

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main  
Zentrum der Kinderheilkunde und Jugendmedizin  
Klinik für Kinderheilkunde III: Hämatologie, Onkologie und Hämostaseologie  
Direktor: Prof. Dr. med. Th. Klingebiel

# Immunomagnetische T-Zell-Depletion mit monoklonalen Antikörpern bei der Herstellung von NK-Zell-Präparaten

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von  
Carsten Seckelmann  
aus Lüdenscheid

Frankfurt am Main  
2004

Dekan: Prof. Dr. J. Pfeilschifter

Referent: PD Dr. D. Schwabe

Koreferent: Prof. Dr. E. Seifried

Tag der Disputation: 24.02.2005

*Gott ist zwar unsichtbar,  
doch an seinen Werken, der Schöpfung,  
haben die Menschen seit jeher  
seine göttliche Macht und Größe  
sehen und erfahren können.*

*(Römer 1,20)*

Meiner Familie

# Inhaltsverzeichnis

## Seite

<b>Verzeichnis der Abkürzungen</b> .....	<b>iii</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>iv</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>vi</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Grundlagen zum Thema</b> .....	<b>3</b>
2.1 Natürliche Killer - Zellen .....	3
2.1.1 Definition .....	3
2.1.2 Immunphänotyp .....	3
2.1.3 Herkunft und Entwicklung .....	3
2.1.4 Physiologische Rolle .....	4
2.1.5 Regulation .....	6
2.1.6 Zielzellerkennung .....	7
2.1.7 Lysemechanismen .....	11
2.2 Anfänge der Immuntherapie mit Natürlichen Killer - Zellen .....	12
2.3 Klinische Relevanz einer NK-Zell-Therapie im Rahmen von Stammzelltransplantationen .....	13
<b>3 Aufgabenstellung</b> .....	<b>15</b>
<b>4 Material</b> .....	<b>16</b>
4.1 Geräte .....	16
4.2 Antikörper .....	17
4.3 Arbeitsmaterialien und Chemikalien .....	18
4.4 Herstellung der Lösungen .....	19
4.5 Buffy coats .....	19
<b>5 Methoden</b> .....	<b>20</b>
5.1 Ficoll-Separation .....	20

---

	<b>Seite</b>
5.2	T-Zell-Depletion..... 21
5.2.1	Antikörper-Inkubation..... 21
5.2.2	Immunomagnetische Zellseparation ..... 22
5.3	Durchflusszytometrische Bestimmungen ..... 24
5.3.1	FACS-Ansätze..... 24
5.3.2	FACS-Analysen ..... 25
5.4	Aufbau der Versuchsreihe ..... 27
5.5	Statistik..... 28
<b>6</b>	<b>Ergebnisse..... 29</b>
6.1	Zielgrößen ..... 29
6.2	Auslastung der Säulenkapazität ..... 29
6.3	T-Zell-Depletion..... 30
6.4	Restkontamination mit T-Zellen nach Depletion ..... 35
6.5	NK-Zell-Ertrag (recovery) ..... 38
6.6	Weitere Einflussgrößen ..... 41
6.7	NK-Zell-Verlust während der Depletion ..... 44
6.7.1	NK-Zell-Verlust in der Trennsäule ..... 44
6.7.2	NK-Zell-Verlust in der Spülung..... 47
6.8	NK-Zell-Reinheit mit dem „NK isolation kit“ ..... 50
6.9	Fehlerbetrachtung ..... 52
<b>7</b>	<b>Diskussion ..... 53</b>
7.1	Methodendiskussion..... 53
7.2	Ergebnisdiskussion ..... 56
7.3	Vergleich der Ergebnisse mit Methoden und Ergebnissen in der Literatur unter Berücksichtigung der klinischen Relevanz. .... 59
<b>8</b>	<b>Schlussfolgerung ..... 66</b>
	<b>Literaturverzeichnis..... 68</b>
	<b>Anhang..... 90</b>

## Verzeichnis der Abkürzungen

AK	Antikörper
BSD	Blutspendedienst
CD	cluster of differentiation
DISC	death inducing signaling complex
DNA	desoxyribonucleic acid
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
FACS	flow acquisition cytometry scan
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
flt3	fms like tyrosine kinase 3
flt3-L	fms like tyrosine kinase 3 - Ligand
FS	forward scatter
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
GVHD	graft-versus-host-disease
GVL	graft-versus-leukaemia
GVT	graft-versus-tumor
HLA	human leukocyte antigen
HSA	Humanserumalbumin
HVG	host-versus-graft
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IK	NK isolation kit
IL	Interleukin
ITAM	immunoreceptor tyrosine based activatory motif
ITIM	immunoreceptor tyrosine based inhibitory motif
KIR	killer inhibitory receptor
KMT	Knochenmarkstransplantation
LAK	Lymphokin-aktivierte Killerzellen
MB	CD3 MicroBeads
MHC	major histocompatibility complex
MRD	minimal residual disease
mRNA	messenger ribonucleic acid
NCAM	neural cell adhesion molecule
NK Zelle	Natürliche Killer Zelle
NKCF	NK-Zell Faktoren
PBS	phosphate buffered saline
PBSZT	periphere Blutstammzell-Transplantation
PE	Pycoerythrin
SCF	stem cell factor
SS	side scatter
TGF	tumor growth factor
TNF	Tumor Nekrose Faktor

---

# Immunomagnetische T-Zell-Depletion mit monoklonalen Antikörpern bei der Herstellung von NK-Zell-Präparaten

## Zusammenfassung

### Hintergrund

Bei einigen Krankheiten bekommt die Knochenmarkstransplantation bzw. die Transplantation peripherer Blutstammzellen als Therapiemöglichkeit eine wachsende Bedeutung. Trotz aller Fortschritte birgt diese Therapieform die Gefahr von schwer zu kontrollierenden Komplikationen (Graft-versus-Host-Krankheit, Host-versus-Graft-Krankheit, lebensbedrohliche Infektionen), die die Behandlungsmöglichkeiten einschränken.

Die Eigenschaften und Fähigkeiten von Natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) eröffnen vielversprechende Möglichkeiten, die Komplikationen einer Stammzelltransplantation besser zu kontrollieren. Dafür ist es notwendig, NK-Zellen in möglichst reiner Form und ausreichender Menge bereitzustellen. Seit einigen Jahren stehen verschiedene immunomagnetische Antikörper zur Verfügung, mit denen Zellen gezielt selektiert oder depletiert werden können. Allerdings sind die Herstellerangaben zu Versuchsbedingungen an experimentellen Ansätzen orientiert. Um die Antikörper im klinischen Bereich in entsprechenden Größenordnungen einzusetzen, sind Versuchsansätze in klinischen Größenmaßstäben nötig.

### Methoden

In dieser Arbeit wird eine Methode zur immunomagnetischen T-Zell-Depletion bei der Herstellung von NK-Zell-Präparaten untersucht. Mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern werden Zellen immunomagnetisch markiert und in einem starken Magnetfeld getrennt. Es wird ein etablierter Einzelantikörper („CD3 MicroBeads“) mit einem neuen Antikörper Kit („NK isolation kit“) verglichen. In der Versuchsreihe sollen die Wahl des Antikörpers, die Antikörpermenge, und die Flussgeschwindigkeit durchs Magnetfeld (Auftraggeschwindigkeit) hinsichtlich ihres Einflusses auf die T-Zell-Depletion, die T-Zell-Restkontamination nach Depletion und den NK-Zell-Ertrag untersucht werden. Bei einem der verwendeten Antikörper („NK isolation kit“) interessiert außerdem die NK-Zell-Reinheit des resultierenden NK-Zell-Präparates.

## **Ergebnisse**

Während die T-Zell-Depletion mit dem „NK isolation kit“ tendenziell größer ist als mit „CD3 MicroBeads“, unterscheiden sich beide Antikörper nicht signifikant in der T-Zell-Restkontamination. Mit „CD3 MicroBeads“ kann allerdings eine verlässlichere T-Zell-Restkontamination mit einer geringeren Schwankungsbreite der Ergebnisse erreicht werden.

Weiterhin liefern „CD3 MicroBeads“ einen signifikant höheren NK-Zell-Ertrag, da mit dem „NK isolation kit“ abhängig von der eingesetzten Antikörpermenge und der damit zusammenhängenden Antikörperkonzentration mehr NK-Zellen in der magnetischen Trennsäule verloren gehen. Dabei deutet sich an, dass bei einer höheren Auftraggeschwindigkeit der NK-Zell-Verlust geringer ist. Die Menge der eingesetzten Antikörper korreliert beim „NK isolation kit“ positiv mit der erzielten NK-Zell-Reinheit.

## **Schlussfolgerung**

Die vorgelegten Ergebnisse zeigen, dass sowohl mit einem Einzelantikörper („CD3 MicroBeads“) also auch mit einem Antikörper-Cocktail („NK isolation kit“) eine ausreichende Depletion von T-Zellen in einem klinischen Maßstab möglich ist. Bei beiden Verfahren kann mit einem Separationsschritt eine höhere T-Zell-Depletion erreicht werden, als mit anderen oder ähnlichen in der Literatur beschriebenen Verfahren.

Während mit dem „NK isolation kit“ in einem Depletionsschritt NK-Zell-Präparate mit bis zu 90%iger Reinheit hergestellt werden können, müsste sich nach der T-Zell-Depletion mit „CD3 MicroBeads“ noch eine NK-Zell-Positivselektion anschließen. Während die Auftraggeschwindigkeit von untergeordneter Bedeutung ist, spielt die eingesetzte Antikörpermenge beim „NK isolation kit“ eine signifikante Rolle.

---

# Immunomagnetic T-cell-depletion in the preparation of NK-cell-specimens using monoclonal antibodies

## Abstract

### Background

Bone marrow transplantation or peripheral blood stem cell transplantation respectively is becoming increasingly important in the treatment of several diseases. Despite all the advances made, this form of therapy can cause complications that are difficult to manage. Thus its use is limited.

The characteristics of natural killer cells offer promising means to control complications such as graft-versus-host-disease and host-versus-graft-disease. Because of this, it is necessary to ensure a sufficient quantity of NK cells is available, in the purest possible form.

For many years now immunomagnetic antibodies have been available to selectively mark and separate cells. But manufacturer specifications are based on small scale experiments. Clinical scale studies are necessary before immunomagnetic antibodies are used in clinical applications.

### Methods

In this study, a method to immunomagnetically deplete T-cells was tested. By using magnetically labeled monoclonal antibodies, cells were marked and separated in a strong magnetic field. An established antibody, “CD3 MicroBeads”, was compared to a new antibody kit, “NK isolation kit”. Concerning the effect on T-cell-depletion, T-cell-contamination after depletion and NK-cell-recovery changes in the choice of antibody, the amount of antibody and flow rate were tested. When the “NK isolation kit” was used, the NK-cell-purity of the resulting NK-cell-specimen was also of interest.

### Results

T-cell-depletion was slightly but not significantly higher with the “NK isolation kit” than with the “CD3 MicroBeads”. There were no significant differences in T-cell-contamination. But with “CD3 MicroBeads” a more reliable T-cell-contamination with variation over a smaller range was obtained.

In addition “CD3 MicroBeads” yielded a higher NK-cell-recovery.

Using the “NK isolation kit”, a higher percentage of NK-cells was lost within the depletion column, depending on the amount of antibodies used and the corresponding higher antibody concentration. There are indications that a higher flow rate reduces the loss of NK-cells. The amount of antibodies correlates positively with NK-cell-purity.

## **Conclusions**

The results show that both “CD3 MicroBeads” and “NK isolation kit” are capable of sufficiently depleting T-cells in a clinical scale setting. Only one depletion-cycle was necessary to achieve a higher T-cell-depletion than mentioned elsewhere in literature. With “NK isolation kit”, one depletion cycle was sufficient to yield a NK-cell-specimen with a purity as high as 90%. “CD3 MicroBeads” would need another cycle of NK-cell-selection after T-cell-depletion. While the flow rate has minor importance, the amount of antibody when using the “NK isolation kit” plays a significant role.

## 1 Einleitung

Für immer mehr neoplastische Krankheiten bekommt die Knochenmarkstransplantation (KMT) bzw. die Transplantation peripherer Blutstammzellen (PBSZT) als Therapiemöglichkeit eine wachsende Bedeutung. Sowohl bei Leukämien und Lymphomen als auch bei soliden Tumoren, wie z.B. Brustkrebs, wurden erfolgreiche Behandlungen durchgeführt. Die Verfügbarkeit hämatopoetischer Wachstumsfaktoren und die Möglichkeit der Gewinnung und Transplantation peripherer Stammzellen hat die Beherrschung der dosislimitierenden Myelotoxizität möglich gemacht, so dass dosiseskalierte Chemotherapien angewendet werden konnten. In der Vergangenheit wurde in zahlreichen Studien belegt, dass eine dauerhafte Rekonstitution der Hämatopoese durch Transplantation hämatopoetischer Vorläuferzellen nach hochdosierter Chemotherapie möglich ist [173]. Man erhoffte sich durch eine Dosiserhöhung der Chemotherapie das Ausmaß der Tumorzellzerstörung zu vergrößern und nach Möglichkeit die gesamte Tumorzellpopulation zu zerstören [174,175].

Trotz aller Fortschritte auf dem Gebiet der Stammzelltransplantation, gibt es Faktoren, die die Behandlungsmöglichkeiten einschränken.

Einerseits ist zum Zeitpunkt der Transplantation das gesamte blutbildende System durch die konditionierende (vorbereitende) Chemotherapie abgetötet. Da insbesondere auch das Immunsystem außer Kraft gesetzt ist, sind die Patienten zu diesem Zeitpunkt der maximalen Immunsuppression äußerst infektionsgefährdet.

Andererseits werden neben den Blutstammzellen unter anderem auch T-Zellen des Spenders mittransplantiert, die eine Graft-versus-Host-Krankheit (GVHD) auslösen können [176]. Die immunkompetenten T-Zellen greifen abhängig von der Kompatibilität des HLA-Systems (human leucocyte antigen) die Zellen des Empfängerorganismus an, weil sie deren Oberflächenstrukturen als Fremdantigene erkennen können, was zu starken Nebenwirkungen bis hin zum Tod führen kann. Außerdem können sich Tumorzellen, die nach der Hochdosis-Chemotherapie noch im Organismus verbleiben (minimal residual disease, MRD), im Anschluss wieder neu vermehren und ein Rezidiv hervorrufen, was ein Scheitern des Therapieversuchs bedeutet. Deshalb gilt es, neben der Gefahr einer Infektion oder einer GVHD auch die Rezidivwahrscheinlichkeit zu minimieren.

In der Klinik steht man vor dem Problem, dass es eigentlich keine geeignete Behandlungsmethode gibt, die alle drei Komplikationen gleichzeitig kontrolliert. Im Gegenteil hat man es mit widerstreitenden Effekten zu tun. Versucht man eine drohende GVHD durch Gabe von

Immunsuppressiva in den Griff zu bekommen, vergrößert man gleichzeitig die Wahrscheinlichkeit eines Rezidives und opportunistischer Infektionen.

Entfernt man die T-Zellen aus den Stammzelltransplantaten, kann das Auftreten einer akuten GVHD verhindert werden [176-178]. Zusätzlich zu den unerwünschten haben T-Zellen aber auch erwünschte Wirkungen, die bei einer T-Zell-Depletion (TCD) verloren gehen. Sie attackieren nämlich die noch überlebenden Tumorzellen (MRD) und haben so einen Graft-versus-Tumor-Effekt (GVT). Durch die Entfernung der T-Zellen steigt also wieder die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs.

Will man dagegen die Rezidivgefahr durch Stimulation der T-Zellen mit Zytokinen (z.B. IL-2) minimieren, läuft man Gefahr eine GVHD zu provozieren. Man steht also vor dem Problem, gleichzeitig auftretende positive und negative Effekte zu kontrollieren und sie nach Möglichkeit selektiv zu beeinflussen.

Als vielversprechende Therapieoption bieten sich seit einigen Jahren Natürliche Killer Zellen (NK-Zellen) an, die eine ausgeprägte tumorizide Wirkungen haben [2,179], ohne eine GVHD auszulösen [180]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass aktivierte NK-Zellen das Anwachsen eines Transplantats fördern, indem sie die T- und NK-Zellen des Empfängers zerstören, und so eine Abstoßungsreaktion (Host-versus-Graft, HVG) verhindern. In gleichem Maße ist ihre Produktion von Wachstumsfaktoren (GM-CSF, G-CSF) für die Immunrestitution förderlich.

Zu alledem können NK-Zellen die T-Zell-vermittelte GVHD auch aktiv unterdrücken, ohne dabei ihre, wahrscheinlich über IFN- $\gamma$  gesteuerten, GVT-Effekte einzubüßen [181].

NK-Zellen scheinen also für die gewünschte selektive Beeinflussung von GVHD und GVT bestens geeignet zu sein.

Um dem ausgeweiteten Anwendungsspektrum der Stammzelltransplantation Rechnung zu tragen, ist es unumgänglich, die Effizienz dieser Behandlungsform zu verbessern. Die Eigenschaften und Fähigkeiten von NK-Zellen eröffnen vielversprechende Möglichkeiten, die Komplikationen der Stammzelltransplantation besser zu kontrollieren.

Da die Funktionen und Wechselwirkungen der verschiedenen Zelltypen (z.B. T- und NK-Zellen) sehr komplex sind, ist es wichtig, die Zelltypen zu isolieren, um sie gezielt einsetzen zu können. Eine Forderung ist deshalb, NK-Zellen in möglichst reiner Form und ausreichender Menge zur Verfügung zu stellen.

## 2 Grundlagen zum Thema

### 2.1 Natürliche Killer - Zellen

#### 2.1.1 Definition

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind eine eigenständige Subpopulation der Lymphozyten mit charakteristischen morphologischen, immunphänotypischen und funktionellen Eigenschaften. Sie sind definiert als spontan zytotoxische, große granuläre Lymphozyten, die verschiedenste Zellen ohne vorherige Sensitivierung lysieren können [1]. Sie exprimieren keine T-Zell-Rezeptoren und T-Zell-Rezeptor assoziierte Protein-Komplexe (CD3) oder Oberflächenimmunglobuline [2-4] und sind in ihrer zytotoxischen Aktivität nicht auf MHC I-Moleküle angewiesen [5].

#### 2.1.2 Immunphänotyp

Die Mehrheit der NK-Zellen exprimieren als sogenannte NK-Zell-Marker CD16 (Fc $\gamma$ -Rezeptor IIIA für IgG) und fast alle CD56 (neurales Zell-Adhäsions-Molekül, NCAM). Die Ausprägung dieser Oberflächenstrukturen ist in 90% der Fälle CD16<sup>+</sup> CD56<sup>dim</sup> (d.h. starke CD16 und schwache CD56 Expression). Die restlichen Zellen sind phänotypisch entweder CD16<sup>-</sup> CD56<sup>bright</sup> oder CD16<sup>-</sup> CD56<sup>-</sup> [6,7]. Als weitere Oberflächenmoleküle finden sich auf NK-Zellen CD11b und CD57 (HNK-1), die besonders für die zytolytische Aktivität von Bedeutung sind [8-11].

#### 2.1.3 Herkunft und Entwicklung

Wie alle hämatopoetischen Zellen entwickeln sich auch die Lymphozyten aus einer pluripotenten Stammzelle. Man postuliert, dass am Anfang der lymphozytären Zelllinie eine gemeinsame lymphozytäre Vorläuferzelle steht, die sich in der weiteren Entwicklung zu B-, T- oder NK-Zellen differenziert. Sowohl im murinen als auch im humanen Knochenmark konnten Vorläuferzellen gefunden werden, die sich nur noch zu den drei lymphozytären Linien differenzieren können [12,13]. Die NK-Zelllinie ist damit von der myeloischen Linie abgespalten [14].

Phänotypische und funktionelle Ähnlichkeiten zwischen T- und NK-Zellen lassen auf einen gemeinsamen T/NK-Vorläufer schließen [15-17]. Solche T/NK-Vorläuferzellen wurden im Thymus gefunden; ihr Potential, sich sowohl in T- als auch in NK-Zellen differenzieren zu können, konnte von Sánchez et al. anschaulich nachgewiesen werden [18].

Der Hauptort für die NK-Zell-Entwicklung ist das Knochenmark [19-22]. Das gleichzeitige Vorhandensein von T/NK-Vorläufern, NK-Vorläufern und reifen NK-Zellen im Thymus zeigt jedoch, dass die NK-Zell-Differenzierung auch im Thymus möglich ist, obwohl der Thymus nicht unbedingt benötigt wird [19,20,234].

Williams et al. haben ein in vitro Modell entwickelt, mit dem sie die Differenzierung von NK-Zellen untersuchen konnten. Aus multipotenten Vorläuferzellen entwickelten sich unter Zytokineinfluss NK1.1<sup>+</sup>-Zellen (NK1.1 ist ein Marker für Maus-NK-Zellen) [104]. In der ersten Phase wurden die Zellen in einem Zytokincocktail aus Interleukin-7 (IL-7), stem cell factor (SCF) und fms-like tyrosine kinase 3-Ligand (flt3-L) und anschließend mit IL-15 alleine kultiviert. Es stellte sich heraus, dass flt3-L der wichtigste Faktor zur Differenzierung ist, wobei SCF und IL-7 eine unterstützende Rolle spielen. Entscheidend für die Differenzierung zu NK1.1<sup>high</sup> Zellen ist das Vorhandensein des flt3-Rezeptors [14,24].

Ohne vorherige Kultivierung im Zytokincocktail sind die Vorläuferzellen unter IL-15-Einfluss nicht fähig, sich zu NK1.1<sup>+</sup> Zellen zu differenzieren, da die  $\beta$ -Kette des IL-15-Rezeptors fehlt. Durch flt3-L wird vermutlich die Expression der  $\beta$ -Kette des IL-2/15 Rezeptors (CD122) induziert, die für einen funktionsfähigen IL-15-Rezeptor wichtig ist. Die so für IL-15 empfänglichen Zellen differenzieren sich dann IL-15-abhängig zu NK1.1<sup>+</sup> Zellen, die viele Oberflächenmarker von reifen NK-Zellen tragen.

Auch Yu et al. konnten zeigen, dass CD34<sup>+</sup> hämatopoetische Vorläuferzellen unter flt3-L-Einfluss CD122 exprimieren. In der NK-Zell-Differenzierung stellen diese CD34<sup>+</sup>, CD122<sup>+</sup> Zellen, die weder NK-Zell-Rezeptoren tragen noch eine zytotoxische Aktivität haben, eine Zwischenstufe dar, die sich unter IL-15-Einfluss zu reifen CD56<sup>+</sup> NK-Zellen differenzieren [25]. Die Zunahme der CD56 Expression ist ein guter Marker für die Reife und Funktionsfähigkeit von NK-Zellen, da eine sehr starke Korrelation zwischen CD56 Expression und den charakteristischen Eigenschaften (Rezeptoren, Zytotoxizität, Zytokinproduktion) von NK-Zellen besteht [25].

Allerdings können auf diesen Zellen noch keine Ly-49-Rezeptoren (ein inhibitorischer Rezeptortyp von murinen NK-Zellen) nachgewiesen werden [14]. Die weitere Differenzierung mit Expression dieser Rezeptoren scheint von Stroma-Zellen des Knochenmarks abhängig zu sein, da bei in vivo Versuchsansätzen und bei Anwesenheit von Stroma-Zellen in vitro Ly-49 auf NK-Zellen exprimiert wird [26].

#### **2.1.4 Physiologische Rolle**

NK-Zellen sind Teil des angeborenen Immunsystems [27], d.h., sie müssen nicht erst sensitiviert werden, sondern ihre Funktion und Spezifität sind genetisch festgelegt. Im Gegensatz zu T-Zellen haben sie keine Fähigkeit zur Antikörper-spezifischen Erkennung von Zellen und auch kein Gedächtnis, sondern lysieren ihre Zielzellen spontan beim ersten Kontakt [28]. So stehen sie

zusammen mit Makrophagen dem Organismus sofort zur Antigenabwehr zur Verfügung und stellen die erste Verteidigungslinie des Immunsystems dar.

NK-Zellen haben eine ausgeprägte antivirale Aktivität. Sie lysieren selektiv virusinfizierte Zellen und verschonen nicht infizierte Zellen [29,30]. Entscheidend dafür ist die Expression viraler Antigene auf der Zelloberfläche [29-31]. Die Bedeutung der NK-Zellen für die Virusabwehr konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in Tiermodellen nachgewiesen werden [29,30,32]. An einer Patientin mit isolierter NK-Zell-Defizienz, die an einer Reihe lebensbedrohlicher Virusinfektionen erkrankte, wurde eine ähnliche Wichtigkeit beim Menschen deutlich sichtbar [33].

Die antivirale Aktivität von NK-Zellen wird hauptsächlich über das von ihnen selbst produzierte Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) vermittelt, das direkte antivirale Effekte hat, aber auch indirekt über die Aktivierung einer induzierbaren NO-Synthetase wirkt. Die durch NO entstehenden Intermediate verändern Replikationsmoleküle und verhindern so die Virusreplikation [27,34].

NK-Zellen scheinen in der ersten Phase der Immunabwehr für die Verhinderung der Virusausbreitung und die Begrenzung der Viruslast verantwortlich zu sein [29], während die antigenspezifische humorale und T-Zell-Anwort die endgültige Abwehr übernimmt.

In-vitro-Versuche haben gezeigt, dass NK-Zellen auch gram-positive und gram-negative Bakterien, Pilze und Protozoen lysieren [35-38]. Gegen Bakterien kommen lösliche Faktoren zum Einsatz [35], während die Lyse von Pilzen und Protozoen zellvermittelt abläuft. Dabei wirkt IFN verstärkend auf die Zytolyse infizierter Zellen und protektiv für nicht-infizierte Zellen [29,30].

NK-Zellen haben außerdem eine antineoplastische Aktivität. Die Theorie der Immunaufsicht (immune surveillance) besagt, dass Immuneffektorzellen spontan auftretende maligne Zellen erkennen und zerstören können. Das konnte für NK-Zellen experimentell in Mäusen gezeigt werden, wo man eine Korrelation zwischen NK-Zell-Aktivität und Resistenz gegen implantierte Tumore gefunden hat [39,40]. Auch die protektive Wirkung gegen metastatische Tumorzellen konnte in Tiermodellen gezeigt werden [41,42].

Beim Menschen ist es schwierig, diese Immunaufsicht nachzuweisen. Patienten mit mangelhafter oder fehlender NK-Zell-Funktion bzw. -Aktivität sind allerdings sehr anfällig für maligne Entartungen [43-45]; auch wurde in Familien mit genetischer Disposition zu malignen Erkrankungen eine mangelhafte NK-Zell-Aktivität gefunden [46,47]. Weiterhin haben retrospektive Studien eine subnormale NK-Zell-Funktion bei Patienten mit malignen Erkrankungen gezeigt, wobei die NK-Defizienz aber auch Folge des malignen Geschehens sein könnte [45,48,49].

### 2.1.5 Regulation

NK-Zellen können von einer Reihe von Zytokinen beeinflusst werden. Interferone (IFN) z.B. verstärken die zytolytische Aktivität von NK-Zellen schon innerhalb von 4-6 Stunden nach Exposition, wobei IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  einen größeren Effekt als IFN $\gamma$  haben [50-52]. Durch die Einwirkung von IFN- $\alpha$  und - $\beta$  werden NK-Zellen befähigt, NK-sensible Zellen verstärkt zu lysieren und außerdem ein breiteres Spektrum an Zellen zu attackieren [27]. Außerdem wird neben der zytotoxischen Aktivität auch die Blastogenese und Proliferation von NK-Zellen induziert [27,53]. Dabei scheint IL-15 eine Rolle zu spielen, da NK-Zellen IL-15-Rezeptoren besitzen und auf diesen Stimulus proliferieren [14,27,54,]. IFN allein stimuliert die Proliferation nicht ausreichend [50,55,56].

NK-Zellen können auch selber IFN- $\gamma$  produzieren; sie sind dabei auf IL-12 angewiesen [53,57,58]. IFN- $\alpha/\beta$  blockieren die IL-12-Effekte indem sie seine Induktion inhibieren und NK-Zellen für die Wirkung refraktär machen [59]. Auf diese Art und Weise induzieren hohe Spiegel von IFN- $\alpha/\beta$  die Blastogenese und Zytotoxizität von NK-Zellen, verhindern aber ihre IFN- $\gamma$ -Produktion.

Bei allen beobachteten Virusinfektionen ist der IFN- $\alpha/\beta$ -Spiegel stark erhöht, die Bedeutung der dadurch aktivierten NK-Zell-Zytotoxizität ist aber noch nicht klar [27].

IFN- $\gamma$ , IL-12 und IL-18 verstärken die natürliche Zytotoxizität von NK-Zellen sowohl in vitro als auch in vivo [60-64]. Mäusen, denen einer dieser Faktoren fehlt, haben eine verminderte Ruhe-NK-Zell-Aktivität [65-67]. Weiterhin produzieren IL-12- und IL-18-knockout Mäuse in geringerem Maße IFN- $\gamma$ , wenn sie mit Antigenen (Lipopolysacchariden) stimuliert werden. Da die NK-Zellzahl in diesen Mäusen normal ist, scheinen IL-12 und IL-18 einen Einfluss auf die Funktion, nicht aber auf die Entwicklung von NK-Zellen zu haben [14].

IL-2 spielt eine zentrale Rolle in der Regulation von NK-Zellen. Es kann die Proliferation und die zytolytische Aktivität stimulieren [68-70]. Schon 4-6 Stunden nach IL-2-Exposition zeigt sich eine verstärkte zytolytische Aktivität; eine optimale Stimulation erreicht man nach 1-2 Tagen IL-2-Einfluss [68,71-73]. Um die Proliferation anzuregen, müssen die Zellen mindestens 3-4 Tage mit IL-2 stimuliert werden [68,69].

IL-2 fördert weiterhin die Expression von Adhäsionsmolekülen [74] und die Vermehrung von zytolytischen Bläschen [75].

### 2.1.6 Zielzellerkennung

NK-Zellen zeigen ohne vorherige Immunisierung einen sofortigen Effekt („natürliche Killer“). Erstaunlicherweise können sie sowohl körperfremde als auch körpereigene Zellen selektiv abtöten. Da sie keine T-Zell-Rezeptoren (TCR) besitzen [2,3], stellt sich die Frage, wie sie ihre Zielzellen erkennen.

In den letzten Jahren wurden etliche Rezeptoren entdeckt, mit Hilfe derer NK-Zellen zur Zielzellerkennung fähig sind. NK-Zellen besitzen auf ihrer Zelloberfläche aktivierende und inhibierende Rezeptoren, die Zielstrukturen auf Zellen erkennen und über intrazelluläre Signalkaskaden die NK-Zell-vermittelte Zytolyse entweder triggern oder inhibieren [76]. Die Summe aller Trigger oder Inhibitoren entscheidet über Aktivierung oder Inaktivierung des Lyseprozesses [77-81].

Die meisten inhibitorischen Rezeptoren sind MHC-I-spezifisch (major histocompatibility complex), d.h. sie binden an MHC-I-Moleküle auf den Zielzellen. Körpereigene Zellen, die MHC-I exprimieren, können durch die Bindung an diese Rezeptoren ein inhibierendes Signal auslösen und werden dadurch vor der Zelllyse geschützt. Zellen ohne MHC-I oder mit abnormem MHC-I-Muster, wie z.B. maligne entartete oder virusinfizierte Zellen, werden von diesen Rezeptoren nicht erkannt, so dass ihre Zerstörung nicht verhindert wird. Entscheidend ist dabei nicht unbedingt die Stärke der MHC-I-Expression, sondern die Mismatch-Situation zwischen der Rezeptorkombination der NK-Zellen und entsprechenden oder nicht entsprechenden Epitopen auf den Zielzellen [82]. Finden sich für die NK-Zell-Rezeptoren nicht die richtigen Liganden, kommt es zur Lyse.

Im Gegensatz zu T-Zellen, die Zellen lysieren, wenn ihnen spezifische Fremd-Antigene in MHC-Molekülen präsentiert werden [83], erkennen und töten NK-Zellen also Zellen, denen passende körpereigene MHC-I-Moleküle fehlen [84]. D.h., sie reagieren nicht direkt auf Fremd-Antigene, sondern überwachen die Expression von Oberflächenmolekülen auf körpereigenen Zellen, die durch pathologische Veränderungen innerhalb der Zellen verändert wird. Dieser Zusammenhang wurde in der sogenannten „missing self-Hypothese“ formuliert [85-87].

Die Rezeptoren lassen sich in zwei strukturelle Gruppen unterscheiden:

Es gibt C-Typ- (=Ca<sup>2+</sup>-abhängige) Lectin-ähnliche Rezeptoren und eine Immunglobulin-Superfamilie [88].

C-Typ Lectin-ähnliche Rezeptoren:

Bei Mäusen konnte eine Gruppe von Rezeptoren (Ly49) nachgewiesen werden, die zur C-Typ-Lectin-Familie gehören. Sie erkennen polymorphe H-2-MHC I - Moleküle auf Zielzellen und verhindern so die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität [89,90]. Die Ly49-Familie setzt sich aus neun sehr verwandten Genen (Ly49A – Ly49I) zusammen, die im NK-Gen-Komplex auf dem murinen Chromosom 6 lokalisiert sind [89-92]. Die Gene kodieren für Typ II Membranglykoproteine, die als disulfidverknüpfte Homodimere exprimiert werden [89,90,93]. Da sich die verschiedenen Ly49 Gene in ihren intra- und extrazellulären Domänen unterscheiden, geht man davon aus, dass sie eine unterschiedliche Ligandenbindung und Signaltransduktion haben [94].

