results are shown as electrical impedance signal (given as cell index normalized after addition of rhRANKL to the tumor cells). (B) pNK cells were cultured in the presence or absence of 50,000 platelets/ μ L or rhRANKL (125 ng/mL) for 24 h. Then culture supernatants were collected and added to MCF-7 cell cultures at a ratio of 1:1. Tumor cell proliferation/survival was then analyzed as described in (A).

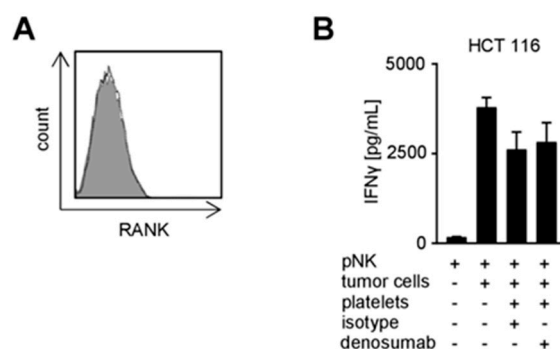


Figure S2. Denosumab does not affect NK cell reactivity via its Fc part. To exclude that denosumab affected NK reactivity by other mechanisms than RANKL neutralization, pNK cells lacking RANKL expression as determined by flow cytometry (A) were cultured in the presence or absence of the HCT 116 tumor cells and platelets from HD. Where indicated, denosumab (10 μ g/mL) or the respective isotype control was applied. IFN γ levels in the culture supernatants were determined by ELISA after 24 h (B).



Article

Receptor Activator of NF- κ B (RANK) Confers Resistance to Chemotherapy in AML and Associates with Dismal Disease Course

Kim L. Clar ^{1,2,†} , Lisa M. Weber ^{1,2,†} , Bastian J. Schmied ^{1,2}, Jonas S. Heitmann ^{1,2}, Maddalena Marconato ¹, Claudia Tandler ^{1,2}, Pascal Schneider ³ and Helmut R. Salih ^{1,2,*} 

¹ Clinical Collaboration Unit Translational Immunology, German Cancer Consortium (DKTK) and German Cancer Research Center (DKFZ), Department of Internal Medicine, University Hospital Tuebingen, 72076 Tuebingen, Germany; Kim-Larissa.Clar@med.uni-tuebingen.de (K.L.C.); Lisa.Weber@med.uni-tuebingen.de (L.M.W.); bschmied88@googlemail.com (B.J.S.); Jonas.Heitmann@med.uni-tuebingen.de (J.S.H.); Maddalena.Marconato@med.uni-tuebingen.de (M.M.); Claudia.Tandler@med.uni-tuebingen.de (C.T.)

² DFG Cluster of Excellence 2180 “Image-Guided and Functional Instructed Tumor Therapy (iFIT)”, University of Tuebingen, 72076 Tuebingen, Germany

³ Department of Biochemistry, University of Lausanne, 1066 Epalinges, Switzerland; Pascal.Schneider@unil.ch

* Correspondence: Helmut.Salih@med.uni-tuebingen.de; Tel.: +49-7071-29-83275

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Clar, K.L.; Weber, L.M.; Schmied, B.J.; Heitmann, J.S.; Marconato, M.; Tandler, C.; Schneider, P.; Salih, H.R. Receptor Activator of NF- κ B (RANK) Confers Resistance to Chemotherapy in AML and Associates with Dismal Disease Course. *Cancers* **2021**, *13*, 6122. <https://doi.org/10.3390/cancers13236122>

Academic Editor: Francesco Bertolini

Received: 5 November 2021

Accepted: 1 December 2021

Published: 4 December 2021

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: Acute myeloid leukemia (AML) is the most common form of acute leukemia in adults. Despite the emergence of new therapeutic agents in recent years, curation remains challenging, and new and better treatment options are needed. In the present study, we investigated the expression, prognostic significance, and functional role of the Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B (RANK) in AML. We found that RANK is expressed on leukemic cells in a substantial proportion of AML patients and is associated with a dismal disease course. We further demonstrated that signaling via RANK induces release of factors that favor AML cell survival and confers resistance to chemotherapeutics in AML treatment. Together, our findings identify RANK as novel prognostic marker and putative candidate for therapeutic intervention in AML to enhance response to treatment.

Abstract: Although treatment options of acute myeloid leukemia (AML) have improved over the recent years, prognosis remains poor. Better understanding of the molecular mechanisms influencing and predicting treatment efficacy may improve disease control and outcome. Here we studied the expression, prognostic relevance and functional role of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) family member Receptor Activator of Nuclear Factor (NF)- κ B (RANK) in AML. We conducted an experimental ex vivo study using leukemic cells of 54 AML patients. Substantial surface expression of RANK was detected on primary AML cells in 35% of the analyzed patients. We further found that RANK signaling induced the release of cytokines acting as growth and survival factors for the leukemic cells and mediated resistance of AML cells to treatment with doxorubicin and cytarabine, the most commonly used cytostatic compounds in AML treatment. In line, RANK expression correlated with a dismal disease course as revealed by reduced overall survival. Together, our results show that RANK plays a yet unrecognized role in AML pathophysiology and resistance to treatment, and identify RANK as “functional” prognostic marker in AML. Therapeutic modulation of RANK holds promise to improve treatment response in AML patients.

Keywords: RANK; AML; chemotherapy resistance; cytarabine; doxorubicin; prognosis

1. Introduction

Acute myeloid leukemia (AML) is the most common form of acute leukemia in adults and characterized by a clonal expansion of myeloid precursor cells with a reduced

capacity to differentiate [1,2]. Untreated, AML leads to death within months after first symptoms [3]. Combinatorial chemotherapy, mostly using a pyrimidine analog together with an anthracycline, made this previously incurable disease medicable [4], and response to therapy strongly correlates with patient outcome [5]. Nevertheless, curation remains challenging and complications, such as refractory disease and relapse caused by treatment-resistant cells, lead to a poor prognosis with an average 5-year survival rate of 30% [6,7]. Despite the development and approval of several new therapeutic agents in recent years, AML-related deaths are expected to almost double worldwide by 2040 [8]. This underlines the high medical need of patients and the necessity to develop better treatment options based on the discovery of novel druggable targets [9,10].

The members of the tumor necrosis factor (TNF)/tumor necrosis factor receptor (TNFR) superfamily are involved in activation, proliferation, differentiation and cell death of various cell types [11]. The TNFR family member Receptor Activator of Nuclear Factor (NF)- κ B (RANK) is best known for its crucial role in regulating bone remodeling [12,13]. In healthy as well as in malignant cells of the hematopoietic system, the RANK/RANKL molecule system was further shown to affect cellular functions [14–16], and involvement in metastasis of different cancer entities has been reported [17–22]. So far, nothing is known regarding the expression and function of RANK in AML. We here studied the expression of RANK in AML and its functional relevance for leukemia cell cytokine production, survival and treatment resistance.

2. Materials and Methods

2.1. Patient Samples

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) collected from blood of AML patients at diagnosis and from bone marrow (BM) of healthy volunteers were isolated by density gradient centrifugation. Informed consent was obtained from all individuals in accordance with the Declaration of Helsinki protocol. Viable frozen cells were freshly thawed prior to each experiment. To avoid potential artifacts by further purification, only PBMCs of patients with $\geq 85\%$ blast count according to differential blood count in blood smears were used in functional analyses. The study was performed according to the guidelines of the local ethics committee (vote 13/2007V) and all relevant ethical regulations were considered.

2.2. Cell Lines

AML cell lines (HL-60, NB-4, THP-1) were obtained from German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Braunschweig, Germany) and tested for mycoplasma contamination by PCR. Authenticity was assessed by routine validation of the respective immunophenotype described by the provider using flow cytometry.

2.3. Quantitative PCR

Amplification of *RANK* cDNA was performed post RNA isolation from AML cell lines and patient samples with $\geq 85\%$ blast count using the High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Mannheim, Germany) and transcription into cDNA using cDNA Synthesis FastGene[®] Scriptase II 5x ReadyMix (NIPPON Genetics Europe, Dueren, Germany). qPCR BIO SyGreen Mix (PCR Biosystems, London, UK) on a LightCycler[®] 480 instrument was utilized. The following primers were employed for quantitative PCR of *RANK* (accession number NM_001270949.2; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/> (accessed on 27 July 2021)), 5'-CCCGTTGCAGCTCAA-3' and 5'-GCATTTGTCCGTGGAGGAA-3' (85 bp). 18S ribosomal RNA (*RRN18S*) was detected by Hs_RRN18S_1_SG QuantiTect Primer Assay (Qiagen, Hilden, Germany). Abundance of *RANK* mRNA was calculated using delta-Ct method relative to *RRN18S* expression.

2.4. Analysis of the RANK Expression on the Cell Surface

Fluorescent conjugates targeting human (h)RANK (clone 80704, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), CD33, CD117 (both Biolegend; San Diego, CA, USA), CD13 (DAKO,

Santa Clara, CA, USA), CD34, 7AAD (both BD Biosciences, Heidelberg, Germany) were used. RANK expression was detected by flow cytometry using mIgG1-PE (BD Biosciences) as isotype control. Analysis was performed on a FACSCanto™ II or a FACS LSRFortessa™ instrument (both BD Biosciences). Specific fluorescence indices (SFI) were calculated as follows: “median fluorescence intensity obtained with specific monoclonal antibody (mAb)” divided by “median fluorescence intensity obtained with isotype control”. Surface positivity was defined as $SFI \geq 1.5$.

