

**Immuntherapie mit allogenen Natürlichen
Killerzellen bei pädiatrischen Patienten nach
Stammzelltransplantation: *In vivo* Monitoring
und Einfluss immunsuppressiver Therapie**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von

Claudia Brehm

aus Offenbach am Main

Frankfurt 2012

(D30)

Vom Fachbereich Biowissenschaften (15) der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz

1. Gutachter: Prof. Dr. Beatrix Süß

2. Gutachter: PD Dr. Ulrike Köhl

Datum der Disputation: 02.11.2012

Wichtig ist, dass man nicht aufhört zu fragen.
Albert Einstein

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Maligne Erkrankungen im Kindesalter	1
1.2. Hämatopoetische Stammzelltransplantation	3
1.2.1. Spenderauswahl – Die HLA-Barriere	4
1.2.2. Haploidente Stammzelltransplantation	5
1.2.3. Stammzellgewinnung und -aufbereitung	6
1.2.4. Immunologische Spender-Empfänger-Reaktionen	8
1.3. Immunsuppressive Therapie nach SZT	13
1.3.1. Mycophenolat-Mofetil	15
1.4. Das Immunsystem – Ein Überblick	18
1.5. Natürliche Killerzellen	19
1.5.1. NK-Zell-Rezeptoren und Signaltransduktion	21
1.5.2. NK-Zell-Effektormechanismen	25
1.5.3. Wirkhypothesen und Selbsttoleranz	27
1.6. Klinische Bedeutung von NK-Zellen	28
1.6.1. NK-Zell-Immuntherapien nach SZT	30
1.6.2. Klinische Phase I/II NK-Zell-Studie in Frankfurt a.M.	30
2. Zielsetzung	33
3. Patienten, Material und Methoden	34
3.1. Patienten	34
3.2. Material	36
3.2.1. Geräte und Software	36
3.2.2. Chemikalien, Medien, Puffer, Lösungen und Kits	37
3.2.3. Verbrauchsmaterialien	38
3.2.4. Zellkulturen	38
3.2.5. Antikörper	39
3.3. Methoden	41
3.3.1. Isolation und Aufreinigung primärer humaner NK-Zellen	41
3.3.2. Kultivierung und Expansion humaner Zellen	43
3.3.3. Herstellung und Verwendung der Mycophenolsäure-Lösung	44
3.3.4. Durchflusszytometrische Methoden	45
3.3.5. Zytokin- und Chemokin-Analysen	59

3.3.6.	Langzeit-Mikroskopie	60
3.3.7.	Statistik	60
4.	Ergebnisse	61
4.1.	Einfluss unstimulierter und IL-2 stimulierter NK-DLIs auf das Immunsystem	61
4.1.1.	Vergleich der Patientengruppen mit NK-DLI _{IL-2 stim} und NK-DLI _{unstim}	61
4.1.2.	Monitoring von NK-Zellen im peripheren Blut	66
4.1.3.	Monitoring Antigen-präsentierender Zellen, Granulozyten, B- und T-Zellen	71
4.1.4.	Monitoring der Zytokin- und Chemokin-Konzentration	73
4.1.5.	Fallbeispiel einer NK-DLI _{IL-2 stim} nach Zytokin-Entfernung	75
4.2.	Einfluss des Immunsuppressivums MMF auf die NK-Zell-Funktionalität . .	76
4.2.1.	Proliferation	76
4.2.2.	Zytotoxizität	80
4.2.3.	NK-Zell-Morphologie und -Mobilität	82
4.2.4.	Expression verschiedener Rezeptoren auf NK-Zellen	84
4.2.5.	Zytokin- und Chemokin-Sekretion	88
4.2.6.	Aktivierung und Hemmung intrazellulärer Signalmoleküle	90
5.	Diskussion	92
5.1.	Einfluss allogener NK-Zellen auf das Immunsystem	92
5.1.1.	<i>In vivo</i> Immunmonitoring nach NK-DLI	92
5.1.2.	Interpretation des selektiven Zellverlustes	93
5.2.	Einfluss immunsuppressiver Therapie auf die NK-Zell-Funktionalität	98
5.2.1.	Dosisabhängige, reversible Proliferationshemmung	99
5.2.2.	Einschränkungen der Effektorfunktion	100
5.2.3.	Einfluss von MPA auf das Rezeptorrepertoire und die NK-Zell- Mobilität	102
5.2.4.	Beeinflussung intrazellulärer Signalkaskaden und der Zytokin/Chemokin- Sekretion	105
5.3.	Schlussfolgerung für die klinische Anwendung	111
5.3.1.	Klinische Studien mit haploidenten NK-Zellen als Immuntherapie .	111
5.3.2.	Bewertung der Sicherheit der NK-Zell-Applikation	113
5.3.3.	Einschränkungen in der NK-Zell-Funktionalität	115
5.3.4.	Bewertung der Effektivität der Immuntherapie	117
6.	Ausblick	118
7.	Zusammenfassung	121