Wichtigster Vertreter dieser Rezeptorgruppe beim Menschen ist der CD94/NKG2-Rezeptor, dessen Zielstruktur polymorphe HLA I (MHC I) Moleküle sind [95-97]. Dieser Rezeptor besteht aus einer konstanten CD94-Einheit, die kovalent mit einem der Glykoproteine der NKG2-Familie (NKG2A/B, NKG2C, NKG2E/H) verbunden ist. Die Gene dafür sind im NK Gen Komplex auf Chromosom 12 lokalisiert [95-100].

Es scheint, als ob die NKG2-Glykoproteine nur dann auf der Zelloberfläche erscheinen können, wenn sie über Disulfidbrücken an CD94 gebunden sind [95-97]. Demnach wäre CD94 primär für den Transport von NKG2-Rezeptoren an die Oberfläche zuständig.

Die Art der Signaltransduktion hängt dagegen vom NKG2-Anteil des Rezeptors ab, weil dieser im Gegensatz zu CD94 zytoplasmatische Domänen besitzt, die zur Signaltransduktion notwendig sind [98-102]. Maßgeblich für den inhibierenden Effekt des Rezeptors sind die inhibierenden Abschnitte (ITIM = immunoreceptor tyrosine based inhibitory motif) des zytoplasmatischen Anteils der NKG2-Moleküle, die sich bei NKG2A/B nachweisen lassen. Über sie wird eine inhibierende Signalkaskade in der Zelle ausgelöst.

Immunglobulin-Superfamilie:

Die Immunglobulin-Superfamilie besteht aus Killer Inhibitory Receptors (KIR) und Immunglobulin Like Transcripts (ILT).

Es gibt mehrere KIR Gene, die zur Ig-Superfamilie gehören [103,104] und sich auf Chromosom 19 befinden [105]; sie weisen einen Allel-Polymorphismus auf [106]. Diese Rezeptoren werden auf

einem Teil der NK-Zellen exprimiert [107-109] und binden spezifisch verschiedene HLA-I Moleküle [110-113]. Durch sie wird die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität verhindert [110].

KIR's kann man in zwei Untergruppen aufteilen, die entweder zwei (KIR-2D) oder drei (KIR-3D) extrazelluläre Ig-ähnliche Domänen haben. Weiterhin unterscheiden sie sich in der Länge ihrer zytoplasmatischen Domänen (KIR-2D short, KIR-2D long, KIR-3D). Insgesamt gibt es 24 verschiedene Rezeptoren [114], von denen mehrere gleichzeitig auf einem NK-Zell-Klon exprimiert werden können [104,107,109].

KIR-3D und KIR-2D mit langem zytoplasmatischen Anteil enthalten zwei ITIM Sequenzen in ihrer zytoplasmatischen Region [89], über die eine inhibitorische Signalkaskade ausgelöst wird [94]. Die KIR-2D short-Isoformen besitzen keine ITIM's; deswegen nimmt man an, dass sie einen aktivierenden Effekt haben [115].

Von den ILT wird nur ILT2 auf NK-Zellen exprimiert. ILT2 ist ein inhibitorischer Rezeptor, da er mehrere ITIM's in seinem zytoplasmatischen Anteil besitzt [116].

Die Verteilung dieser beiden Klassen von Rezeptortypen beim Menschen ist unterschiedlich; es können entweder KIR oder CD94/NKG2 dominieren [94,215].

Die meisten NK-Zellen exprimieren zwei oder mehr inhibitorische Rezeptoren (KIR und/oder CD94/NKG2 [107,109,117]), die unabhängig voneinander funktionsfähig sind [109,112,118].

Jede NK-Zelle trägt einen Rezeptor, der die eigenen MHC I erkennt, aber oft mehrere, die keinen direkten Liganden im eigenen Organismus haben [119-121]. Es könnte sein, dass es noch unentdeckte Liganden für diese Rezeptoren gibt, oder dass sie während der Schwangerschaft die Toleranz zwischen kindlichem und mütterlichem Organismus regulieren [122].

#### Aktivierende Rezeptoren:

Aus der Tatsache, dass es auch Zellen ohne MHC-I-Expression gibt, die von NK-Zellen nicht effektiv lysiert werden, kann man schliessen, dass es zusätzlich noch aktivierende Rezeptoren geben muss [76]. Tatsächlich gibt es einige Subtypen der NK-Zell-Rezeptoren, z.B. KIR2D short, CD94/NKG2C, -E, -H und NKG2D, denen die inhibierende intrazytoplasmatische Domäne (ITIM) fehlt [76,99,115,123-125]. Sie sind an verschiedene transmembranäre Proteine (DAP10, DAP12) gebunden, die aktivierende intrazytoplasmatische Domänen (ITAM = imunoreceptor tyrosine based activatory motif) besitzen [126-129] und teilweise NK-Zell-Aktivität vermitteln. Sie werden Killer-Zell-aktivierende Rezeptoren (KAR) genannt.

Als Zielstruktur für einen der aktivierenden Rezeptoren (NKG2D) wurden MICA und MICB identifiziert. MICA und MICB sind MHC I - Homologe, die sich nur minimal auf normalen Zellen

finden, und häufig auf Tumorzellen überexprimiert und außerdem stressinduzierbar sind. Somit könnten MICA und MICB wichtige Marker zur Erkennung von Tumorzellen sein [76,130,131].

Bei Mäusen konnten zwei weitere Liganden für NKG2D gefunden werden (RAE1 und H60), die wahrscheinlich tumorspezifische Marker sind [132,133].

Zusätzlich wurden drei Rezeptoren (NKp30, NKp44, NKp46) einer neuen Klasse von Immunglobulin-ähnlichen Rezeptoren auf NK-Zellen entdeckt, die als „natural cytotoxicity receptors“ (NCR) bezeichnet werden [134]. Auch sie haben einen stimulierenden Effekt. Der wichtigste von ihnen ist NKp46 der sich auf allen NK-Zellen, aber auf keinen anderen Zellen finden lässt [135]. NKp44 ist nur auf aktivierten NK-Zellen anzutreffen [136-137], während NKp30 sowohl auf ruhenden als auch auf aktivierten NK-Zellen exprimiert wird [138]. Abhängig davon, ob Tumorzellen die entsprechenden Liganden exprimieren, wirken alle drei Rezeptoren unterschiedlich toxisch, wobei ihre Wirkung durch monoklonale Antikörper maskiert werden konnte. Die gleichzeitige Blockade aller drei Rezeptoren unterdrückte die NK-Aktivität am besten [138]. Aus diesen Versuchen schließt man, dass trotz der Menge an aktivierenden Rezeptoren, wenige Rezeptoren, vielleicht sogar ein einzelner, ausreichen, um die Lyse einzuleiten.

Es scheint, dass die inhibitorischen Rezeptoren eine größere Affinität zu den MHC I-Komplexen haben als die aktivierenden und deshalb in ihrer Wirkung dominieren [139-140]. Da auf NK-Zellen gleichzeitig beide Rezeptortypen exprimiert werden, könnte so die Autoimmunität gegen körpereigene, MHC I tragende Zellen verhindert werden. Die NK-Aktivität wird nur dann getriggert, wenn effektive Inhibitoren fehlen.

Welche der oben genannten Rezeptoren und welche Rezeptorkombinationen von NK-Zellen in einem Organismus exprimiert werden, ist noch nicht vollständig aufgeklärt.

In Mäusen kann z.B. der MHC I- Haplotyp des Organismus die Rezeptorexpression der NK-Zellen beeinflussen [141-144]. Demnach scheint das Rezeptorrepertoire von NK-Zellen zum einen durch einen stochastischen Prozess gesteuert zu sein, der die Genexpression reguliert und zum anderen durch den Haplotyp der eigenen MHC I-Moleküle moduliert zu werden. D.h., ob die NK-Zellen bestimmte Zellen lysieren, hängt davon ab, welchem MHC I-Expressionsmuster sie während ihrer Entwicklung ausgesetzt waren. NK-Zellen von transgenen Mäusen mit veränderter MHC I-Expression lysieren im Gegensatz zu Wild-Typ-NK-Zellen die körpereigenen Zellen nicht, obwohl diese ein abnormes MHC-Muster aufweisen. D.h., sie müssen während ihrer Entwicklung an die Besonderheiten ihres Organismus angepasst worden sein [141,145-147].

Die Expression des Ly49-Rezeptors scheint durch Modulation oder Internalisation des Rezeptors reguliert zu werden, wenn der entsprechende Ligand für diesen Rezeptor vorhanden ist [148,149]. Der Grund dafür könnte sein, dass der Organismus mindestens einen Selbst-MHC-spezifischen Ly-49 Rezeptor sicher stellen, aber eine zu große Anzahl dieser Rezeptoren vermeiden will, weil dadurch die Erkennung kleinster MHC-Veränderungen beeinträchtigt wäre [142,150]. Die KIR-Expression dagegen wird nicht durch das Vorhandensein von Liganden moduliert, sondern scheint eher genetisch determiniert zu sein [119].

### **2.1.7 Lysemechanismen**

Ruhende NK-Zellen haben vorformierte zytolytische Bläschen, die bei Zielzellkontakt durch Exozytose Perforine, Serinesterasen, Chondroitinsulfat und Proteoglykane freisetzen [2,151,152]. Die Perforine gelangen als Monomere in die Zellen und formieren sich dort zu einer zylindrischen Membranpore, die eine osmotische Lyse erlaubt [151,153]. Diese Membranläsionen scheinen mit denen von zytotoxischen T-Lymphozyten hervorgerufenen identisch zu sein und ähneln dem Membranangriffskomplex des Komplementsystems [153,154].

Neben der mechanischen Beschädigung der Zellmembran gibt es noch andere Mechanismen. Es werden lösliche Toxine sezerniert, die toxische NK-Zell-Faktoren (NKCF) genannt werden; dazu gehören IL-3, GM-CSF, M-CSF, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  [108]. TNF- $\alpha$  z.B. aktiviert eine Endonuklease in der betroffenen Zelle, die deren DNA zerlegt [155]. Dieser Apoptose-Prozess erfordert im Gegensatz zur osmotischen Lyse die aktive Beteiligung der Zelle.

Durch die Aktivierung des Fas-Systems, das aus dem Fas-Rezeptor der Zielzelle und dem Fas-Ligand der Effektorzelle besteht, wird in der Zielzelle ein sogenannter Zelltod-induzierender-Signalkomplex (DISC = death inducing signal complex) gebildet, der die Zersetzung der DNA einleitet [156,157].

## **2.2 Anfänge der Immuntherapie mit Natürlichen Killer - Zellen**

Schon vor fast 20 Jahren hat man entdeckt, dass Lymphozyten aus peripherem Blut, die einige Tage mit IL-2 kultiviert worden sind, autologe und allogene Tumorzellen lysieren können, die gegen unstimulierte NK-Zellen resistent waren [158,159].

Obwohl Kulturen aus diesen Lymphokin-aktivierten Killerzellen (LAK) eine heterogene Zellmischung enthalten, machen NK-Zellen den größten Anteil des LAK-Effekts aus [160-162]. In klinischen Phase-I und -II Studien mit IL-2/LAK konnte der Antitumor-Effekt dieser Therapie bestätigt werden [163-167]. Es konnten sogar einige Komplettremissionen erreicht werden. Neben diesen positiven Effekten, wurde allerdings auch eine erhebliche systemische Toxizität beobachtet [165-167]. Um die toxischen Effekte zu vermeiden, wurden Versuche mit angereicherten NK-Zellen gemacht [168,169]. Diese Präparationen hatten eine größere zytotoxische Aktivität als unfraktionierte LAK-Zellen.

Wurde nur IL-2 verabreicht, konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden wie bei der IL-2/LAK Therapie [170]. Da IL-2 selbst keine antineoplastische Wirkung hat, beruhte der Effekt wahrscheinlich auf der Aktivierung von NK- und anderen Effektor-Zellen in vivo. Vor allem die CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> NK-Zellen expandierten unter IL-2-Gabe; sie sind stärker zytotoxisch als die CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> Zellen [171,172].

Man beobachtete, dass bei niedriger IL-2-Dosis nur die NK-Zellen expandieren, während die Anzahl der T-Zellen gleich bleibt; in diesem Fall hätte man die Möglichkeit, die NK-Effektorzellen selektiv zu aktivieren und die toxischen Nebenwirkung der Hochdosisgabe von IL-2 zu vermeiden.

Die anfänglichen Therapiestudien mit aktivierten Lymphozyten und NK-Zellen wurden an Patienten mit fortgeschrittenem Krebsleiden durchgeführt, für die es vorher keine geeignete Therapie gab. Die Ergebnisse ermutigten dazu, eine adoptive Immuntherapie auch bei Patienten mit geringerer Tumorlast, z.B. nach Hochdosis-Chemotherapie und Knochenmarkstransplantation, anzuwenden.

### **2.3 Klinische Relevanz einer NK-Zell-Therapie im Rahmen von Stammzelltransplantationen**

Wurden Mäusen nach einer Knochenmarkstransplantation (KMT) aktivierte NK-Zellen transplantiert, hatten sie eine signifikant höhere Überlebenszeit als die Vergleichsgruppe ohne NK-Zell-Therapie. Dieser Effekt schien vor allem über TGF- $\beta$  (tumor growth factor) gesteuert zu sein, da er durch Gabe von Anti-TGF- $\beta$ -Antikörper unterdrückt werden konnte [181]. Zeis et al. haben in einer ähnlichen Studie den Graft-versus-Leukämie Effekt (GVL) von aktivierten NK-Zellen untersucht. Sie hoben hervor, dass allogene, d.h. körperfremde NK-Zellen im Vergleich zu syngenen, d.h. körpereigenen NK-Zellen besser dazu geeignet sind, restliche Leukämiezellen (minimal residual disease, MRD) zu entfernen [182].

Die sich in der Literatur widersprechenden Ergebnisse, dass NK-Zellen die GVHD sowohl verhindern [183] als auch verstärken [184] können, lassen sich mit dem Zeitpunkt der NK-Zell-Gabe erklären. NK-Zellen können ihre protektiven Effekte nur dann entfalten, wenn sie direkt nach der KMT transplantiert werden. In diesem Stadium kann die Sensitivierung der Spender T-Zellen auf die Empfänger-Antigene durch NK-Zellen TGF- $\beta$ -vermittelt verhindert werden. Findet die NK-Zell-Therapie später als drei Tage nach der KMT statt, hat die GVHD schon begonnen. Zu diesem Zeitpunkt wird der inhibierende TGF- $\beta$ -Effekt durch die inflammatorischen Zytokine von T- und NK-Zellen (IL-1, TNF- $\alpha$ ) übertroffen, so dass auch NK-Zellen zur GVHD beitragen [185]. Eine erfolgversprechende NK-Zell-Therapie muss sich also direkt an eine KMT anschließen.

Da man in jedem Fall eine Verschlimmerung der GVHD in einer klinischen Anwendung vermeiden muss, bietet sich als sicheres Protokoll eine T-Zell-depletierte KMT mit anschließender Gabe von IL-2-aktivierten NK-Zellen an. Die Gefahr einer GVHD wäre minimiert, und die NK-Zellen könnten neben der Abstoßungsreaktion auch die verbliebenen Tumorzellen bekämpfen.

Die Herstellung eines Transplantats ex vivo IL-2-aktivierter NK-Zellen ist zwar wesentlich teurer und aufwendiger als die systemische Stimulation mit IL-2, scheint aber einige Vorteile zu haben. Denn auch mit hohen systemischen IL-2 Dosen ist die erreichbare NK-Aktivität wahrscheinlich nicht so effizient wie die Aktivität exogen aktivierter Zellen. Außerdem haben die erforderlichen systemischen IL-2-Dosen eine beträchtliche Toxizität. Um die Aktivität der transplantierten NK-Zellen zu erhalten, muss IL-2 zwar auch systemisch verabreicht werden [183]; die erforderlichen Mengen sind allerdings viel niedriger, so dass das Risiko einer durch IL-2 exazerbierten GVHD minimiert wird.

Aus dem gewachsenen Verständnis der Funktion und Wirkungsweise von NK-Zellen ergeben sich immer weitere Möglichkeiten, die NK-Zell-Therapie zu verbessern.

Damit NK-Zellen nicht wahllos andere Zellen angreifen, besitzen sie Rezeptoren, die Oberflächenstrukturen der Zellmembran als Erkennungsmerkmale benutzen (vgl. Kap. 2.1.6). Um die Effektivität einer NK-Zell-Therapie zu erhöhen, hat man deshalb versucht, die inhibierenden Rezeptoren mit F(ab)<sub>2</sub>-Fragmenten zu blockieren. Tatsächlich konnte so ein signifikant größerer Anti-Tumor Effekt erzielt werden [186]. Dabei wurden keine Nebenwirkungen beim Empfänger beobachtet. Die NK-Aktivität gegen die Tumorzellen wurde aber nur dann erhöht, wenn die blockierenden Antikörper-Fragmente den MHC-Komplexen der Tumorzellen entsprachen; d.h., die erzielte Wirkung war spezifisch. Eine Kombination verschiedener spezifischer Antikörper könnte demzufolge in einer umfassenderen Rezeptorblockade und damit einer stärkeren Antitumor-Wirkung resultieren.

Man könnte also nach einer KMT oder PBSZT NK-Zellen transplantieren, deren Tumor-spezifische inhibitorische Rezeptoren blockiert sind. Oder autologe Knochenmarkszellen könnten vor der Transplantation mit diesen NK-Zellen inkubiert werden, damit restliche Tumorzellen beseitigt werden. Die hochaktivierten NK-Zellen wären weiterhin besser in der Lage, restliche T- und NK-Zellen des Empfängers zu lysieren und damit eine Abstoßungsreaktion zu vermeiden.

### 3 Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Optimierung einer Methode zur immunomagnetischen T-Zell-Depletion bei der Herstellung von NK-Zell-Präparaten. Mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern werden Zellen immunomagnetisch markiert und in einem starken Magnetfeld aufgetrennt. In der Versuchsreihe sollen die Wahl des Antikörpers (AK), die AK-Menge, und die Auftragsgeschwindigkeit hinsichtlich ihres Einflusses auf die T-Zell-Depletion, die T-Zell-Restkontamination nach Selektion und den NK-Zell-Ertrag (in der Literatur auch als „recovery“ bezeichnet) untersucht werden. Bei einem der verwendeten Antikörper („NK isolation kit“) interessiert außerdem die NK-Zell-Reinheit des resultierenden NK-Zell-Präparates.

Die Hersteller immunomagnetischer Antikörper machen zwar Angaben über optimale Versuchsbedingungen, insbesondere über die Antikörper-Menge; diese Daten beziehen sich aber auf Laborexperimente mit geringeren Zellmengen ohne konstante Flussgeschwindigkeit. Man hat deshalb keine Anhaltspunkte dafür, welche zusätzlichen Einflüsse die Aufreinigung großer Zellmengen auf den Versuchsablauf haben könnte. Die Herstellerangaben sind also nicht ohne weiteres auf die klinische Anwendung übertragbar. Damit die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit direkt für eine klinische Umsetzung verwertbar sind, wurde besonderer Wert auf den klinischen Maßstab des Versuchsaufbaus gelegt.

Zur Herstellung von NK-Zell-Präparaten mit monoklonalen Antikörpern gibt es zwei Ansätze.

In der Regel werden in einem ersten Arbeitsschritt die T-Zellen markiert und depletiert; im Präparat verbleiben dann die NK-Zellen und alle übrigen Zellen (Monozyten, B-Zellen, etc.). Daran schließt sich als zweiter Auftrennungsschritt eine Markierung und Selektion von NK-Zellen an.

Seit einiger Zeit stehen auch Antikörper-Cocktails zur Verfügung, die sowohl Antikörper gegen T-Zellen (CD3) als auch gegen B-Zellen (CD19) und Monozyten (CD14, CD36) enthalten. Damit können in einem einzigen Arbeitsschritt alle Nicht-NK-Zellen entfernt werden; die nachgeschaltete Selektion von NK-Zellen kann also entfallen.

Ziel ist, wie oben gefordert, die Herstellung eines ausreichend großen NK-Zell-Präparates hoher NK-Zell-Reinheit, das frei von Spender-T-Zellen ist. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Depletion der T-Zellen; die Anreicherung von NK-Zellen ist ein untergeordneter Aspekt, der für einen der verwendeten Antikörper („CD3 MicroBeads“) weiterer Arbeitsschritte bedürfte. Beide Antikörper können deshalb bezüglich der NK-Zell-Reinheit nicht verglichen werden. In dieser Arbeit wird verglichen, mit welchem der beiden Ansätze die bessere und zuverlässigere T-Zell-Depletion bzw. geringere T-Zell-Restkontamination nach Selektion bei möglichst geringem Verlust von NK-Zellen erreicht werden kann.

## 4 Material

### 4.1 Geräte

Folgende Geräte wurden verwendet:

1. Für die durchflusszytometrischen Bestimmungen stand ein Durchflusszytometer (COULTER® EPICS® XL-MCL) mit aktueller Software (System II, Version 3.0) zur Verfügung (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland).
2. Die automatischen Zellzahlbestimmungen wurden mit Cell-DYN®1700-Gerät durchgeführt (Abbott GmbH Diagnostika, Wiesbaden, Deutschland).
3. Für die Zentrifugationsschritte wurde eine Varifuge 3.0 eingesetzt (Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland).
4. Bei der magnetischen Separation der Zellen kam ein SuperMACS II zum Einsatz (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland).
5. Zum Auftragen der Zellsuspension in die Magnetsäule wurden die Perfusoren P4000 und P6000 der Marke IVAC benutzt (IVAC Medizintechnik GmbH, Giessen, Deutschland).
6. Für den Spülvorgang standen IVAC 560 Infusomaten zur Verfügung. (IVAC Corporation, San Diego, CA, USA)
7. Das Vortexen der FACS-Ansätze wurde mit einem REAX 2000-Gerät durchgeführt (Heidolph, Deutschland).

## 4.2 Antikörper

Die immunomagnetischen Antikörper wurden von Miltenyi Biotec bezogen (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach).

„CD3 MicroBeads“ (MB): kolloidale, super-paramagnetische MicroBeads konjugiert mit monoklonalen Maus anti-Mensch CD3 Antikörpern (Isotyp: Maus IgG2a)

„NK isolation kit“ (IK): Hapten-konjugierte monoklonale CD3, CD14, CD19, CD36 und anti-IgE-Antikörper und Anti-Hapten MicroBeads (kolloidale super-paramagnetische MACS MicroBeads konjugiert mit anti-Hapten Antikörpern)

Für die durchflusszytometrischen Messungen standen fluoreszierende CD45 (Anti-HLe-1)-, CD56 (Leu<sup>TM</sup>-19)-, CD3- und CD16-Antikörper zur Verfügung (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA).

### 4.3 Arbeitsmaterialien und Chemikalien

<b>Arbeitsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
Kulturflaschen Nunclon Surface 200 ml	Brand Products, Dänemark
Falcon® Blue Max™ 50 ml konische Röhrchen	Becton Dickinson, NJ, USA
Pipettierhilfe 10-100 µl und 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen 100 und 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Automatische Pipettierhilfe pipetus®-akku	Hirschmann, Eberstadt
Auslaufpipetten 10 und 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Auslaufpipetten 50 ml, Falcon®	Becton Dickinson, NJ, USA
Heidelberger Verbindungsschlauch	Braun, Melsungen
Original Perfusor®-Leitung	Braun, Melsungen
Infusionsverteilterrampe, Infu-Star Solo 3-fach	CareMed, Dresden
Infusionsleitung	Ivac, Ltd. Hants, UK
3-Wege-Hähne	pfm, Produkte für die Medizin AG, Köln
XS <sup>+</sup> Trennsäulen für 1E+9 markierte Zellen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Blutkonservenbeutel, Compoflex®	Fresenius Hemo Care GmbH, Bad Homburg
Perfusorspritze, B-D Plastipack 50 ml	Becton Dickinson, Drogheda, Irland
Perfusorspritze, Proinjekt 50 ml	Braun, Melsungen
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Transferpipetten 3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
FACS-Probengefäße 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Biocoll Separating Solution	Seromed BiochromKG, Berlin
Phosphate buffered saline w/o Ca/Mg (Dulbecco's)	Life Technologies, Ltd Paisley, Schottland
Rinderalbumin, Sigma A3350	Sigma, Deisenhofen
Natriumacid (NaN <sub>3</sub> )	Apotheke JWG-Uni, Frankfurt/M.
Humanserumalbumin 20% (HSA)	Blutspendedienst Baden-Württemberg
Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) 0,25 mol/l	Apotheke JWG-Uni, Frankfurt/M.
Erythrozyten-Lyse, Ortho-mune®	Ortho Clinical Diagnostics, Neckargemünd

#### **4.4 Herstellung der Lösungen**

1. Herstellung des SAP Puffers: 2,5 g Rinderalbumin (Sigma A3350) + 0,5 g Natriumacid ( $\text{NaN}_3$ ) mit PBS (ohne  $\text{Ca}^{++}$  und  $\text{Mg}^{++}$ ) auf 500ml auffüllen. Der pH wurde zwischen 7,2 – 7,4 eingestellt.
2. Herstellung des Waschpuffers: Mit 500 ml PBS und 10ml HSA 20 BaWü wurde ein 0,4% PBS/HSA Puffer hergestellt, zu dem 10 ml EDTA zugegeben wurden.

#### **4.5 Buffy coats**

Als Ausgangsmaterial standen Leukozytenpräparationen (buffy coats) des Blutspendedienstes (BSD) Hessen zur Verfügung. Buffy coats entstehen als Nebenprodukt bei der Herstellung von Erythrozytenkonzentraten aus Blutspenden; sie enthalten hauptsächlich Leukozyten. Um ausreichend Ausgangszellen zu erhalten, wurden jeweils zwei buffy coats von blutgruppengleichen Spendern gemischt; das Volumen betrug 150-180 ml. Die Leukozytenpräparation wurde 2:1 mit Puffer (PBS Dulbecco's) verdünnt.

## 5 Methoden

### 5.1 *Ficoll-Separation*

Zur Gewinnung der mononukleären Zellen aus den buffy coats wurde eine Ficoll-Separation durchgeführt. Bei dieser Methode werden zwei flüssige Phasen (Zellsuspension und Trennmedium) unterschiedlicher Dichte übereinandergeschichtet und die verschiedenen Zellen abhängig von ihrer Sedimentationsrate aufgetrennt. Als Trennmedium kommt Ficoll-Paque (Biocoll Separating Solution), ein leicht wasserlösliches Copolymer aus Saccharose und Epichlorhydrin mit einer Dichte von  $1,077 \pm 0,001 \text{ g/cm}^3$  zur Anwendung.

In 8-12 sterilen Falcon®-Röhrchen (50 ml) wurden 20 – 25 ml Trennmedium vorgelegt, und 25-30 ml der Zellsuspension mit einer Auslaufpipette vorsichtig über das Trennmedium geschichtet. Dabei durften die beiden Phasen nicht vermischt werden. Der so hergestellte Ficoll-Gradient wurde bei  $2000 \text{ Umin}^{-1}$  (800g), 30 Minuten lang, bei Raumtemperatur ohne Bremse in einem Ausschwingrotor (Varifuge 3.0) zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation stellten sich vier Phasen dar: als oberste Schicht eine gelbliche Phase (Plasma mit Thrombozyten), eine schmale weißliche Bande (Lymphozyten und Monozyten), eine farblose visköse Bande (Ficoll-Trennmedium) und als unterste Phase im Konus des Zentrifugenröhrchens eine rote Schicht (Erythrozyten und Granulozyten).

Die weißliche Bande mit den mononukleären Zellen, die zwischen Plasma und Ficoll lag, wurde vorsichtig mit einer Pipette abgezogen und in 4-6 sterile Falcon®-Röhrchen (50 ml) überführt. Dabei durfte so wenig wie möglich Ficoll-Medium und Plasma mitpipettiert werden, da es sonst wieder zu Verunreinigungen mit Granulozyten und Thrombozyten kommen konnte.

Die mononukleären Zellen wurden in 50 ml PBS-Puffer, der 0,4% Humanserumalbumin und EDTA enthielt, suspendiert und 10 – 15 Minuten bei  $1500 \text{ Umin}^{-1}$  (400g) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellpellets erneut in 50 ml Waschpuffer (PBS + HSA + EDTA) resuspendiert und 10 Minuten mit  $1200$  oder  $1500 \text{ Umin}^{-1}$  (300 bzw. 400g) zentrifugiert. Die Zellsedimente wurden anschließend vereinigt und in 20 – 34 ml Waschpuffer resuspendiert.

Vor und nach der Ficoll-Separation wurden Proben zur Zellzählung und FACS-Analyse entnommen (Probe F vor Ficoll, Probe P1 nach Ficoll).

## 5.2 T-Zell-Depletion

### 5.2.1 Antikörper-Inkubation

An jedem Versuchstag wurde nur mit einem einzigen Antikörper (AK) gearbeitet; es lief jeweils ein Doppelversuch mit zwei parallelen Ansätzen, die sich in der AK-Menge unterschieden.

#### „CD3 MicroBeads“

Die Zellsuspension nach der Ficoll-Separation wurden auf zwei Falcon®-Röhrchen mit je 15-17 ml aufgeteilt.

Beiden Fraktionen wurden unterschiedliche AK-Mengen, entweder 7,5 ml (5 ml AK / 10 ml Suspension oder 1,5 ml (1 ml AK / 10 ml Suspension) „CD3 MicroBeads“ zugesetzt. Während der 20-minütigen Inkubationszeit bei einer Temperatur von 4°C wurden die Suspensionen durch gelegentliches leichtes Schütteln gemischt.

Im Anschluss wurde mit PBS-Puffer (phosphate buffered saline) bis auf 50 ml aufgefüllt und 10 Minuten bei 1200 Umin<sup>-1</sup> (300g) zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Waschvorgang wiederholt.

Das verbliebene Zellsediment jedes Ansatzes wurde in je 15-20 ml PBS resuspendiert und in eine 50 ml Perfusorspritze überführt.

Für Zellzählung und FACS-Analysen wurde anschließend Probe P2 entnommen.

#### „NK isolation kit“

Für die Antikörper-Inkubation mit dem „NK isolation kit“ wurden die 20 ml Zellsuspension nach der Ficoll-Trennung auf zwei Falcon®-Röhrchen mit je 10 ml aufgeteilt.

Nach Zugabe von 5 bzw. 1 ml des Hapten-Antibody-Cocktail wurde 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Dabei wurden die Röhrchen zur besseren Durchmischung gelegentlich leicht geschüttelt.

Nach der Inkubation wurde mit PBS auf 50ml aufgefüllt und 10 Minuten bei 1200 Umin<sup>-1</sup> (300g) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Waschvorgang noch einmal wiederholt.

Anschließend wurden die Pellets in 10 ml PBS resuspendiert und nach Zugabe von 5 bzw. 1 ml Anti-Hapten Microbeads 15 Minuten bei 4°C inkubiert.

Nach nochmaligem Waschen (mit PBS auf 50 ml auffüllen, 10 Minuten bei 1200 Umin<sup>-1</sup> / 300g zentrifugieren) konnte jeder Ansatz in 20 ml PBS resuspendiert und in eine 50 ml Perfusorspritze überführt werden.

Für Zellzählung und FACS-Analysen wurde Probe P2 entnommen.

### 5.2.2 Immunomagnetische Zellseparation

Für die magnetische Zellseparation wurden zwei SuperMACS II-Geräte mit einem 0,6 Tesla starken Dauermagneten eingesetzt, die besonders zur Verarbeitung von sehr großen Zellmengen geeignet sind. In das Magnetfeld wurden passende Trennsäulen eingespannt, die einen mit zellfreundlichem Plastik überzogenen Eisenkern besitzen und bis zu  $10^9$  positiv markierte Zellen aufnehmen können. Zur Vorbereitung der eigentlichen Zellseparation (Purging) wurden zwei SuperMACS II-Geräte wie in Abb. 1 aufgebaut. Zu Beginn wurden Schlauchsystem und Säule mit etwa 15-20 ml PBS vorgespült.

Über einen Perfusor wurde die Suspension mit den AK-markierten Zellen mit einer Geschwindigkeit von 50 oder 100 ml/h auf die Säule im Magnetfeld aufgetragen. Zellen, die die Säule passieren konnten und Puffer wurden in einer Spritze (neg) aufgefangen.

Die Perfusorspritze im Perfusor wurde über einen 3-Wege-Hahn mit 20 ml PBS-Puffer gefüllt, und das Leitungssystem mit der gleichen Auftraggeschwindigkeit gespült. So konnten die noch im Schlauchsystem verbliebenen Zellen in die Säule gelangen (spül1).

Zuletzt wurde das ganze System mit PBS-Puffer per Infusomat eine Stunde lang gespült; der Durchlauf gelangte in die Spül-Fraktion (spül2).

Anschließend wurde die Säule aus dem Magnetfeld gefahren, aus dem Schlauchsystem entfernt und zweimal durch direktes Aufschrauben einer Perfusorspritze mit je 50 ml PBS durchgespült, um die Zellen aus der Säule zu eluieren. Das Eluat wurde in den Fraktionen pos1 und pos2 aufgefangen.

Von allen fünf Fraktionen (neg, spül1, spül2, pos1, pos2) wurden Zellzahlbestimmungen durchgeführt. Vorher mussten die Volumina von spül2 und pos2 durch Zentrifugation auf 4-10 ml eingeeengt werden.