2.5. Cell Viability Assay

PBMC of AML patients were incubated as previously described [23] in the presence or absence of recombinant Fc-hRANKL fusion protein (15 µg/mL, containing amino acids 152-317 of RANKL, produced as described in [24]) or rhIgG1-Fc (R&D) as isotype control for 24 h. Absence of endotoxins in recombinant proteins was confirmed by ENDONEXT™ EndoZyme® II assay (bioMérieux, Nuertingen, Germany) prior to functional analyses. Where indicated, cells were additionally incubated with doxorubicin (1.25 µM) and cytarabine (10 µM; both Selleckchem, Houston, TX, USA) for 24 h and 72 h, respectively. Cell viability was measured as Relative Light Units (RLU) using the CellTiterGlo® Luminescent Cell Viability Assay (CTG) on a GloMax® microplate reader (both Promega, Madison, WI, USA) according to manufacturer’s instructions.

2.6. Measurement of Transmembrane Potential and Activation of Caspase-3

AML patient-PBMC were cultured at 5×10^5 cells per well in a 96-well plate (CELLSTAR® U-Bottom, Greiner Bio-One; Frickenhausen, Germany) and left untreated or were treated with Fc-hRANKL (15 µg/mL) or rhIgG1-Fc as isotype control. After 24 h, therapeutics (doxorubicin, 5 µM; cytarabine, 10 µM) were added as described in the section Cell Viability Assay. Mitochondrial membrane potential was determined in AML cells after incubation with doxorubicin and cytarabine for 24 h and 72 h, respectively, by staining with TMRE (tetramethylrodamine ethyl ester) according to manufacturer’s instructions. For determination of caspase-3 activity in AML cells, PBMC were stained with LIVE/DEAD™ Fixable Aqua (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The subsequent intracellular staining of active caspase-3 was performed as previously described [23]. Samples were analyzed on a FACS LSRFortessa™ using a high throughput sampler (both BD Biosciences). Latex beads (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) were used to obtain uniform measurement numbers for all samples.

2.7. Measurement of Cytokine Induction

The experimental setup was chosen as described in the section Measurement of Transmembrane Potential and Activation of Caspase-3, except for treatment with chemotherapeutic agents. To analyze cytokine induction, supernatants were collected and analyzed for IL-6, IL-8, TNF and IL-10 using LEGENDplex™ assays (Biolegend, San Diego, CA, USA) according to manufacturer’s instructions.

Intracellular levels of IL-6 and IL-8 were flow cytometrically determined in Fixable Aqua⁻ CD33⁺ cells using the BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit with an anti-IL-6-PE and anti-IL-8-PE antibody or mIgG1-PE as isotype control using a BD FACSCanto™ II (all BD Biosciences).

2.8. Statistics

Unless otherwise specified, data are presented as mean with standard deviation, median and box plots with min/max whiskers. For combined data, the number of patients examined is noted accordingly. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 9.1.2 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). To analyze normality distribution, Shapiro–Wilk normality test was applied. Comparison of individual groups was done by a 2-tailed paired Student’s *t*-test or a Wilcoxon matched-pairs signed rank test, unpaired data were compared using a 2-tailed unpaired Mann–Whitney test or a Kruskal–Wallis test

followed by Dunn's multiple comparisons test. Association of mRNA and SFI levels as well as proportion of RANK⁺ cells and WBC counts were analyzed using Spearman's rank correlation coefficient. Survival of AML patients was analyzed by Kaplan–Meier method with log-rank test to estimate survival differences between the groups. Cut-off values for separation of individuals into RANK^{high} and RANK^{low} were determined using receiver operating characteristic (ROC) analysis in JMP[®] Pro 14.2 (SAS, Heidelberg, Germany) and were defined through value of highest Youden's index. *p*-values of < 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. RANK Is Expressed by AML Cells

As a first step, we analyzed various AML cell lines to determine whether RANK is expressed on these malignant hematopoietic cells. Flow cytometric analyses of the AML cell lines HL-60, NB-4 and THP-1 revealed different levels of surface positivity (Figure 1A). RANK expression was also confirmed by determination of mRNA levels using quantitative PCR (Figure 1B). Next, we analyzed leukemic cells of AML patients and found that also primary AML cells express substantial levels of RANK on the cell surface (top row), whereas CD34⁺ hematopoietic progenitor cells contained in BM of healthy donors (bottom row) did not display relevant expression (Figure 1C). A high interindividual variation with regards to RANK expression was observed between the different patients; individual SFI levels as well as the proportion of RANK⁺ among leukemic cells and clinical characteristics of the patients are summarized in Table 1. Among the investigated patients, 31/54 (57%) showed RANK expression on at least 10% of the blasts (Figure 1D), and 19/54 (35%) expressed SFI levels of at least 1.5 as the defined threshold for surface positivity (Figure 1E). Expression was again confirmed by analysis of RANK mRNA levels using quantitative PCR (Figure 1F). No correlation between RANK mRNA and surface levels was observed in the patients, which points to posttranscriptional/posttranslational mechanisms that influence RANK surface expression (Figure 1G; Spearman correlation coefficient, $R_s = -0.39$). Notably, this phenomenon has also been observed for several other members of the TNF/TNFR superfamily including RANKL, GITR/L, OX40 and BAFF by us and other investigators [14,25–27]. Altogether, our data demonstrate that RANK is expressed in a substantial proportion of AML cases.

Table 1. Patient characteristics and RANK expression.

UPN	RANK		FAB	Age	Sex	PBB	Karyotype	WBC	Hb	Plt
	[%]	[SFI]		[Years]		[%]		[G/L]	[G/dL]	[G/L]
1	1.7	1.0	M0	46	M	97	46,XY	60.6	7.0	39
2	11.9	1.5	M0	83	M	90	48,XY,+X,+13	191.6	8.9	59
3	3.1	1.8	M0	68	M	93	ND	52.8	10.5	114
4	4.9	1.6	M0	65	M	85	46,XY	186.3	9	11
5	20.2	1.3	M0	90	F	97	complex	14.5	8.1	586
6	11.0	1.2	M1	40	M	100	complex	81.3	10.8	51
7	13.5	1.7	M1	69	M	86	46,XY	84.1	6.7	322
8	4.8	1.0	M1	21	F	95	46,XX; 46,XX,del(9)(q13q22)	84.0	7.1	30
9	2.6	1.1	M1	56	F	56	46,XX	52.0	12.1	9
10	3.0	1.1	M1	77	M	87	46,XY	116.0	7.3	57
11	9.0	1.5	M1	50	F	93	46,XX	267.8	8.0	18
12	1.3	1.1	M1	64	F	98	ND	222.2	9.2	44
13	1.6	1.1	M2	88	M	29	ND	45.4	8.9	81
14	18.0	1.1	M2	68	M	96	46,XY	85.5	9.5	146

Table 1. Cont.

UPN	RANK		FAB	Age [Years]	Sex	PBB [%]	Karyotype	WBC [G/L]	Hb [G/dL]	Plt [G/L]
	[%]	[SFI]								
15	9.3	1.2	M2	64	M	82	complex	338.5	8.1	19
16	5.9	1.1	M2	60	M	95	46,XY,+14	42.0	10.1	57
17	41.3	1.1	M2	71	F	89	47,XX,+11	16.4	8.6	18
18	3.8	2.6	M2	79	F	69	46,XX	21.5	7.0	14
19	3.5	1.1	M2	67	F	94	complex	112.7	10.6	137
20	21.5	1.3	M3	46	M	87	46,XY,t(15;17)(q22;q11~21)	8.42	9.9	40
21	23.6	1.5	M3	65	M	70	46,XY,t(15;17)(q22;q12)	7.0	9.7	27
22	6.0	1.1	M3	29	M	93	46,XY,t(15;17)(q22;q12)	21.6	7.1	61
23	9.3	1.0	M3	58	F	96	46,XX,t(15;17)(q22;q12)	42.1	8.4	17
24	7.9	1.0	M3	46	F	42	46,XX,t(15;17)(q24.1;q21.2)	21.6	7.1	14
25	2.5	1.0	M4	30	F	90	complex	214.0	6.4	10
26	58.3	1.7	M4	64	F	91	46,XX	61.5	7.2	100
27	5.6	1.1	M4	71	M	97	47,XY,+11	87.1	7.5	23
28	9.4	1.0	M4	76	F	94	complex	140.9	12.0	70
29	9.3	1.2	M4	85	M	92	ND	183.2	8.9	64
30	11.2	1.1	M4	45	F	97	46,XX,t(1;3)(p36;q21)(22)	448.3	6.6	36
31	1.9	1.0	M4	62	M	91	complex	104.7	6.5	34
32	17.2	2.1	M4	83	F	95	46,XX,add(14)(p11); 46,XX	155.8	11.6	144
33	25.1	1.2	M4	36	M	95	46,XY	207.4	6.1	55
34	60.0	1.9	M4	67	F	86	ND	315.9	8.2	34
35	42.5	1.6	M4	57	M	87	ND	333.7	9.4	293
36	40.9	1.3	M4	54	F	91	46,XX	17.2	10.6	167
37	2.7	1.0	M4	57	M	14	45,XY,inv(3)(q21.3q26.2),-7	26.2	10.4	252
38	57.0	1.6	M5	69	F	95	ND	274.9	7.1	47
39	3.5	1.1	M5	72	M	97	47,XY,+8; 46,XY	90.3	8.9	79
40	22.3	1.5	M5	65	M	91	ND	151.0	7.9	151
41	70.2	1.3	M5	76	M	93	complex	169.3	9.9	26
42	35.7	1.2	M5	54	M	89	46,XY,del(9)(q13q22)	97.1	8.1	73
43	74.3	2.0	M5	37	F	85	ND	126.8	9.7	41
44	81.8	1.2	M5	81	M	93	46,XY	61.3	11.7	72
45	14.3	1.2	M5	23	M	92	48,XY,+8,+13; 46,XY	153.5	6.7	44
46	28.7	1.2	M5	35	F	83	46,XX	45.4	8.9	81
47	65.7	1.5	M5	53	M	85	46,XY	105.6	8.1	35
48	49.5	1.5	M5	48	M	95	46,XY	54.6	6.8	190
49	22.0	1.3	M5	70	M	90	46,XY	190.9	7.1	65
50	48.9	1.4	M5	32	M	98	complex	179.3	3.3	80
51	24.1	1.5	M5	71	M	94	complex	161.1	8.6	61
52	68.4	1.8	M5	68	M	95	46,XY	148.7	9.1	134
53	13.9	1.0	M5	41	F	92	46,XX	59.9	8.9	34
54	67.7	2.7	ND	49	M	96	ND	316.0	7.1	80

UPN, uniform patient number; SFI, specific fluorescence index; FAB, French-American-British classification; F, female; M, male; PBB, peripheral blood blasts among nucleated cells; WBC, white blood count; Hb, hemoglobin; Plt, platelets; ND, not determined. Complex karyotypes were defined as having 3 or more chromosome aberrations.