8. Literaturverzeichnis	123
9. Abbildungsverzeichnis	140
10. Tabellenverzeichnis	142
11. Abkürzungsverzeichnis	143
Anhang	148
A. CD-Nomenklatur	150
B. Zytokine und Chemokine	152
C. Publikationen und Kongressbeiträge	154
D. Danksagung	156
E. Eidesstattliche Erklärung	158
F. Lebenslauf	159
G. Langzeit-Mikroskopie Zeitrafferfilme	161

1. Einleitung

1.1. Maligne Erkrankungen im Kindesalter

In Deutschland wird jährlich bei etwa 1.800 Kindern und Jugendlichen eine maligne (lat. *malignus* = schlecht, bösartig) Krebserkrankung diagnostiziert. Dies entspricht einer jährlichen Inzidenz von 13 Erkrankungen bei 100.000 Kindern. Im Vergleich zum Erwachsenen sind Krebserkrankungen bei Kindern jedoch eher selten und machen nur 1 % aller Erkrankungen im Kindesalter aus. Dennoch stellen sie bis heute die zweithäufigste Todesursache bei Kindern und Jugendlichen dar [1, 2].

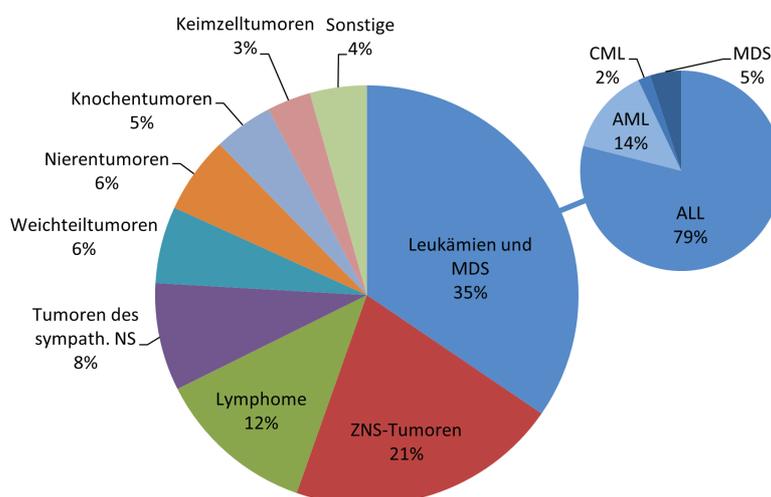


Abbildung 1.1: Häufigkeitsverteilung maligner Erkrankungen bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland. Im Jahresbericht 2010 des Deutschen Kinderkrebsregisters wurden 44.866 Erkrankungen bei Patienten unter 15 Jahren an insgesamt 83 deutschen Kliniken aus den Jahren 1980 bis 2008 zusammengefasst. Die häufigsten Krebserkrankungen sind Leukämien, ZNS-Tumoren und Lymphome. *Abkürzungen:* ALL: akute lymphatische Leukämie, AML: akute myeloische Leukämie, CML: chronische myeloische Leukämie, MDS: Myelodysplastisches Syndrom, sympath. NS: sympathisches Nervensystem, ZNS: zentrales Nervensystem (Eigene Abbildung in Anlehnung an das Deutsche Kinderkrebsregister) [1].