In der Regel wurden alle Arbeitsschritte unter nicht sterilen Bedingungen durchgeführt. Sollten die gepurigten Zellen im Anschluss für andere Versuche weiter kultiviert werden, wurde unter einer Sterilbank gearbeitet.

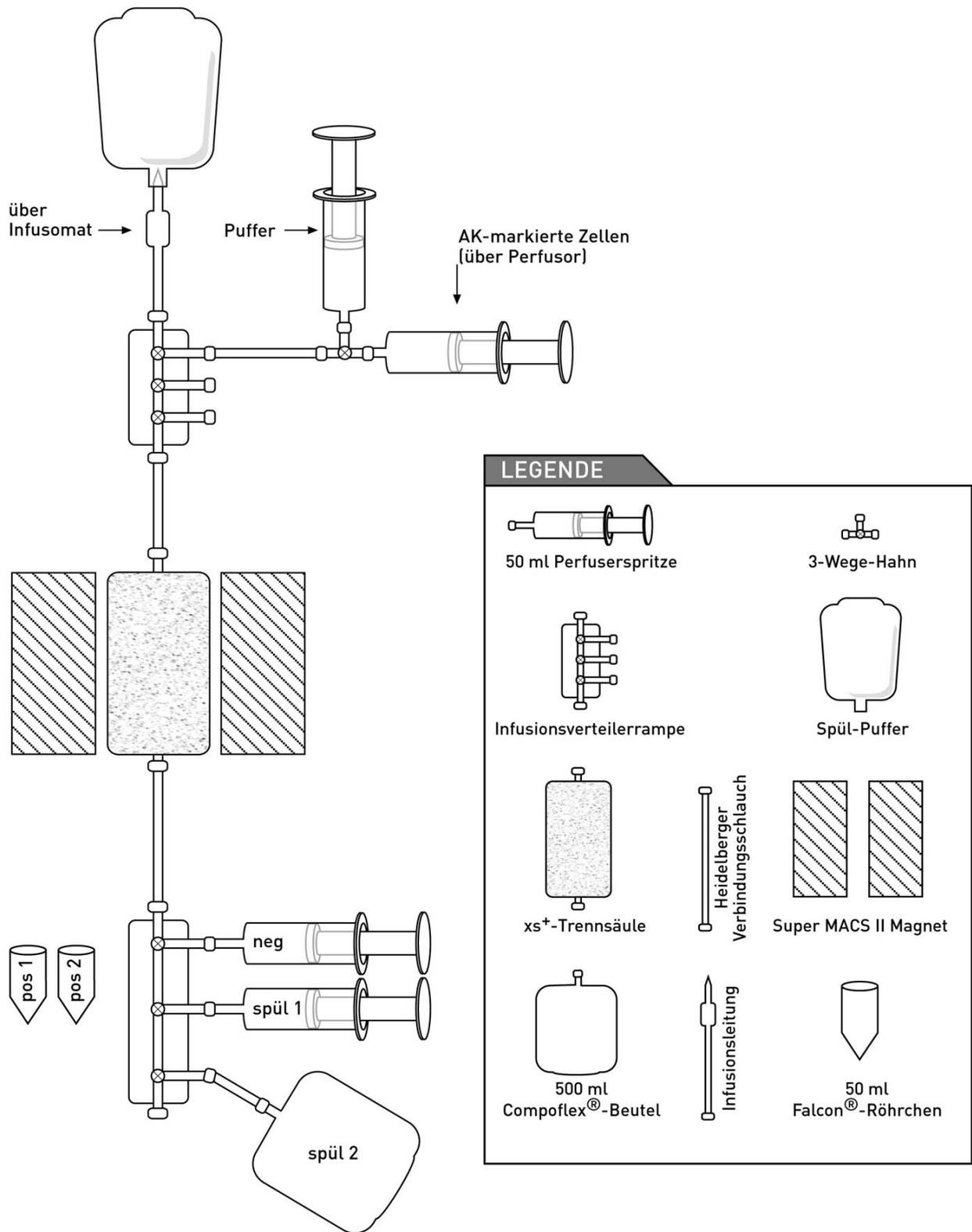


Abb. 1: Versuchsaufbau

### **5.3 Durchflusszytometrische Bestimmungen**

In den drei Proben vor Purging (F, P1, P2) und den fünf Proben nach Purging (neg, spül1, spül2, pos1, pos2) wurden die Lymphozyten-Subpopulationen durchflusszytometrisch bestimmt. Die Messungen wurden mit einem grünfluoreszierenden (FITC) und einem orangefluoreszierenden (PE) Farbstoff mit zwei (CD45FITC + CD3PE) bzw. drei (CD45FITC + CD56PE + CD16PE) verschiedenen Antikörpern wie folgt durchgeführt.

#### **5.3.1 FACS-Ansätze**

##### quantitative T-Zell-Bestimmung:

10<sup>6</sup> Zellen aus der jeweiligen Probe  
+ 20µl CD45-FITC-Antikörper  
+20 µl CD3-PE- Antikörper

##### quantitative NK-Zell-Bestimmung:

10<sup>6</sup> Zellen aus der jeweiligen Probe  
+ 20µl CD45-FITC- Antikörper  
+ 20µl CD56-PE- Antikörper  
+ 20µl CD16-PE- Antikörper

20-minütige Inkubation im Kühlschrank bei 4°C

Zugabe von 2 ml zimmerwarmer Erythrozyten-Lyse

kurzes Vortexen der Ansätze

10-minütiges Inkubieren im Dunkeln bei Zimmertemperatur.

10 Minuten mit 1100 Umin<sup>-1</sup> zentrifugieren

Überstand abschütten und 2ml Erythrozyten-Lyse zugeben

kurz vortexen

10 Minuten mit 1100 Umin<sup>-1</sup> zentrifugieren

Überstand verwerfen und mit 500µl SAP-Puffer resuspendieren

### Schnell-FACS-Ansätze

Zellen und FACS-Antikörper wie oben zentrifugieren

10-15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren

2 ml warme Erythrozyten-Lyse zugeben

kurz vortexen

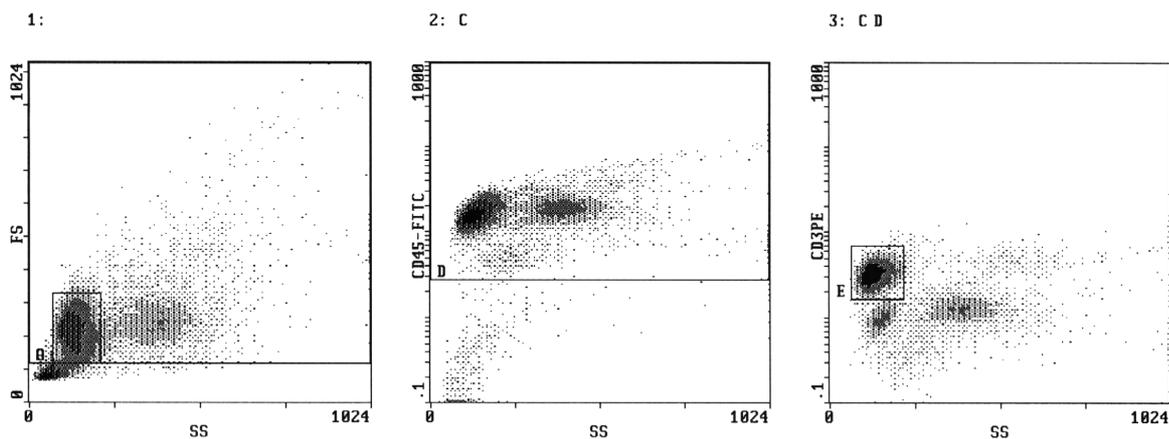
10 Minuten im Dunkeln inkubieren

innerhalb von einer Stunde messen

### **5.3.2 FACS-Analysen**

Die FACS-Ansätze wurden im Kühlschrank aufbewahrt und am gleichen oder folgenden Tag gemessen. Jede Messung wurde mit mindestens 50.000 Zählereignissen durchgeführt.

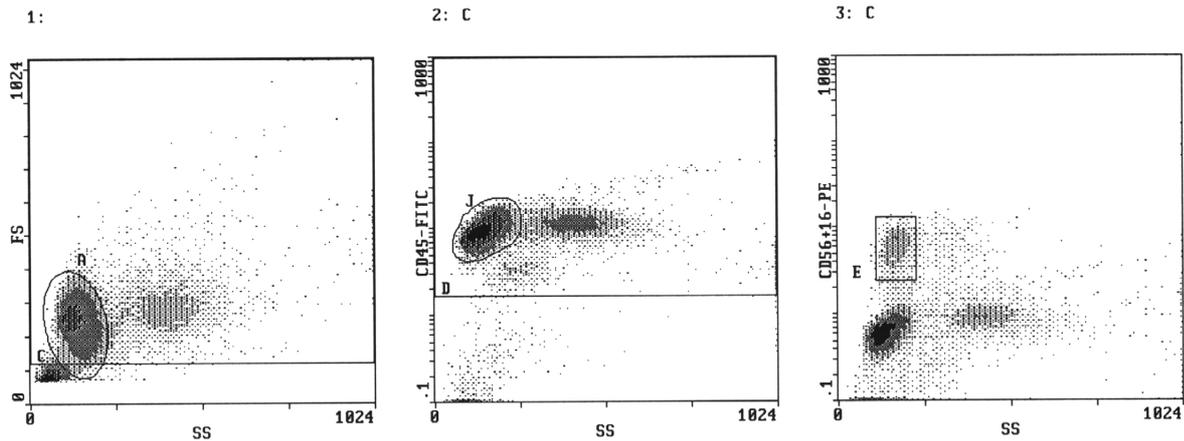
Zuerst konnten in einem Forward-Scatter (FS) / Side-Scatter (SS) - Histogramm ein Life-Gate (C) festgelegt werden, das die toten Zellen und Zelltrümmer ausschloss. Gleichzeitig wurde die lymphozytäre Zellpopulation in einem Gate (A) eingefasst. Für die T-Zell-Messung wurden die lebenden Zellen in einem CD45-FITC / SS - Histogramm auf CD45+ Zellen eingeschränkt (D-Gate) und diese wiederum in einem CD3PE / SS - Histogramm auf CD3+ Zellen (E-Gate). Alle Zellen, die sowohl in A, C, D und E enthalten waren, wurden als prozentualer Anteil der Zellen in D angegeben. Diese phänotypisch CD45+ und CD3+ Zellen wurden als T-Zellen betrachtet.



### **Abb. 2: Durchflusszytometrische T-Zell-Bestimmung**

Durchflusszytometrisch wird jede Zelle einzeln gezählt und abhängig von ihrer Größe (FS), Granulierung (SS) und einiger, mit fluoreszierenden Antikörpern sichtbar gemachten, Oberflächenstrukturen (CD45, CD3) in Histogrammen dargestellt. Mit Hilfe von Zählfeldern (Gates), die manuell angepasst werden, können die prozentualen Anteile einzelner Lymphozytenpopulationen errechnet werden.

Die NK-Zellen wurden auf ähnliche Weise gemessen. Alle lebenden Zellen (aus C), die eine CD45-FITC Fluoreszenz besaßen, wurden in D, alle CD56/16PE+ Zellen auf E eingefasst. Um die in D enthaltene lymphozytäre Population wurde das J-Gate gelegt. Alle Zellen, die sowohl in D, J und E enthalten waren, wurden als prozentualer Anteil der Zellen in D angegeben und als NK-Zellen (CD56+, CD16+) betrachtet.

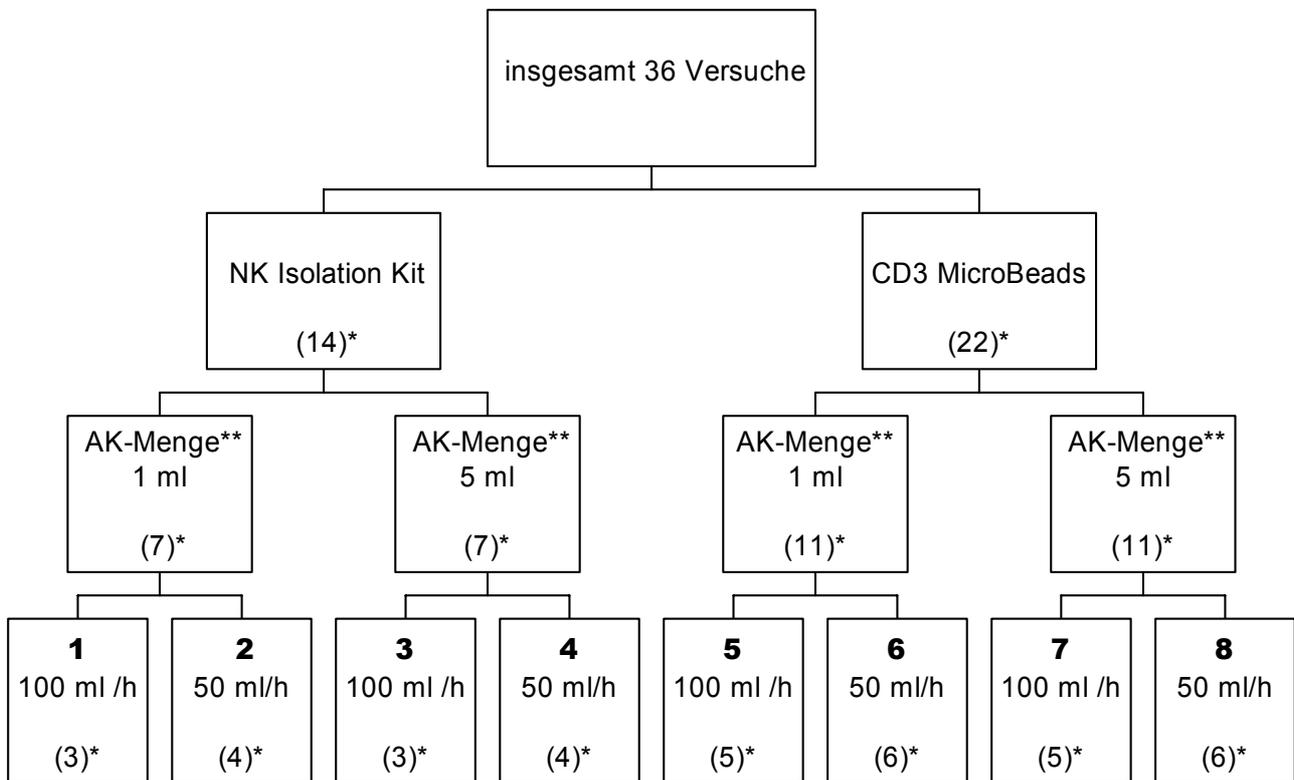


**Abb. 3: Durchflusszytometrische NK-Zell-Bestimmung**

Durchflusszytometrisch wird jede Zelle einzeln gezählt und abhängig von ihrer Größe (FS), Granulierung (SS) und einiger, mit fluoreszierenden Antikörpern sichtbar gemachten, Oberflächenstrukturen (CD45, CD56, CD16) in Histogrammen dargestellt. Mit Hilfe von Zählfeldern (Gates), die manuell angepasst werden, können die prozentualen Anteile einzelner Lymphozytenpopulationen errechnet werden.

### 5.4 Aufbau der Versuchsreihe

Die Versuchsreihe umfasste insgesamt 36 Versuche, mit denen drei verschiedene Versuchsparameter (Antikörperwahl, Antikörpermenge, Auftragsgeschwindigkeit) untersucht werden sollten. Von den Versuchen wurden 14 mit dem „NK isolation kit“ (IK) und 22 mit „CD3 MicroBeads“ (MB) durchgeführt. Die Hälfte jeder Gruppe wurde mit 1ml (pro 10ml Zellsuspension) die andere mit 5ml (pro 10ml Zellsuspension) Antikörpern inkubiert. Jede dieser Untergruppen wurde noch einmal in eine Gruppe mit großer (100 ml/h) und kleiner (50 ml/h) Auftragsgeschwindigkeit unterteilt. Es ergab sich folgender Versuchsplan (Abb. 4) mit insgesamt acht verschiedenen Versuchskonfigurationen **1-8**, die Anzahl der Versuche ist in Klammern angegeben:



**Abb. 4: Aufbau der Versuchsreihe**

(\*) Anzahl der Versuche

(\*\*) angegeben ist die Antikörpermenge, die pro 10 ml Zellsuspension zugegeben wurde; rechnerisch entsprach das einer Antikörperkonzentration von 3–34  $\mu\text{l} / 10^7$  Zellen (1 ml), bzw. 41–168  $\mu\text{l} / 10^7$  Zellen (5 ml)

## **5.5 Statistik**

In der Versuchsreihe wurden die Versuchsparameter Antikörper, Antikörpermenge und Auftraggeschwindigkeit verändert. Um den Einfluss des einzelnen Parameters zu bestimmen, wurden zwei Stichproben gebildet, die sich nur in einem Parameter unterschieden. Mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests wurde der Unterschied zwischen beiden Stichproben auf zweiseitige Signifikanz geprüft.

Um weitere Einflussgrößen zu finden, wurden auf Grundlage der vorliegenden Daten lineare Regressionsberechnungen durchgeführt.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Zielgrößen

Für die Auswertung der Ergebnisse wurden die Proben neg und spül1 zur Negativ-Fraktion (neg gesamt) und die Proben pos 1 und pos 2 zur Positiv-Fraktion (pos gesamt) zusammengefasst. Die Negativ-Fraktion ist die eigentliche Zielfraktion; sie besteht aus den Zellen, die das Magnetfeld ungehindert passieren konnten; d.h. aus möglichst wenigen T-Zellen und möglichst vielen NK-Zellen. In der Positiv-Fraktion befinden sich die Zellen, die während des Selektionsprozesses in der Magnetsäule festgehalten wurden. In der Spül-Fraktion wurde der Anteil Zellen bestimmt, der sich noch in den Leitungen befand bzw. aus der Magnetsäule durch den Spülvorgang herausgewaschen wurde.

Zielgrößen der experimentellen Untersuchungen waren die T-Zell-Depletion, die T-Zell-Restkontamination und der NK-Zell-Ertrag ( in der Literatur auch als „recovery“ bezeichnet) in der Negativ-Fraktion. Bei Versuchen mit dem „NK isolation kit“ interessierte auch die NK-Zell-Reinheit. Um den Verlust bzw. Verbleib der NK-Zellen zu dokumentieren, wurden NK-Zellen in Positiv- und Spül-Fraktion bestimmt.

In der Versuchsauswertung wurden immer zwei Versuchsgruppen, die sich nur in einem Merkmal des Versuchsaufbaus (Versuchskonfiguration) unterschieden, hinsichtlich einer Zielgröße miteinander verglichen und auf Signifikanz geprüft. Das sind jeweils die beiden Gruppen, die im Versuchsplanung-Organigramm (Abb. 4) auf der gleichen Höhe stehen und direkt miteinander verbunden sind.

### 6.2 Auslastung der Säulenkapazität

Die eingesetzte MACS XS<sup>+</sup>-Trennsäule besitzt die Kapazität, aus einem Gesamtvolumen von  $2 \times 10^{10}$  Zellen bis zu  $1 \times 10^9$  positiv markierte Zellen zu separieren.

Die Zellzahlen der gepoolten buffy coats vor der Selektion lagen zwischen  $4 \times 10^8$  und  $1,5 \times 10^9$  Zellen. T-Zellen hatten einen Anteil zwischen 33% - 68% ( $2 \times 10^8 - 1 \times 10^9$ ), der NK-Zell-Anteil lag zwischen 3% und 13% ( $3 \times 10^7 - 1 \times 10^8$ ).

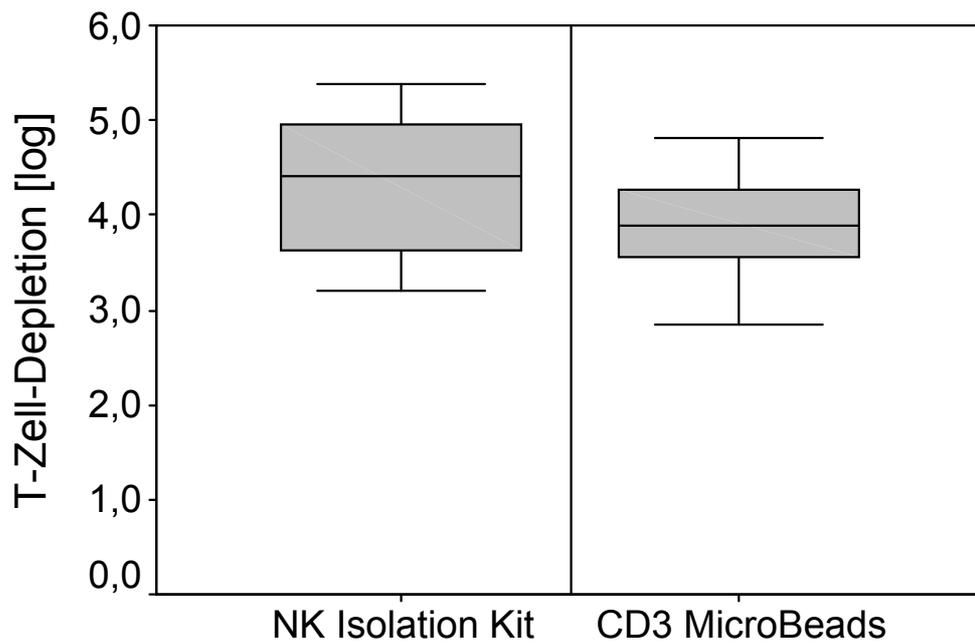
Der Anteil positiv markierter Zellen lag mit „CD3 MicroBeads“ zwischen 33% und 67% ( $2 \times 10^8 - 9,8 \times 10^8$  Zellen). Die Säulenkapazität wurde durchschnittlich zu 42% (20% - 98%) ausgelastet.

Bei Versuchen mit dem „NK isolation kit“ wurden  $4 \times 10^8 - 1 \times 10^9$  Zellen positiv markiert (88% - 97%). Damit lag die Auslastung der Säulenkapazität durchschnittlich bei 74% (43% - 101%).

### 6.3 T-Zell-Depletion

Die T-Zell-Depletion wird in log-Stufen dargestellt (Abb. 5, Tab. 8 siehe Anhang).

Mit dem „NK isolation kit“ konnte eine Reduzierung der T-Zellen um 3,2 bis 5,4 log-Stufen erreicht werden (4,35 +/- 0,7 log), mit „CD3 MicroBeads“ lag das Ergebnis zwischen 2,8 und 4,8 log-Stufen (3,9 +/- 0,5 log, P= 0,089).



**Abb. 5: T-Zell-Depletion, Einfluss der Antikörperwahl**

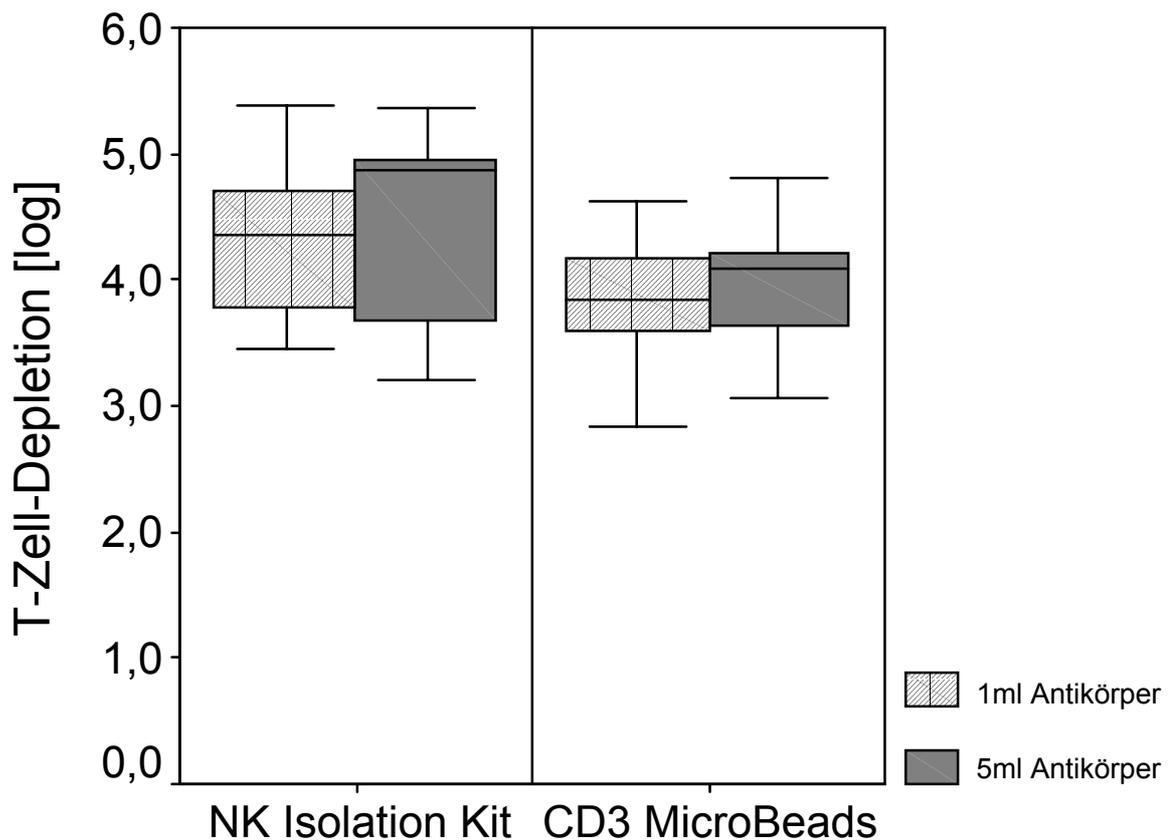
Es werden zwei Antikörper hinsichtlich der T-Zell-Depletion verglichen und in Box-Whisker-Plots dargestellt. Der zentrale Kasten zeigt die Lage der mittleren 50 Prozent der Daten als Rechteck zwischen dem oberen und unteren Quartil an; die horizontale Linie markiert den Median. Die sogenannten Whiskers reichen vom Kasten bis zum letzten verbundenen oberen bzw. unteren Wert, der innerhalb des 1,5-fachen Interquartilenabstands nach oben bzw. unten liegt.

Während des Versuchs wurden T-Zellen verloren, die in keiner der untersuchten Fraktionen mehr nachgewiesen werden konnten. Deshalb wurden die Ergebnisse der T-Zell-Depletion mit der Wiederfindungsrate für T-Zellen um den unspezifischen Zellverlust korrigiert (Tab. 9, siehe Anhang). Von der errechneten T-Zell-Depletion in der Zielfraktion (T-Zellen (Start) / T-Zellen (Ende)) wird der Anteil Zellen abgezogen, der in der Versuchsanordnung verlorengegangen ist (T-Zellen (Start) / Summe der T-Zellen in allen Fraktionen (Ende)):

$$T - Zell - Depletion(korrigiert) = \log\left(\frac{T - Zellen(Start)}{T - Zellen(Ende)}\right) - \log\left(\frac{1}{Wiederfindungsrate\ T - Zellen}\right)$$

Die korrigierte mittlere T-Zell-Depletion lag für das „NK isolation kit“ bei 4,3 log, für „CD3 MicroBeads“ bei 3,8 log.

Die je nach verwendetem Antikörper in zwei Gruppen zusammengefassten Versuche wurden getrennt auf den Einfluss der Antikörpermenge hin untersucht. Die Antikörpermenge hatte keine Bedeutung für die T-Zell-Depletion (Abb. 6).

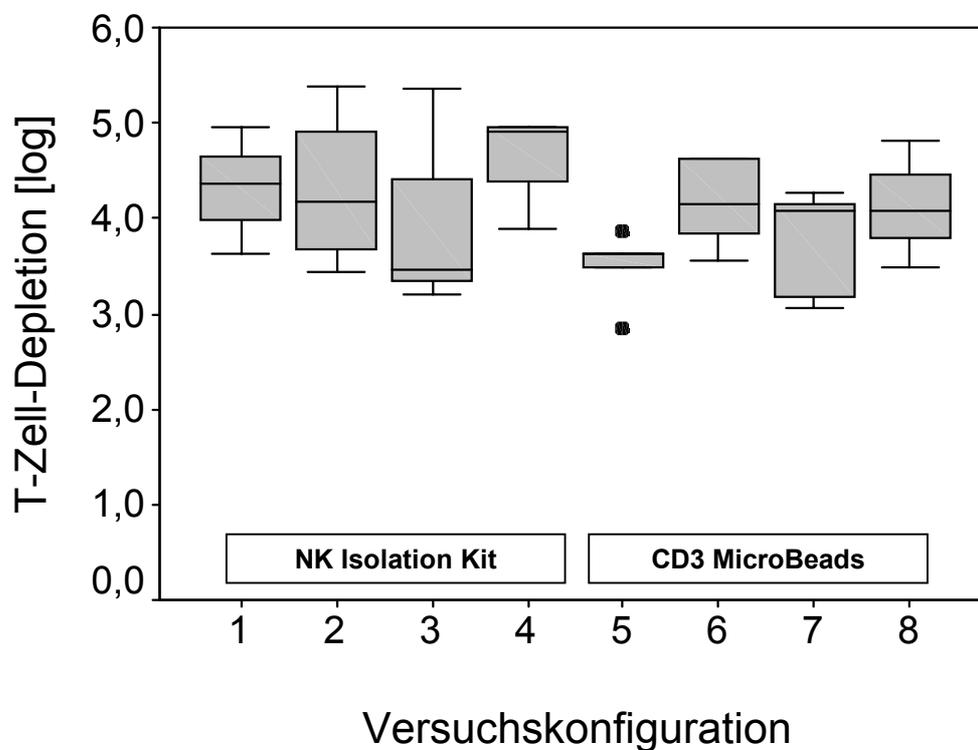


**Abb. 6: T-Zell-Depletion, Einfluss der Antikörpermenge**

Es werden zwei Antikörper hinsichtlich der T-Zell-Depletion in Abhängigkeit von der eingesetzten Antikörpermenge verglichen und in Box-Whisker-Plots dargestellt. Der zentrale Kasten zeigt die Lage der mittleren 50 Prozent der Daten als Rechteck zwischen dem oberen und unteren Quartil an; die horizontale Linie markiert den Median. Die sogenannten Whiskers reichen vom Kasten bis zum letzten verbundenen oberen bzw. unteren Wert, der innerhalb des 1,5-fachen Interquartilenabstands nach oben bzw. unten liegt.

Um den Einfluss der Auftraggeschwindigkeit isoliert zu ermitteln, wurden jeweils die beiden Versuchskonfigurationen miteinander verglichen, die sich nur in der Auftraggeschwindigkeit unterschieden (1 und 2, 3 und 4, 5 und 6, 7 und 8).

Die Änderung der Auftraggeschwindigkeit hatte in keinem Vergleichspaar einen signifikanten Einfluss auf die T-Zell-Depletion. Im Vergleichspaar 5-6 zeigt sich allerdings eine Tendenz zugunsten der langsameren Auftraggeschwindigkeit (3,5 +/- 0,4 log vs 4,2 +/- 0,5 log, P = 0,052) (Abb. 7).



**Abb. 7: T-Zell-Depletion, Einfluss der Auftraggeschwindigkeit**

Es werden zwei Antikörper hinsichtlich der T-Zell-Depletion in Abhängigkeit von der eingesetzten Antikörpermenge und der Flussgeschwindigkeit im Magnetfeld (Auftraggeschwindigkeit) verglichen und in Box-Whisker-Plots dargestellt (siehe Tab. 1). Der zentrale Kasten zeigt die Lage der mittleren 50 Prozent der Daten als Rechteck zwischen dem oberen und unteren Quartil an; die horizontale Linie markiert den Median. Die sogenannten Whiskers reichen vom Kasten bis zum letzten verbundenen oberen bzw. unteren Wert, der innerhalb des 1,5-fachen Interquartilenabstands nach oben bzw. unten liegt. Werte die außerhalb dieses Bereichs liegen, werden als schwarze Punkte gekennzeichnet.

**Tab. 1: Legende zu Abb. 7**

Versuchskonfiguration	1	2	3	4	5	6	7	8
Antikörper	IK	IK	IK	IK	MB	MB	MB	MB
Antikörpermenge [ml]	1	1	5	5	1	1	5	5
Auftragsgeschwindigkeit [ml/h]	100	50	100	50	100	50	100	50
N	3	4	3	4	5	6	5	6

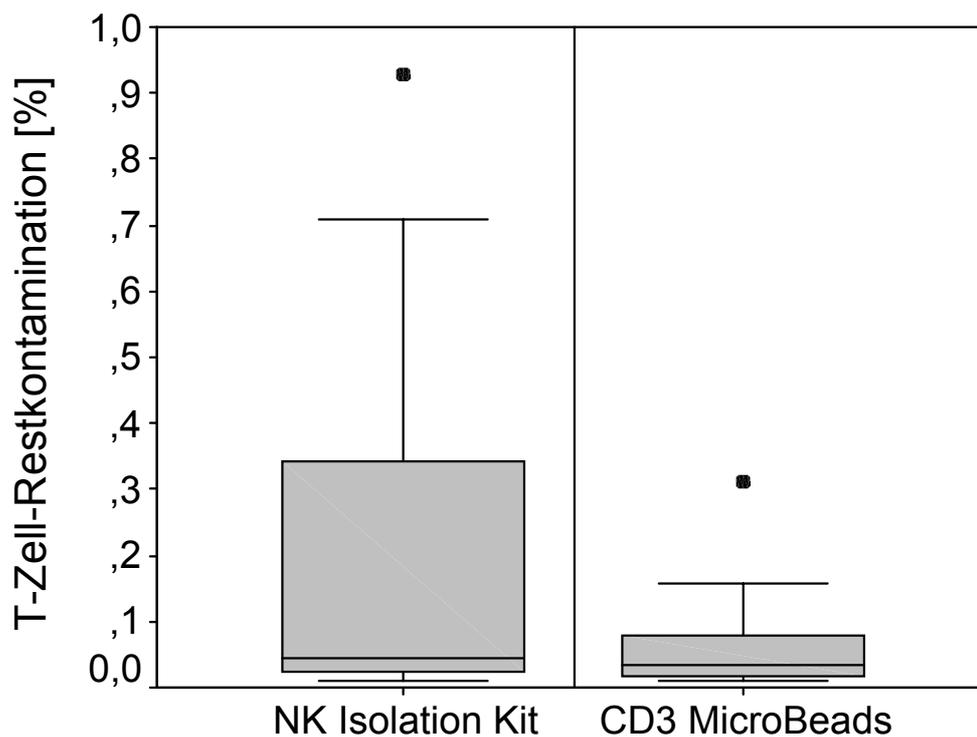
Mit der Versuchskonfiguration 4 (NK isolation kit, 5 ml, 50 ml/h) wurden die meisten ( $4,7 \pm 0,5$  log), mit der Konfiguration 5 (CD3 MicroBeads, 1 ml, 100 ml/h) die wenigsten ( $3,5 \pm 0,4$  log) T-Zellen depletiert.