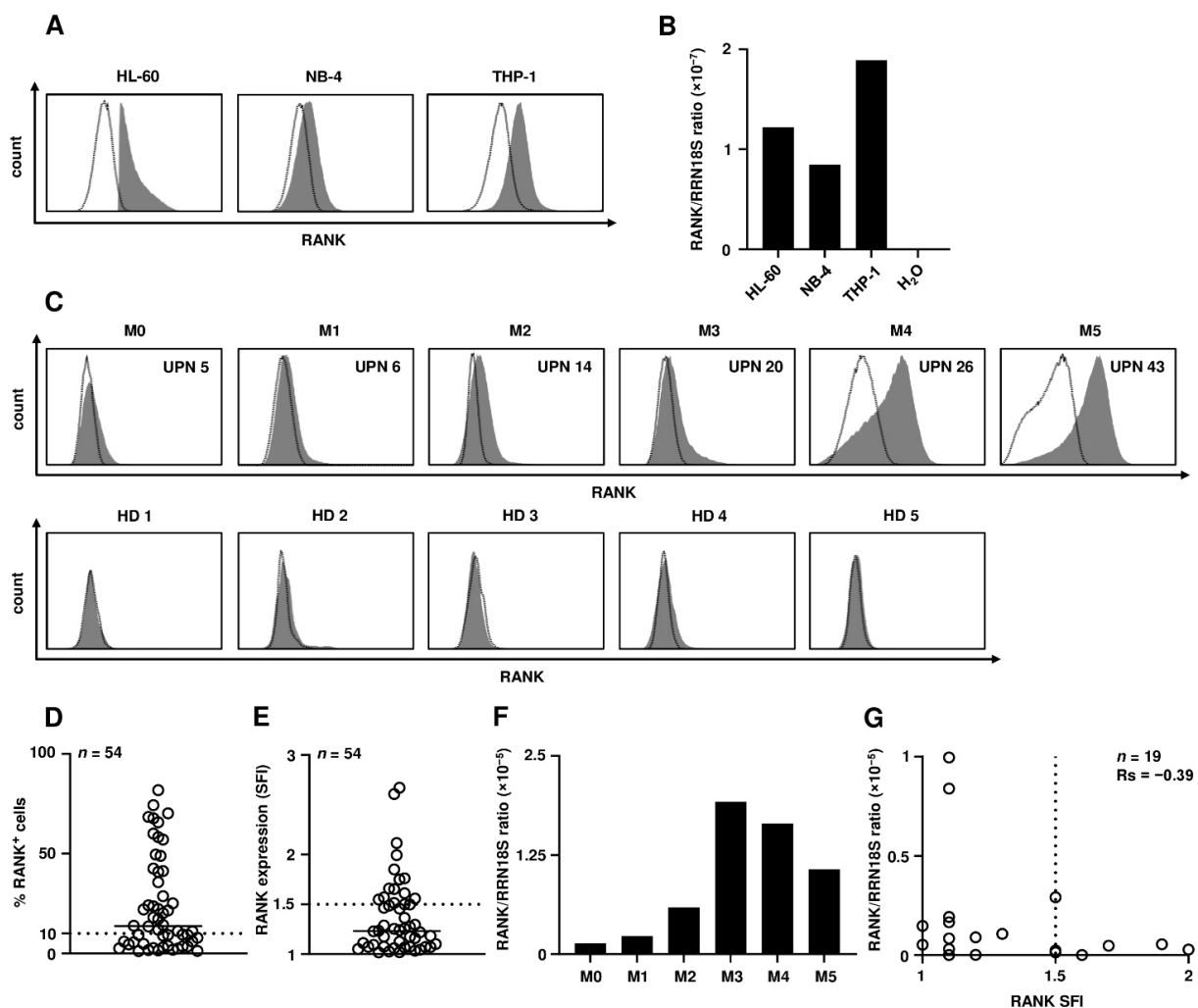


Figure 1. RANK expression in AML. (A) RANK surface expression on AML cell lines HL-60, NB-4 and THP-1 was analyzed by flow cytometry using the anti-RANK mAb FAB683P (shaded peaks) with mouse IgG1 serving as isotype control (open peaks). (B) RANK expression was assessed by quantitative PCR and abundance of RANK mRNA was calculated using delta-Ct method relative to *RRN18S* expression. (C) Exemplary results for RANK surface levels on PBMC of AML patients with different FAB types (top row) and on CD34⁺ hematopoietic progenitor cells contained in BM of healthy donors are shown (bottom row; shaded peaks, anti-RANK mAb FAB683P; open peaks, isotype control). Numbers in histograms represent uniform patient number (UPN) as shown in Table 1. (D,E) Combined results of RANK surface expression on primary AML cells showing (D) the proportion of RANK⁺ cells (solid line, median; dotted line, 10% RANK⁺ cells) and (E) SFI levels obtained by analysis of 54 patients (solid line, median; dotted line, SFI = 1.5 as defined threshold for surface positivity). Malignant cells in all patients with <85% blast count were defined based on blast selection markers of each individual patient. (F) RANK expression was assessed by quantitative PCR and abundance of RANK mRNA was calculated using delta-Ct method relative to *RRN18S* expression. Exemplary results for relative mRNA levels of PBMC from AML patients with different FAB types (M0, UPN 2; M1, UPN 11; M2, UPN 17; M3, UPN 22; M4, UPN 28; M5, UPN 49) are shown. (G) Relative RANK mRNA levels of different AML patients ($n = 19$) are plotted against RANK SFI values.

3.2. RANK Induces Cytokines Involved in Pathophysiology and Promotes Metabolic Activity of AML Cells

To determine whether RANK transduces activating signals into AML cells, primary leukemic cells of patients were incubated with the RANK agonist Fc-hRANKL or isotype control for 24 h, followed by analysis of cytokine levels in the culture supernatants using LEGENDplex™ assays. Stimulation of RANK was found to induce the release of IL-6, IL-8, TNF and IL-10 by AML cells (Figure 2A,B). These cytokines were previously described to contribute to the cytokine milieu associated with AML pathophysiology and thus create an

environment conducive for AML cells. Substantial interindividual differences concerning the release of cytokines by AML cells upon RANK signaling were observed: For none of the 7 investigated samples, release of all four cytokines was observed, whereas at least 1.5-fold increased release of IL-6, IL-8, TNF and IL-10 compared to the control was observed in 3, 4, 5 and 2 patient samples, respectively (Figure 2C). RANK may thus (variably) contribute to an AML-associated cytokine milieu. Analysis of intracellular IL-6 and IL-8 levels by flow cytometry and gating for Fixable Aqua⁻/CD33⁺ cells ascertained that in fact the leukemic cells among patient-PBMC produced the respective cytokines upon signals transduced by RANK (Figure 2D).