Etwa ein Drittel aller krebserkrankten Kinder in Deutschland leidet an Leukämie (▷ Abb. 1.1). Diese kann in eine akute und in eine chronische Form unterschieden werden, wobei die chronische Leukämie im Kindesalter eine eher untergeordnete Rolle spielt. Die überwiegende Mehrzahl der Kinder leidet an der schnell voranschreitenden, akuten Form der Leukämie [3]. Die akute lymphatische oder lymphoblastische Leukämie (ALL) ist eine maligne klonale Neoplasie (Neubildung, griech. *neo* = neu, *plastein* = formen) der frühen lymphatischen Vorläuferzelle und ist die häufigste Krebserkrankung im Kindesalter. Die aku-

1. Einleitung

te myeloische Leukämie (AML) entsteht durch eine maligne Transformation einer frühen myeloischen Vorläuferzelle und ist die deutlich seltenere, aber prognostisch ungünstigere Leukämieform bei Kindern. Während die ALL mit einer Inzidenz von 80 % im Vergleich zur AML die häufigste Leukämieform im Kindesalter darstellt, macht die AML einen Großteil der akuten Leukämien im Erwachsenenalter aus. Ebenfalls zu den hämatologischen, also das blutbildende System betreffenden, onkologischen Erkrankungen zählen die Lymphome, welche die drittgrößte Gruppe maligner Erkrankungen im Kindesalter repräsentieren. Sie werden in Hodgkin-Lymphome (auch Morbus Hodgkin genannt, MH) und Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) unterteilt und sind maligne Neoplasien des lymphatischen Gewebes. Des Weiteren treten auch maligne solide Tumoren des zentralen und sympathischen Nervensystems wie z. B. das Neuroblastom (NB), aber auch Weichteiltumoren wie das Rhabdomyosarkom (RMS) auf [4, 5].

Aufgrund der relativ geringen Inzidenz einzelner Krebserkrankungen bei Kindern werden diese in pädiatrisch-onkologischen Kliniken in Deutschland, Österreich und der Schweiz nach Therapieoptimierungsprotokollen der Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) behandelt [2]. Die verschiedenen Therapieprotokolle basieren dabei meist auf einer Kombination von Chirurgie, Radiotherapie und Chemotherapie. Patienten werden zudem erkrankungsspezifisch nach internationalen Therapieprotokollen unterschiedlichen Risikogruppen zugeordnet (*high-, middle-, low-risk*) und erhalten entsprechend intensive Therapieprotokolle. Am Beispiel der Leukämien erfolgt die Risikogruppenzuordnung unter Berücksichtigung von molekulargenetischen Abberationen, dem Therapieansprechen und dem Niveau an Resterkrankung (*minimal residual disease*, MRD) [6, 7]. Bei Kindern mit ALL betragen die Überlebensraten in Abhängigkeit der initialen Risikogruppe im Durchschnitt etwa 80 %, bei der AML liegen die Heilungsraten hingegen nur bei etwa 55 bis 60 % [8].

Ein weiteres Therapieelement zur Behandlung von malignen hämatologischen und onkologischen Erkrankungen kann zudem die Transplantation von hämatopoetischen (blutbildenden) Stammzellen darstellen, wodurch die Überlebenschance pädiatrischer Hochrisikopatienten erheblich verbessert werden konnte. Patienten mit Leukämien stellen dabei die größte pädiatrische Patientengruppe mit Indikation zu einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation dar. Auch Hochrisikopatienten mit malignen Lymphomen, Weichteil- und soliden Tumoren wie dem Neuroblastom werden häufig nach nicht kurativer Therapie und Rezidiv zur Therapieintensivierung nach einer Hochdosis-Chemotherapie mit hämatopoetischen Stammzellen transplantiert [9].

1.2. Hämatopoetische Stammzelltransplantation

Einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation (SZT) geht eine sog. Konditionierung – eine kombinierte Behandlung aus verschiedenen Chemotherapeutika, immunsuppressiven Medikamenten und ggf. einer Radiotherapie – zur Eliminierung der Tumorzellen voraus. Die Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen wird durchgeführt, um die Hämatopoese (Blutbildung) nach einer myeloablativen, d.h. einer knochenmark- und stammzelltoxischen Konditionierung, wieder aufzubauen (▷ Abb. 1.2) [5].