#### 6.4 Restkontamination mit T-Zellen nach Depletion

Die Rest-Kontamination mit T-Zellen nach Purging lag in allen Versuchen unter 1% (0,01% - 0,93%); in über 2/3 der Fälle sogar unter 0,1%.

Differenziert man zwischen den Antikörpern, kamen Versuche mit dem „NK isolation kit“ in 64%, Versuche mit „CD3 MicroBeads“ in 95% der Fälle unter 0,2%. Unter 0,1% Kontamination lagen 57% (IK) bzw. 77% (MB) der Versuche.

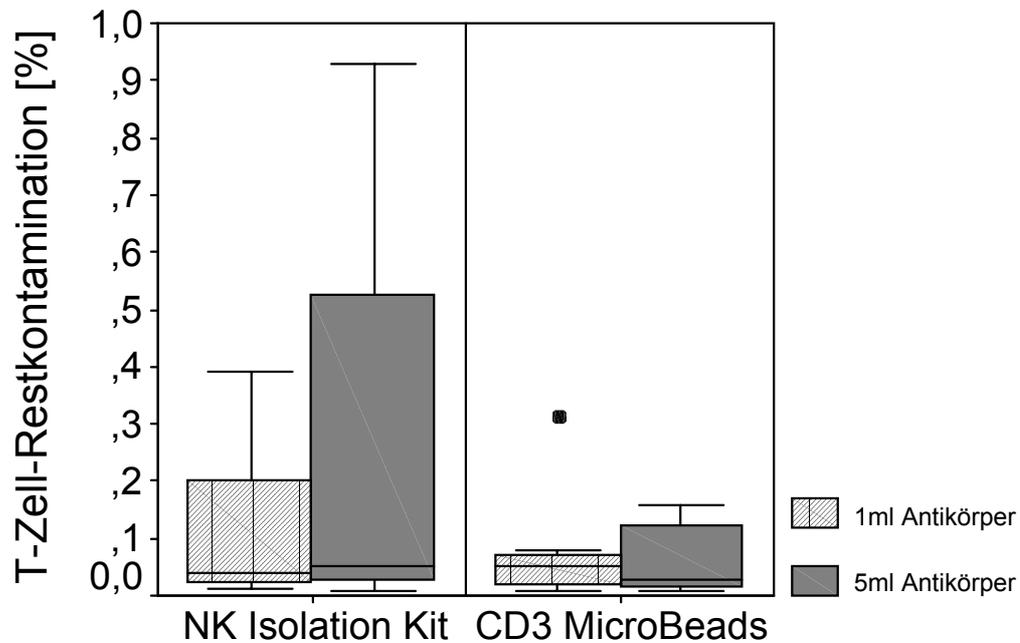
Im Mittel lag die Restkontamination mit T- Zellen mit IK bei 0,21 +/- 0,29% ( $1 \times 10^3 - 3 \times 10^5$  Zellen) bzw. bei 0,06 +/- 0,07% mit MB ( $5 \times 10^3 - 1 \times 10^6$  Zellen), ( $P = NS$ ) (Abb. 8, Tab. 10 siehe Anhang).



**Abb. 8: T-Zell-Restkontamination, Einfluss der Antikörperwahl**

Es werden zwei Antikörper hinsichtlich der T-Zell-Restkontamination nach Selektion verglichen und in Box-Whisker-Plots dargestellt. Der zentrale Kasten zeigt die Lage der mittleren 50 Prozent der Daten als Rechteck zwischen dem oberen und unteren Quartil an; die horizontale Linie markiert den Median. Die sogenannten Whiskers reichen vom Kasten bis zum letzten verbundenen oberen bzw. unteren Wert, der innerhalb des 1,5-fachen Interquartilenabstands nach oben bzw. unten liegt. Werte die außerhalb dieses Bereichs liegen, werden als schwarze Punkte gekennzeichnet.

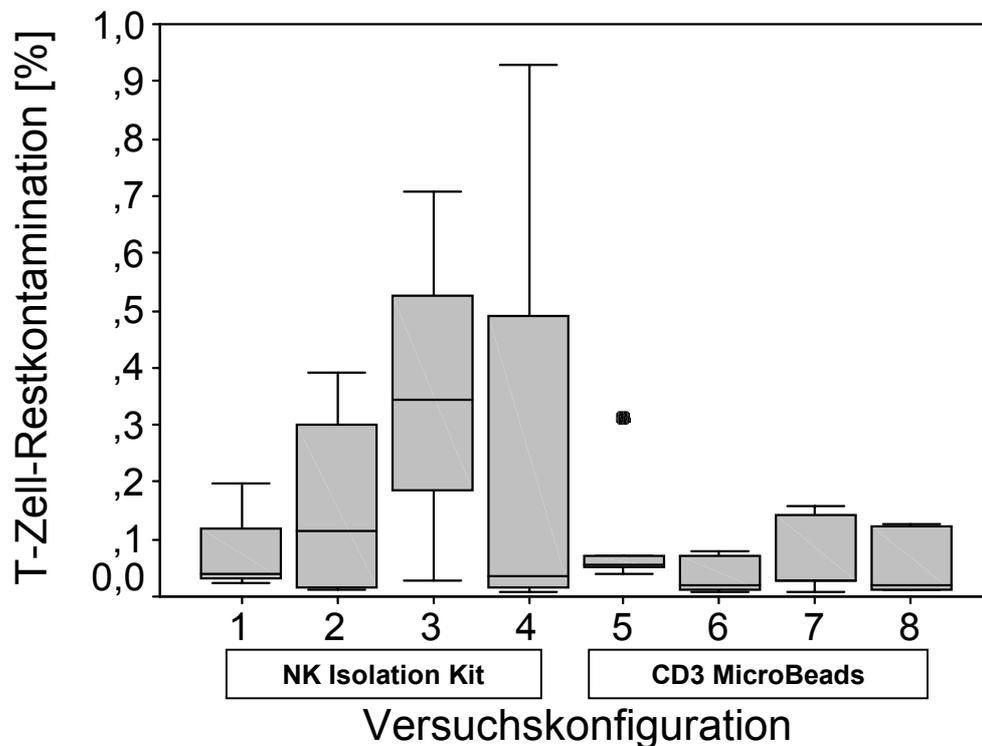
Beim Vergleich der eingesetzten Antikörpermenge ergab sich für die T-Zell-Restkontamination kein signifikanter Unterschied (Abb. 9).



### Abb. 9: T-Zell-Restkontamination, Einfluss der Antikörpermenge

Es werden zwei Antikörper hinsichtlich der T-Zell-Restkontamination nach Selektion in Abhängigkeit von der eingesetzten Antikörpermenge verglichen und in Box-Whisker-Plots dargestellt. Der zentrale Kasten zeigt die Lage der mittleren 50 Prozent der Daten als Rechteck zwischen dem oberen und unteren Quartil an; die horizontale Linie markiert den Median. Die sogenannten Whiskers reichen vom Kasten bis zum letzten verbundenen oberen bzw. unteren Wert, der innerhalb des 1,5-fachen Interquartilenabstands nach oben bzw. unten liegt. Werte die außerhalb dieses Bereichs liegen, werden als schwarze Punkte gekennzeichnet.

Auch die Änderung der Auftraggeschwindigkeit hatte keinen signifikanten Einfluss auf die T-Zell-Restkontamination (Abb. 10).



**Abb. 10: T-Zell-Restkontamination, Einfluss der Auftraggeschwindigkeit**

Es werden zwei Antikörper hinsichtlich der T-Zell-Restkontamination nach Selektion in Abhängigkeit von der eingesetzten Antikörpermenge und der Flussgeschwindigkeit im Magnetfeld (Auftraggeschwindigkeit) verglichen und in Box-Whisker-Plots dargestellt (siehe Tab. 2). Der zentrale Kasten zeigt die Lage der mittleren 50 Prozent der Daten als Rechteck zwischen dem oberen und unteren Quartil an; die horizontale Linie markiert den Median. Die sogenannten Whiskers reichen vom Kasten bis zum letzten verbundenen oberen bzw. unteren Wert, der innerhalb des 1,5-fachen Interquartilenabstands nach oben bzw. unten liegt. Werte die außerhalb dieses Bereichs liegen, werden als schwarze Punkte gekennzeichnet.

**Tab. 2: Legende zu Abb. 10**

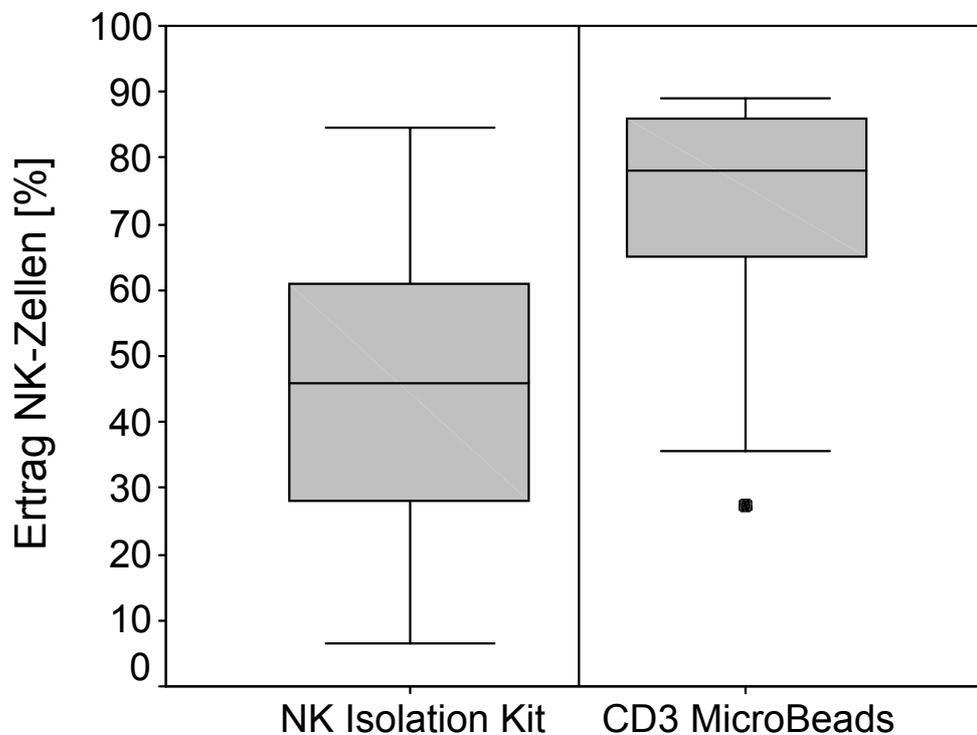
Versuchskonfiguration	1	2	3	4	5	6	7	8
Antikörper	IK	IK	IK	IK	MB	MB	MB	MB
Antikörpermenge [ml]	1	1	5	5	1	1	5	5
Auftraggeschwindigkeit [ml/h]	100	50	100	50	100	50	100	50
N	3	4	3	4	5	6	5	6

Die geringste T-Zell-Restkontamination wurde mit Versuchskonfiguration 6 (CD3 MicroBeads, 1 ml, 50 ml/h) erreicht (0,04 +/- 0,03%,  $8 \times 10^3 - 2 \times 10^5$  Zellen); die Versuchskonfiguration 3 (NK isolation kit, 5 ml, 100 ml/h) lieferte die größte Kontamination (0,36% +/- 0,34%,  $2 \times 10^3 - 3 \times 10^5$  Zellen).

### 6.5 NK-Zell-Ertrag (recovery)

In Abb. 11 sind die Ergebnisse für den Ertrag an NK-Zellen nach Purging angegeben (Tab. 11 siehe Anhang). Diese Werte drücken aus, wie viel Prozent der Ausgangs-NK-Zellen nach der Zellseparation zur Herstellung eines NK-Zell-Präparates weiterverarbeitet werden können.

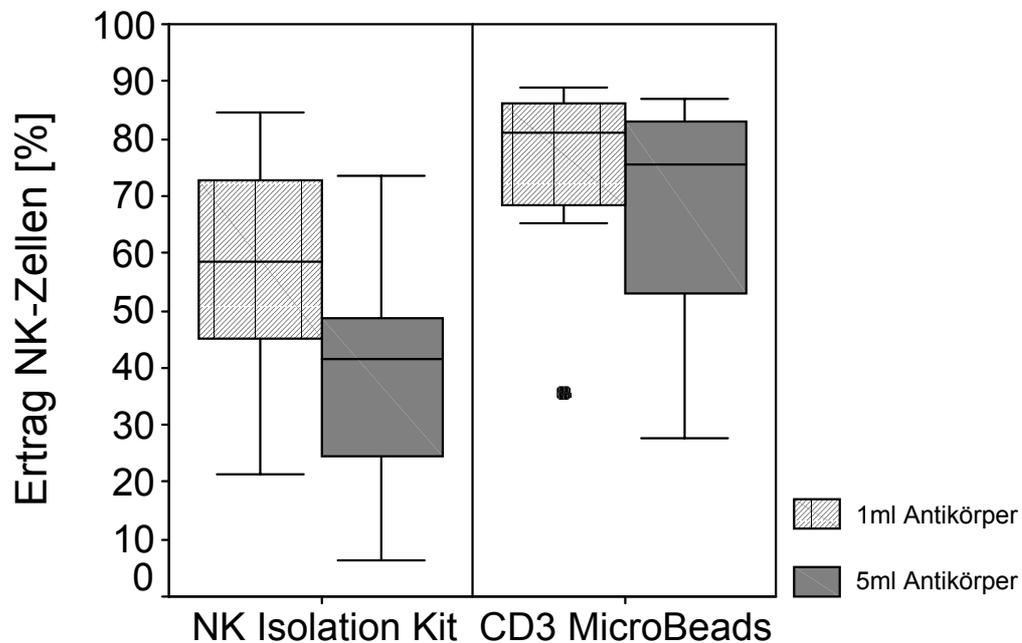
Bei Verwendung des „NK isolation kit“ konnte ein NK-Zell-Ertrag von 48 +/- 24% ( $3 \times 10^7 - 6 \times 10^7$  Zellen) erreicht werden; kamen „CD3 MicroBeads“ zum Einsatz, lag der Ertrag an NK-Zellen bei 72 +/- 17% ( $1 \times 10^7 - 9 \times 10^7$  Zellen,  $P = 0,02$ ).



**Abb. 11: NK-Zell-Ertrag, Einfluss der Antikörperwahl**

Es werden zwei Antikörper hinsichtlich des NK-Zell-Ertrags verglichen und in Box-Whisker-Plots dargestellt. Der zentrale Kasten zeigt die Lage der mittleren 50 Prozent der Daten als Rechteck zwischen dem oberen und unteren Quartil an; die horizontale Linie markiert den Median. Die sogenannten Whiskers reichen vom Kasten bis zum letzten verbundenen oberen bzw. unteren Wert, der innerhalb des 1,5-fachen Interquartilenabstands nach oben bzw. unten liegt. Werte die außerhalb dieses Bereichs liegen, werden als schwarze Punkte gekennzeichnet.

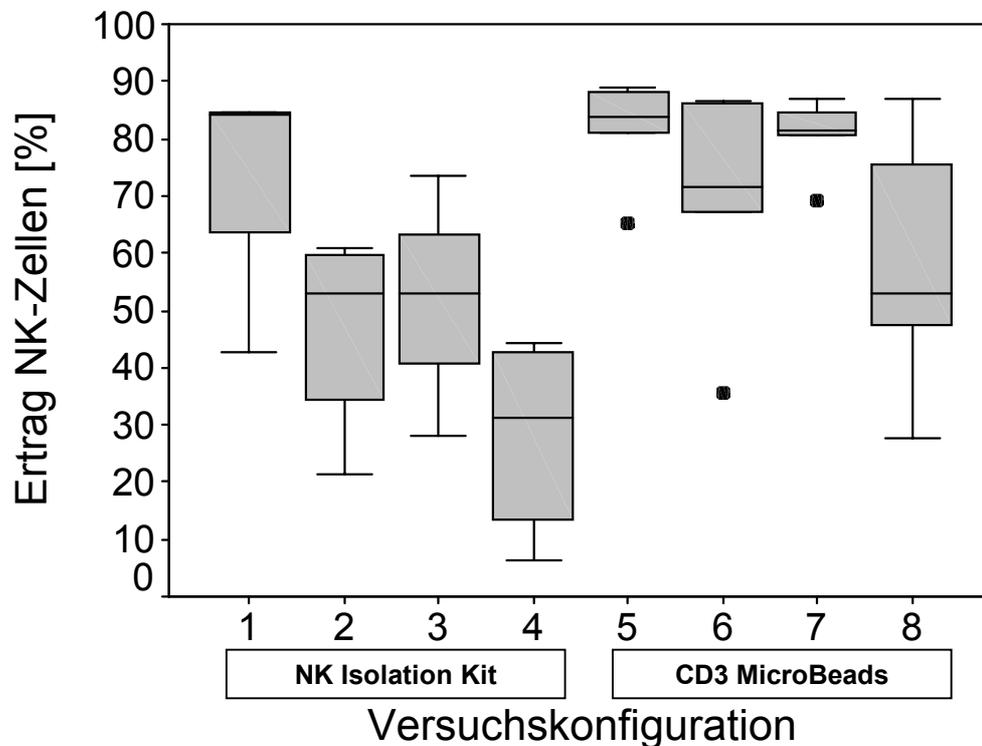
Die eingesetzte Antikörpermenge spielte keine signifikante Rolle hinsichtlich des NK-Zell-Ertrages (Abb. 12).



**Abb. 12: NK-Zell-Ertrag, Einfluss der Antikörpermenge**

Es werden zwei Antikörper hinsichtlich des NK-Zell-Ertrags in Abhängigkeit von der eingesetzten Antikörpermenge verglichen und in Box-Whisker-Plots dargestellt. Der zentrale Kasten zeigt die Lage der mittleren 50 Prozent der Daten als Rechteck zwischen dem oberen und unteren Quartil an; die horizontale Linie markiert den Median. Die sogenannten Whiskers reichen vom Kasten bis zum letzten verbundenen oberen bzw. unteren Wert, der innerhalb des 1,5-fachen Interquartilenabstands nach oben bzw. unten liegt. Werte die außerhalb dieses Bereichs liegen, werden als schwarze Punkte gekennzeichnet.

Der NK-Zell-Ertrag veränderte sich bei unterschiedlichen Auftragsgeschwindigkeiten in keiner der verglichenen Gruppen signifikant (Abb. 13).



**Abb. 13: NK-Zell-Ertrag, Einfluss der Auftragsgeschwindigkeit**

Es werden zwei Antikörper hinsichtlich des NK-Zell-Ertrags in Abhängigkeit von der eingesetzten Antikörpermenge und der Flussgeschwindigkeit im Magnetfeld (Auftragsgeschwindigkeit) verglichen und in Box-Whisker-Plots dargestellt (siehe Tab. 3). Der zentrale Kasten zeigt die Lage der mittleren 50 Prozent der Daten als Rechteck zwischen dem oberen und unteren Quartil an; die horizontale Linie markiert den Median. Die sogenannten Whiskers reichen vom Kasten bis zum letzten verbundenen oberen bzw. unteren Wert, der innerhalb des 1,5-fachen Interquartilenabstands nach oben bzw. unten liegt. Werte die außerhalb dieses Bereichs liegen, werden als schwarze Punkte gekennzeichnet.

**Tab. 3: Legende zu Abb. 13**

Versuchskonfiguration	1	2	3	4	5	6	7	8
Antikörper	IK	IK	IK	IK	MB	MB	MB	MB
Antikörpermenge [ml]	1	1	5	5	1	1	5	5
Auftragsgeschwindigkeit [ml/h]	100	50	100	50	100	50	100	50
N	3	4	3	4	5	6	5	6

Die größten Erträge, 81 +/- 10% ( $3 \times 10^7 - 8 \times 10^7$  Zellen) bzw. 81 +/- 7% ( $3 \times 10^7 - 8 \times 10^7$  Zellen), wurden mit den Versuchskonfigurationen 5 (CD3 MicroBeads, 1 ml, 100 ml/h) und 7 (CD3

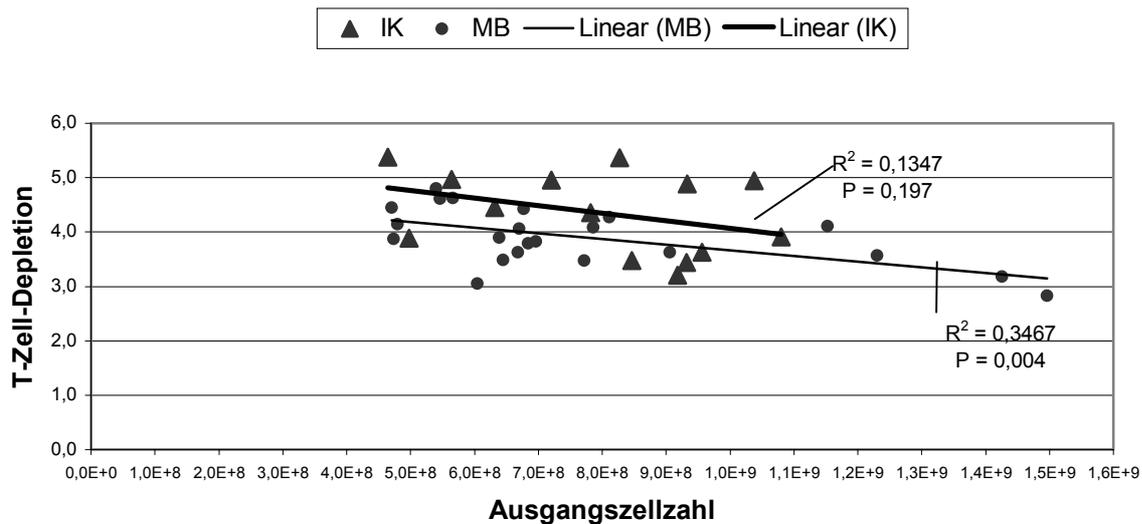
MicroBeads, 5 ml, 100 ml/h) erzielt; die niedrigsten Ergebnisse ( $28 \pm 18\%$ ,  $3 \times 10^6 - 3 \times 10^7$  Zellen) lieferte Konfiguration 4 (NK isolation kit, 5 ml, 50 ml/h).

## 6.6 Weitere Einflussgrößen

Mit den vorliegenden Versuchsdaten wurden Regressionsberechnungen durchgeführt, um weitere Parameter zu finden, die auf das Versuchsergebnis Einfluss nehmen.

Verwendet man „CD3 MicroBeads“, besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Ausgangszellzahl (eingesetzte Menge an Leukozyten) und der T-Zell-Depletion; d.h., je größer die Ausgangszellzahl desto geringer die T-Zell-Depletion ( $P = 0,004$ ). Die Ausgangszellzahlen der gepoolten buffy coats lagen zwischen  $4 \times 10^8$  und  $1,5 \times 10^9$  Zellen.

Beim „NK isolation kit“ findet sich eine solche Korrelation nicht (Abb. 14).

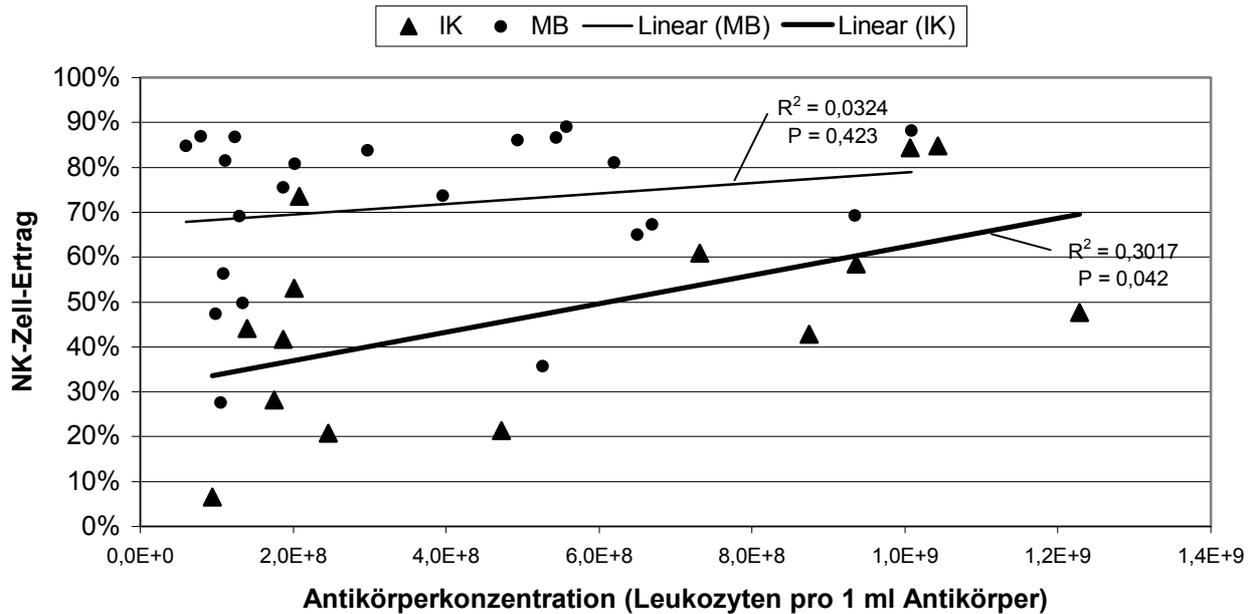


**Abb. 14: Zusammenhang zwischen Ausgangszellzahl und T-Zell-Depletion**

Es wurden lineare Regressionsanalysen durchgeführt, um den Zusammenhang zwischen der Ausgangszellzahl und der T-Zell-Depletion zu ermitteln

Bei Versuchen mit dem „NK isolation kit“ besteht eine positive Korrelation zwischen der Antikörperkonzentration (Leukozyten / 1 ml Antikörper) und dem NK-Zell-Ertrag (Abb. 15). Je geringer die Antikörperkonzentration, desto höher der NK-Zell-Ertrag bzw. desto geringer der NK-Zell-Verlust ( $P = 0,042$ ).

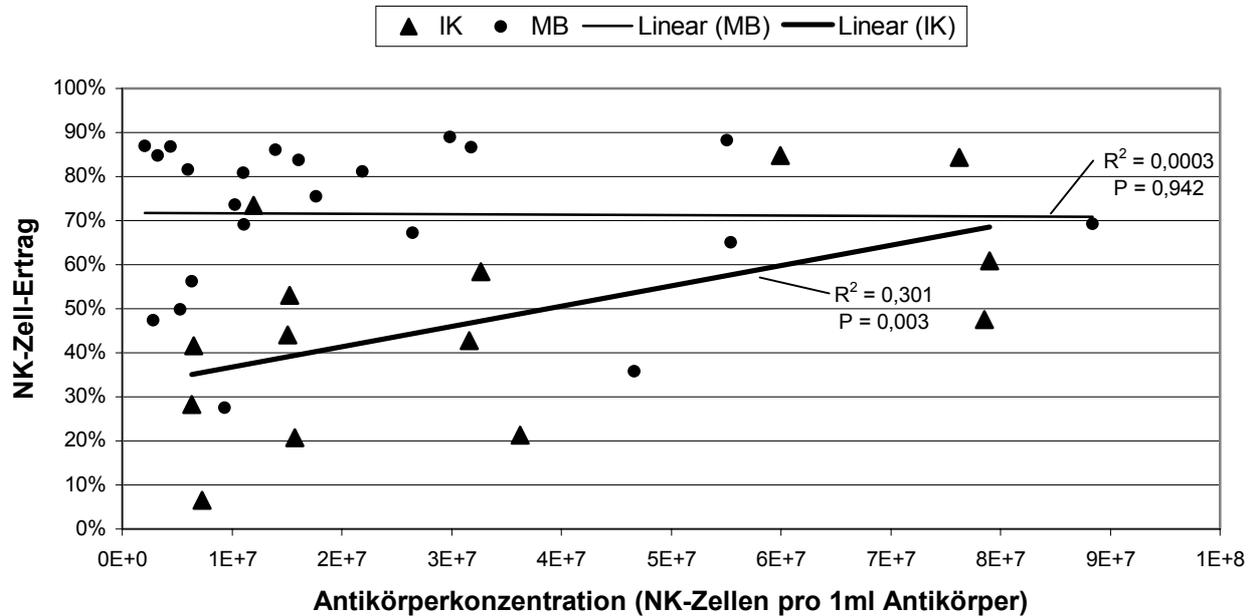
Ein vergleichbarer Zusammenhang lässt sich für Versuche mit „CD3 MicroBeads“ nicht bestätigen.



**Abb. 15: Korrelation zwischen Antikörperkonzentration und NK-Zell-Ertrag**

Es wurden lineare Regressionsanalysen durchgeführt, um den Zusammenhang zwischen der Antikörperkonzentration (Anzahl der Leukozyten pro 1 ml Antikörper) und dem NK-Zell-Ertrag zu ermitteln.

Ausserdem ist bei Versuchen mit dem „NK isolation kit“ der NK-Zell-Ertrag umso größer je größer das NK-Zell / Antikörper -Verhältnis ist ( $P = 0,003$ ). In der Versuchsgruppe mit „CD3 MicroBeads“ als Antikörper besteht diesbezüglich kein Zusammenhang (Abb. 16).



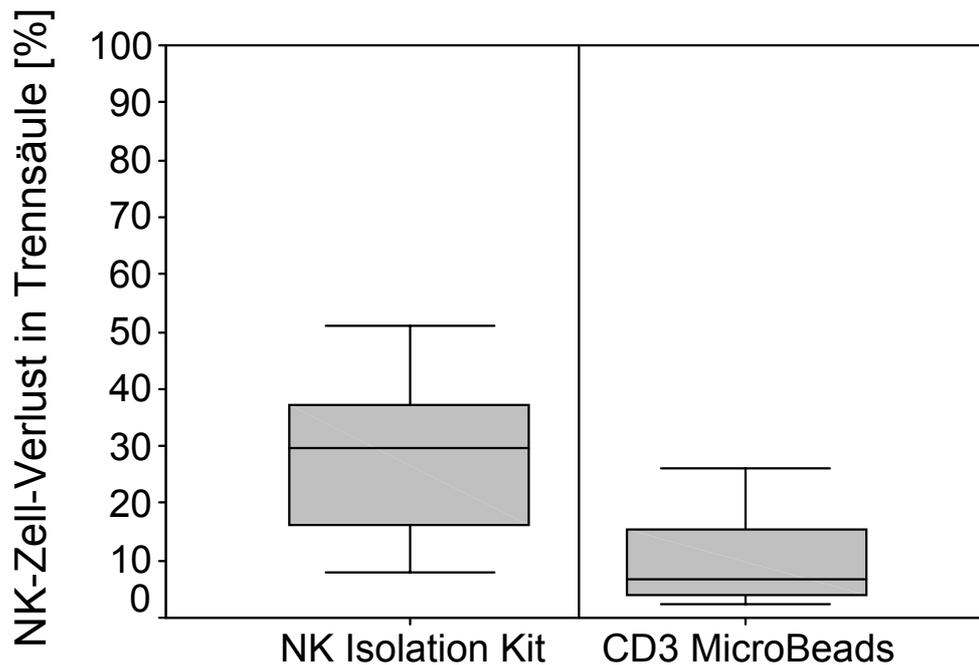
**Abb. 16: Korrelation zwischen Antikörperkonzentration und NK-Zell-Ertrag**

Es wurden lineare Regressionsanalysen durchgeführt, um den Zusammenhang zwischen der Antikörperkonzentration (Anzahl der NK-Zellen pro 1 ml Antikörper) und dem NK-Zell-Ertrag zu ermitteln.

## 6.7 NK-Zell-Verlust während der Depletion

### 6.7.1 NK-Zell-Verlust in der Trennsäule

Während des Purging-Prozesses sind auch NK-Zellen in der Trennsäule festgehalten worden und damit verloren gegangen. Dieser Verlust von NK-Zellen ist bei Verwendung des „NK isolation kit“ (IK) größer als mit MicroBeads (MB) ( $P = 0,00002$ ). Die Verluste liegen mit IK bei  $28 \pm 13\%$ , während mit MB  $10 \pm 7\%$  der NK-Zellen verloren gehen (Abb. 17, Tab. 12 siehe Anhang).