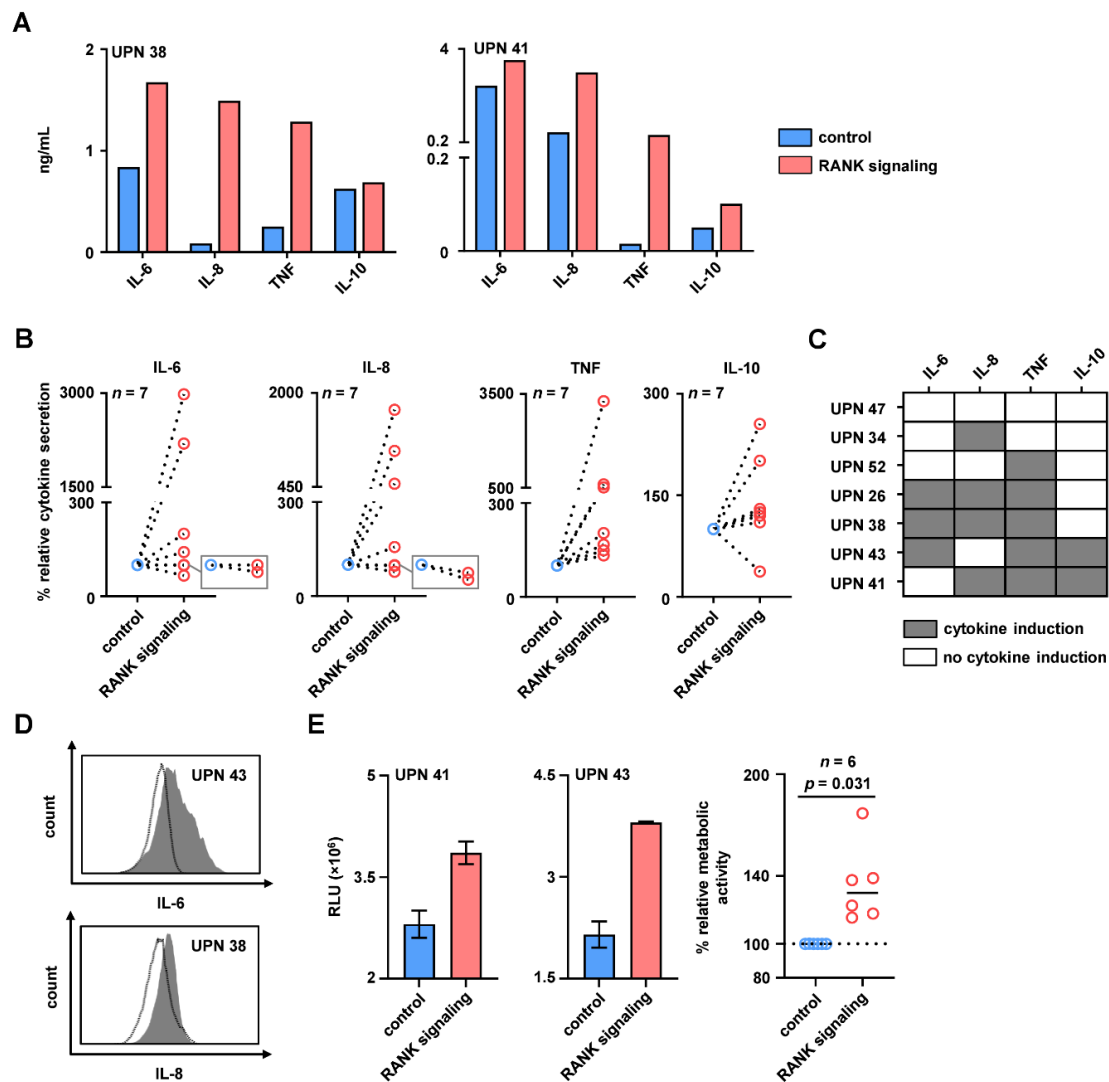


Figure 2. Induction of cytokines and metabolic activity upon RANK signaling in primary AML cells. PBMC of AML patients were cultured with Fc-hRANKL or rhIgG1-Fc as isotype control. (A–C) The levels of IL-6, IL-8, TNF and IL-10 in culture supernatants were determined by LEGENDplexTM assay after 24 h. (A) Exemplary data on the induction of IL-6, IL-8, TNF and IL-10 in culture supernatants of 2 AML patients are depicted. (B) Combined data of the cytokine release in $n = 7$ patients normalized to the isotype control are shown and individual patients are connected by dotted lines. (C) Patient-specific cytokine induction pattern upon RANK signaling is shown as heatmap representation (grey, cytokine induction; white, no cytokine induction). (D) Intracellular cytokine levels of IL-6 and IL-8 in 2 exemplary AML patients were analyzed by flow cytometry (shaded peaks, intracellular IL-6/IL-8; open peaks, isotype control). (E) Metabolic activity of leukemic cells was determined by CTG assay after 24 h. Results of representative experiments (left 2 panels) as well as combined results (right panel) obtained in independent experiments with leukemic cells of $n = 6$ AML patients are depicted (solid line, median; dotted line, 100% relative metabolic activity). Numbers in panels, heatmap and histograms represent uniform patient number (UPN) as shown in Table 1.

Next, we determined whether and how RANK signaling affected the viability of AML cells. We found that stimulation of RANK significantly increased metabolic activity as indicator of cell proliferation and viability in the primary AML cells (Figure 2E; $p = 0.031$). This indicates that RANK signaling transduces activating signals into primary AML cells that promote release of cytokines involved in pathophysiology as well as AML cell metabolic activity/viability.

3.3. RANK Mediates Chemotherapy Resistance of AML Cells

Based on our finding that RANK affects AML cell viability, we next analyzed whether signaling via RANK also affects resistance of the leukemic cells to treatment with doxorubicin and cytarabine, the most commonly used chemotherapeutics utilized for treatment of AML. A schematic representation of the experimental approach is given in Figure 3A. PBMC of AML patients were incubated with Fc-hRANKL or isotype control for 24 h. Then cells were treated with either doxorubicin and cytarabine for additional 24 h and 72 h, respectively. Thereafter, the consequences of RANK signaling for treatment resistance in terms of ATP content, mitochondrial membrane potential and apoptosis of the leukemic cells were analyzed by CTG assays, flow cytometry for TMRE staining and analysis of intracellular caspase-3 activity, respectively. Analyses of ATP levels revealed that RANK signaling significantly protected the AML cells from drug-induced cell death induced by either chemotherapeutic agent (Figure 3B; doxorubicin, $p = 0.007$; cytarabine, $p = 0.031$). In addition, signals transduced by RANK prevented the effects of treatment on AML cell mitochondrial membrane potential: upon treatment with doxorubicin, RANK signaling significantly increased the proportion of TMRE⁺ cells ($p = 0.002$). Similar effects were observed upon exposure of the AML cells to cytarabine, which however closely failed to reach statistical significance (Figure 3C; $p = 0.112$). Analyses of downstream apoptotic events, i.e., treatment-induced activation of caspase-3, an effector caspase with a central role in the process of cell apoptosis, revealed that RANK signaling also reduced the cleavage of procaspase-3 into its active form upon chemotherapeutic treatment: a significant reduction of active caspase-3 levels upon RANK stimulation was observed in the presence of both doxorubicin and cytarabine (Figure 3D; $p = 0.002$ and 0.031 , respectively). Similar but less pronounced results were observed in all assay systems when non-clustered trimeric soluble hRANKL (sRANKL) instead of multimeric Fc-hRANKL was used to induce signals by RANK (Supplementary Figure S1), in line with data, that for TNF family members in general and RANK in particular multimerization of ligands is required to obtain optimal signaling efficacy [28,29]. Altogether, our findings demonstrate that in AML cells signaling via RANK confers resistance to chemotherapy.

3.4. RANK Expression Is Associated with Dismal Survival of AML Patients

Based on our findings on the role of RANK in chemotherapy resistance, we next analyzed whether RANK expression on AML cells correlates with clinical characteristics and survival of patients. As a first step, we correlated RANK positivity with morphological characteristics according to the French-American-British (FAB) classification. The fractions of samples expressing at least 10% RANK on their surface among patients with different FAB types were as follows: M0, 2 of 5 (40%); M1, 2 of 7 (29%); M2, 2 of 7 (29%); M3, 2 of 5 (40%); M4, 7 of 13 (54%); M5, 15 of 16 (94%). A significant association of RANK expression with leukemia cell maturity, i.e., specimen from AML patients with differentiated FAB types (M4-M5) compared to M0-M2 subclasses was observed (Figure 4A; $p = 0.0002$).

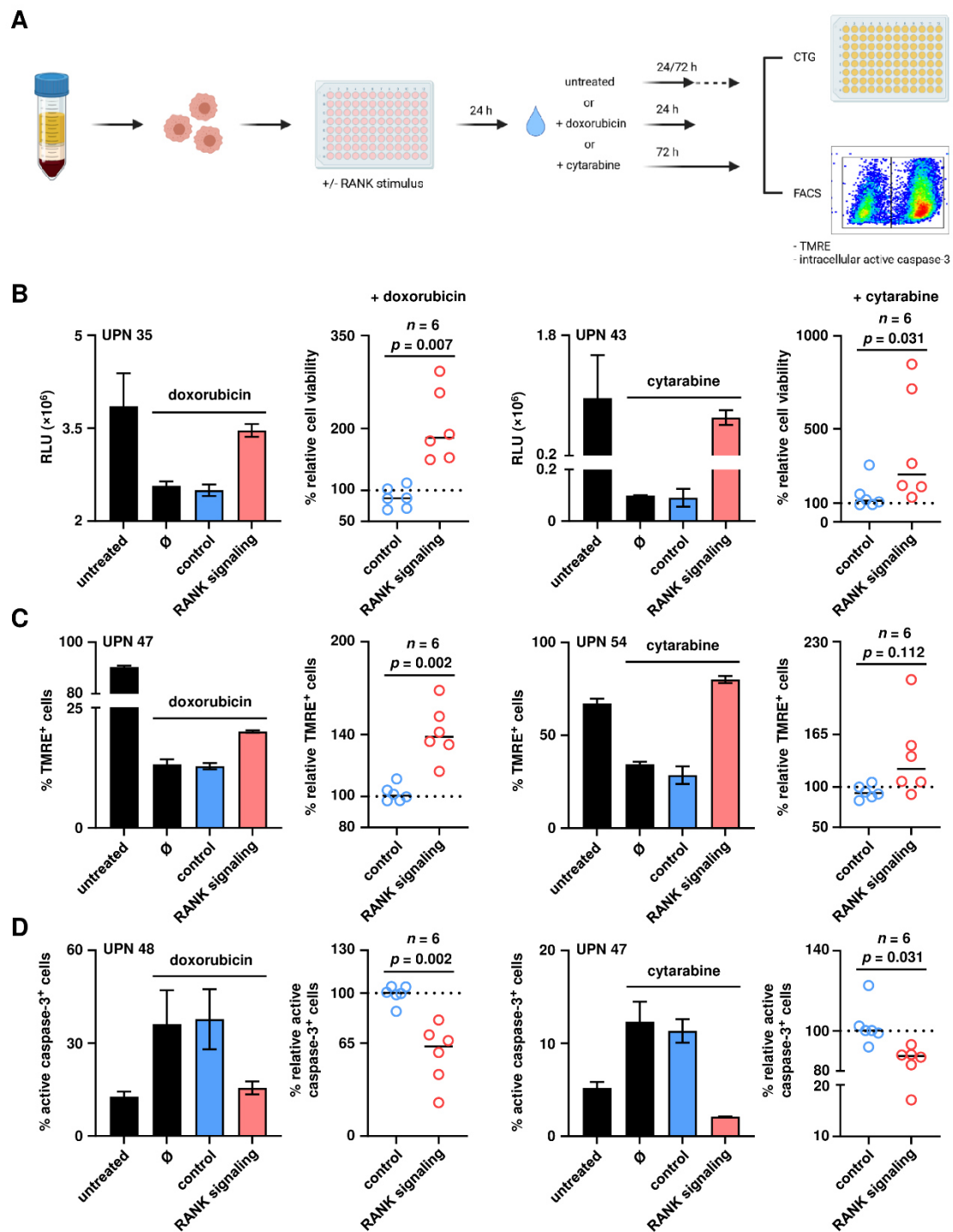


Figure 3. Resistance of primary AML cells to chemotherapeutic agents upon RANK signaling. (A) Schematic workflow for the analysis of resistance to doxorubicin and cytarabine of primary AML cells upon stimulation of RANK. (B) Cell viability was determined by CTG assay. Results of one representative experiment (bars) and combined results obtained in independent experiments with leukemic cells of $n = 6$ AML patients are shown (dot plots; solid lines, median; dotted lines, 100% relative cell viability; Ø, samples only treated with the respective chemotherapeutic agent). For combined results, data were normalized to samples treated with the respective chemotherapeutic agent (Supplementary Figure S2) and relative cell viability was calculated. (C) Mitochondrial membrane potential of AML cells was analyzed by staining with TMRE using flow cytometry. Results of one representative experiment (bars) and combined results obtained in independent experiments with leukemic cells of $n = 6$ AML patients are shown (dot plots; solid lines, median; dotted lines, 100% relative mitochondrial membrane potential; Ø, samples only treated with the respective chemotherapeutic agent). For combined results, data were normalized to samples treated with the respective chemotherapeutic agent (Supplementary Figure S2) and relative mitoc-