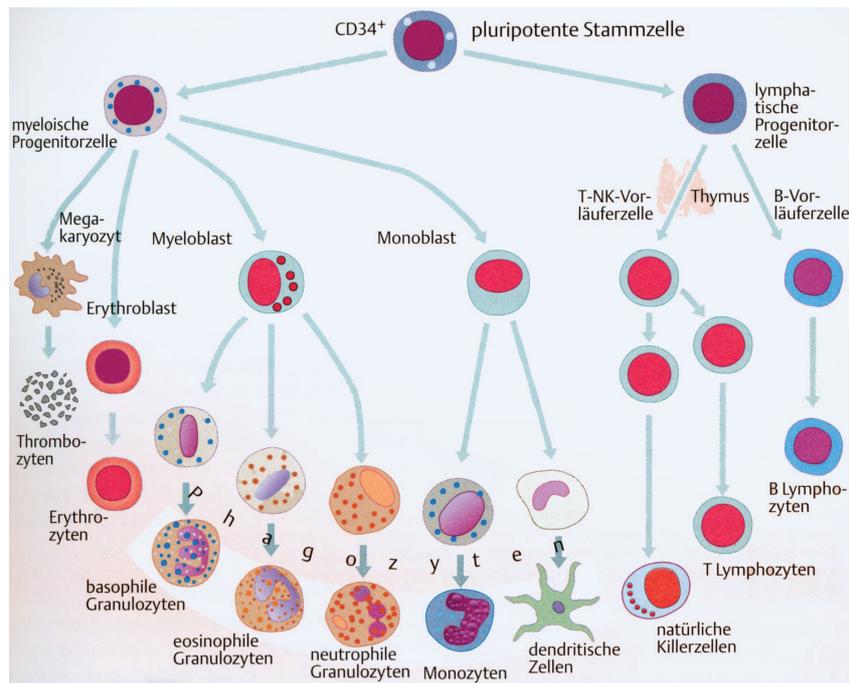


Abbildung 1.2: Hämatopoese. Bildung der Zellen des Blutes aus den pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark in die drei blutbildenden Zellreihen der Thrombozyten, Erythrozyten und die Gruppe der Leukozyten (Abbildung entnommen aus dem Taschenatlas der Immunologie, Thieme-Verlag, 2. Auflage 2006) [10].

Man unterscheidet zwischen einer autologen und allogenen Transplantation. Bei der autologen Transplantation (griech. *autós* = selbst) werden dem Patienten eigene hämatopoetische Stammzellen nach einer myeloablativen Konditionierung retransfundiert [11]. Die autologe SZT gewährleistet somit eine Rekonstitution der Hämatopoese, wodurch eine Dosisintensivierung der Chemo- bzw. Chemoradiotherapie (Hochdosistherapie) zur nachhaltigen Eradikation, also der vollständigen Eliminierung von Tumorzellen, erst ermöglicht wird [5].

Bei einer allogenen Transplantation (griech. *allos* = anders, verschieden) werden dem Patienten hingegen körperfremde hämatopoetische Spenderstammzellen appliziert. Hämatologische Erkrankungen wie Leukämien, bei denen die Malignität ihren Ursprung in

1. Einleitung

den hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark hat, bedürfen den Austausch durch neue, gesunde Spenderstammzellen. Die Myeloablation dient neben der Eradikation von Tumor- und Leukämiezellen und der Vermeidung einer Abstoßung des Transplantats durch Spenderlymphozyten auch dazu, „Platz“ für die Ansiedlung der gesunden hämatopoetischen Stammzellen des Spenders zu schaffen [11].

Nach erfolgter myeloablativer Konditionierung und hämatopoetischer SZT besteht in den ersten ein bis zwei Wochen beim Empfänger eine sog. Aplasie (griech. *aplastia* = Nichtausbildung) mit einhergehender Panzytopenie – dem Fehlen aller drei blutbildenden Zellreihen der Leukozyten, Thrombozyten und Erythrozyten. In den folgenden zwei bis drei Wochen beginnt die Neubildung des blutbildenden Systems aus den Stammzellen des Spenders, was durch steigende Zellzahlen der Neutrophilen, Monozyten, Lymphozyten, Thrombozyten und auch Erythrozyten im peripheren Blut gekennzeichnet ist [4]. Von einem *Engraftment*, dem Anwachsen des Transplantats, spricht man je nach Definition bei stabilen Werten neu gebildeter Leukozyten $> 1.000/\mu\text{l}$ und Thrombozyten $> 50.000/\mu\text{l}$ im peripheren Blut. Chimärismus-Analysen nach allogener SZT geben dabei anhand der Bestimmung des Anteils an Spender- und Empfängerzellen Auskunft über das *Engraftment* bzw. ein mögliches Transplantatversagen, ermöglichen aber auch die frühzeitige Erkennung eines Rezidivs. Erfolgt die gesamte Hämatopoese durch Spenderzellen wird von einem kompletten Chimärismus (*complete chimerism*, CC) gesprochen, während eine Koexistenz von hämatopoetischen Spender- und Empfängerzellen als gemischter Chimärismus (*mixed chimerism*, MC) bezeichnet wird [12, 13].