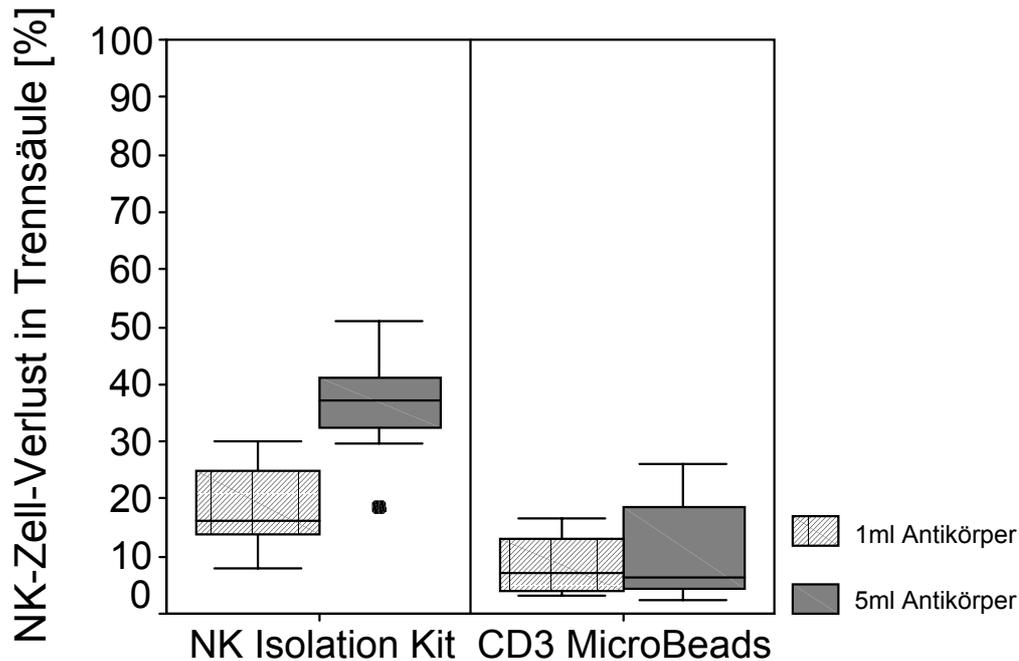


**Abb. 17: NK-Zell-Verlust in der Trennsäule, Einfluss der Antikörperwahl**

Es werden zwei Antikörper hinsichtlich des NK-Zell-Verlustes in der Trennsäule verglichen und in Box-Whisker-Plots dargestellt. Der zentrale Kasten zeigt die Lage der mittleren 50 Prozent der Daten als Rechteck zwischen dem oberen und unteren Quartil an; die horizontale Linie markiert den Median. Die sogenannten Whiskers reichen vom Kasten bis zum letzten verbundenen oberen bzw. unteren Wert, der innerhalb des 1,5-fachen Interquartilenabstands nach oben bzw. unten liegt.

Bei der Verwendung des „NK isolation kit“ spielt die Antikörpermenge eine signifikante Rolle ( $P = 0,007$ ). Wird eine große Antikörpermenge eingesetzt, verbleiben  $36 \pm 10\%$  NK-Zellen in der Säule; mit geringer Antikörpermenge  $19 \pm 8\%$  (Abb.18).

Verwendet man „CD3 MicroBeads“, zeigt sich, dass der NK-Zell-Verlust unabhängig von der Antikörpermenge ist.



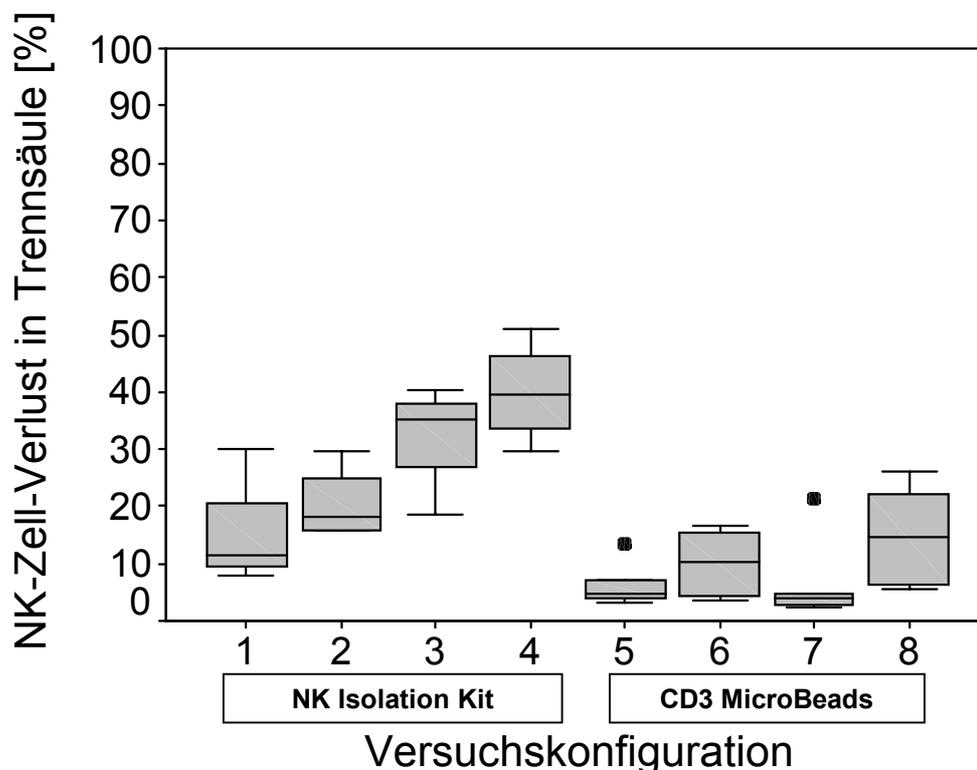
**Abb. 18: NK-Zell-Verlust in der Trennsäule, Einfluss der Antikörpermenge**

Es werden zwei Antikörper hinsichtlich des NK-Zell-Verlustes in der Trennsäule in Abhängigkeit von der eingesetzten Antikörpermenge verglichen und in Box-Whisker-Plots dargestellt. Der zentrale Kasten zeigt die Lage der mittleren 50 Prozent der Daten als Rechteck zwischen dem oberen und unteren Quartil an; die horizontale Linie markiert den Median. Die sogenannten Whiskers reichen vom Kasten bis zum letzten verbundenen oberen bzw. unteren Wert, der innerhalb des 1,5-fachen Interquartilenabstands nach oben bzw. unten liegt. Werte die außerhalb dieses Bereichs liegen, werden als schwarze Punkte gekennzeichnet.

Die Auftragsgeschwindigkeit hat keinen statistisch signifikanten Einfluss auf den Verbleib der NK-Zellen in der Trennsäule (Abb. 19).

Für die Versuche, bei denen große Mengen „CD3 MicroBeads“ zugegeben wurden (Konfigurationen 7 und 8), deutet sich an, dass sich eine hohe Auftragsgeschwindigkeit in einem geringeren NK-Zell-Verlust in der Säule niederschlägt (7 +/- 8% vs 15 +/- 8%, P = 0,052).

Den durchschnittlich niedrigsten Verlust erbrachten die Versuchskonfigurationen 5 und 7 (6 +/- 4% bzw. 7 +/- 8%). Den höchsten Verlust sah man bei Konfiguration 4 (40 +/- 9%).



**Abb. 19: NK-Zell-Verlust in der Trennsäule, Einfluss der Auftragsgeschwindigkeit**

Es werden zwei Antikörper hinsichtlich des NK-Zell-Verlustes in der Trennsäule in Abhängigkeit von der eingesetzten Antikörpermenge und der Flussgeschwindigkeit im Magnetfeld (Auftragsgeschwindigkeit) verglichen und in Box-Whisker-Plots dargestellt (siehe Tab. 4). Der zentrale Kasten zeigt die Lage der mittleren 50 Prozent der Daten als Rechteck zwischen dem oberen und unteren Quartil an; die horizontale Linie markiert den Median. Die sogenannten Whiskers reichen vom Kasten bis zum letzten verbundenen oberen bzw. unteren Wert, der innerhalb des 1,5-fachen Interquartilenabstands nach oben bzw. unten liegt. Werte die außerhalb dieses Bereichs liegen, werden als schwarze Punkte gekennzeichnet.

**Tab. 4: Legende zu Abb. 19**

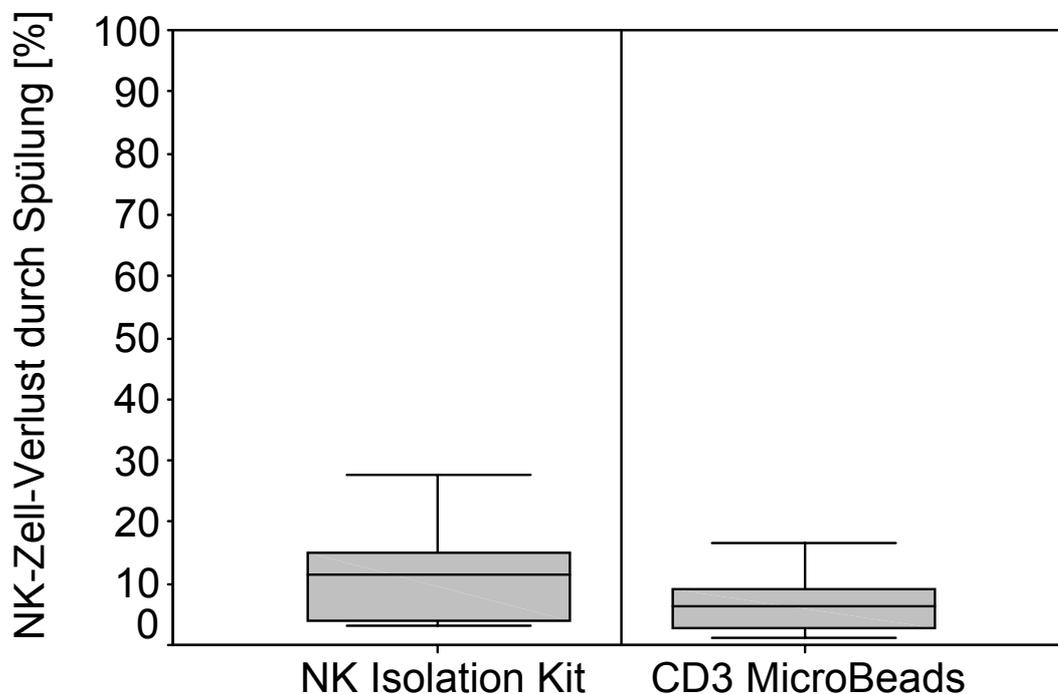
Versuchskonfiguration	1	2	3	4	5	6	7	8
Antikörper	IK	IK	IK	IK	MB	MB	MB	MB
Antikörpermenge [ml]	1	1	5	5	1	1	5	5
Auftragsgeschwindigkeit [ml/h]	100	50	100	50	100	50	100	50
N	3	4	3	4	5	6	5	6

### 6.7.2 NK-Zell-Verlust in der Spülung

Durch den Spülvorgang am Ende eines Versuchs wurden die Ergebnisse für T-Zell-Depletion, T-Zell-Restkontamination und NK-Zell-Ertrag nicht mehr verändert. Es wurden allerdings Zellen, die sich noch in den Leitungen befanden, und ggf. Zellen aus der Trennsäule herausgespült.

In der Spülflüssigkeit waren bei Versuchen mit dem „NK isolation kit“ 12 +/- 3 % der NK-Zellen enthalten; bei Versuchen mit „CD3 MicroBeads“ waren es 7 +/- 1% (P = 0,08)

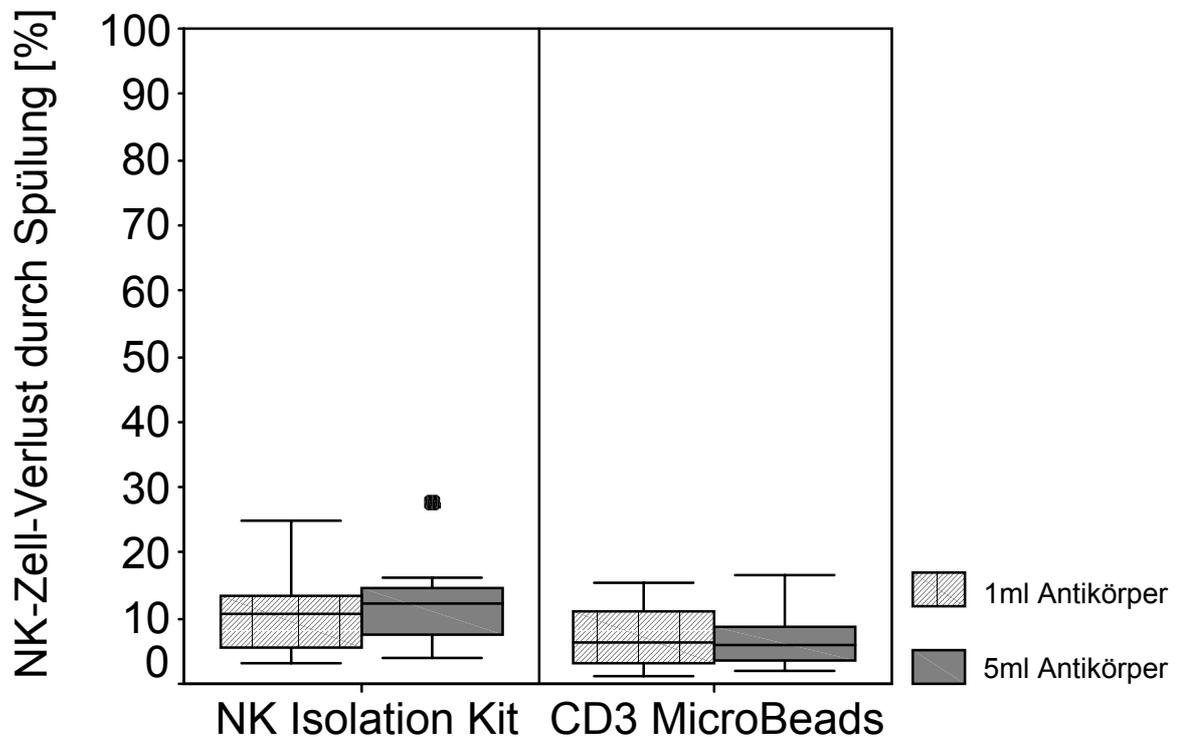
(Abb. 20, Tab. 13 siehe Anhang).



**Abb. 20: NK-Zell-Verlust in der Spülung, Einfluss der Antikörperwahl**

Es werden zwei Antikörper hinsichtlich des NK-Zell-Verlustes in der Spülung verglichen und in Box-Whisker-Plots dargestellt. Der zentrale Kasten zeigt die Lage der mittleren 50 Prozent der Daten als Rechteck zwischen dem oberen und unteren Quartil an; die horizontale Linie markiert den Median. Die sogenannten Whiskers reichen vom Kasten bis zum letzten verbundenen oberen bzw. unteren Wert, der innerhalb des 1,5-fachen Interquartilenabstands nach oben bzw. unten liegt.

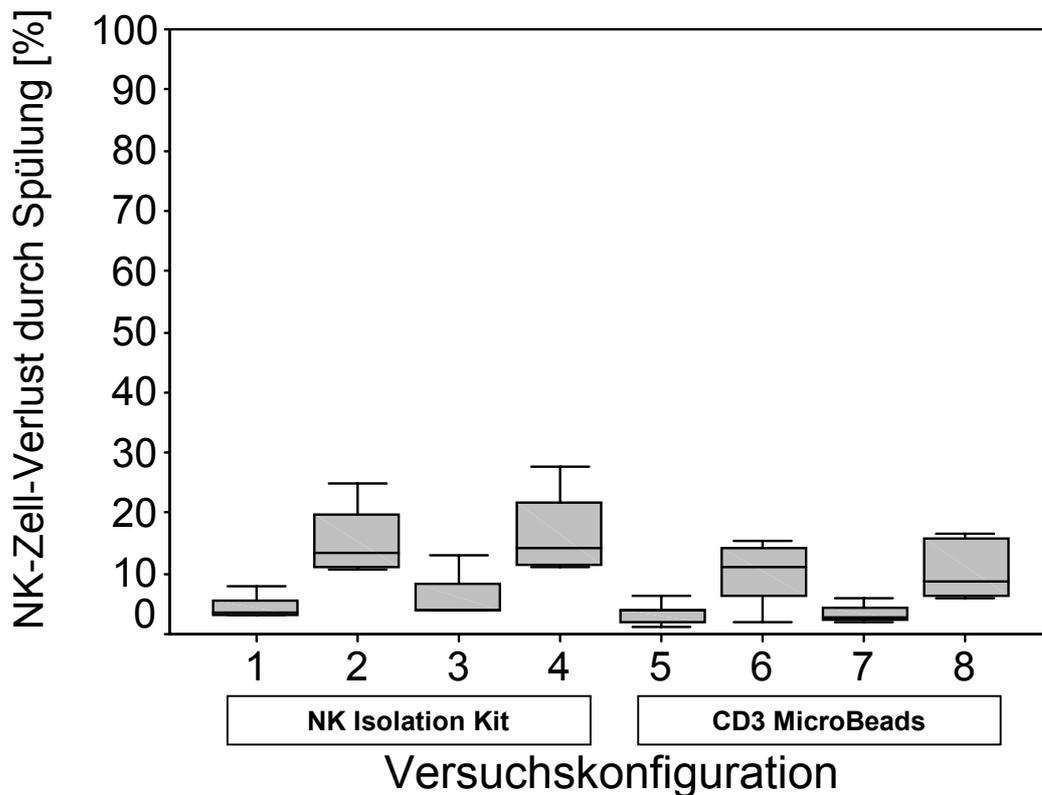
Die eingesetzte Antikörpermenge hat bei keinem der verwandten Antikörper einen signifikanten Einfluss auf den NK-Zell-Verlust in der Spülung ergeben (Abb. 21).



**Abb. 21: NK-Zell-Verlust in der Spülung, Einfluss der Antikörpermenge**

Es werden zwei Antikörper hinsichtlich des NK-Zell-Verlustes in der Spülung in Abhängigkeit von der eingesetzten Antikörpermenge verglichen und in Box-Whisker-Plots dargestellt. Der zentrale Kasten zeigt die Lage der mittleren 50 Prozent der Daten als Rechteck zwischen dem oberen und unteren Quartil an; die horizontale Linie markiert den Median. Die sogenannten Whiskers reichen vom Kasten bis zum letzten verbundenen oberen bzw. unteren Wert, der innerhalb des 1,5-fachen Interquartilenabstands nach oben bzw. unten liegt. Werte die außerhalb dieses Bereichs liegen, werden als schwarze Punkte gekennzeichnet.

Der Vergleich der Auftragsgeschwindigkeiten erbrachte das Ergebnis, dass bei niedriger Auftragsgeschwindigkeit der NK-Zell-Anteil in der Spülung höher ist als beim schnellen Auftragen der Zellen. Beim Vergleich der Versuchskonfigurationen 7 und 8 ist der Unterschied signifikant ( $P = 0,009$ ), bei den Vergleichspaaren 1 und 2 bzw. 5 und 6 zeigt sich eine statistische Tendenz ( $P = 0,057$  bzw.  $P = 0,08$ ), während beim Paar 3 und 4 kein signifikanter Unterschied besteht (Abb. 22).



**Abb. 22: NK-Zell-Verlust in der Spülung, Einfluss der Auftragsgeschwindigkeit**

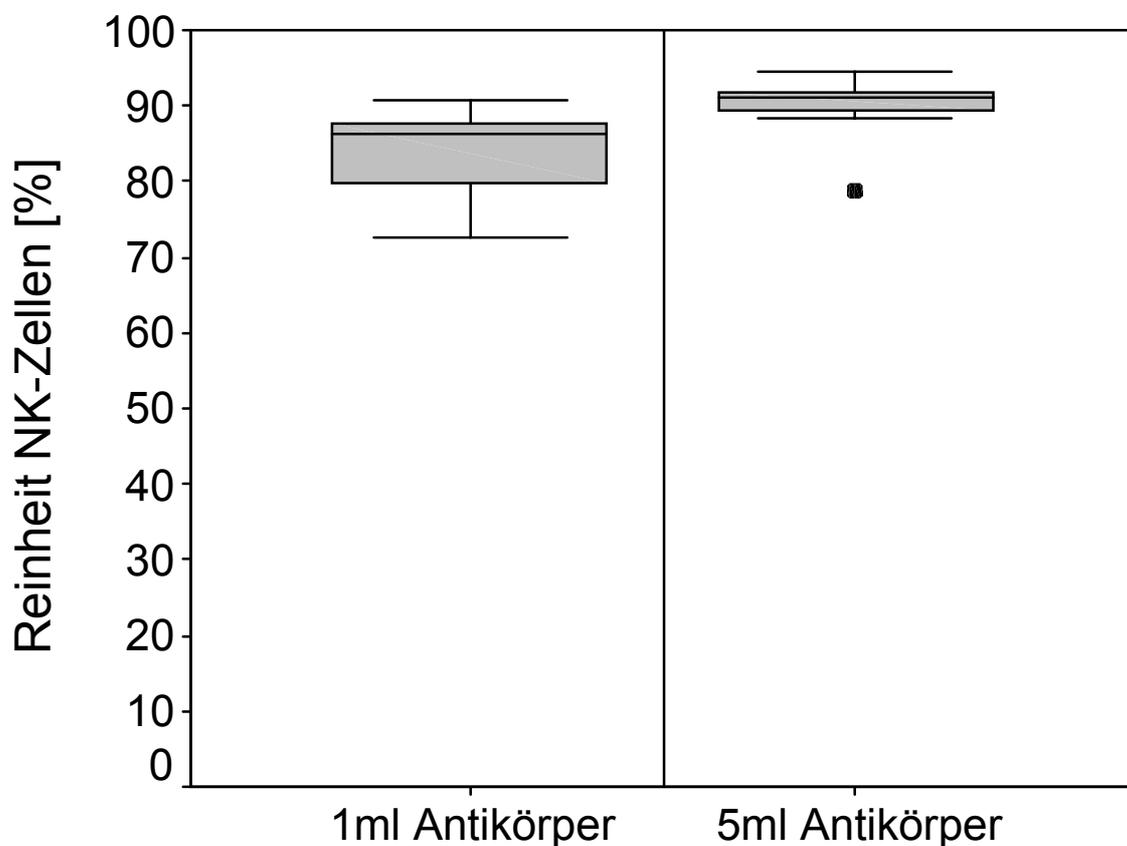
Es werden zwei Antikörper hinsichtlich des NK-Zell-Verlustes in der Spülung in Abhängigkeit von der eingesetzten Antikörpermenge und der Flussgeschwindigkeit im Magnetfeld (Auftragsgeschwindigkeit) verglichen und in Box-Whisker-Plots dargestellt (siehe Tab. 5). Der zentrale Kasten zeigt die Lage der mittleren 50 Prozent der Daten als Rechteck zwischen dem oberen und unteren Quartil an; die horizontale Linie markiert den Median. Die sogenannten Whiskers reichen vom Kasten bis zum letzten verbundenen oberen bzw. unteren Wert, der innerhalb des 1,5-fachen Interquartilenabstands nach oben bzw. unten liegt.

**Tab. 5: Legende zu Abb. 22**

Versuchskonfiguration	1	2	3	4	5	6	7	8
Antikörper	IK	IK	IK	IK	MB	MB	MB	MB
Antikörpermenge [ml]	1	1	5	5	1	1	5	5
Auftragsgeschwindigkeit [ml/h]	100	50	100	50	100	50	100	50
N	3	4	3	4	5	6	5	6

### 6.8 NK-Zell-Reinheit mit dem „NK isolation kit“

Bei der Depletion der Nicht-NK-Zellen mit dem „NK isolation kit“ hatte die verwendete Antikörpermenge einen signifikanten Einfluss auf die Reinheit des NK-Zell-Präparates ( $P = 0,026$ ). Bei Einsatz von 5 ml Antikörpern pro 10 ml Zellsuspension lag die NK-Zell-Reinheit bei 89,5% (78,8 – 94,4); wurde nur 1 ml Antikörper zugesetzt, resultierte eine NK-Zell-Reinheit von 83,6% (72,6 – 90,8) (Abb. 23, Tab. 14 siehe Anhang).



**Abb. 23: NK-Zell-Reinheit mit „NK isolation kit“, Einfluss der Antikörpermenge**

Es werden die Versuche mit kleiner bzw. großer Antikörpermenge hinsichtlich der NK-Zell-Reinheit verglichen und in Box-Whisker-Plots dargestellt. Der zentrale Kasten zeigt die Lage der mittleren 50 Prozent der Daten als Rechteck zwischen dem oberen und unteren Quartil an; die horizontale Linie markiert den Median. Die sogenannten Whiskers reichen vom Kasten bis zum letzten verbundenen oberen bzw. unteren Wert, der innerhalb des 1,5-fachen Interquartilenabstands nach oben bzw. unten liegt. Werte die außerhalb dieses Bereichs liegen, werden als schwarze Punkte gekennzeichnet.

Die Geschwindigkeit, mit der die Zellen die Trennsäule im Magnetfeld passieren (Auftragsgeschwindigkeit), hat keinen signifikanten Einfluss auf die NK-Zell-Reinheit (Abb. 24).

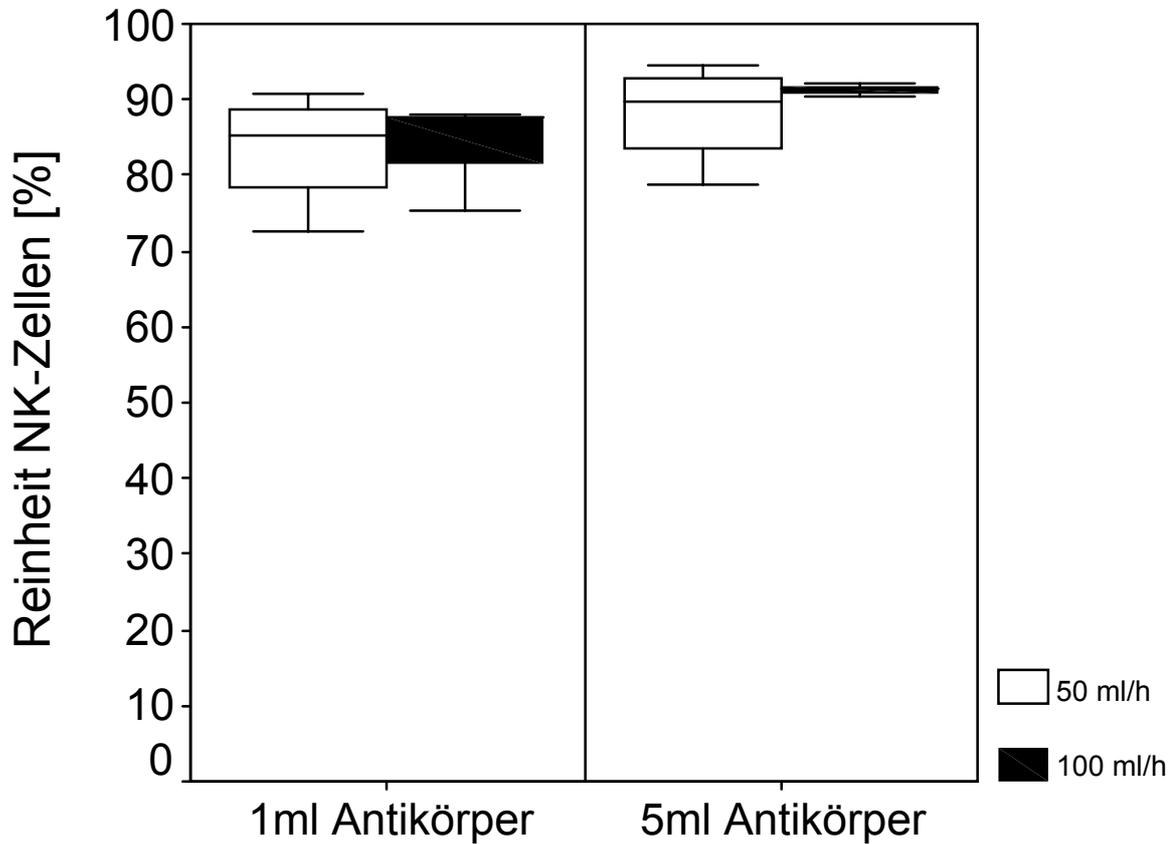


Abb. 24: NK-Zell-Reinheit mit NK isolation kit, Einfluss der Auftragsgeschwindigkeit

Es werden die Versuche mit kleiner bzw. großer Antikörpermenge hinsichtlich der NK-Zell-Reinheit in Abhängigkeit von der Flussgeschwindigkeit im Magnetfeld (Auftragsgeschwindigkeit) verglichen und in Box-Whisker-Plots dargestellt. Der zentrale Kasten zeigt die Lage der mittleren 50 Prozent der Daten als Rechteck zwischen dem oberen und unteren Quartil an; die horizontale Linie markiert den Median. Die sogenannten Whiskers reichen vom Kasten bis zum letzten verbundenen oberen bzw. unteren Wert, der innerhalb des 1,5-fachen Interquartilenabstands nach oben bzw. unten liegt.

## 6.9 Fehlerbetrachtung

Als Messverfahren wurden bei dieser Arbeit automatische Zellzahlmessungen, Volumenmessungen und FACS-Analysen eingesetzt. Mit Hilfe der absoluten Zellzahlen aus Zellzahl- und Volumenmessungen und den prozentualen Angaben der FACS-Analysen, konnten alle erforderlichen Daten errechnet werden.

Bei den Volumenmessungen konnte es zu leichten Ungenauigkeiten kommen, da es sich teilweise um sehr kleine Volumina (1-5 ml) handelte, oder das Volumen bei größeren Mengen in 50ml Falcon®-Röhrchen abgelesen wurde.

Die FACS-Analysen sind eine elegante Methode, um Subpopulationen von Zellen quantitativ zu bestimmen. Dabei bedarf es allerdings einiger Übung und Erfahrung, da die eigentlich Messung zwar automatisch, die Festlegung der Zählfelder (Gates) aber manuell erfolgt. Hinzukommt, dass die Abgrenzung der Zellpopulationen manchmal nicht eindeutig ist. Während sich CD3<sup>+</sup> markierte Zellen in der Regel recht deutlich von den nicht markierten Zellen abheben, gestaltet sich die Messung der NK-Zellen schwieriger. Werden die NK-Zellen mit CD56 Antikörpern gefärbt, ist die emittierte Fluoreszenz manchmal nicht stark genug, so dass die Zellwolken ineinander übergehen. Um dieses Problem zu umgehen, wurden die NK-Zellen zusätzlich noch mit CD16 Antikörpern markiert; das sollte die Fluoreszenz verstärken. Mit dieser Methode erhält man bessere Bilder, die eindeutiger auszuwerten sind. Trotzdem gab es manche Messungen, in denen die Zellpopulationen nicht eindeutig zu trennen waren und der Bearbeiter einen Ermessensspielraum zur Auswertung hatte. So lassen sich die auf den ersten Blick unverständlichen negativen Werte bei den Auswertungen der Zellverluste erklären. Sie stellen vorgetäuschte Zellgewinne dar, die mit den oben erklärten Messfehlern zusammenhängen.

Diese beiden möglichen Fehlerquellen mahnen dazu, die Messergebnisse nicht über zu bewerten, sondern sie mit anderen Daten ähnlicher Versuche zu vergleichen.

Bei der Regressionsberechnung für die Korrelation zwischen einer Einfluss- und einer Zielgröße lagen immer wieder einzelne Datenpunkte relativ weit von der Mehrheit der Datenpunkte entfernt. Diese hatten einen großen Einfluss auf die Berechnung der Regression, so dass in diesen Fällen die Regressionsberechnungen nicht mit berücksichtigt wurden. Da es sich um kleine und unterschiedlich große Stichproben (N=14 bzw. N=22) handelte, konnten die errechneten Signifikanzwerte nicht ohne weiteres miteinander verglichen werden. Man muss zum einen die oben erwähnten weit entfernten Datenpunkte und zum anderen den betrachteten Datenbereich berücksichtigen.

## 7 Diskussion

### 7.1 Methodendiskussion

Es wurde eine Methode zur immunomagnetischen Selektion von Zellen mit dem SuperMACS II – Magneten hinsichtlich möglicher Verbesserungsvorschläge untersucht.

Um ein Versuchsverfahren zu optimieren, ist es wichtig zu wissen, welche Faktoren auf das Endergebnis Einfluss haben. Wenn man die relevanten Faktoren kennt, kann man sie in einer Versuchsreihe gezielt verändern, und prüfen, wie groß der Einfluss der einzelnen Versuchparameter auf das Endergebnis ist. Da theoretisch unendlich viele Faktoren das Versuchsergebnis beeinflussen können, ist die Auswahl der wichtigsten Einflussgrößen von Bedeutung. Je sensibler ein Versuchsaufbau ist, desto mehr Einfluss- und Störgrößen kommen in Frage.

In der vorliegenden Versuchsreihe wurden drei Parameter untersucht.

Es standen ein CD3 Antikörper (MicroBeads) und ein Cocktail aus CD3, CD14, CD19, CD36 und Anti-IgE Antikörpern („NK isolation kit“) zur Verfügung. Es war zu erwarten, dass die Wahl des Antikörpers eine Bedeutung haben würde, aber es gab bisher keine vergleichenden Untersuchungen, die dies experimentell bestätigt haben. Daher war es interessant, die schon etablierten MicroBeads mit diesem relativ neuen Antikörper-Cocktail hinsichtlich der T-Zell-Depletion zu vergleichen.