hondrial membrane potential was calculated. (D) Active caspase-3 in viable AML cells was determined intracellularly by flow cytometry. Results of one representative experiment (bars) and combined results obtained in independent experiments with leukemic cells of $n = 6$ AML patients are shown (dot plots; solid lines, median; dotted lines, 100% relative active caspase-3⁺ primary AML cells; \emptyset , samples only treated with the respective chemotherapeutic agent). For combined results, data were normalized to samples treated with the respective chemotherapeutic agent (Supplementary Figure S2) and relative percentage of active caspase-3⁺ primary AML cells was calculated. Numbers in panels represent uniform patient number (UPN) as shown in Table 1.

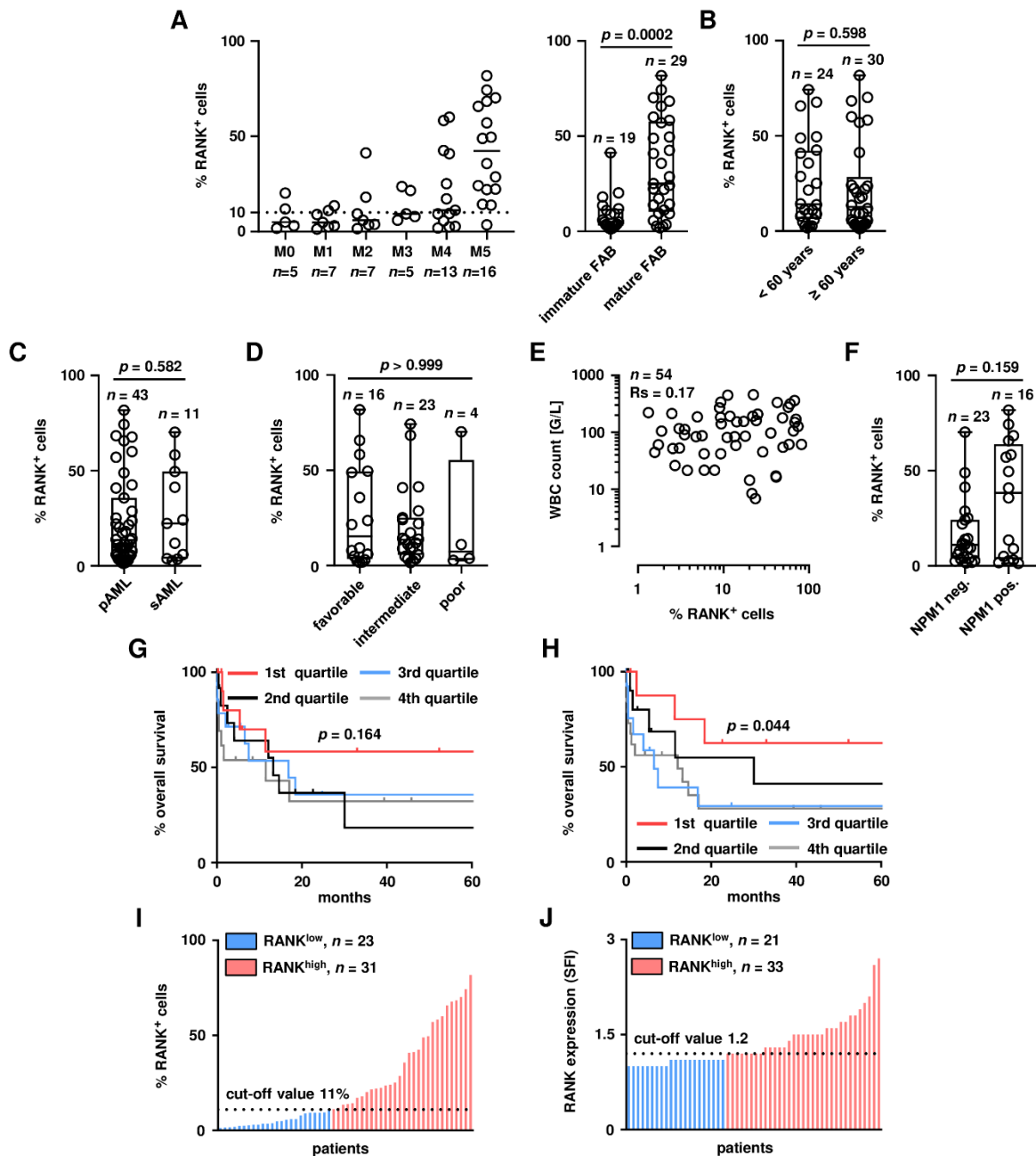


Figure 4. Cont.

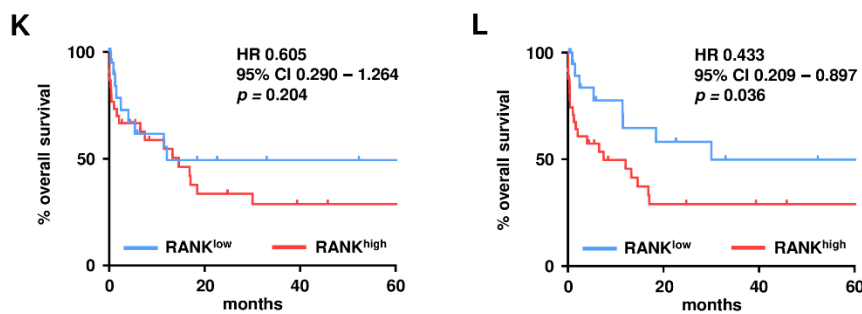


Figure 4. Association of RANK expression with clinical parameters and prognostic evaluation of RANK in AML. (A) Proportion of RANK⁺ cells in primary AML samples are grouped according to the individual FAB type (left panel) and in immature (M0-2, $n = 19$) versus mature (M4-5, $n = 29$) FAB types (right panel; solid lines, median; dotted line, 10% RANK⁺ cells). (B–D) Distribution of RANK expression (percentage of positive cells) in (B) AML patients below and above 60 years (<60 years, $n = 24$; ≥ 60 years, $n = 30$), (C) primary (pAML, $n = 43$) and secondary (sAML, $n = 11$) cases and (D) NCCN risk groups (favorable, $n = 16$; intermediate, $n = 23$; poor, $n = 4$) is shown. (E) Proportion of RANK⁺ cells in 54 primary AML samples are plotted against WBC counts. (F) AML cases positive ($n = 16$) or negative ($n = 23$) for *NPM1* mutations are shown. (G,H) Overall survival of 54 AML patients grouped into quartiles according to (G) percent RANK⁺ cells and (H) SFI levels are depicted (first to fourth quartile, low to high proportion of RANK⁺ cells and SFI levels, respectively). (I,J) Separation into RANK^{low} and RANK^{high} patient groups using the cut-off value of (I) 11% positive cells and (J) an SFI of 1.2 is shown. (K,L) Overall survival of patients assigned to the RANK^{low} and RANK^{high} groups based on the cut-off value of (K) 11% positive cells and (L) an SFI of 1.2 (HR, hazard ratio; CI, confidence interval).

No clear correlation of RANK expression with age (Figure 4B; $p = 0.598$) and primary versus secondary AML (Figure 4C; $p = 0.582$) was observed. Likewise, no correlation of RANK expression with the categorization of patients based on their genetic profile according to the National Comprehensive Cancer Network (NCCN) risk score into three different risk-groups (Figure 4D; $p > 0.999$) [30], white blood count (Figure 4E; $R_s = 0.17$) and recurrent genetic alterations such as nucleophosmin 1 (*NPM1*) mutations (Figure 4F; $p = 0.159$) was observed. To study whether RANK expression correlates with survival of AML patients, we grouped patients into quartiles according to the proportion of RANK⁺ cells (Figure 4G) or SFI levels (Figure 4H) and assessed overall survival (OS) in each group using Kaplan-Meier analysis. A tendency towards longer OS was observed when patients were grouped according to the percent RANK⁺ cells (Figure 4G; $p = 0.164$), while OS was significantly longer when SFI levels were used for determination of RANK positivity (Figure 4H; $p = 0.044$). Due to the substantial interindividual variation of RANK expression among AML patients, for subsequent analysis, predicted cut-off values were estimated by ROC analysis. A cut-off value of 11% (Figure 4I) and an SFI of 1.2 (Figure 4J) separated all AML patients in low and high expressing cases. OS tended to be longer in RANK^{low} patients than in high expressing cases when a cut-off value of 11% RANK expression was used (Figure 4K; hazard ratio 0.605, $p = 0.204$). A clear and statistically significantly longer OS was observed when comparing the groups below versus above an SFI of 1.2 (Figure 4L; hazard ratio 0.433, $p = 0.036$). These results are in line with the functional role of RANK observed in our antecedent experiments and identify a prognostic relevance of RANK in AML.