1.2.1. Spenderauswahl – Die HLA-Barriere

Bei allogenen Transplantationen sind Übereinstimmungen von spezifischen Gewebemerkmalen, den sog. Histokompatibilitätsantigenen oder *human leukocyte antigen* (HLA)-Molekülen, zwischen Spendern und Empfängern von entscheidender Bedeutung. Die HLA-Moleküle zeigen einen sehr hohen Polymorphismus, wodurch jeder Mensch durch ein individuelles Expressionsmuster ausgezeichnet wird. Es gibt zwei Klassen von HLA-Molekülen, die beide auf dem Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex (*major histocompatibility complex*, MHC) auf Chromosom 6 codiert sind und daher auch MHC-Moleküle genannt werden [4]. HLA-Klasse-I-Moleküle (HLA-A, HLA-B, HLA-C) werden von allen kernhaltigen Zellen und Thrombozyten mit Ausnahme von Trophoblasten exprimiert und präsentieren intrazelluläre körpereigene und körperfremde Antigene den CD8^+ zytotoxischen T-Zellen. HLA-Klasse-II-Moleküle (HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ) werden nur von Antigen-präsentierenden Zellen wie Monozyten/Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen exprimiert und präsentieren vorwiegend durch Phagozytose aufgenommenen extrazelluläre

Antigene den CD4⁺ Helfer-T-Zellen [14]. Da aufgrund des hohen Polymorphismus eine vielfältige Kombination der zahlreichen Allele an jedem Genlocus (HLA-A, -B, -C, -DR, -DP, -DQ) möglich ist, aber jedes Individuum nur je 2 Allele besitzt – je eins vom mütterlichen und eins vom väterlichen Chromosom codiert – ist die Suche nach einem „passenden“ Spender nicht immer erfolgreich [15].

Im Rahmen einer Gentypisierung werden die Merkmale HLA-A, -B, -Cw, -DRB1 und -DQB1 hochauflösend untersucht, d.h. es wird eine molekulargenetische Analyse der Allele auf vierstelligem Niveau durchgeführt (z. B. DRB1*1203). Eine Übereinstimmung zwischen Spender und Empfänger in allen 10 (2 × 5) vierstelligen Merkmalen wird als 10 von 10 (10/10) *Matching* bezeichnet [16]. Anhand der Übereinstimmung der HLA-Merkmale ergibt sich folgende Spenderhierarchie:

Tabelle 1.1: Spenderhierarchie nach HLA-Merkmalen [17].

<i>Matching</i>	Spender
1. 10/10	HLA-genomisch identer Geschwisterspender (<i>matched sibling donor</i> , MSD)
2. 10/10	HLA-phänotypisch identer Familien- oder Fremdspender (<i>matched family donor</i> , MFD / <i>matched unrelated donor</i> , MUD)
3. 9/10	HLA-identer Familien- oder Fremdspender (<i>matched family donor</i> , MFD / <i>matched unrelated donor</i> , MUD)
4. ≤ 8/10	HLA-haploidenter Familien- oder Fremdspender (<i>mismatched family donor</i> , MMFD / <i>mismatched unrelated donor</i> , MMUD)

1.2.2. Haploidente Stammzelltransplantation

Nur etwa 25 % der Patienten haben einen HLA-genomisch identen Geschwisterspender. Für weitere 50 bis 60 % kann innerhalb von drei Monaten ein HLA-phänotypisch identer Fremdspender in Spenderdatenbanken gefunden werden. Dennoch verbleiben etwa 15 bis 25 % der Patienten für die kein passender Spender zum Zeitpunkt der benötigten Transplantation verfügbar ist [18, 19]. In diesem Fall besteht die Möglichkeit Stammzellen eines nur zur Hälfte übereinstimmenden HLA-haplo(halb)identen Spenders zu transplantieren. Neben Geschwistern kommen hier meist die Eltern als Stammzellspender in Frage.