Da die Zielzellen mit Hilfe der Antikörper magnetisch markiert werden sollten, schien die Antikörpermenge eine Rolle zu spielen. Vom Hersteller werden zwar Angaben über die erforderliche oder empfohlene Antikörperkonzentration gemacht, diese Angaben beziehen sich aber nur auf Versuche im kleinen Labormaßstab und sind deshalb nicht auf ein Arbeiten im klinischen Maßstab übertragbar. Um die Methode für den Gebrauch in „large-volume“-Größenordnungen zu etablieren, wurde der Einfluss der Antikörperkonzentration (bzw. der Antikörper-Menge) überprüft. Als dritte Stellgröße bot sich die Auftraggeschwindigkeit, mit der die Zellen durch das Magnetfeld geführt wurden, an. Es schien einleuchtend, dass eine markierte Zelle, die langsam durch das Magnetfeld fließt, besser dort festgehalten werden kann, als Zellen, die mit hoher Geschwindigkeit hindurchfließen. Gerade in diesem Punkt sind die Versuche in klinischem Größenmaßstab nicht mit den Laborversuchen zu vergleichen. Im kleinen Labormaßstab werden die Zellen manuell aufgetragen und die Auftraggeschwindigkeit ist nicht konstant. Bisher hatte man deswegen keine Daten darüber, welche Rolle die Flussgeschwindigkeit spielt. Mit den verwendeten Perfusoren

konnte der Einfluss der Geschwindigkeit gemessen werden, da sie genau vorgegeben und konstant gehalten wurde.

Eine weitere Möglichkeit wäre gewesen, die Stärke des Magnetfeldes zu variieren. Denn neben der Stärke der Markierung mit magnetischen Antikörpern und der Flussgeschwindigkeit spielt das magnetische Feld eine Rolle. So ist z.B. bei Doppelmarkierung mit zwei verschiedenen Antikörpern die Größe der Beads (magnetische Antikörper) in Zusammenhang mit der magnetischen Feldstärke für die Selektion von Bedeutung [187]. Im vorliegenden Versuchsansatz stand ein ausreichend starker Dauermagnet zur Verfügung, so dass eine Veränderung der Feldstärke weder sinnvoll noch möglich war.

Als Ausgangsmaterial wurden buffy coats des BSD Hessen verwendet. Ein Vorteil dieser Präparationen war, dass sie Leukozyten in angereicherter Form enthielten. Ein weiteres Argument für die Verwendung der buffy coats war die gute Verfügbarkeit. Wegen der Nachbarschaft mit dem BSD und der guten Zusammenarbeit standen die buffy coats zu fast jeder Zeit in ausreichender Menge zur Verfügung, was den Arbeitsablauf und die Versuchsdurchführung sehr vereinfacht hat.

Weil die buffy coats für das Purging noch zu stark mit Erythrozyten und Thrombozyten kontaminiert waren, musste vor der Inkubation mit Antikörpern noch ein weiterer Reinigungsschritt durchgeführt werden. Um die großen Zellmengen zu bewältigen, bot sich eine Ficoll-Trennung an. Laut Herstellerangaben sollten dazu die Zellen im Verhältnis 1:2 mit Puffer verdünnt werden. Um den Arbeitsaufwand und den Materialverschleiß nicht zu groß werden zu lassen, wurde ein Verdünnungsverhältnis von 2/3 Zellsuspension und 1/3 Puffer gewählt. Die relativ großen Zellverluste während der Ficoll-Separation lassen sich zum Teil auf den Bearbeiter und zum Teil auf die Methode zurückführen. Beim Abpipettieren der mononukleären Bande wurden nicht immer alle Zellen und unterschiedliche Mengen Plasma (mit Thrombozyten) bzw. Ficoll-Lösung mitgenommen. Außerdem war die mononukleäre Bande unterschiedlich klar abgegrenzt. Während der anschließenden Waschschrte gingen im Überstand, der manchmal noch relativ trüb war, erhebliche Mengen Zellen verloren. Wurde der Überstand ein zweites Mal zentrifugiert, sammelte sich am Boden des Gefäßes ein deutliches weißes Pellet, was zeigt, wie viele Zellen mit dem Überstand regelmäßig verworfen wurden. Letztendlich hatte die Ficoll-Trennung keinen Einfluss auf das Versuchsergebnis, sondern nur auf die vor dem eigentlichen Depletionsschritt zur Verfügung stehende Ausgangszellzahl.

In der klinischen Anwendung entfällt die Ficoll-Trennung, da dort mit Leukapheresepreparaten gearbeitet wird, die im wesentlichen nur noch Lymphozyten und Monozyten enthalten.

Die Durchmischung der Ansätze während der Antikörper-Inkubation im Kühlschrank wurden durch manuelles Schwenken erreicht. Um absolut gleiche Bedingungen zu schaffen, wäre die Verwendung eines automatischen Schüttlers besser gewesen. Da die Herstellerangaben befolgt wurden, ist davon auszugehen, dass die Antikörper-Inkubation in allen Versuchen erfolgreich verlaufen ist. Der Zellverlust durch die anschließenden Waschvorgänge konnte nicht vermieden werden.

Da direkt vor dem Purging von jedem Versuchsansatz Zellzählungen (WBC, white blood count) und FACS-Messungen (T-Zellen, NK-Zellen) gemacht wurden, standen für die späteren Berechnungen verlässliche Ausgangswerte zur Verfügung, die unabhängig von Ficoll-Separation oder Antikörper-Inkubation waren.

Während des Purgings traten einige Schwierigkeiten auf, die das Endergebnis beeinflusst haben könnten. Es war z.B. zu beobachten, dass sich im Schlauchsystem an den Drei-Wege-Hähnen vor der Säule Zellsedimente ablagerten. Durch Umlagern der Schläuche konnten diese Zellen allerdings wieder mobilisiert werden. Des weiteren verblieb ein nicht quantifizierbarer Anteil der vom Perfusor eingepumpten Zellen im Schlauchsystem, welches ein Volumen von etwa 15ml hatte, hängen. Die zuerst aufgetragenen Zellen füllten also in erster Linie das Schlauchsystem, bzw. verdrängten den Puffer und gelangten nur teilweise in die Auffangspritze (neg).

Auch in der Perfusorspritze lagerten sich Zellen ab, die somit gar nicht in das System eingebracht wurden. Um diese Zellverluste in der Versuchsanordnung zu vermeiden, wurde das System nach erneutem Füllen der Perfusorspritze mit 20 ml Puffer gespült. Dabei wurden die restlichen Zellen in der Spritze mobilisiert und die in den Schläuchen vor und nach der Säule liegenden Zellen weitertransportiert und aufgefangen (spül1). Diese erste Spülung gehört deswegen zur Negativ-Fraktion und wurde dazu addiert. Es war durch diese Maßnahme trotzdem nicht zu verhindern, dass Zellen im Versuchsaufbau verloren gingen.

## 7.2 **Ergebnisdiskussion**

Das Hauptaugenmerk bei dieser Untersuchung lag darauf, ob sich die T-Zell-Depletion, die T-Zell-Restkontamination und der NK-Ertrag bei Änderungen in der Versuchskonfiguration verbesserten oder verschlechterten.

Bezüglich der Depletion von T-Zellen zeigte sich zwischen dem „NK isolation kit“ und den „CD3 MicroBeads“ kein signifikanter Unterschied. Sowohl die „CD3 MicroBeads“ als auch die im Isolation Kit enthaltenen CD3-Antikörper schienen CD3+ Zellen effektiv zu binden und zu depletieren. Eine niedrige Antikörpermenge war dafür ausreichend, so dass bezüglich der TCD im weiteren ein ressourcensparendes Vorgehen gerechtfertigt ist. Verwendet man „CD3 MicroBeads“, empfiehlt es sich, eine geringe Zellmenge einzusetzen, da die TCD antiproportional zur Ausgangszellmenge stieg. Die Antikörperkonzentration spielte dabei keine Rolle, so dass man dieses Phänomen mit der steigenden Auslastung der Säulenkapazität erklären könnte.

Betrachtet man die Restkontamination mit T-Zellen, liegt zwischen IK und MB zwar kein signifikanter Unterschied vor, mit „CD3 MicroBeads“ liegt aber ein größerer Anteil der Versuche unter 0,2%. Dieser Richtwert sollte unterschritten werden, wenn sich eine Positiv-Selektion mit CD56-Antikörpern anschließen soll. Außerdem unterlag die Kontamination mit „CD3 MicroBeads“ einer geringeren Schwankungsbreite.

Die Restkontamination mit T-Zellen ist von entscheidender Bedeutung, da die T-Zellen für die unbedingt zu vermeidende GVHD verantwortlich sind. Eine Methode zur Herstellung eines NK-Zell-Präparates muss deshalb zuverlässig möglichst T-Zell-freie Präparate liefern. Deshalb stellt die geringere Streuung bei der Restkontamination für MicroBeads einen klinisch relevanten Vorteil dar.

Die Bedeutung der Antikörperwahl für die Zielgröße T-Zell-Restkontamination kann durch das vorliegende Datenmaterial nicht abschließend geklärt werden. Es könnte sein, dass der etwas aus der Reihe fallende Wert des Versuchs Nr. 39 (Restkontamination 0,9%, vgl. Kap 6.4), die Durchschnittskontamination für das „NK isolation kit“ nach oben zieht und es deshalb schlechter abschneidet.

Ein Grund für die stärkere Kontamination mit T-Zellen könnte die Überladung der Säulenkapazität sein, da in einer Trennsäule nur eine bestimmte Anzahl markierter Zellen festgehalten werden können. Werden mehr Zellen eingesetzt und markiert, können die markierten Zellen nicht vollständig depletiert werden. Gerade bei Einsatz mehrerer Antikörper („NK isolation kit“) könnte

die Säulenkapazität schnell erreicht werden. Die maximale Säulenkapazität wurde in der Versuchsreihe zwar nicht überschritten, bei einigen Versuchen jedoch voll ausgelastet. Dabei muß man berücksichtigen, dass die Zellverluste ab einer Säulenauslastung von ca. 70% rapide zunehmen. Da die Auslastung bei 2/3 der Versuche mit dem „NK isolation kit“ über 70% lag (mit CD3 MicroBeads nur in 9% der Fälle), lässt sich so die stärkere Schwankungsbreite der T-Zell-Restkontamination zum Teil erklären. Bei dem oben erwähnten Versuch Nr. 39 wurde die Säulenkapazität allerdings nur zu 46% ausgelastet.

Ein weiteres Problem war die sehr geringe absolute Anzahl der gemessenen CD3+ Zellen in der Negativ-Fraktion, so dass kleine Schwankungen oder Meßungenauigkeiten ggf. stärker ins Gewicht fielen.

Der Ertrag der NK-Zellen ist als Zielgröße deshalb von Bedeutung, da es in der späteren klinischen Anwendung darauf ankommt, wie viele NK-Zellen letztendlich für eine Transplantation bereitgestellt werden können. Da das Spendermaterial nur in einer begrenzten Menge zur Verfügung steht, muss eine gute Purging-Technik gewährleisten, dass so wenig NK-Zellen wie möglich verloren gehen. Abgesehen von Zellverlusten in der Versuchsanordnung hängt der NK-Zell-Ertrag im wesentlichen von der Wahl des Antikörpers ab.

Laut der statistischen Auswertung mit dem Mann-Whitney-U-Test liefern die „CD3 MicroBeads“ einen signifikant besseren Ertrag als das „NK isolation kit“. Allerdings muss man die relativ große Streubreite in beiden Stichproben berücksichtigen, die vom verwendeten Testverfahren nicht erfasst wurde. Der Unterschied zwischen beiden Antikörpern lässt sich damit erklären, dass mit dem „NK isolation kit“ mehr NK-Zellen in der magnetischen Trennsäule festgehalten werden als mit „CD3 MicroBeads“. Eine Begründung dafür könnte sein, dass mit dem Isolation Kit fast alle Nicht-NK-Zellen markiert und so eine viel größere Anzahl Zellen in der Magnetsäule festgehalten wurden. Die relativ wenigen nicht markierten NK-Zellen könnten von der Überzahl an festgehaltenen Zellen am Hindurchfließen gehindert worden sein. Dieser Verdacht wird dadurch erhärtet, dass bei den Versuchen mit IK die Antikörpermenge eine signifikante Rolle hinsichtlich des NK-Verlustes in der Säule spielte. Beim Einsatz großer Antikörpermengen, blieben deutlich mehr NK-Zellen in der Säule hängen und gingen verloren. Ein weiterer Grund für NK-Zell-Verluste in der Trennsäule könnten unspezifische AK-Bindungen an NK-Zellen gewesen sein. Des Weiteren könnte eine Subpopulation CD3 positiver NK-Zellen mit depletiert worden sein.

Das nur beim „NK isolation kit“ interessante Ergebnis für die NK-Zell-Reinheit war eindeutig von der Antikörpermenge abhängig. Die Wahrscheinlichkeit, dass mehr Nicht-NK-Zellen bei einer größeren Antikörpermenge markiert und depletiert werden ist einleuchtend. Wie oben erwähnt, ging dies aber zu Lasten eines höheren NK-Zell-Verlustes. In der klinischen Anwendung wird man abwägen müssen, welchem Parameter der Vorzug zu geben ist.

### **7.3 Vergleich der Ergebnisse mit Methoden und Ergebnissen in der Literatur unter Berücksichtigung der klinischen Relevanz.**

In der Literatur werden mehrere Methoden beschrieben, um T-Zellen zu depletieren; es gibt physikalische und immunologische Verfahren, sowie Kombinationen aus beiden. Die Immunorosettentechnik mit Erythrozyten oder die Counterflow Centrifugal Elutriation (CCE) sind Beispiele für physikalische Methoden. Als immunologische Verfahren stehen monoklonale Antikörper zur Verfügung, die entweder alleine oder in Kombination mit Komplement oder Immunotoxinen eingesetzt werden. Als kombiniertes Verfahren hat besonders der Einsatz von monoklonalen Antikörpern in Verbindung mit magnetischen Beads an Bedeutung gewonnen.

Eine relativ etablierte Methode ist die Agglutination an ein Lectin der Sojabohne (SBA). Dabei werden Zellen, die durch ein Sojabohnenlectin agglutiniert werden durch Sedimentation entfernt. Anschließend wird mit Hilfe von Schaferythrozyten, die mit T-Zellen Rosetten bilden, versucht, die noch verbliebenen T-Zellen durch Zentrifugation zu entfernen [188]. Knobloch et al. depletierten damit T-Zellen um 3,39 log-Stufen [189]. Frame et al. verringerten den Anteil an T-Zellen mit anschließender Rosettenbildung um 99,8%; ohne Rosettenbildung um 94,2% [190]. Weiterentwickelt wurde diese Technik von Slaper-Cortenbach et al., die statt Schaferythrozyten menschliche Erythrozyten verwendeten [191]. Monoklonale Antikörper, die an die Erythrozytenoberfläche binden, wurden über Verbindungsantikörper mit T-Zell-spezifischen Antikörpern (CD2, CD3) vernetzt. Die mit diesen Antikörperkomplexen besetzten Erythrozyten bildeten mit T-Zellen in Stammzelltransplantaten Immunorosetten, die dann in einer Zentrifuge über einen Dichtegradienten depletiert wurden. Mit dieser Methode konnten in zwei holländischen Zentren T-Zell-Reduktionen um 2,5 bzw. 2,3 log-Stufen erreicht werden.

Mit der Counterflow Centrifugal Elutriation werden die Zellen aufgrund unterschiedlicher Zellgröße und Sedimentationscharakteristika mit Hilfe einer Zentrifuge aufgetrennt. Die Eluierung der Zellen wird bei gleichbleibender Zentrifugengeschwindigkeit durch Veränderung der Flussrate gesteuert und kontinuierlich mit Hilfe eines Durchflusszytometers kontrolliert. Wagner et al. erreichten eine T-Zell-Depletion um 2-3 log, die Restkontamination mit Lymphozyten lag bei 0,3 +/- 0,1% (0,0 – 1,9) [192]. Ähnliche Ergebnisse erreichten Noga et al. mit einer Lymphozyten-Restkontamination von 0,2 +/- 0,1% [193]. Die Gruppe um de Witte kamen auf eine Kontamination

von 2,4 +/- 2,1% Lymphozyten bzw. 2,2 +/- 1,3 % T-Zellen [194]. Eine französische Arbeit, in der mehrere Methoden miteinander verglichen werden, erreicht eine T-Zell-Depletion von 1,3 +/- 0,5 log-Stufen mit einem NK-Zell-Ertrag von über 80% [195].

Im Rahmen von Knochenmarkstransplantationen wurde versucht, die im Transplantat enthaltenen T-Zellen vor der Transplantation mit spezifischen, monoklonalen Antikörpern (OKT3) zu opsonisieren. Die Opsonisation sollte die Sequestration der T-Zellen in vivo und die Elimination durch das retikuloendotheliale System des Empfängers erleichtern. Prentice et al. konnten so die Inzidenz für eine akute schwere Graft-versus-host-Reaktion von 79% auf 18% und die damit verbundene Mortalität von 29% auf 12% senken [196]. Filipovich et al. dagegen konnten mit einem ähnlichen Ansatz keine Verringerung der GVHD-Inzidenz erreichen [197].

Um eine bessere GVHD-Kontrolle zu erzielen, setzten Prentice et al. monoklonale Antikörper in Kombination mit Kaninchenkomplement ein; von 13 so behandelten Patienten entwickelten nur zwei eine akute GVHD vom Grad I [198].

Die Arbeitsgruppe um PJ Martin konnte T-Zellen mit dieser Methode um 2-3 log-Stufen reduzieren. Nur 16% der erfolgreich transplantierten Patienten hatten eine klinisch signifikante akute GVHD; allerdings war die Inzidenz der Transplantatabstoßung erhöht [199].

Herve et al. transplantierten 10 Patienten mit hohem Risiko für eine akute GVHD. Das Knochenmark wurde vorher mit zwei monoklonalen Antikörpern (OKT 3, OKT11) und Kaninchenkomplement behandelt, wodurch die T-Zellen um 88,3% +/- 11,8 reduziert wurden [200]. Keiner der Patienten erkrankte an einer akuten GVHD. Drei Patienten verstarben an einem Rezidiv.

In den Jahren 1991 - 2001 verglichen Keever-Taylor et al. die T-Zell-Depletion mit zwei verschiedenen Antikörpern bei 481 Transplantationen. Zum Einsatz kamen der  $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor-Antikörper T<sub>10</sub>B<sub>9</sub> und ab 1998 OKT3 jeweils in Kombination mit Kaninchenkomplement. Mit T<sub>10</sub>B<sub>9</sub> wurde eine Depletion von 1,94 log (1,48 - 2,4), mit OKT3 von 1,69 log (1,29 - 2,09) erreicht [201]. Demzufolge war die Inzidenz einer akuten GVHD (Grad II-IV) in der T<sub>10</sub>B<sub>9</sub>-Gruppe niedriger als in der OKT3-Gruppe (30% bzw. 48%); die Inzidenz einer schweren akuten GVHD (Grad III-IV) war entsprechend (9% bzw. 22%).

Granger et al. untersuchten die Komplement-vermittelte T-Zell-Lyse mit drei verschiedenen Antikörpern. Mit einer Kombination der Antikörper OKT3, OKT11A und MBG6 wurden über 99% der T-Zellen in vitro lysiert [202].

Eine französische Arbeitsgruppe um Maraninchi führte eine kontrollierte Studie mit T-Zell-depletierten Knochenmarkstransplantationen durch [203]. Die T-Zellen wurden mit zwei verschiedenen Cocktails aus monoklonalen Antikörpern und Kaninchenkomplement depletiert. Mit Antikörpern gegen CD4, CD5 und CD8 wurden 97% (53 - 99) der T-Zellen eliminiert, mit CD2-, CD5- und CD7-Antikörpern 99% (81 - 99). Die Inzidenz einer mäßigen bis schweren akuten GVHD war in der nicht T-Zell-depletierten Kontrollgruppe signifikant höher ( $P < 0,01$ ), die Inzidenz einer chronischen GVHD ebenfalls ( $P = 0,05$ ). Im Gegenzug war die Rezidivrate in den T-Zell-depletierten Gruppen höher ( $P < 0,05$ ); die krankheitsfreie Überlebenszeit unterschied sich zwischen den drei Gruppen nicht.

Mehrere Arbeitsgruppen benutzten CAMPATH-1 als Antikörper, welcher gegenüber anderen anti-T-Zell-Antikörpern den Vorteil hat, dass er sowohl an Kaninchen- als auch an menschliches Komplement bindet. CAMPATH-1 kann Lymphozyten deshalb auch in menschlichem Serum lysieren. Während die mittlere T-Zell-Depletion bei Dreger et al. bei 2,16 log lag und 29% der NK-Zellen erhalten blieben [204], erreichten Clark et al. eine Depletion von 2,04 log und einen NK-Zell-Ertrag von 56 % +/-38 [205]. Frame et al. depletierten unter optimalen Bedingungen 2,6 +/- 0,12 log T-Zellen [206].

Filipovich et al. führten eine Pilotstudie über die T-Zell-Depletion mit Immunotoxinen durch [207]. Sie inkubierten das Knochenmark vor der Transplantation zwei Stunden lang mit drei T-Zell-spezifischen Antikörpern, an die kovalent ein Ricin-Toxin gebunden war. Durch das Eindringen des Toxins in die T-Zellen können diese nicht mehr proliferieren und gehen innerhalb einer Woche zu Grunde. Von 14 behandelten Patienten entwickelten zwei eine akute GVHD II Grades, sechs erlitten ein Rezidiv.

Laurent et al. behandelten mit einer etwas modifizierten Methode 38 Patienten. Diese Arbeitsgruppe konnte T-Zellen um 99,5% (91 - 99,9) reduzieren. Nur drei Patienten erkrankten an einer zweit- oder höhergradigen akuten GVHD, bei 10 Patienten kam es zu einem Rezidiv [208].

Antin et al. schlossen 71 Patienten in ihre Studie ein, von denen 2/3 ein vollständig histokompatibles und 1/3 ein partiell kompatibles Transplantat erhielten [209]. In der ersten Gruppe lag das Risiko, an einer II-IVgradigen GVHD zu erkranken bei 23%, in der zweiten Gruppe bei 50%. Mit monoklonalen CD5-Antikörpern und Komplement wurden 97% der T-Zellen aus den Transplantaten depletiert, mit CD5-Antikörpern und Ricin-A-Immunotoxin 95%.

In einer weiteren Studie wurde der T-Zell-Anteil mit dem gleichen Toxin um 99% reduziert [190].

Der neueste Ansatz zur T-Zell-Depletion ist die Verwendung von monoklonalen Antikörpern, die an magnetische Beads gekoppelt sind. So können Zellen selektiv immunomagnetisch markiert und in einem starken Magnetfeld aufgetrennt werden.

Knobloch et al. setzten CD2- und CD3-Antikörper alleine und in Kombination ein. Die mittlere T-Zell-Depletion lag bei 1,81 log für CD3-Antikörper, bei 2,31 log für CD2-Antikörper und bei 2,76 log für die Kombination beider Antikörper [189].

Gordon et al. führten 8 Versuche mit mehr als  $10^{10}$  eingesetzten Zellen durch. Die T-Zellen wurden mit CD3-Antikörpern (OKT3) markiert und mit einem Clinimacs-Gerät automatisch aufgetrennt [210]. T-Zellen wurden um 3,4 log-Stufen (2,8 - 4,1) depletiert es blieben 0,15% (0,01 - 1,01) T-Zellen als Restkontamination zurück.

Eine Düsseldorfer Arbeitsgruppe um G. Kögler verglich einen einzelnen Antikörper (CD3) mit einem Antikörper-Cocktail (CD2, CD5, CD7). Die mittlere T-Zell-Depletion mit CD3-Antikörpern lag bei 1,9 log, mit dem Antikörper-Cocktail wurde eine 2,2 log - Depletion erreicht. Mit einer zweiten Passage durch das Magnetfeld konnte die T-Zell-Depletion auf 2,26 log bzw. 2,35 log gesteigert werden. Die T-Zell-Restkontamination lag bei 0,06% bzw. 0,87%, war also mit dem Antikörper-Cocktail größer [211].

Vartdal et al. erreichten mit CD2- und CD3-Antikörpern eine 3 log-Depletion bei einer Restkontamination von  $< 0,025\%$  T-Zellen [212].

Eine weitere Arbeitsgruppe depletierte mit einer Kombination von CD2- und CD7-Antikörpern 1,7 log +/- 0,5 T-Zellen [195]. Yau et al. erzielten ähnliche Ergebnisse mit einem Cocktail aus CD2-, CD3-, CD4- und CD8-Antikörpern [213].

In einer Transplantationsstudie mit Ratten verglichen Neipp et al. T-Zell-depletierte und nicht depletierte Knochenmarkstransplantate. Mit anti- $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor-Antikörpern wurden die T-Zellen bis auf 0,1% (0,0 - 0,2%) depletiert. Die so transplantierten Ratten zeigten keine klinischen Zeichen einer GVHD, während die Empfänger von nicht depletierten Knochenmarkszellen alle eine schwere akute GVHD entwickelten [214].

Frame et al. kombinierten ebenfalls ein immunologisches und eine physikalisches Verfahren. Nach der Agglutination an ein Sojabohnenlectin (SBA) setzten sie monoklonale Antikörper ein (anti-CD2, -CD3, -CD8), die an magnetische Beads gebunden waren. Die T-Zellen konnten so um 99,9% depletiert werden [190].

---

In keiner der gesichteten Literaturangaben war die T-Zell-Depletion mit einem einzigen Depletionsschritt größer als bei der vorliegenden Arbeit (3,8 bzw. 4,3 log). Die Restkontamination von 0,06% T-Zellen mit CD3-MicroBeads wird mit 0,025% nur von Vartdal et al. [212] unterboten. Neipp [214], Gordon [210] und Noga [193] liegen mit einer mittleren T-Zell-Restkontamination von 0,1%, 0,15% bzw. 0,2% etwas unterhalb der 0,21%, die in dieser Arbeit mit dem „NK isolation kit“ erreicht wurden.

Da bei den meisten Versuchen kein Wert auf den NK-Ertrag gelegt wurde, muss sich der Vergleich auf die T-Zell-Depletion beschränken. Lediglich Clarke [205] und Dreger [204] ermittelten einen NK-Ertrag von durchschnittlich 56% bzw. 29%. Damit liegen sie teilweise über und teilweise unter den eigenen Ergebnissen von 71% (MB) und 48% (IK). Feugier erreichte sogar einen NK-Ertrag von > 80%, depletierte T-Zellen aber nur um 1,3 log-Stufen [195].

Tab. 6: Literaturvergleich

Autor	Methode	T-Zell-Depletion	T-Zell-Restkont.	NK-Ertrag	GVHD
eigene Ergebnisse	CD3 MicroBeads (Anti-CD3)	3,80 log	0,06+/-0,07	71%	
	NK Isolation Kit (Anti-CD3, CD14, CD19, CD36, IgE)	4,28 log	0,21+/-0,29	48%	
<b>physikalische Methoden</b>					
Knobloch [189]	SBA + SRBC	3,39 log			
Frame [190]	SBA	94,20%			
Frame [190]	SBA + SRBC	99,80%			
Slaper-Cortenbach [191]	Immunorosettentechnik mit menschlichen Erythrozyten	2,5 log + 2,3 log			
Wagner JE [192]	counterflow centrifugal elutriation (CCE)	2-3 log	0,3 +/- 0,1% (0,0 - 1,9)		
Noga SJ [193]	CCE		0,2 +/- 0,1%		
de Witte T [194]	CCE		2,2% +/- 1,3%		
Feugier P [195]	CCE	1,3 +/-0,5 log		> 80%	
<b>immunologische Methoden</b>					
Prentice HG [196]	Opsonisation mit OKT3-Antikörpern*				schwere aGVHD 18%
Filipovich AH [197]	Opsonisation mit OKT3-Antikörpern*				aGVHD 50%
Prentice HG [198]	MBG6 + RFT8 + Komplement*				aGVHD Grad I 15%
Martin PJ [199]	acht verschiedene monoklonale AK + Komplement*	2-3 log			aGVHD 16%
Herve P [200]	OKT3 + OKT11 + Komplement*	88,3% +/- 11,8			aGVHD 0 %
Keever-Taylor CA [201]	T10B9.1A-31+ Komplement*	1,94 log (1,48 - 2,4)			schwere aGVHD 9%, aGVHD 30%
Keever-Taylor CA [201]	OKT3 + Komplement*	1,69 log (1,29 - 2,09)			schwere aGVHD 22%, aGVHD 48%
Granger S [202]	OKT3 + OKT11A + MBG6 + Komplement	> 99%			
Maraninchi D [203]	CD4 + CD5 + CD8 + Komplement	97% (53 - 99)			
Maraninchi D [203]	CD2 + CD5 + CD7 + Komplement	99% (81-99)			
Antin JH [209]	CD5 Antikörper + Komplement	97%			

\* klinische Studie

**Tab. 7: Literaturvergleich (Fortsetzung)**

<b>Autor</b>	<b>Methode</b>	<b>T-Zell-Depletion</b>	<b>T-Zell-Restkont. NK-Ertrag</b>	<b>GVHD</b>
Dreger P [204]	Campath-1 + Komplement	2,16 log		29%
Clarke E [205]	Campath-1 + Komplement	2,04 log		56% +/- 38
Frame JN [206]	Campath-1 + Komplement	2,6 log		
Filipovich AH [207]	Antikörper (TA-1, UCHT-1, T101) + Immunotoxin*			GVHD II 14%
Laurent G [208]	T101 fab Fragment + Immunotoxin (ricin A-chain)*	99,5% (91 - 99,9)		GVHD >= II 7,9%
Antin JH [209]	CD5 Antikörper + Immunotoxin (ricin A-chain)	95%		
Frame JN [190]	anti-T-Zell Immunotoxin (ricin A chain)	99,00%		
<b>kombinierte Methoden</b>				
Knobloch [189]	Anti-CD2 + magnetische Beads	2,31 log		
Knobloch [189]	Anti-CD3 + magnetische Beads	1,81 log		
Knobloch [189]	Anti-CD2 + Anti-CD3 + magnetische Beads	2,76 log		
Gordon [210]	anti-CD3 (OKT3) + magnetische Beads	3,4 log	0,15% (0,01 - 1,01)	
Kögler G [211]	Anti-CD3 + magnetische Beads	1,9 log bzw. 2,26 log		
Kögler G [211]	Anti-CD2, CD5, CD7 + magnetische Beads	2,2 log bzw. 2,35 log		
Vartdal [212]	Anti-CD2 + Anti-CD3 + magnetische Beads	~ 3 log	0,03%	
Feugier P [195]	Anti-CD2 + Anti-CD7 + magnetische Beads	1,7 log		
Yau JC [213]	Anti-CD2, CD3, CD4, CD8 + magnetische Beads	1,7 log		
Neipp M [214]	anti-alphabetaTCR-Antikörper + magnetische Beads		0,1% (0,0 - 0,2)	
Frame [190]	SBA + magnetische Beads	99,90%		

\* klinische Studie

## 8 Schlussfolgerung

Die vorgelegten Ergebnisse zeigen, dass sowohl mit einem Einzelantikörper („CD3 MicroBeads“) also auch mit einem Antikörper-Cocktail („NK isolation kit“) eine ausreichende Depletion von T-Zellen in einem klinischen Maßstab möglich ist. Bei beiden Verfahren kann mit einem Separationsschritt eine höhere T-Zell-Depletion erreicht werden, als mit anderen oder ähnlichen in der Literatur beschriebenen Verfahren.

Änderungen der untersuchten Parameter Antikörperwahl, Antikörpermenge und Auftraggeschwindigkeit wirken sich nicht signifikant aus. Allerdings ist die durchschnittliche TCD mit dem „NK isolation kit“ tendenziell größer als mit „CD3 MicroBeads“ (4,3 log vs 3,8 log).

Die TCD ist für „CD3 MicroBeads“ umso höher, je kleiner die eingesetzte Zellmenge ist.

Die Restkontamination mit T-Zellen ist unabhängig von den drei veränderten Parametern. Mit dem „NK isolation kit“ ist die Schwankungsbreite jedoch größer als mit „CD3 MicroBeads“, die eine etwas geringere T-Zell-Restkontamination liefern.

Bezüglich der TCD bzw. T-Zell-Restkontamination sind demnach „CD3 MicroBeads“ zu bevorzugen. Dabei sollte mit möglichst geringen Zellmengen gearbeitet werden. Ein ressourcenschonender Einsatz von geringen Antikörpermengen ist gerechtfertigt.

Für den NK-Zell-Ertrag zeigt sich ein signifikant höheres Ergebnis mit „CD3 MicroBeads“ (72% vs 48%); die Antikörpermenge und die Auftraggeschwindigkeit spielen keine signifikante Rolle. Bei Versuchen mit dem „NK isolation kit“ ist der NK-Zell-Ertrag umso geringer, je höher die Antikörperkonzentration (Leukozyten / Antikörper bzw. NK-Zellen / Antikörper) ist.

Das liegt daran, dass mit dem „NK isolation kit“ signifikant mehr NK-Zellen in der Trennsäule verloren gehen als mit „CD3 MicroBeads“ (28% vs 10%). Bei Versuchen mit dem „NK isolation kit“ ist der Verlust in der Trennsäule bei großer Antikörpermenge größer als bei niedriger Antikörpermenge (36% vs 19%). Die Auftrageschwindigkeit ist von untergeordneter Bedeutung.