4. Discussion

The TNF superfamily member RANK and its cognate ligand are key players in bone metabolism [12,13]. RANK is expressed on osteoclast precursors, while its ligand RANKL is expressed in membrane-bound form on and cleaved from the surface of osteoblasts [31–33]. Receptor-ligand interaction causes the differentiation of progenitor cells into active osteoclasts, which then degrade bone. Beside its role in bone metabolism, available data document a role of RANK also in various other cellular functions and the pathophysiology of diseases such as thermoregulation and metastatic spread of different cancer entities mediation [14–22,34].

Here we report that RANK is functionally expressed on leukemic cells in a high number of AML cases, with expression being associated with a mature phenotype. Our *ex vivo* study using leukemia cells of AML patients identified RANK as potent influencer of cellular function and thus potential target for therapeutic approaches: upon RANK stimulation we observed induction of the cytokines IL-6, IL-8, TNF and IL-10, which can act as autocrine/paracrine growth and survival factors in AML and contribute to disease pathophysiology [35–38]. Among others, Hou et al. [39] demonstrated that knockout of IL-6 in bone marrow stromal cells increased chemosensitivity of AML cells, and likewise IL-8 was reported to promote proliferation and chemotherapy resistance [40]. IL-10 was shown to positively affect cell survival via autocrine mechanisms and upregulation of E-Cadherin acting as survival factor [41]. TNF was, among others, suggested to form a positive feedback loop with NF- κ B resulting in enhanced leukemia progression [42], and high TNF serum levels correlate with poor event-free and overall survival of AML patients [35]. In line, analyses of cell viability, mitochondrial membrane potential and activation of caspase-3 using primary leukemic cells revealed that RANK signaling increases cell viability and protects primary cells from apoptosis. Notably, this also held true upon exposure to doxorubicin or cytarabine, the most commonly used cytostatic compounds in AML treatment.

Our *ex vivo* analyses, enabled by the use of AML patient material, are particularly well suited when it comes to translation of results into clinical application in humans when compared to studies in murine models, as TNFR family members reportedly can mediate different effects in mice and men [43–45]. To ensure that our results were indeed due to effects in leukemic cells, only patient samples with $\geq 85\%$ blast count were used in functional analyses. This served to avoid artifacts arising from purification procedures. In addition, confirmation that effects occurred specifically in leukemia cells was provided by intracellular flow cytometry analyses where leukemic cells were selected by staining with appropriate surface markers.

The functional relevance of RANK in AML identified in our *ex vivo* analyses was further corroborated by our finding that RANK surface expression correlated with dismal disease outcome: a strong correlation of RANK positivity with shorter OS was detected, which also identified RANK surface expression as potential novel prognostic marker in AML. Notably, the association with disease course was clearly significant despite the relatively small cohort of 54 patients included in our study. This is of particular interest considering that no correlation of gene expression of RANK in AML cells with overall survival of patients was observed upon analysis of the “Acute Myeloid Leukemia (OHSU, Nature 2018) Whole-exome sequencing of acute myeloid leukemia samples from the Beat AML program” dataset from cBioPortal for Cancer Genomics. However, it should be considered that the public database only allows for correlative analyses of gene expression levels, but not for protein levels as in our study. Taking into account our finding that RANK mRNA and protein levels in AML cells do not correlate, not only the seeming discrepancy is explained, but also the relevance of analysis of protein expression as conducted in our study is underlined. Nevertheless, future analyses in larger cohorts are warranted to confirm our findings and to validate the utility of RANK as predictor of prognosis in AML.

RANK is known to interact with various TNFR-associated factor (TRAF) molecules (including TRAF 6) that are linked, among others, to activation of the transcription factor NF- κ B [46]. The latter is generally considered to exert pro-survival effects, for example by inducing expression of caspase inhibitors (inhibitors of apoptosis, IAPs) and mitochondria-mediated cell death inhibitors such as B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xL) [47,48], and reportedly can promote oncogenesis in mammalian systems [49]. Prevention of cell death through induced inhibitors upon activation of NF- κ B might also underlie the protective effects of RANK signaling observed with the AML patient samples in our study. In line, recent findings on resistance of AML cells e.g., upon exposure to a multikinase inhibitor targeting fms such as tyrosine kinase 3 (FLT3) as well as IL-1 receptor-associated kinase 1 and 4 (IRAK1/4) point to a mechanism associated with NF- κ B [50]. Together with our

results, these findings further highlight the potential of therapeutic RANK modulation to sensitize malignant cells to treatment. This could be achieved by inhibiting of RANK-RANKL interaction and thus RANK signaling into AML cells, e.g., using denosumab, a clinically approved neutralizing RANKL antibody that was found to improve disease-free survival in breast cancer patients [51]. This is even more since AML arises in the BM where (i) various cells abundantly express RANKL (e.g., [12,14,16]) and since (ii) the tightly controlled microenvironment plays an important role in transformation and development of malignant hematopoietic disease as well as chemotherapy resistance [52,53].

5. Conclusions

In conclusion, we provide the first evidence that RANK is expressed in AML and mediates resistance to chemotherapy. Moreover, the association of RANK expression with dismal disease course identifies RANK as potential “functional” prognostic marker and putative target for therapeutic intervention to improve treatment response of patients.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers13236122/s1>, Figure S1: Effects of RANK signaling in primary AML cells treated with chemotherapeutic agents using sRANKL, Figure S2: Extended data on resistance to doxorubicin and cytarabine upon RANK signaling in primary AML cells.

Author Contributions: Conceptualization, H.R.S., K.L.C. and B.J.S.; methodology, K.L.C., B.J.S., C.T. and P.S.; software, K.L.C., L.M.W. and J.S.H.; validation, K.L.C. and L.M.W.; formal analysis, K.L.C., L.M.W. and J.S.H.; investigation, K.L.C., L.M.W., B.J.S., J.S.H., M.M. and C.T.; resources, H.R.S., J.S.H. and P.S.; data curation, K.L.C., L.M.W., J.S.H. and M.M.; writing—original draft preparation, K.L.C. and L.M.W.; writing—review and editing, H.R.S., J.S.H. and P.S.; visualization, K.L.C. and L.M.W.; supervision, H.R.S.; project administration, K.L.C.; funding acquisition, H.R.S. and P.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript. K.L.C. and L.M.W. contributed equally to this work.

Funding: This research was funded by grants from Deutsche Forschungsgemeinschaft (SA1360/9-3), Germany’s Excellence Strategy (EXC 2180/1, 390900677), Wilhelm Sander-Stiftung (2017.100.2) and Deutsche Krebshilfe (70113496 and 70113999). P.S. was supported by the Swiss National Science Foundation (grant 310030A_176256). We furthermore acknowledge support from the Deutsche Forschungsgemeinschaft Open Access Publishing Fund of the University of Tuebingen.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of the University of Tuebingen (protocol code: 13/2007V; date of approval: 16 February 2007).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to the used patient material.

Acknowledgments: The authors thank Melanie Maerklin for scientific advice and Michael Beller for excellent technical assistance. Schematic representation of the experimental approach given in Figure 3A and graphical abstract were created with [BioRender.com](https://www.biorender.com). Flow cytometry sample acquisition was done on shared instruments of the Flow Cytometry Core Facility Tuebingen.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Yamamoto, J.F.; Goodman, M.T. Patterns of leukemia incidence in the United States by subtype and demographic characteristics, 1997–2002. *Cancer Causes Control* **2008**, *19*, 379–390. [[CrossRef](#)]
2. De Kouchkovsky, I.; Abdul-Hay, M. Acute myeloid leukemia: A comprehensive review and 2016 update. *Blood Cancer J.* **2016**, *6*, e441. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Southam, C.M.; Craver, L.F.; Dargeon, H.W.; Burchenal, J.H. A study of the natural history of acute leukemia with special reference to the duration of the disease and the occurrence of remissions. *Cancer* **1951**, *4*, 39–59. [[CrossRef](#)]