Haploidente Stammzelltransplantationen sind eine vielversprechende alternative Therapieoption für pädiatrische Hochrisikopatienten ohne passenden Stammzellspender, da für nahezu jeden Patient ein haploidenter Familienspender schnell und wenn nötig wiederholt verfügbar ist [16, 20]. Aufgrund der HLA-Disparität besteht allerdings die Gefahr von schwerwiegenden immunologischen Spender-Empfänger-Reaktionen (▷ Kapitel 1.2.4). Um

1. Einleitung

Abstoßungsreaktionen zu vermeiden, wird daher zum einen die Zahl der potentiell alloreaktiven T-Zellen im Transplantat massiv reduziert und zum anderen wird eine deutlich erhöhte Menge an Stammzellen transplantiert (Megadosis) [21]. Dennoch waren nahezu vollständig T-Zell-depletierte haploidente Transplantationen durch die Entfernung aller immunkompetenter Zellpopulationen häufig von einer späten Immunrestitution und einem hohen Infektionsrisiko begleitet [22–24].

In der in Frankfurt a. M. laufenden Studie „Allogene Stammzelltransplantation mit CD3/CD19-depletierten haploidenten Stammzellen bei pädiatrischen Patienten mit malignen und nicht malignen Systemerkrankungen“ (*Clinical Trials.gov* Nr. NCT 00945126) werden Patienten mit einer Megadosis von $> 7 \times 10^6$ /kg KG CD34⁺ Stammzellen und mit bis zu 1×10^5 /kg KG CD3⁺ residualen T-Zellen und anderen immunkompetenten Zellen wie NK-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen transplantiert [19, 25]. Residuale T-Zellen und vor allem alloreaktive NK-Zellen können sowohl gegen residuale Empfängerlymphozyten wirken (\Rightarrow Vermeidung der Transplantatabstoßung) als auch gegen residuale Leukämie- und Tumorzellen eine antitumorale Wirkung ausüben (\Rightarrow Förderung *Graft-versus-Leukemia/Tumor* (GvL/T) Effekt) [26, 27]. Da eine intensive Konditionierungstherapie häufig von einer erhöhten transplantationsbedingten Mortalität (*transplant-related mortality*, TRM) begleitet ist – einhergehend mit einer langen Aplasie, langsamen Immunrestitution und einer hohen Gefahr von Infektionen – wurden die Patienten mit einem *reduced-intensity conditioning regime* konditioniert. Diese dosisreduzierte Konditionierung, bestehend aus den Substanzen Melphalan, Thiotepa, Fludarabin und OKT3, führte zu einem schnelleren *Engraftment* und einer zügigen Immunregeneration bei geringerer Toxizität [28–30]. Um die haploidente SZT klinisch realisierbar zu machen, spielt vor allem das Verfahren der Transplantataufbereitung eine entscheidende Rolle.

1.2.3. Stammzellgewinnung und -aufbereitung

Neben der Isolierung von hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark und aus Nabelschnurblut hat die Gewinnung peripherer Blutstammzellen (*peripheral blood stem cells*, PBSC) in den letzten 15 Jahren zunehmend Anwendung gefunden. Durch subkutane Gabe des Wachstumsfaktors G-CSF (Neopogen[®]) kommt es zur Mobilisierung der Stammzellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut des Spenders. Somit wird ein 20- bis 100-facher Anstieg hämatopoetischer Stammzellen im peripheren Blut verursacht. Diese können mittels einer Leukapherese, d.h. einem Hinwegtragen (griech. *apherein*) des weißen (griech. *leukós*) Zellgutes, abgesammelt werden. Dabei werden bei sog. *large volume* Leukapheresen innerhalb von vier bis fünf Stunden ca. 20 Liter Blut des Spenders, was in etwa dem 3,5- bis 4-fachen Blutvolumen entspricht, in einen extrakorporalen ge-