Um einen hohen NK-Zell-Ertrag zu erzielen, müsste man demnach „CD3 MicroBeads“ einsetzen. Verwendet man allerdings „CD3 MicroBeads“, muss sich nach der T-Zell-Depletion noch eine Positiv-Selektion der NK-Zellen anschließen, bei der ebenfalls NK-Zellen verloren gehen werden. Das „NK isolation kit“ hat dagegen den Vorteil, dass mit nur einem Depletionsschritt fast alle Nicht-NK-Zellen entfernt werden, so dass man direkt ein NK-Zell-Präparat erhält. Es lassen sich NK-Zell-Präparate mit einer Reinheit von 90% herstellen, wobei mit großen Antikörpermengen signifikant bessere Ergebnisse erreicht werden als mit geringen Antikörpermengen (90% vs 84%).

Da dies aber zu Lasten eines höheren NK-Zell-Verlustes geht, wird man in der klinischen Anwendung abwägen müssen, welchem Parameter der Vorzug zu geben ist.

Um bei der Herstellung von NK-Zell-Präparaten abschliessend zwischen „NK isolation kit“ und „CD3 MicroBeads“ entscheiden zu können, müsste von dieser Arbeit ausgehend ein Vergleich zwischen „NK isolation kit“ und einer Kombination aus T-Zell-Depletion und NK-Zell-Selektion durchgeführt werden.

---

## Literaturverzeichnis

1. Robertson MJ, Ritz J.  
Biology and clinical relevance of human natural killer cells.  
*Blood* 1990, 76:2421-2438.
2. Trinchieri G.  
Biology of natural killer cells.  
*Adv Immunol* 1989,47:187-376.
3. Scott P, Trinchieri G.  
The role of natural killer cells in host-parasite interactions.  
*Curr Opin Immunol* 1995, 7:34-40.
4. Ortaldo JR, Herberman RB.  
Heterogeneity of natural killer cells.  
*Annu Rev Immunol* 1984; 2:359:394
5. Timonen T.  
Natural killer cells: Endothelial interactions, migration, and target cell recognition.  
*J Leukoc Biol* 1997; 62: 693-701
6. Nagler A, Lanier LL, Cwirla S, Phillips JH.  
Comparative studies of human FcR3-positive and negative natural killer cells.  
*J Immunol* 1989, 143:3183-3191
7. Bennet IM, Zatssepina O, Zamai L, Azzoni L, Mikheeva T, Perussia B.  
Definition of a natural killer NKR-P1A+/CD56-/CD16- functionally immature human NK cell subset that differentiates in vitro in the presence of interleukin 12.  
*J Exp Med* 184:1845-1856
8. Perussia B, London L, Trinchieri G.  
Phenotypic characteristics of human natural killer cells.  
*Biomed Pharmacother* 1985;39(1):13-8
9. Lebow LT, Bonavida B.  
Purification and characterization of cytolytic and noncytolytic human natural killer cell subsets  
*Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 6063-6067
10. Abo T, Balch CM.  
A differentiation antigen of human NK and K cells identified by a monoclonal antibody (HNK-1)  
*J Immunol* 1981; 127 (3): 1024-1029
11. Abo T, Cooper MD, Balch CM.  
Characterization of HNK-1 (Leu-7) human lymphocytes  
*J Immunol* 1982; 129 (4): 1752-1757

12. Kondo M, Weissman IL, Akashi K.  
Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow.  
*Cell* 1997; 91:661-672
13. Galy A, Travis M, Cen D, Chen B.  
Human T, B, natural killer and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset.  
*Immunity* 1995; 3:459-473
14. Williams NS, Klem J, Puzanov IJ, Schatzle JD, Bennet M, Kumar V.  
Natural killer cell differentiation: insights from knockout and transgenic mouse models and in vitro systems.  
*Immunol Rev* 1998; 165:47-61
15. Spits H, Lanier LL, Phillips JH.  
Development of human T and natural killer cells.  
*Blood* 1995; 85:2654-70
16. Lanier LL, Spits H, Phillips J.  
The developmental relationship between NK cells and T cells.  
*Immunol Today* 1992; 13(10): 392 – 395
17. Wang B, et al.  
A block in both early T lymphocyte and natural killer cell development in transgenic mice with high-copy numbers of the human CD3e gene.  
*Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:9402-06
18. Sánchez M-J, Muench MO, Roncarolo MG, Lanier LL, Phillips JH.  
Identification of a common T/NK cell progenitor in human fetal thymus.  
*J Exp Med* 1994; 180:569
19. Haller O, Kiessling R, Orn A, Wigzell H.  
Generation of natural killer cells: An autonomous function of the bone marrow.  
*J Exp Med* 1977; 145:1411
20. Hackett JH, Bosma GC, Bosma MJ, Kumar V.  
Origin and differentiation of natural killer cells: Characteristics of a transplantable NK cell precursor.  
*J Immunol* 1985; 134:3731
21. Lotzova E, Savary C, Chamlin RE.  
Genesis of human oncolytic natural killer cells from primitive CD34+CD33- bone marrow progenitors.  
*J Immunol* 1993; 150:5263
22. Miller JS, Verfaillie C, McGlave PM.  
The generation of human natural killer cells from CD34+/DR- primitive progenitors in long-term bone marrow culture.  
*Blood* 1992; 80:2182

23. Phillips JH, Hori T, Nagler A, Bhat N, Spits H, Lanier LL.  
Ontogeny of human natural killer cells: Fetal NK cells mediate cytolytic function and express cytoplasmic CD3ε,δ proteins.  
J Exp Med 1992; 175:1055
24. Williams NS, et al.  
Generation of lytic natural killer 1.1+, Ly-49- cells from multipotential murine bone marrow progenitors in a stroma-free culture: definition of cytokine requirements and developmental intermediates.  
J Exp Med 1997; 186:1609-14
25. Yu H, Fehniger TA, Fuchshuber P, Thiel KS, Vivier E, Williams EC, Caligiuri MA.  
Flt3 Ligand Promotes the Generation of a Distinct CD34+ Human Natural Killer Cell Progenitor That Responds to Interleukin-15.  
Blood 1998; 92:3647-57
26. Williams NS, Klem J, Puzanov IJ, Sivakumar PV, Bennett M, Kumar V.  
Differentiation of NK1.1+, Ly49+ NK Cells from flt3+ Multipotent Marrow Progenitor Cells.  
J Immunol 1999; 163:2648-56
27. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP.  
Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines.  
Annu Rev Immunol 1999; 17:189-220
28. Herbermann RB, Nunn ME, Holden HT, et al.  
Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II, Characterization of effector cells.  
Int J Cancer 1975; 6:230-239
29. Welsh RM.  
Regulation of virus infections by natural killer cells: A review.  
Nat Immun Cell Growth Regul 1986; 5:169
30. Fitzgerald PA, Lopez C.  
Natural killer cells active against viral, bacterial, protozoan and fungal infections.  
in Lotzova E, Herberman RB (eds): Immunobiology of Natural Killer Cells, vol 2. Boca Raton, FL, CRC, 1986, p 107
31. Borysiewicz LK, Rodgers B, Morris S, Graham S, Sissons JGP.  
Lysis of human cytomegalovirus infected fibroblasts by natural killer cells: Demonstration of an interferon-independent component requiring expression of early viral proteins and characterization of effector cells.  
J Immunol 1985; 134:2695
32. Bukowski JF, Woda BA, Habu S, Okamura K, Welsh RM.  
Natural killer cell depletion enhances virus synthesis and virus-induced hepatitis in vivo.  
J Immunol 1983; 131:1531

33. Biron CA, Byron KS, Sullivan JL.  
Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells.  
N Engl J Med 1989; 320:1731
34. Orange JS, Wang B, Terhorst C, Biron CA.  
Requirement for natural killer (NK) cell-produced interferon  $\gamma$  in defense against murine cytomegalovirus infection and enhancement of this defense pathway by interleukin 12 administration.  
J Exp Med 1995; 182:1045-1056
35. Garcia-Penarrubia P, Koster FT, Kelley RO, MacDowell TD, Bankhurst AD.  
Antibacterial activity of human natural killer cells.  
J Exp Med 1989; 169:99
36. Hidore MR, Murphy JW.  
Murine natural killer cell interactions with a fungal target, *Cryptococcus neoformans*.  
Infect Immun 1989; 57:1990
37. Hauser WE, Tsai V.  
Acute toxoplasma infection of mice induces spleen cells that are cytotoxic for *T. gondii* in vitro.  
J Immunol 1986; 136:313
38. Hatcher FM, Kuhn RE.  
Destruction of *Trypanosoma cruzi* by natural killer cells.  
Science 1982; 218:195
39. Haller O, Hansson M, Kiessling R, Wigzell H.  
Role of non-conventional natural killer cells in resistance against syngeneic tumor cells in vivo.  
Nature 1977; 270:609
40. Talmadge JE, Meyers KM, Prieur DJ, Starkey JR.  
Role of NK cells in tumor growth and metastasis in beige mice.  
Nature 1980; 284:622
41. Habu S, Fukui H, Shimamura K, et al.  
In vivo effects of anti-asialo GM1. I. Reduction of NK activity and enhancement of transplanted tumor growth in nude mice.  
J Immunol 1981; 127:34-38
42. Warner JF, Dennert G.  
Effects of a cloned cell line with NK activity on bone marrow transplants, tumour development and metastasis in vivo.  
Nature 1982; 300:31-34
43. Roder JC, Haliotis T, Klein M, Korec S, Jett JR, Ortaldo J, Herberman RB, Fauci AS:  
A new immunodeficiency disorder in humans involving NK cells.  
Nature 1980; 284:553

44. Sullivan JL, Byron KS, Brewster FE, Purtilo DT.  
Deficient natural killer cell activity in X-linked lymphoproliferative disorder syndrome.  
*Science* 1980; 210:543
45. Pross HF.  
The involvement of natural killer cells in human malignant disease.  
In Lotzova E, Herberman RB (eds): *Immunobiology of Natural Killer Cells*, vol 2. Boca Raton, FL, CRC, 1986, p 11
46. 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
47. trayer DR, Carter WA, Mayberry SD, Pequignot E, Brodsky I.  
Low natural cytotoxicity of peripheral mononuclear cells in individuals with high familial incidences of cancer.  
*Cancer Res* 1984; 44:370
48. Kadish AS, Doyle AT, Steinhauser EH, Ghossein NA.  
Natural cytotoxicity and interferon production in human cancer: Deficient natural killer activity and normal interferon production in patients with advanced disease.  
*J Immunol* 1981; 127:1817
49. Gastl G, Niederwieser D, Marth C, Huber H, Egg D, Schuler G, Margreiter R, Braunsteiner H, Huber C.  
Human large granular lymphocytes and their relationship to natural killer cell activity in various disease states.  
*Blood* 1984; 64:288
50. EllisTM, McKenzie RS, Simms PE, Helfrich BA, FisherRI.  
Induction of human lymphokine-activated killer cells by INF-a and IFN-g.  
*J Immunol* 1989; 143:4282
51. Ortaldo JR, Herberman RB.  
Augmentation of natural killer activity.  
In Lotzova E, Herberman RB (eds): *Immunobiology of Natural Killer4 Cells*, vol 2. Boca Raton, FL, CRC, 1986, p 145
52. Djeu JY, Stocks N, Varesio L, Holden HR, Herbermann RB.  
Metabollic requirements for the in vitro augmentation of mouse natural killer activity by interferon.  
*Cell Immunol* 1981; 58:49
53. Orange JS, Biron CA.  
Characterization of early IL-12, IFN-a/b and TNF effects on antiviral state and Nk cell responses during murine cytomegalovirus infection.  
*J Immunol* 1996; 156:4746-4756

- 
54. Waldmann TA, Tagaya Y.  
The multifaceted regulation of interleukin 15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens.  
*Annu Rev Immunol* 1999; 17:19-49
  55. Brunda MJ, Tarnowski D, Davatelis V.  
Interaction of recombinant interferons with recombinant interleukin-2: Differential effects on natural killer cell activity and interleukin-2 activated killer cells.  
*Br J Cancer* 1986; 37:787
  56. Sone S, Utsugi T, Nii A, Ogura T.  
Differential effects of recombinant interferons  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  on induction of human lymphokine (IL-2)-activated killer activity.  
*J Natl Cancer Inst* 1988; 80:425
  57. Orange JS, Biron CA.  
An absolute and restricted requirement for IL-12 in natural killer cell IFN- $\gamma$  production and antiviral defense.  
*J Immunol* 1996; 156:1138-1142
  58. Monteiro JM, Harvey C, Trinchieri G.  
Role of interleukin-12 in primary influenza virus infection.  
*J Virol* 1998; 72:4825-4831
  59. Biron AC.  
Initial and innate responses to viral infections – pattern setting in immunity or disease.  
*Curr Opin Microbiol* 1999; 2:374-381
  60. Djeu JY, Stocks N, Zoon K, Stanton GJ, Timonen T, Herberman RB.  
Positive self regulation of cytotoxicity in human natural killer cells by production of interferon upon exposure to influenza and herpes viruses.  
*J Exp Med* 1982; 156:1222-34
  61. Weigent DA, Stanton GJ, Johnson HM.  
Interleukin 2 enhances natural killer cell activity through induction of  $\gamma$  interferon.  
*Infect Immun* 1983; 41:992-997
  62. Trinchieri G.  
Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity.  
*Annu Rev Immunol* 1995; 13:251-276
  63. Okamura H, et al.  
Cloning of a new cytokine that induces IFN- $\gamma$  production by T cells.  
*Nature* 1995; 378:88-91
  64. Ushio S, et al.  
Cloning of the cDNA for human IFN- $\gamma$  inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biologic activities of the protein.  
*J Immunol* 1996; 156:4274-79

65. Dalton DK, Pitts-Veek S, Keshav S, Figari IS, Bfadley A, Stewart TA.  
Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-g genes.  
*Science* 1993; 259:1739-42
66. Magram J, et al.  
IL-12-deficient mice are defective in IFN-g production and type 1 cytokine responses.  
*Immunity* 1996; 4:471-481
67. Takeda K, et al.  
Defective NK cell activity and Th 1 response in Il-18-deficient mice.  
*Immunity* 1998; 8:383-390
68. Trinchieri G, Matsumoto-Kobayashi M, Clark SC, Sehra J, London L, Perussia B.  
Response of resting human peripheral blood natural killer cells to interleukin 2.  
*J Exp Med* 1984; 160:1147
69. London L, Perussia B, Trinchieri G.  
Induction of proliferation in vitro of resting human natural killer cells: IL-2 induces into cell cycle most peripheral blood NK cells but only a minor subset of low density T cells.  
*J Immunol* 1983; 137:3845
70. Henney CS, Kuribayashi K, Kern DE, Gillis S.  
Interleukin-2 augments natural killer activity.  
*Nature* 1981; 291:335
71. Siegel JP, Sharon M, Smith PL, Leonard WJ.  
The IL-2 receptor b chain (p70): Role in mediating signals for LAK, NK and proliferative activities.  
*Science* 1987; 238:75
72. Kehrl JH, Dukovich M, Whalen G, Katz P, Fauci AS, Greene WC.  
Novel interleukin 2 (IL-2) receptor appears to mediate IL-2-induced activation of natural killer cells.  
*J Clin Invest* 1988; 81:200
73. Lanier LL, Benike CJ, Phillips JH, Engleman EG.  
Recombinant interleukin 2 enhanced natural killer cell-mediated cytotoxicity in human lymphocyte subpopulations expressing the Leu-7 and Leu-11 antigens.  
*J Immunol* 1985; 134:794
74. Robertson MJ, Caligiuri MA, Manley TJ, Levine H, Ritz J.  
Human natural killer cell adhesion molecules: Differential expression after activation and participation in cytolysis.  
*J Immunol* 1990; 145(10): 3194 – 3201
75. Manyak CL, Norton GP, Lobe CG, Bleackley RC, Gershenfeld HK, Weissman IL, Kumar V, Sigal NH, Koo GC.  
IL-2 induces expression of serine protease enzymes and genes in natural killer and nospecific T killer cells.  
*J Immunol* 1989; 142:3707

- 
76. Soloski MJ.  
Recognition of tumor cells by the innate immune system.  
*Curr Opin Immunol* 2001; 13:154-162
  77. Moretta L, Ciccone E, Mingari MC, Biassone R, Moretta A.  
Human natural killer cells: origin, clonality specificity and receptors.  
*Adv. Immunol* 1994; 55:341-380
  78. Raulet DH, Held W.  
Natural killer cell receptors: the offs and ons of NK cell recognition.  
*Cell* 1995; 82:697-700
  79. Chambers WH, Brissette-Storkus CS.  
Hanging in the balance: natural killer cell recognition of target cells.  
*Chem Biol* 1995; 2:429-435
  80. Gumperz JE, Parham P.  
The enigma of the natural killer cell.  
*Nature* 1995; 378:245-248
  81. López-Botet M, Moretta L, Strominger J.  
NK cell receptors and recognition of MHC class I molecules.  
*Immunol Today* 1996; 17:212-214
  82. Ruggeri L, Capanni M, Asucci M, Volpi I, Tosti A, Perruccio K, Urbani E, Negrin RS, Martelli MF, Velardi A  
Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation  
*Blood* 1999; 94(1):333-339
  83. Townsend A, Bodmer H.  
Antigenrecognition by class I-restricted T lymphocytes.  
*Ann Rev Immunol* 1989; 7:601-624
  84. Porgador A, Mandelboim O, Restifo NP, Strominger JL.  
Natural killer cell lines kill autologous b2-microglobulin-deficient melanoma cells: Implications for cancer immunotherapy.  
*Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:13140-5
  85. Yokohama WM.  
Recognition structures on natural killer cells.  
*Curr Opin Immunol* 1993; 5:67-73
  86. Kärre K.  
Role of target histocompatibility antigens in regulation of natural killer activity: a re-evaluation and a hypothesis. In *Mechanisms of Cytotoxicity by NK Cells*. Edited by Herberman RB, Callewaert DM, Orlando: Academic Press; 1985:81-103

- 
87. Ljunggren H-G, Kärre K.  
In search of the 'missing self': MHC molecules and NK recognition.  
*Immunol Today* 1991; 11:237-242
  88. Yokoyama WM.  
Natural killer cell receptors.  
*Curr Opin Immunol* 1998; 10:298-305
  89. Mason LH, Ortaldo JR, Young HA, Kumar K, Bennet M, Anderson SK.  
Cloning and functional characteristics of murine LGL-1: a member of the Ly-49 gene family (Ly-49G2).  
*J Exp Med* 1995; 182:293-304
  90. Stoneman ER, Bennet M, An J, Chesnut KA, Scheerer JB, Siciliano MJ, Kumar V, Mathew PA.  
Cloning and characterization of 5E6 (Ly-49C), a receptor molecule expressed on a subset of murine natural killer cells.  
*J Exp Med* 1995; 182:305-314
  91. Brown MG, Scalzo AA, Matsumoto K, Yokoyama WM.  
The natural killer gene complex: a genetic basis for understanding natural killer cell function and innate immunity.  
*Immunol Rev* 1997; 155:53-65
  92. Brennan J, Lemieux S, Freeman JD, Mager DL, Takei F.  
Heterogeneity among Ly-49C natural killer (NK) cells: characterization of highly related receptors with differing functions and expression patterns.  
*J Exp Med* 1996; 184:2085-2090
  93. Brennan J, Mahon G, Mager DL, Jefferies WA, Takei F.  
Recognition of class I major histocompatibility complex molecules by Ly-49: specificities and domain interactions.  
*J Exp Med* 1996; 183:1553-1559
  94. Lanier L.L.  
NK Cell Receptors.  
*Annu Rev Immunol* 1998; 16:359-93
  95. Lazetic S, Chang C, Houchins JP, Lanier LL, Phillips JH.  
Human NK cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits.  
*J Immunol* 1996; 157:4741-4745
  96. Carretero M, Cantoni C, Bellon T, Bottino C, Biassoni R, Rodriguez A, Perez-Villar JJ, Moretta L, Moretta A, Lopez-Botet M.  
The CD94 and NKG2-A C type lectins covalently assemble to form a natural killer cell inhibitory receptor for HLA class I molecules.  
*Eur J Immunol* 1997; 27:563-575

97. Brooks AG, Posch PE, Scorzelli CJ, Borrego F, Coligan JE.  
NKG2A complexed with CD94 defines a novel inhibitory NK cell receptor.  
*J Exp Med* 1997; 185:795-800
98. Yabe T, McSherry C, Bach FH, Fisch P, Schall RP, Sondel PM, Houchins JP.  
A multigen family on human chromosome 12 encodes natural killer –cell lectins.  
*Immunogenetics* 1993; 37:455-60
99. Houchins JP, Yabe T, McSherry C, Bach FH.  
DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II  
integral membrane proteins on human natural killer cells.  
*J Exp Med* 1991; 173:1017-1020
100. Plougastel B, Jones T, Trowsdale J.  
Genomic structure, chromosome location and alternative splicing of the human NKG2-A  
gene.  
*Immunogenetics* 1996; 44:286-291
101. Plougastel B, Trowsdale J.  
Cloning of NKG2-F, a new member of the NKG2 family of human natural killer cell  
receptor genes.  
*Eur J Immunol* 1997; 27:2835-2839
102. Chang C, Todriguez A, Carretero M, Lopez-Botet M, Phillips JH, Lanier LL.  
Molecular characterization of human CD94: a type II membrane glycoprotein related to the  
C-type lectin superfamily.  
*Eur J Immunol* 1995; 25:2433-2437
103. Colonna M, Samaridis J.  
Cloning of Ig-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by  
human NK cells.  
*Science* 1995; 268:405-408
104. Wagtmann N, et al.  
Molecular clones of the p58 natural killer cell receptor reveal Ig-related molecules with  
diversity in both the extra – and intracellular domains.  
*Immunity* 1995; 2:439-449
105. Baker E, D’Andrea A, Phillips JH, Sutherland GR, Lanier LL.  
Natural killer cell receptor for HLA-B allotypes, NKB1: Map position 19q13.4.  
*Chromosome Research* 1995;3:511
106. Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, Shilling HG, Lienertweidenbach K, Corliss B, Tyan D,  
Lanier LL, Parham P.  
Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes.  
*Immunity* 1997; 7:753-763

107. Moretta A, et al.  
Identification of four subsets of human CD3-CD16+ natural killer (NK) cells by the expression of clonally distributed functional surface molecules: Correlation between subset assignment of NK clones and ability to mediate specific alloantigen recognition.  
*J Exp Med* 1990; 172:1589-1598
108. Litwin V, Gumperz J, Parham P, Phillips JH, Lanier LL. NKB1:  
An NK cell receptor involved in the recognition of polymorphic HLA-B molecules.  
*J Exp Med* 1994; 180:537-543
109. Lanier LL, Gumperz J, Parham P, Melero I, López-Botet M, Phillips JH.  
The NKB1 and HP-3E4 NK cell receptors are structurally distinct glycoproteins and independently recognize polymorphic HLA-B and HLA-C molecules.  
*J Immunol* 1995; 154:3320-3327
110. Wagtmann N, Rajagopalan S, Winter CC, Peruzzi M, Long EO.  
Killer cell inhibitory receptors specific for HLA-C and HLA-B identified by direct binding and by functional transfer.  
*Immunity* 1995; 3:801-809
111. Fan QR, Garboczi DN, Winter CD, Wagtmann N, Long EO, Wiley DC.  
Direct binding of a soluble natural killer cell inhibitory receptor to a soluble human leukocyte antigen-Cw4 class I major histocompatibility complex molecule.  
*Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:7178-7183
112. Vitale M, Sivori S, Pende D, Augugliaro R, Di Donato R, Amoroso A, Malnati M, Bottino C, Moretta L, Moretta A.  
Physical and functional independency of p70 and p58 NK cell receptors for HLA class I  
Their role in definition of different groups of alloreactive NK cell clones.  
*Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:1453-57
113. Pende D, Biassoni R, Cantoni C, Verdiani S, Falco M, Di Donato C, Accame L, Bottino C, Moretta A, Moretta L.  
The natural killer cell receptor specific for HLA-A allotypes: a novel member of the p58/p70 family of inhibitory receptors that is characterized by three immunoglobulin-like domains and is expressed as a 140 kDa disulfide-linked dimer.  
*J Exp Med* 1996; 184:505-518
114. Lanier LL, Corliss B, Phillips JH.  
Arousal and inhibition of human NK cells.  
*Immunol. Rev.* 1997; 155:145-154
115. Biassoni R, et al.  
The human leukocyte antigen (HLA)-C-specific "activatory" or "inhibitory" natural killer cell receptors display highly homologous extracellular domains but differ in their transmembrane and intracytoplasmic portions.  
*J Exp Med* 1996; 183:645-650

116. Colonna M, Navarro F, Bellon T, Llano M, Garcia P, Samaridis J, Angman L, Cella M, López-Botet M  
A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells  
J Exp Med 1997; 186: 1809-1818
117. Moretta L, Sivori S, Vitale M, Pende D, Morelli L, Augugliaro R, Bottino C, Moretta L.  
Existence of both inhibitory (p58) and activatory (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells.  
J Exp Med 1995; 182:875-884
118. Vitale M, Sivori S, Pende D, Moretta L, Moretta A.  
Coexpression of two functionally independent p58 inhibitory receptors in human natural killer cell clones results in the inability to kill all normal allogeneic target cells.  
Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92:3536-40
119. Gumperz JE, Valiante NM, Parham P, Lanier LL, Tyan D.  
Heterogeneous phenotypes of expression of the NKB1 natural killer cell class I receptor among individuals of different HLA types appear genetically regulated but not linked to MHC haplotype.  
J Exp Med 1996; 183:1817-27
120. Karlhofer FM, Ribuado RK, Yokoyama WM.  
MHC class I alloantigen specificity of Ly-49+IL-2- activated natural killer cells.  
Nature 1992; 358:66-70
121. Valiante NM, Phillips JH, Lanier LL, Parham P.  
Killer cell inhibitory receptor recognition of human leukocyte antigen (HLA) class I blocks formation of a pp36/PLC-g signaling complex in human natural killer (NK) cells.  
J Exp Med 1996; 184:2243-50
122. Timonen T, Helander TS.  
Natural killer cell-target cell interactions.  
Curr Opin Cell Biol 1997; 9:667-673
123. Mason LH, Anderson SK, Yokoyama WM, Smith HRC, Winkler –Pickett R, Ortaldo JR.  
The Ly-49D receptor activates murine natural killer cells.  
J Exp Med 1996; 184:2119-28
124. Brennan J, Mager D, Jefferies W, Takei F.  
Expression of different members of the Ly-49 gene family defines distinct natural killer cell subsets and cell adhesion properties.  
J Exp Med 1994; 180:2287-95
125. Dissen E, Ryan JC, Seaman WE, Fossum S.  
An autosomal dominant locus, Nka, mapping to the Ly-49 region of a rat natural killer (NK) gene complex, controls NK cell lysis of allogeneic lymphocytes.  
J Exp Med 1996; 183:2197-2207

126. Lanier LL.  
On guard – activating Nk cell receptors.  
Nature Immunol 2001; 2 (1):23-27
127. Wu J, Cherwinski H, Spies T, Phillips JH, Lanier LL.  
DAP10 and DAP12 form distinct, but functionally cooperative, receptor complexes in natural killer cells.  
J Exp Med 2000; 192:1059-68
128. Lanier LL, Corliss BC, Wu J, Leong C, Phillips JH.  
Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells.  
Nature 1998; 391:703-707
129. Olcese L, et al.  
Human killer cell activatory receptors for MHC class I molecules are included in a multimeric complex expressed by natural killer cells.  
J Immunol 1997; 158:5083-86
130. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T.  
Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress inducible MICA.  
Science 1999; 285:727-729
131. Groh V, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabstein KH, Spies T.  
Broad tumor –associated expression and recognition by tumor derived gamma delta T cells of MICA and MICB.  
Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96:6879-84
132. Diefenbach A, Jamieson AM, Liu SD, Shastri N, Raulet DH.  
Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of Nk cells and macrophages.  
Nat Immunol 2000; 1:119-126
133. Cerwenka A, Bakker AB, McClanahan T, Wagner J, Wu J, Phillips JH, Lanier LL.  
Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice.  
Immunity 2000; 12:721-727
134. Biassoni R, Cantoni C, Pende D, Sivori S, Parolini S, Vitale M, Bottino C, Moretta A.  
Human natural killer cell receptors and co-receptors.  
Immunol Rev 2001 Jun; 181:203-14
135. Sivori S, Vitale M, Morelli L, Sanseverino L, Augugliaro R, Bottino C, Moretta L, Moretta A.  
Nkp46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation.  
J Exp Med 1997; 186:1129-36

- 
136. Cantoni C, Bottino C, Bitale M, Pessino A, Augugliaro R, Malaspina A, Parolini S, Moretta L, Moretta A, Biassoni R.  
NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily.  
*J Exp Med* 1999; 189:787-796
137. Vitale M, Bottino C, Sivori S, Sanseverino L, Castriconi R, Marcenaro E, Augugliaro R, Moretta L, Moretta A.  
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
138. Pende D, Parolini S, Pessino A, Sivori S, Augugliaro R, Morelli L, Marcenaro E, Accame L, Malaspina A, Biassoni R 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
139. Winter CC, Gumperz JE, Parham P, Long EO, Wagtmann N.  
Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition.  
*J Immunol* 1998; 161:571-577
140. Valés-Gómez M, Reyburn HT, Erskine RA, Lopez-Botet M, Strominger JL.  
Kinetics and peptide dependency of the binding of the inhibitory NK receptor CD94/NKG2-A and the activating receptor CD94/NKG2-C to HLA-E.  
*EMBO J* 1999; 18:4250-60
141. Wu M-F, Raulet DH.  
Class I-deficient hemopoietic cells and non-hemopoietic cells dominantly induce unresponsiveness of natural killer cells to class I-deficient bone marrow cell grafts.  
*J Immunol* 1997; 158:1628-33
142. Held W, Dorfman JR, Wu M-F, Raulet DH.  
Major histocompatibility complex class I-dependent skewing of the natural killer cell Ly-49 receptor repertoire.  
*Eur J Immunol* 1996; 26:2286-92
143. Dorfman JR, Raulet DH.  
Major histocompatibility complex genes determine natural killer cell tolerance.  
*Eur J Immunol* 1996; 26:151-155
144. Held W, Raulet DH.  
Ly-49A transgenic mice provide evidence for a major histocompatibility complex-dependent education process in natural killer cell development.  
*J Exp Med* 1997; 185:2079-88

- 
145. Hoglund P, Ohlen C, Carbone E, Franksson L, Ljunggren H-G, Latour A, Koller B, Karre K. Recognition of b2-microglobulin-negative (b2m-) T-cell blasts by natural killer cells from normal but not from b2m- mice: nonresponsiveness controlled by b2m- none marrow in chimeric mice.  
Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:10332-36
  146. Liao N-S, Bix M, Zijlstra M, Jaenisch R, Raulet D. MHC class I deficiency: susceptibility to natural killer (NK) cells and impaired NK activity.  
Science 1991; 253:199-202
  147. Ljunggren H-G, van Kaer L, Ploegh HL, Tonegawa S. Altered natural killer cell repertoire in Tap-1 mutant mice.  
Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91:6520-24
  148. Karlhofer FM, Hunziker R, Reichlin A, Margulies DH, Yokoyama WM. Host MHC class I molecules modulate in vivo expression of a NK cell receptor.  
J Immunol 1994; 153:2407-16
  149. Olsson MY, Karre K, Sentman CL. Altered phenotype and function of natural killer cells expressing the major histocompatibility complex receptor Ly-49 in mice transgenic for its ligand.  
Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92:1649-53
  150. Vance RE, Raulet DH. Towards a quantitative analysis of the repertoire of class I MHC-specific inhibitory receptors on natural killer cells.  
Curr Top Microbiol Immunol 1998; 230: 135-160
  151. Young JD, Cohn ZA. Cellular and humoral mechanisms of cytotoxicity: Structural and functional analogies.  
Adv Immunol 1987; 41:269
  152. Schmidt RE, MacDermott RP, Bartley G, Bertovich M, Amato DA, Austen KF, Schlossman SF, Stevens RL, Ritz J. Specific release of proteoglycans from human natural killer cells during target lysis.  
Nature 1985; 318:289
  153. Joag S, Zychlinsky A, Young JD. Mechanisms of lymphocyte-mediated lysis.  
J Cell Biochem 1989; 39:239
  154. Criado M, Sinstrom JM, Anderson CG, Dennert G. Cytotoxic granules from killer cells: Specificity of granules and insertion of channels of defined size into target membranes.  
J Immunol 1985; 135:4245
  155. Dealtry GB, Naylor MS, Fiers W, Balkwill FR. DNA fragmentation and cytotoxicity caused by tumor necrosis factor is enhanced by interferon-g.  
Eur J Immunol 1987; 17:689