4. Crowther, D.; Bateman, C.J.T.; Vartan, C.P.; Whitehouse, J.M.; Malpas, J.S.; Fairley, G.H.; Scott, R.B. Combination Chemotherapy using L-Asparaginase, Daunorubicin, and Cytosine Arabinoside in Adults with Acute Myelogenous Leukaemia. *Br. Med. J.* **1970**, *4*, 513–517. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Wheatley, K.; Burnett, A.K.; Goldstone, A.H.; Gray, R.G.; Hann, I.M.; Harrison, C.J.; Rees, J.K.; Stevens, R.F.; Walker, H. A simple, robust, validated and highly predictive index for the determination of risk-directed therapy in acute myeloid leukaemia derived from the MRC AML 10 trial. United Kingdom Medical Research Council's Adult and Childhood Leukaemia Working Parties. *Br. J. Haematol.* **1999**, *107*, 69–79. [[CrossRef](#)]
6. Ganzel, C.; Sun, Z.; Cripe, L.D.; Fernandez, H.F.; Douer, D.; Rowe, J.M.; Paietta, E.M.; Ketterling, R.; O'Connell, M.J.; Wiernik, P.H.; et al. Very poor long-term survival in past and more recent studies for relapsed AML patients: The ECOG-ACRIN experience. *Am. J. Hematol.* **2018**, *93*, 1074–1081. [[CrossRef](#)]
7. SEER: Cancer Stat Facts: Acute Myeloid Leukemia. Available online: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html> (accessed on 18 October 2021).
8. Foreman, K.J.; Marquez, N.; Dolgert, A.; Fukutaki, K.; Fullman, N.; McGaughey, M.; Pletcher, M.A.; Smith, A.E.; Tang, K.; Yuan, C.W.; et al. Forecasting life expectancy, years of life lost, and all-cause and cause-specific mortality for 250 causes of death: Reference and alternative scenarios for 2016–40 for 195 countries and territories. *Lancet* **2018**, *392*, 2052–2090. [[CrossRef](#)]
9. Liu, H. Emerging agents and regimens for AML. *J. Hematol. Oncol.* **2021**, *14*, 49. [[CrossRef](#)]
10. Short, N.J.; Konopleva, M.; Kadia, T.M.; Borthakur, G.; Ravandi, F.; Dinardo, C.D.; Daver, N. Advances in the Treatment of Acute Myeloid Leukemia: New Drugs and New Challenges. *Cancer Discov.* **2020**, *10*, 506–525. [[CrossRef](#)]
11. Aggarwal, B.B. Signalling pathways of the TNF superfamily: A double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, *3*, 745–756. [[CrossRef](#)]
12. Hsu, H.; Lacey, D.L.; Dunstan, C.R.; Solovyev, I.; Colombero, A.; Timms, E.; Tan, H.-L.; Elliott, G.; Kelley, M.J.; Sarosi, I.; et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 3540–3545. [[CrossRef](#)]
13. Hofbauer, L.C.; Neubauer, A.; Heufelder, A.E. Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin: Potential implications for the pathogenesis and treatment of malignant bone diseases. *Cancer* **2001**, *92*, 460–470. [[CrossRef](#)]
14. Schmiedel, B.J.; Scheible, C.A.; Nuebling, T.; Kopp, H.-G.; Wirths, S.; Azuma, M.; Schneider, P.; Jung, G.; Grosse-Hovest, L.; Salih, H.R. RANKL Expression, Function, and Therapeutic Targeting in Multiple Myeloma and Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 683–694. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Rajakumar, S.A.; Papp, E.; Lee, K.K.; Grandal, I.; Merico, D.; Liu, C.C.; Allo, B.; Zhang, L.; Grynepas, M.D.; Minden, M.D.; et al. B cell acute lymphoblastic leukemia cells mediate RANK-RANKL-dependent bone destruction. *Sci. Transl. Med.* **2020**, *12*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Schmiedel, B.J.; Nuebling, T.; Steinbacher, J.; Malinowska, A.; Wende, C.M.; Azuma, M.; Schneider, P.; Grosse-Hovest, L.; Salih, H.R. Receptor activator for NF- κ B ligand in acute myeloid leukemia: Expression, function, and modulation of NK cell immunosurveillance. *J. Immunol.* **2013**, *190*, 821–831. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Park, M.; Cho, Y.J.; Kim, B.; Ko, Y.J.; Jang, Y.; Moon, Y.H.; Hyun, H.; Lim, W. RANKL immunisation inhibits prostate cancer metastasis by modulating EMT through a RANKL-dependent pathway. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 12186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Infante, M.; Fabi, A.; Cognetti, F.; Gorini, S.; Caprio, M.; Fabbri, A. RANKL/RANK/OPG system beyond bone remodeling: Involvement in breast cancer and clinical perspectives. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2019**, *38*, 12. [[CrossRef](#)]
19. Wu, X.; Li, F.; Dang, L.; Liang, C.; Lu, A.; Zhang, G. RANKL/RANK System-Based Mechanism for Breast Cancer Bone Metastasis and Related Therapeutic Strategies. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 76. [[CrossRef](#)]
20. Santini, D.; Schiavon, G.; Vincenzi, B.; Gaeta, L.; Pantano, F.; Russo, A.; Ortega, C.; Porta, C.; Galluzzo, S.; Armento, G.; et al. Receptor activator of NF- κ B (RANK) expression in primary tumors associates with bone metastasis occurrence in breast cancer patients. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e19234. [[CrossRef](#)]
21. Clar, K.L.; Hinterleitner, C.; Schneider, P.; Salih, H.R.; Maurer, S. Inhibition of NK Reactivity Against Solid Tumors by Platelet-Derived RANKL. *Cancers* **2019**, *11*, 277. [[CrossRef](#)]
22. Tan, W.; Zhang, W.; Strasner, A.; Grivennikov, S.; Cheng, J.Q.; Hoffman, R.M.; Karin, M. Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL–RANK signalling. *Nature* **2011**, *470*, 548–553. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Tandler, C.; Schmidt, M.; Heitmann, J.S.; Hierold, J.; Schmidt, J.; Schneider, P.; Dörfel, D.; Walz, J.; Salih, H.R. Neutralization of B-Cell Activating Factor (BAFF) by Belimumab Reinforces Small Molecule Inhibitor Treatment in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancers* **2020**, *12*, 2725. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Schneider, P.; Willen, L.; Smulski, C.R. Tools and Techniques to Study Ligand–Receptor Interactions and Receptor Activation by TNF Superfamily Members. *Methods Enzymol.* **2014**, *545*, 103–125. [[CrossRef](#)]
25. Buechele, C.; Baessler, T.; Wirths, S.; Schmohl, J.U.; Schmiedel, B.J.; Salih, H.R. Glucocorticoid-induced TNFR-related protein (GITR) ligand modulates cytokine release and NK cell reactivity in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Leukemia* **2011**, *26*, 991–1000. [[CrossRef](#)]
26. Nuebling, T.; Schumacher, C.E.; Hofmann, M.; Hagelstein, I.; Schmiedel, B.J.; Maurer, S.; Federmann, B.; Rothfelder, K.; Roerden, M.; Dörfel, D.; et al. The Immune Checkpoint Modulator OX40 and Its Ligand OX40L in NK-Cell Immunosurveillance and Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Immunol. Res.* **2018**, *6*, 209–221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

27. Mihalczik, S.A.; Tschumper, R.C.; Jelinek, D.F. Transcriptional and post-transcriptional mechanisms of BAFF-receptor dysregulation in human B lineage malignancies. *Cell Cycle* **2010**, *9*, 4884–4892. [[CrossRef](#)]
28. Schneider, P.; Holler, N.; Bodmer, J.-L.; Hahne, M.; Frei, K.; Fontana, A.; Tschopp, J. Conversion of Membrane-bound Fas(CD95) Ligand to Its Soluble Form Is Associated with Downregulation of Its Proapoptotic Activity and Loss of Liver Toxicity. *J. Exp. Med.* **1998**, *187*, 1205–1213. [[CrossRef](#)]
29. Kucka, K.; Wajant, H. Receptor Oligomerization and Its Relevance for Signaling by Receptors of the Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *8*, 1890. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. O'Donnell, M.R.; Tallman, M.S.; Abboud, C.N.; Altman, J.K.; Appelbaum, F.R.; Arber, D.A.; Bhatt, V.; Bixby, D.; Blum, W.; Coutre, S.E.; et al. Acute Myeloid Leukemia, Version 3.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J. Natl. Compr. Cancer Netw.* **2017**, *15*, 926–957. [[CrossRef](#)]
31. Nakashima, T.; Kobayashi, Y.; Yamasaki, S.; Kawakami, A.; Eguchi, K.; Sasaki, H.; Sakai, H. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: Modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *275*, 768–775. [[CrossRef](#)]
32. Lum, L.; Wong, B.R.; Josien, R.; Becherer, J.D.; Erdjument-Bromage, H.; Schlondorff, J.; Tempst, P.; Choi, Y.; Blobel, C.P. Evidence for a role of a tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 13613–13618. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Hikita, A.; Yana, I.; Wakeyama, H.; Nakamura, M.; Kadono, Y.; Oshima, Y.; Nakamura, K.; Seiki, M.; Tanaka, S. Negative regulation of osteoclastogenesis by ectodomain shedding of receptor activator of NF-kappaB ligand. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 36846–36855. [[CrossRef](#)]
34. Hanada, R.; Leibbrandt, A.; Hanada, T.; Kitaoka, S.; Furuyashiki, T.; Fujihara, H.; Trichereau, J.; Paolino, M.; Qadri, F.; Plehm, R.; et al. Central control of fever and female body temperature by RANKL/RANK. *Nature* **2009**, *462*, 505–509. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Tsimberidou, A.M.; Estey, E.; Wen, S.; Pierce, S.; Kantarjian, H.; Albitar, M.; Kurzrock, R. The prognostic significance of cytokine levels in newly diagnosed acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndromes. *Cancer* **2008**, *113*, 1605–1613. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Kornblau, S.M.; McCue, D.; Singh, N.; Chen, W.; Estrov, Z.; Coombes, K.R. Recurrent expression signatures of cytokines and chemokines are present and are independently prognostic in acute myelogenous leukemia and myelodysplasia. *Blood* **2010**, *116*, 4251–4261. [[CrossRef](#)]
37. Binder, S.; Luciano, M.; Horejs-Hoeck, J. The cytokine network in acute myeloid leukemia (AML): A focus on pro- and anti-inflammatory mediators. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2018**, *43*, 8–15. [[CrossRef](#)]
38. Sanchez-Correa, B.; Bergua, J.M.; Campos, C.; Gayoso, I.; Arcos, M.J.; Bañas, H.; Morgado, S.; Casado, J.G.; Solana, R.; Tarazona, R. Cytokine profiles in acute myeloid leukemia patients at diagnosis: Survival is inversely correlated with IL-6 and directly correlated with IL-10 levels. *Cytokine* **2013**, *61*, 885–891. [[CrossRef](#)]
39. Hou, D.; Wang, B.; You, R.; Wang, X.; Liu, J.; Zhan, W.; Chen, P.; Qin, T.; Zhang, X.; Huang, H. Stromal cells promote chemoresistance of acute myeloid leukemia cells via activation of the IL-6/STAT3/OXPHOS axis. *Ann. Transl. Med.* **2020**, *8*, 1346. [[CrossRef](#)]
40. Vijay, V.; Miller, R.; Vue, G.S.; Pezeshkian, M.B.; Maywood, M.; Ast, A.M.; Drusbosky, L.M.; Pompeu, Y.; Salgado, A.D.; Lipton, S.D.; et al. Interleukin-8 blockade prevents activated endothelial cell mediated proliferation and chemoresistance of acute myeloid leukemia. *Leuk. Res.* **2019**, *84*, 106180. [[CrossRef](#)]
41. Nishioka, C.; Ikezoe, T.; Pan, B.; Xu, K.; Yokoyama, A. MicroRNA-9 plays a role in interleukin-10-mediated expression of E-cadherin in acute myelogenous leukemia cells. *Cancer Sci.* **2017**, *108*, 685–695. [[CrossRef](#)]
42. Kagoya, Y.; Yoshimi, A.; Kataoka, K.; Nakagawa, M.; Kumano, K.; Arai, S.; Kobayashi, H.; Saito, T.; Iwakura, Y.; Kurokawa, M. Positive feedback between NF-κB and TNF-α promotes leukemia-initiating cell capacity. *J. Clin. Investig.* **2014**, *124*, 528–542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Baessler, T.; Charton, J.E.; Schmiedel, B.J.; Grünebach, F.; Krusch, M.; Wacker, A.; Rammensee, H.-G.; Salih, H.R. CD137 ligand mediates opposite effects in human and mouse NK cells and impairs NK-cell reactivity against human acute myeloid leukemia cells. *Blood* **2010**, *115*, 3058–3069. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Levings, M.K.; Sangregorio, R.; Sartirana, C.; Moschin, A.L.; Battaglia, M.; Orban, P.C.; Roncarolo, M.G. Human CD25+CD4+ T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells. *J. Exp. Med.* **2002**, *196*, 1335–1346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Tuyaearts, S.; Van Meirvenne, S.; Bonehill, A.; Heirman, C.; Corthals, J.; Waldmann, H.; Breckpot, K.; Thielemans, K.; Aerts, J.L. Expression of human GITRL on myeloid dendritic cells enhances their immunostimulatory function but does not abrogate the suppressive effect of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Leukoc. Biol.* **2007**, *82*, 93–105. [[CrossRef](#)]
46. Walsh, M.C.; Choi, Y. Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone, and Beyond. *Front Immunol.* **2014**, *5*, 511. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Gyrd-Hansen, M.; Meier, P. IAPs: From caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 561–574. [[CrossRef](#)]
48. Chen, C.; Edelman, L.C.; Gelinas, C. The Rel/NF-κB Family Directly Activates Expression of the Apoptosis Inhibitor Bcl-xL. *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*, 2687–2695. [[CrossRef](#)]
49. Rayet, B.; Gélinas, C. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene* **1999**, *18*, 6938–6947. [[CrossRef](#)]