156. Shresta S, Pham CTN, Thomas DA, Graubert TA, Ley TJ.  
How do cytotoxic lymphocytes kill their targets?  
Curr Opin Immunol 1998; 10:581-587
157. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME.  
Cytotoxic-dependent APO-1 (Fas/CD95)- associated proteins form a death inducing signaling complex (DISC) with the receptor.  
EMBO J 1995; 14:5579-88
158. Grimm EA, Mazumder A, Zhang HZ, Rosenberg SA.  
Lymphokine-activated killer cell phenomenon: Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes.  
J Exp Med 1982; 155:1823
159. Grimm EA, Robb RJ, Roth JA, Neckers LM, Lachman LB, Wilson DJ, Rosenberg SA.  
Lymphokine-activated killer cell phenomenon: III. Evidence that IL-2 is sufficient for direct activation of peripheral blood lymphocytes into lymphokine-activated killer cells.  
J Exp Med 1983; 158:1356
160. Phillips JH, Lanier LL.  
Dissection of the lymphokine activated killer phenomenon: Relative contribution of peripheral blood natural killer cells and T lymphocytes to cytolysis.  
J Exp Med 1986; 164:814
161. Phillips JH, Gemlo BT, Myers WW, Rayner AA, Lanier LL.  
In vivo and in vitro activation of natural killer cells in advanced cancer patients undergoing combined recombinant interleukin-2 and LAK cell therapy.  
J Clin Oncol 1987; 5:1933
162. McMannis JD, Fisher RI, Creekmore SP, Braun DP, Harris JE, Ellis TM:  
In vivo effects of recombinant IL-2: I. Isolation of circulating Leu-19+ lymphokine-activated killer effector cells from cancer patients receiving recombinant IL-2.  
J Immunol 1988; 140:1335
163. Rosenberg SA.  
The adoptive immunotherapy of cancer using the transfer of activated lymphoid cells and interleukin-2.  
Sem Oncol 1986; 13:200
164. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Leitman S, Chang AE, Ettinghausen SE, Matory YL, Skibber JM, Shiloni E, Vetto JT, Seipp CA, Simpson CG, Reichert CM.  
Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer.  
N Engl J Med 1985; 313:1485
165. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Chang AE, Avis FP, Leitman S, Linehan WM, Robertson CN, Lee RE, Rubin JT, Seipp CA, Simpson CG, White DE.  
A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-alone.  
N Engl J Med 1987; 316:889

- 
166. Fisher RI, Coltman CA, Doroshow JH, Rayner AA, Hawkins MJ, Mier JW, Wiernik P, McMannis JD, Weiss GR, Margolin KA, Gemlo BT, Hoth DF, Parkinson DR, Paietta E. Metastatic renal cancer treated with interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells: A phase II clinical trial. *Ann Intern Med* 1988; 108:518
167. Dutcher JP, Creekmore S, Weiss GR, Margolin K, Markowitz AB, Roper M, Parkinson D, Ciobanu N, Fisher RI, Boldt DH, Doroshow JH, Rayner AA, Hawkins M, Atkins M. A phase II study of interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells in patients with metastatic malignant melanoma. *J Clin Oncol* 1989; 7:477
168. Hercend T, Farace F, Baume D, Charpentier F, Droz JP, Triebel F, Escudier B. Immunotherapy with Lymphokine-activated natural killer (LANAK) cells and rIL-2: A feasibility trial in metastatic renal cell carcinoma. *J Biol Response Mod* 1990; 9(6): 546-555
169. Melder RJ, Whiteside TL, Vujanovic NI, Hiserodt JC, Herberman RB. A new approach to generating antitumor effectors for adoptive immunotherapy using human adherent lymphokine-activated killer cells. *Cancer Res* 1988; 48:3461
170. Hawkins MJ. IL-2/LAK: Current status and possible future directions. *PPO Updates* 1989; 3:1
171. Ellis TM, Creekmore SP, McMannis JD, Braun DP, Harris JA, Fisher RI. Appearance and phenotypic characterization of circulating Leu 19+ cells in cancer patients receiving recombinant interleukin 2. *Cancer Res* 1988; 48:6597
172. Weil-Hillman G, Fisch P, Prieve AF, Sosman JA, Hank JA, Sondel PM. Lymphokine-activated killer activity induced by in vivo interleukin 2 therapy: Predominant role for lymphocytes with increased expression of CD2 and Leu19 but negative expression of CD16 antigens. *Cancer Res* 1989; 49:3680
173. Sheridan WP, Wolf M, Lusk J, et al. Granulocyte colony-stimulation factor and neutrophil recovery after high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. *Lancet* 1989; 2:891-894
174. Frei E III, Antmann K, Teicher B, et al. Bone marrow autotransplantation for solid tumors – prospects. *J Clin Oncol* 1989; 7:515-526
175. Frei E III, Canellos G. Dose: a critical factor in cancer chemotherapy. *Am J Med* 1980; 69:585-594

- 
176. Ferrera JL, Deeg HJ.  
Graft-versus-host disease.  
N Engl J Med 1991; 324:667-672
177. Armitage JO.  
Bone marrow transplantation.  
N Engl J Med 1994; 330:827-829
178. Storb R.  
Bone marrow transplantation.  
Transplant Proc 1995; 27:2649-52
179. Murphy WJ, Reynolds CW, Tiberghien P, Longo DL.  
Natural killer cells and bone marrow transplantation.  
J Natl Cancer Inst 1993; 85:1475-1480
180. Murphy WJ, Bennett M, Kumar V, Longo DL.  
Donor-type activated natural killer cells promote marrow engraftment and B cell development during allogeneic bone marrow transplantation.  
J Immunol. 1992; 148:2953-2960
181. Asai O, Longo DL, Tian Z-G, Hornung RL, Taub DD, Ruscetti FW, Murphy WJ.  
Suppression of Graft-Versus-Host Disease and Amplification of Graft-Versus-Tumor Effects by Activated Natural Killer Cells after Allogeneic Bone Marrow Transplantation.  
J Clin Invest 1998; (101) 9:1835-42
182. Zeis M, Uharek L, Glass B, Steinmann J, Dreger P, Gassmann W, Schmitz N.  
Allogeneic MHC-mismatched activated natural killer cells administered after bone marrow transplantation provide a strong graft-versus-leukaemia effect in mice.  
Br J Haematol 1997; 96:757-761
183. Murphy WJ, Keller JR, Harrison CL, Young HA, Longo DL.  
Interleukin-2-activated natural killer cells can support hematopoiesis in vitro and promote marrow engraftment in vivo.  
Blood 1992; 80:670-677
184. Ghayur R, Seemayer TA, Lapp WS.  
Prevention of murine graft-versus-host disease by inducing and eliminating ASGM1+ cells of donor origin.  
Transplantation 1988; 45:586-590
185. Murphy WJ, Longo DL.  
The potential role of NK cells in the separation of graft-versus-tumor effects from graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation.  
Immunol Rev 1997; 157:167-176
186. Koh CY, et al.  
Augmentation of antileukemia effects by NK inhibitory receptor blockade in vitro and in vivo.  
Blood 2001; 97(10):3132-37

- 
187. Partington KM, Jenkinson EJ, Anderson G.  
A novel method of cell separation based on dual parameter immunomagnetic cell selection.  
*J Immunol Methods* 1999; Mar 4; 223 (2):195-205
  188. Reisner Y, Kapoor N, Kirkpatrick D, Pollack MS, Cunningham-Rundles S, Dupont B, Hodes MZ, Good RA, O'Reilly RJ  
Transplantation for severe combined immunodeficiency with HLA-A, B, D, DR incompatible parental marrow cells fractionated by soybean agglutinin and sheep red blood cells  
*Blood* 1983; 61 (2): 341-348
  189. Knobloch C, Spadinger U, Rueber E, Friedrich W.  
T cell depletion from human bone marrow using magnetic beads.  
*Bone Marrow Transplantation* 1990; 6:21-24
  190. Frame JN, Collins NH, Cartagena T, Waldmann H, O'Reilly RJ, Dupont B, Kernan NA  
T cell depletion of human bone marrow. Comparison of Campath-1 plus complement, anti-T cell ricin A chain immunotoxin and soybean agglutinin alone or in combination with sheep erythrocytes or immunomagnetic beads  
*Transplantation* 1989; 47(6): 984-8
  191. Slaper-Cortenbach IC, Wijngaarden-du Bois MJ, de Vries-van Rossen A, Borst HP, van der Lelie H, van Heugten HG, Verdonck LF, Wulffraat NM, Hoogerbrugge PM  
The depletion of T cells from haematopoietic stem cell transplants  
*Rheumatology* 1999; 38: 751-754
  192. Wagner JE, Donnerberg AD, Noga SJ, Cremo CA, Gao IK, Yin HJ, Vogelsang GB, Rowley S, Saral R, Santos GW  
Lymphocyte depletion of donor bone marrow by counterflow centrifugal elutriation: Results of a phase I clinical trial  
*Blood* 1988; 72(4): 1168-1176
  193. Noga SJ, Donnerberg AD, Schwartz CL, Strauss LC, Civin CI, Santos GW  
Development of a simplified counterflow centrifugation elutriation procedure for depletion of lymphocytes from human bone marrow  
*Transplantation* 1986; 41(2): 220-229
  194. de Witte T, Hoodenhout J, de Pauw B, Holdrinet R, Janssen J, Wessels J, van Daal W, Hustinx T, Haanen C  
Depletion of donor lymphocytes by counterflow centrifugation successfully prevents acute graft-versus-host disease in matched allogeneic marrow transplantation  
*Blood* 1986; 67(5): 1302-1308
  195. Feugier P, Thévenin S, Billot M, Serrurier B, Soigerot C, Schooneman F, Janot C, Hervé P, Racadot E.  
Comparison of T cell depletion strategies from bone marrow, umbilical cord and peripheral blood using five separation systems.  
*Hematol Cell Ther* 1997; 39:67-73

- 
196. Prentice HG, Janossy G, Skeggs D, Blacklock HA, Bradstock KF, Goldstein G, Hoffbrand AV  
Use of anti-T-cell monoclonal antibody OKT3 to prevent acute graft-versus-host disease in allogeneic bone marrow transplantation for acute leukaemia  
The Lancet 1982; 1: 700-703
197. Filipovich AH, Ramsay NK, Warkentin PI, McGlave PB, Goldstein G, Kersey JH  
Pretreatment of donor bone marrow with monoclonal antibody OKT3 for prevention of acute graft-versus-host disease in allogeneic histocompatible bone marrow transplantation  
The Lancet 1982; 1: 1266-1269
198. Prentice HG, Janossy G, Price-Jones L, Trejdosiewicz LK, Panjwani D, Graphakos S, Ivory K, Blacklock HA, Gilmore MJ, Tidman N, Skeggs DB, Ball S, Patterson J, Hoffbrand AV  
Depletion of T Lymphocytes in donor marrow prevents significant graft-versus host disease in matched allogeneic leukaemic marrow transplant recipients  
The Lancet 1984; 1; 472-475
199. Martin PJ, Hansen JA, Buckner CD, Sanders JE, Deeg HJ, Stewart P, Appelbaum FR, Clift R, Fefer A, Witherspoon RP  
Effects of in vitro depletion of T cells in HLA-identical allogeneic marrow grafts  
Blood 1985; 66 (3): 664-672
200. Herve P, Flesch M, Cahn JY, Racadot E, Plouvier E, lamy B, Rozenbaum A, Noir A, Leconte Des Floris R, Peters A  
Removal of marrow T cells with OKT3-OKT11 monoclonal antibodies and complement to prevent acute graft-versus host disease  
Transplantation 1985; 39 (2): 138-143
201. Keever-Taylor CA, Bredeson Ch, Loberiza FR, Casper JT, Lawton C, Rizzo D, Burns WH, Margolis DA, Vesole DH, Horowitz M, Zhang M, Juckett M, Drobyski WR  
Analysis of risk factors for the development of GVHD after T-cell depleted allogeneic BMT: effect of HLA disparity, ABO incompatibility, and method of T-cell depletion  
Biol Blood Marrow Transplant. 2001; 7: 620-630
202. Granger S, Janossy G, Francis G, Blacklock H, Poulter LW, Hoffbrand AV.  
Elimination of T-lymphocytes from human bone marrow with monoclonal T-antibodies and cytolytic complement.  
Br J Haematol 1982; 50(2):367-374
203. Maraninchi D, Blaise D, Rio B, Leblond V, Dreyfus F, Gluckman E, Guyotat D, Pico JL, Michallet M, Ifrah N, Bordigoni A  
Impact of T-cell depletion on outcome of allogeneic bone marrow transplantation for standard risk leukaemias  
The Lancet 1987; 2: 175 – 178

- 
204. Dreger P, Viehmann K, Steinmann J, Eckstein V, Müller-Ruchholtz W, Löffler H, Schmitz N.  
G-CSF-mobilized peripheral blood progenitor cells for allogeneic transplantation: Comparison of T cell depletion strategies using different CD34+ selection systems or CAMPATH-1.  
Exp Hematol 1995; 23:147-154
205. Clarke E, Potter MN, Hale G, Waldmann H, Lankester A, Cornish JM, Steward CD, Marks DI, Oakhill A, Pamphilon DH.  
Double T cell depletion of bone marrow using sequential positive and negative cell immunoaffinity or CD34+ cell selection followed by Campath-1M; effect on CD34+ cells and progenitor cell recoveries.  
Bone Marrow Transplantation 1998; 22:117-124
206. Frame JN, Sheehy D, Cartagena T, Cirrincione C, O'Reilly RJ, Dupont B, Kernan NA.  
Optimal conditions for in vitro T cell depletion of human bone marrow by Campath-1a plus complement as demonstrated by limiting dilution analysis.  
Bone Marrow Transplant 1989; 4(1):55-61
207. Filipovich AH, Vallera DA, Youle RJ, Neville DM, Kersey Jr, Kersey JH  
Ex vivo T cell depletion with immunotoxins in allogeneic bone marrow transplantation: the pilot clinical study for prevention of graft-versus-host disease  
Transplantation Proceedings 1985; 17 (1): 442-444
208. Laurent G, Maraninchi D, Gluckman E, Vernant JP, Derocq JM, Gaspard MH, Rio B, Michalet M, Reiffers J, Dreyfus F, Casellas P, Schneider P, Blythman HE, Bouloux C, Jansen FK  
Donor bone marrow treatment with T101 Fab fragment-ricin A-chain immunotoxin prevents graft-versus-host disease  
Bone Marrow Transplantation 1989; 4: 367 – 371
209. Antin JH, Bierer BE, Smith BR, Ferrara J, Guinan EC, Sieff C, Golan DE, Macklis RM, Tarbell NJ, Lynch E  
Selective depletion of bone marrow T lymphocytes with anti-CD5 monoclonal antibodies: effective prophylaxis for graft-versus-host disease in patients with hematologic malignancies  
Blood 1991; 78 (8): 2139 – 2149
210. Gordon PR, Leimig T, Mueller I, Babarin-Dorner A, Holladay MA, Houston J, Kerst G, Geiger T, Handgretinger R  
A large-scale method for T cell depletion: towards graft engineering of mobilized peripheral blood stem cells  
Bone Marrow Transplantation 2002; 30: 69-74
211. Kögler G, Capdeville AB, Hauch M, Brüster HAT, Göbel U, Wernet P, Burdach S.  
High efficiency of a new immunological magnetic cell sorting method for T cell depletion of human bone marrow.  
Bone marrow transplantation 1990; 6:163-168

- 
212. Vartdal F, Kvalheim G, Lea TE, Bosnes V, Gaudernack G, Ugelstad J, Albrechtsen D. Depletion of T Lymphocytes from human bone marrow. *Transplantation* 1987; 43 (3):366-371
213. Yau JC, Reading CL, Thomas MW, Davaraj BM, Tindle SE, Jagannath S, Dicke KA. Purging of T-lymphocytes with magnetic affinity colloid. *Exp Hematol* 1990; 18(3):219-222
214. Neipp M, Exner BG, Maru D, Haber M, Gammie JS, Pham SM, Ildstad ST. T-cell depletion of allogeneic bone marrow using anti-alpha-beta TCR monoclonal antibody: Prevention of graft-versus-host disease without affecting engraftment potential in rats. *Exp Hematol* 1999; 27: 860-867
215. Valiante NM, Uhrberg M, Shilling HG, Lienertweidenbach K, Arnett KL, Dandrea A, Phillips JH, Lanier LL, Parham P. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity* 1997; 7:739-751

## Anhang

Tab. 8: T-Zell-Depletion

Versuchskonfiguration	Antikörper (AK)	AK-Menge [ml]	Auftragungsgeschwindigkeit [ml/h]	Anzahl der Versuche	Versuch Nr.	T-Zell-Depletion [log]	arithmetischer Mittelwert	Standardfehler	Standardabweichung	Minimum	1. Quartile	Median	3. Quartile	Maximum
1	IK	1	100	3	48	3,63	4,31	0,38	0,66	3,63	4,00	4,36	4,65	4,95
					54	4,36								
					44	4,95								
2	IK	1	50	4	46	3,44	4,29	0,42	0,83	3,44	3,68	4,18	4,91	5,38
					60	4,45								
					42	3,91								
					40	5,38								
3	IK	5	100	3	47	3,21	4,02	0,68	1,17	3,21	3,34	3,47	4,42	5,36
					53	3,47								
					43	5,36								
4	IK	5	50	4	59	4,96	4,67	0,26	0,52	3,89	4,38	4,91	4,95	4,96
					45	4,88								
					39	3,89								
					41	4,94								
5	MB	1	100	5	26	3,87	3,49	0,17	0,39	2,83	3,48	3,62	3,62	3,87
					38	3,63								
					24	3,62								
					34	3,48								
					50	2,83								
6	MB	1	50	6	30	4,42	4,16	0,18	0,45	3,57	3,83	4,16	4,62	4,62
					28	3,90								
					36	4,62								
					22	4,62								
					32	3,83								
					56	3,57								
7	MB	5	100	5	25	4,14	3,75	0,26	0,58	3,05	3,19	4,08	4,14	4,27
					37	3,05								
					23	4,08								
					33	4,27								
					49	3,19								
8	MB	5	50	6	27	3,79	4,12	0,19	0,47	3,49	3,79	4,09	4,46	4,80
					29	3,49								
					35	4,46								
					21	4,80								
					31	4,07								
					55	4,11								

Ergebnisse der T-Zell-Depletion aller Einzelversuche und gruppiert nach Versuchskonfigurationen im direkten Vergleich. IK = NK isolation kit; MB = CD3 MicroBeads

Tab. 9: T-Zell-Depletion (korrigiert)

Versuchskonfiguration	Antikörper (AK)	AK-Menge [ml]	Auftragsgeschwindigkeit [ml/h]	Anzahl der Versuche	Versuch Nr.	T-Zell-Depletion (korrigiert) [log]	arithmetischer Mittelwert	Standardfehler	Standardabweichung	Minimum	1. Quartile	Median	3.Quartile	Maximum
1	IK	1	100	3	48	<b>3,52</b>	4,26	0,40	0,70	3,52	3,93	4,34	4,62	4,91
					54	<b>4,34</b>								
					44	<b>4,91</b>								
2	IK	1	50	4	46	<b>3,37</b>	4,21	0,40	0,80	3,37	3,61	4,11	4,80	5,23
					60	<b>4,38</b>								
					42	<b>3,85</b>								
					40	<b>5,23</b>								
3	IK	5	100	3	47	<b>3,14</b>	3,96	0,67	1,15	3,14	3,30	3,47	4,37	5,28
					53	<b>3,47</b>								
					43	<b>5,28</b>								
4	IK	5	50	4	59	<b>4,96</b>	4,60	0,28	0,55	3,77	4,29	4,83	4,91	4,96
					45	<b>4,81</b>								
					39	<b>3,77</b>								
					41	<b>4,86</b>								
5	MB	1	100	5	26	<b>3,85</b>	3,42	0,18	0,41	2,75	3,42	3,51	3,58	3,85
					38	<b>3,58</b>								
					24	<b>3,51</b>								
					34	<b>3,42</b>								
					50	<b>2,75</b>								
6	MB	1	50	6	30	<b>4,35</b>	4,07	0,17	0,42	3,46	3,79	4,12	4,37	4,55
					28	<b>3,90</b>								
					36	<b>4,55</b>								
					22	<b>4,37</b>								
					32	<b>3,79</b>								
					56	<b>3,46</b>								
7	MB	5	100	5	25	<b>3,92</b>	3,66	0,27	0,60	2,93	3,12	3,92	4,07	4,25
					37	<b>2,93</b>								
					23	<b>4,07</b>								
					33	<b>4,25</b>								
					49	<b>3,12</b>								
8	MB	5	50	6	27	<b>3,73</b>	3,98	0,19	0,47	3,32	3,73	3,91	4,36	4,64
					29	<b>3,32</b>								
					35	<b>4,36</b>								
					21	<b>4,64</b>								
					31	<b>4,05</b>								
					55	<b>3,78</b>								

Ergebnisse der T-Zell-Depletion aller Einzelversuche und gruppiert nach Versuchskonfigurationen im direkten Vergleich. Die T-Zell-Depletion ist wegen unspezifischer Zellverluste um die Wiederfindungsrate der T-Zellen korrigiert worden. IK = NK isolation kit; MB = CD3 MicroBeads

Tab. 10: T-Zell-Restkontamination nach Selektion

Versuchskonfiguration	Antikörper (AK)	AK-Menge [ml]	Auftragsgeschwindigkeit [ml/h]	Anzahl der Versuche	Versuch Nr.	T-Zell-Restkontamination	arithmetischer Mittelwert	Standardfehler	Standardabweichung	Minimum	1. Quartile	Median	3. Quartile	Maximum
1	IK	1	100	3	48	0,196%	0,09%	0,05%	0,09%	0,02%	0,03%	0,04%	0,12%	0,20%
					54	0,025%								
					44	0,039%								
2	IK	1	50	4	46	0,391%	0,16%	0,09%	0,18%	0,01%	0,02%	0,11%	0,30%	0,39%
					60	0,022%								
					42	0,206%								
					40	0,012%								
3	IK	5	100	3	47	0,708%	0,36%	0,20%	0,34%	0,03%	0,19%	0,34%	0,53%	0,71%
					53	0,344%								
					43	0,028%								
4	IK	5	50	4	59	0,010%	0,25%	0,23%	0,45%	0,01%	0,02%	0,04%	0,49%	0,93%
					45	0,024%								
					39	0,930%								
					41	0,050%								
5	MB	1	100	5	26	0,039%	0,11%	0,05%	0,12%	0,04%	0,05%	0,06%	0,07%	0,31%
					38	0,056%								
					24	0,069%								
					34	0,053%								
					50	0,313%								
6	MB	1	50	6	30	0,011%	0,03%	0,01%	0,03%	0,01%	0,01%	0,02%	0,07%	0,08%
					28	0,078%								
					36	0,009%								
					22	0,016%								
					32	0,026%								
					56	0,070%								
7	MB	5	100	5	25	0,028%	0,07%	0,03%	0,07%	0,01%	0,03%	0,03%	0,14%	0,16%
					37	0,158%								
					23	0,028%								
					33	0,009%								
					49	0,144%								
8	MB	5	50	6	27	0,125%	0,05%	0,02%	0,06%	0,01%	0,01%	0,02%	0,12%	0,13%
					29	0,121%								
					35	0,012%								
					21	0,013%								
					31	0,019%								
					55	0,018%								

Ergebnisse der T-Zell-Restkontamination nach Selektion von allen Einzelversuchen und gruppiert nach Versuchskonfigurationen im direkten Vergleich. IK = NK isolation kit; MB = CD3 MicroBeads

Tab. 11: NK-Zell-Ertrag (recovery)

Versuchskonfiguration	Antikörper (AK)	AK-Menge [ml]	Auftragsgeschwindigkeit [ml/h]	Anzahl der Versuche	Versuch Nr.	NK-Zell-Ertrag	arithmetischer Mittelwert	Standardfehler	Standardabweichung	Minimum	1. Quartile	Median	3. Quartile	Maximum
1	IK	1	100	3	48	84,7%	70,6%	13,9%	24,1%	42,8%	63,6%	84,3%	84,5%	84,7%
					54	84,3%								
					44	42,8%								
2	IK	1	50	4	46	58,4%	47,0%	90,5%	18,1%	21,3%	34,4%	53,0%	59,6%	60,8%
					60	60,8%								
					42	47,6%								
					40	21,3%								
3	IK	5	100	3	47	73,5%	51,6%	13,1%	22,7%	28,2%	40,6%	53,0%	63,2%	73,5%
					53	53,0%								
					43	28,2%								
4	IK	5	50	4	59	44,1%	28,2%	8,9%	17,9%	6,5%	13,6%	31,2%	42,9%	44,1%
					45	41,6%								
					39	6,5%								
					41	20,7%								
5	MB	1	100	5	26	83,7%	81,4%	4,3%	9,7%	65,1%	81,1%	83,7%	88,2%	89,0%
					38	89,0%								
					24	65,1%								
					34	81,1%								
					50	88,2%								
6	MB	1	50	6	30	86,1%	69,8%	7,6%	18,6%	35,7%	67,3%	71,5%	86,1%	86,6%
					28	67,3%								
					36	73,7%								
					22	35,7%								
					32	86,6%								
					56	69,3%								
7	MB	5	100	5	25	84,8%	80,6%	3,1%	6,9%	69,1%	80,8%	81,5%	84,8%	86,8%
					37	81,5%								
					23	69,1%								
					33	86,8%								
					49	80,8%								
8	MB	5	50	6	27	49,8%	57,2%	8,7%	21,2%	27,5%	47,4%	53,0%	75,5%	86,9%
					29	47,4%								
					35	86,9%								
					21	27,5%								
					31	56,3%								
					55	75,5%								

Ergebnisse des NK-Zell-Ertrags (recovery) von allen Einzelversuchen und gruppiert nach Versuchskonfigurationen im direkten Vergleich. IK = NK isolation kit; MB = CD3 MicroBeads

Tab. 12: NK-Zell-Verlust in der Trennsäule

Versuchskonfiguration	Antikörper (AK)	AK-Menge [ml]	Auftragsgeschwindigkeit [ml/h]	Anzahl der Versuche	Versuch Nr.	NK-Zell-Verlust in der Trennsäule	arithmetischer Mittelwert	Standardfehler	Standardabweichung	Minimum	1. Quartile	Median	3. Quartile	Maximum
1	IK	1	100	3	48	7,9%	16,4%	6,8%	11,8%	7,9%	9,6%	11,4%	20,6%	29,9%
					54	11,4%								
					44	29,9%								
2	IK	1	50	4	46	16,1%	20,5%	3,2%	6,4%	15,9%	16,0%	18,3%	25,0%	29,4%
					60	20,5%								
					42	15,9%								
					40	29,4%								
3	IK	5	100	3	47	18,6%	31,4%	6,6%	11,4%	18,6%	27,0%	35,3%	37,8%	40,3%
					53	40,3%								
					43	35,3%								
4	IK	5	50	4	59	41,6%	39,9%	4,4%	8,9%	29,8%	33,5%	39,4%	46,3%	51,1%
					45	29,8%								
					39	51,1%								
					41	37,3%								
5	MB	1	100	5	26	7,1%	6,4%	1,9%	4,3%	3,0%	3,8%	4,6%	7,1%	13,5%
					38	3,8%								
					24	13,5%								
					34	4,6%								
					50	3,0%								
6	MB	1	50	6	30	8,5%	10,1%	2,3%	5,5%	3,7%	4,3%	10,4%	15,6%	16,5%
					28	15,6%								
					36	3,7%								
					22	16,5%								
					32	4,3%								
					56	12,2%								
7	MB	5	100	5	25	4,7%	7,1%	3,6%	8,1%	2,4%	2,8%	3,9%	4,7%	21,4%
					37	3,9%								
					23	21,4%								
					33	2,4%								
					49	2,8%								
8	MB	5	50	6	27	26,3%	14,9%	3,4%	8,3%	5,4%	6,2%	14,7%	22,0%	26,3%
					29	13,5%								
					35	5,4%								
					21	22,0%								
					31	6,2%								
	55	15,8%												

Ergebnisse des NK-Zell-Verlustes in der Trennsäule von allen Einzelversuchen und gruppiert nach Versuchskonfigurationen im direkten Vergleich. IK = NK isolation kit; MB = CD3 MicroBeads

Tab. 13: NK-Zell-Verlust durch die Spülung

Versuchskonfiguration	Antikörper (AK)	AK-Menge [ml]	Auftragsgeschwindigkeit [ml/h]	Anzahl der Versuche	Versuch Nr.	NK-Zell-Verlust durch die Spülung	arithmetischer Mittelwert	Standardfehler	Standardabweichung	Standardabweichung	Minimum	1. Quartile	Median	3. Quartile	Maximum
1	IK	1	100	3	48	3,2%	4,9%	1,6%	2,8%	2,8%	3,2%	3,3%	3,4%	5,7%	8,0%
					54	3,4%									
					44	8,0%									
2	IK	1	50	4	46	24,8%	15,5%	3,2%	6,4%	6,4%	10,7%	11,2%	13,4%	19,9%	24,8%
					60	10,7%									
					42	11,8%									
					40	15,0%									
3	IK	5	100	3	47	4,0%	6,9%	3,0%	5,2%	5,2%	3,9%	3,9%	4,0%	8,5%	12,9%
					53	3,9%									
					43	12,9%									
4	IK	5	50	4	59	12,3%	16,7%	3,8%	7,6%	7,6%	10,9%	11,6%	14,2%	21,9%	27,7%
					45	27,7%									
					39	10,9%									
					41	16,0%									
5	MB	1	100	5	26	6,5%	3,6%	0,9%	2,0%	2,0%	1,4%	2,1%	4,1%	4,1%	6,5%
					38	2,1%									
					24	1,4%									
					34	4,1%									
					50	4,1%									
6	MB	1	50	6	30	1,8%	10,0%	2,2%	5,4%	5,4%	1,8%	6,5%	10,9%	14,3%	15,4%
					28	15,4%									
					36	8,0%									
					22	13,9%									
					32	6,5%									
					56	14,3%									
7	MB	5	100	5	25	6,0%	3,5%	0,7%	1,7%	1,7%	2,0%	2,4%	2,7%	4,3%	6,0%
					37	2,7%									
					23	2,4%									
					33	2,0%									
					49	4,3%									
8	MB	5	50	6	27	16,6%	10,4%	1,9%	4,6%	4,6%	6,0%	6,3%	8,8%	15,8%	16,6%
					29	15,8%									
					35	6,0%									
					21	6,3%									
					31	8,7%									
					55	8,9%									

Ergebnisse des NK-Zell-Verlustes durch die Spülung von allen Einzelversuchen und gruppiert nach Versuchskonfigurationen im direkten Vergleich. IK = NK isolation kit; MB = CD3 MicroBeads

Tab. 14: NK-Zell-Reinheit mit dem „NK isolation kit“

Versuchskonfiguration	Antikörper (AK)	AK-Menge [ml]	Auftragsgeschwindigkeit [ml/h]	Anzahl der Versuche	Versuch Nr.	NK-Zell-Reinheit	arithmetischer Mittelwert	Standardfehler	Standardabweichung	Minimum	1. Quartile	Median	3.Quartile	Maximum		
1	IK	1	100	3	48	<b>75,2%</b>	83,6%	4,2%	7,3%	75,2%	81,5%	87,8%	87,8%	87,9%		
					54	<b>87,8%</b>										
					44	<b>87,9%</b>										
2	IK	1	50	4	46	<b>72,6%</b>	83,6%	38,9%	7,8%	72,6%	78,5%	85,4%	88,6%	90,8%		
					60	<b>90,8%</b>										
					42	<b>84,4%</b>										
					40	<b>86,4%</b>										
3	IK	5	100	3	47	<b>92,0%</b>	91,2%	0,5%	0,9%	90,3%	90,9%	91,5%	91,7%	92,0%		
					53	<b>91,5%</b>										
					43	<b>90,3%</b>										
4	IK	5	50	4	59	<b>94,4%</b>	88,1%	3,4%	6,7%	78,8%	83,5%	89,6%	92,7%	94,4%		
					45	<b>91,0%</b>										
					39	<b>78,8%</b>										
					41	<b>88,2%</b>										

Ergebnisse der NK-Zell-Reinheit mit dem NK isolation kit von allen Einzelversuchen und gruppiert nach Versuchskonfigurationen im direkten Vergleich. IK = NK isolation kit; MB = CD3 MicroBeads

## **Schriftliche Erklärung**

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zu Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

IMMUNOMAGNETISCHE T-ZELL-DEPLETION  
MIT MONOKLONALEN ANTIKÖRPERN  
BEI DER HERSTELLUNG VON NK-ZELL-PRÄPARATEN

im Zentrum der Kinderheilkunde und Jugendmedizin,

in der Klinik für Kinderheilkunde III: Hämatologie, Onkologie und Hämostaseologie,

unter der Betreuung und Anleitung von PD DR. D. SCHWABE

mit Unterstützung durch DR. U. KÖHL

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Frankfurt am Main, den 27. Mai 2004

---

## Curriculum Vitae

---

### Carsten Seckelmann

Euckenstrasse 5  
65929 Frankfurt am Main  
Telefon.: 069 - 37 00 37 30  
Email: [cseckelmann@web.de](mailto:cseckelmann@web.de)

---

### Zur Person:

Geburtsdatum: 20. Juni 1975  
Geburtsort: Lüdenscheid  
Familienstand: verheiratet  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

### Schule / Studium:

August 1982 – Juni 1986: GRUNDSCHULE BREITENHAGEN, Altena  
August 1986 – Juni 1995: BURGGYMNASIUM, Altena,  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife  
September 1995 – März 1996: Bibelstudium mit sozial-missionarischem Einsatz bei einer  
internationalen Missionsgesellschaft,  
JUGEND MIT EINER MISSION E.V., Nuneaton, England  
April 1996 – Mai 2003: Medizinstudium an der  
JOHANN WOLFGANG GOETHE UNIVERSITÄT, Frankfurt am Main  
seit August 2003: Arzt im Praktikum in den  
KLINIKEN DES MAIN-TAUNUS-KREISES, Bad Soden,  
Abteilung für Kardiologie unter der Leitung von PD Dr. Röhl

Frankfurt am Main, den 27. Mai 2004