50. Melgar, K.; Walker, M.M.; Jones, L.M.; Bolanos, L.C.; Hueneman, K.; Wunderlich, M.; Jiang, J.K.; Wilson, K.M.; Zhang, X.; Sutter, P.; et al. Overcoming adaptive therapy resistance in AML by targeting immune response pathways. *Sci. Transl. Med.* **2019**, *11*, 1–16. [[CrossRef](#)]
51. Gnant, M.; Pfeiler, G.; Steger, G.G.; Egle, D.; Greil, R.; Fitzal, F.; Wette, V.; Balic, M.; Haslbauer, F.; Melbinger-Zeinitzer, E.; et al. Adjuvant denosumab in postmenopausal patients with hormone receptor-positive breast cancer (ABCSG-18): Disease-free survival results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **2019**, *20*, 339–351. [[CrossRef](#)]
52. Behrmann, L.; Wellbrock, J.; Fiedler, W. Acute Myeloid Leukemia and the Bone Marrow Niche—Take a Closer Look. *Front. Oncol.* **2018**, *8*, 444. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Meads, M.B.; Gatenby, R.A.; Dalton, W.S. Environment-mediated drug resistance: A major contributor to minimal residual disease. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 665–674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Supplementary Materials

Receptor Activator of NF- κ B (RANK) confers resistance to chemotherapy in AML and associates with dismal disease course

Kim L. Clar, Lisa M. Weber, Bastian J. Schmied, Jonas S. Heitmann, Maddalena Marconato, Claudia Tandler, Pascal Schneider and Helmut R. Salih

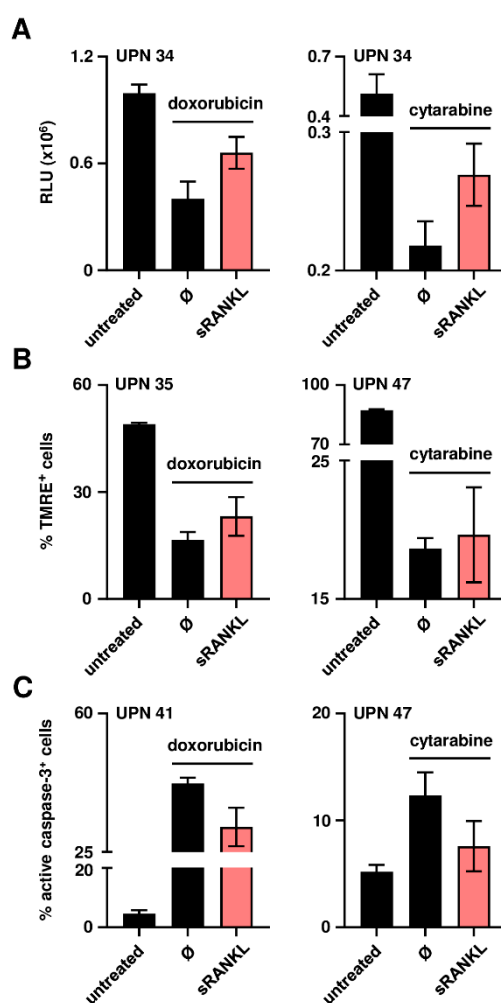


Figure S1. Effects of RANK signaling in primary AML cells treated with chemotherapeutic agents using sRANKL. (A) ATP levels, (B) mitochondrial membrane potential and (C) cell death were analyzed by CTG assays, flow cytometry for TMRE staining and analysis of intracellular caspase-3 activity, respectively, in primary AML cells upon RANK signaling using non-clustered trimeric sRANKL (0.5 μ g/mL) and treatment with either chemotherapeutic agent (\emptyset , samples only treated with the respective chemotherapeutic agent). Numbers in panels represent uniform patient number (UPN) as shown in Table 1.

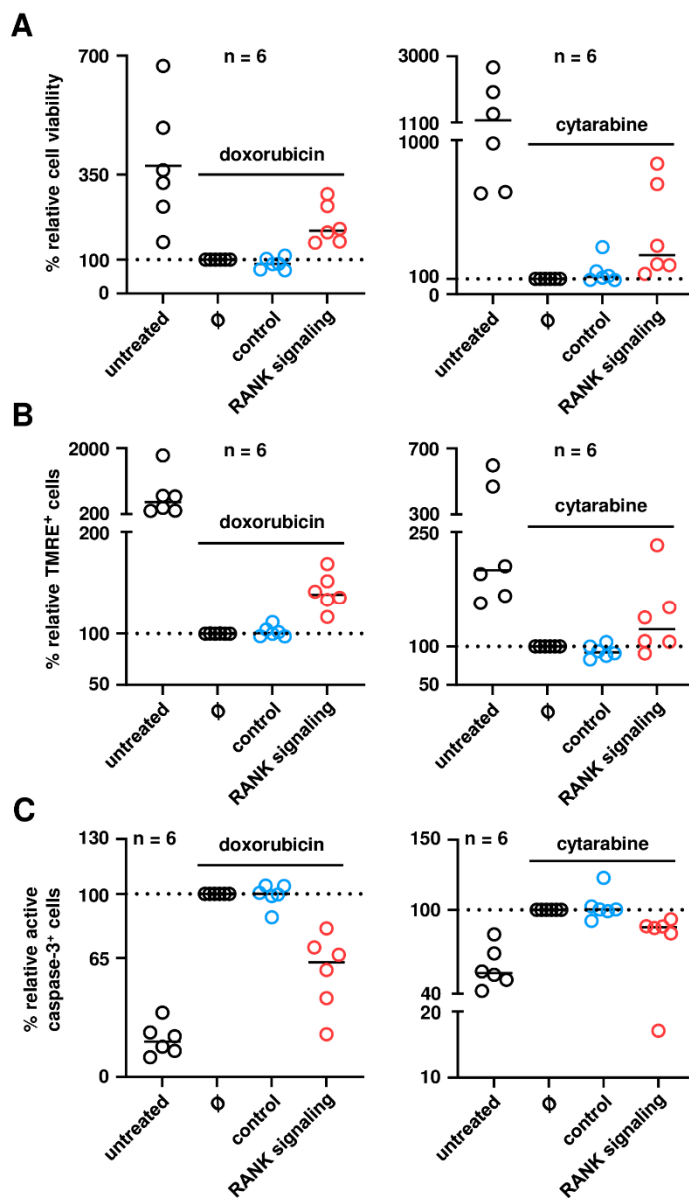


Figure S2. Extended data on resistance to doxorubicin and cytarabine upon RANK signaling in primary AML cells. Additional data on untreated primary AML cells and samples solely treated with the respective chemotherapeutic agent (\emptyset) are shown. Combined results obtained in independent experiments with leukemic cells of $n = 6$ AML patients upon RANK signaling and treatment with either chemotherapeutic agent by (A) CTG assay, (B) flow cytometry for TMRE staining and (C) analysis of intracellular caspase-3 activity are depicted (solid lines, median; dotted lines, 100% relative cell viability, mitochondrial membrane potential and active caspase-3⁺ primary AML cells, respectively). Data were normalized to samples treated with the respective chemotherapeutic agent.