geschlossenen Kreislauf geleitet. Mittels Dichtegradienten-Zentrifugation werden ein Teil der Spenderstammzellen und andere mononukleäre Zellen isoliert, während die übrigen Blutbestandteile und das Plasma dem Spender im Kreislauf wieder vollständig zurückgeführt werden. Bei erfolgreicher Stammzell-Mobilisierung und entsprechendem Körpergewicht-Verhältnis von Spender zu Empfänger wird somit in der Regel in ein bis zwei Leukapheresen eine ausreichende Menge an Stammzellen für die Transplantation gesammelt [31, 32]. Periphere Blutstammzellen in den gewonnenen Leukapherisaten können auf unterschiedliche Weise mittels Positiv- oder Negativselektion aufgereinigt werden. Bei der haploidenten SZT steht neben der Aufreinigung der Stammzellen vor allem die Entfernung bzw. die massive Reduktion der Spender-T-Zellen im Vordergrund, da diese eine schwerwiegende Transplantat-gegen-Empfänger Reaktion (*Graft-versus-Host-Disease*, GvHD) auslösen können. Dies erfolgt durch die Markierung zellspezifischer Oberflächenantigene mit murinen monoklonalen Antikörpern, die an superparamagnetische Eisen-Dextran-Partikel gekoppelt sind. Die immunomagnetische Isolation erfolgt über eine Selektionssäule, die sich im Feld eines Permanentmagneten befindet. Markierte Zellen werden somit zurückgehalten, während unmarkierte Zellen das Magnetfeld passieren können [33]. Für klinische Applikationen ermöglicht das CliniMACS-System der Firma Miltenyi Biotec eine nach EU-Richtlinien zugelassene, CE-zertifizierte Zellaufreinigung in einem geschlossenen sterilen System nach GMP-Bedingungen (*good manufacturing practice*, GMP).

Bei der CD34-Positivselektion werden Stammzellen mit Magnetpartikel-gekoppelten Antikörpern gegen das stammzellspezifische CD34 Oberflächenantigen markiert und mittels Immunmagnetisolation im Magnetfeld angereichert. Nach Eluierung der Selektionssäule wird bei der CD34-Selektion eine hohe Reinheit der Präparate von etwa 97% an CD34⁺ Zellen erzielt. Der Anteil an residualen T-Zellen ist extrem gering, wodurch eine Immunsuppression nach SZT entfällt [34]. Die CD3/CD19-Depletion ist eine Negativselektion bei der CD3⁺ T-Zellen und CD19⁺ B-Zellen direkt aus dem Transplantat depletiert, also entfernt werden. Durch Markierung der CD3 und CD19 Oberflächenantigene werden T- und B-Zellen im Magnetfeld zurückgehalten, während alle übrigen Zellen das Magnetfeld passieren und gesammelt werden können. T-Zellen werden zur Vermeidung der Entstehung einer GvHD entfernt, während durch Depletion der B-Zellen EBV (Epstein-Barr-Virus) assoziierte lymphoproliferative Erkrankungen vermieden werden. Zusammen mit den CD34⁺ Stammzellen und CD34⁻ Progenitorzellen verbleiben NK-Zellen, Antigenpräsentierende Zellen wie Monozyten und dendritische Zellen, Granulozyten aber auch residuale T-Zellen im Transplantat [35, 36]. Hohe Mengen an potentiell alloreaktiven NK-Zellen lassen dabei die Ausübung des GvL/T-Effekts im Patienten erhoffen. Eine erhöhte Anzahl an residualen T-Zellen kann hingegen mit schwerwiegenden immunologischen Spender-Empfänger-Reaktionen wie der Entstehung einer GvHD assoziiert sein.

1.2.4. Immunologische Spender-Empfänger-Reaktionen

Graft-versus-Host-Disease (GvHD)

Die *Graft-versus-Host* Erkrankung (*Graft-versus-Host-Disease*, GvHD) ist die häufigste Komplikation nach allogener hämatopoetischer SZT und stellt eine der Hauptursachen für eine transplantationsbedingte Mortalität dar. Dabei erkennen Spender-T-Zellen aus dem Transplantat die HLA-Moleküle des Empfängers als fremd und reagieren infolgedessen zytotoxisch gegen diese Zellen und Gewebe. Der Grad des HLA *Mismatch* korreliert dabei direkt mit dem Schweregrad der Immunreaktion. Das Auftreten einer GvHD selbst nach HLA-identer Transplantation kann dabei im Zusammenhang mit sog. Minor-Histokompatibilitätsantigenen stehen, die unabhängig von der HLA-Übereinstimmung ebenfalls zu Abstoßungsreaktionen führen können [11, 37, 38].

Klinisch unterscheidet man eine akute und chronische Form der GvHD. Die innerhalb der ersten 100 Tage nach SZT auftretende akute GvHD äußert sich primär durch Schädigungen der Haut (Exanthem bis hin zur Blasenbildung), des gastrointestinalen Trakts (Diarrhoe, Erbrechen) und der Leber (Hepatitis, Cholestase). Eine Manifestation nach dem Tag 100 wird als chronische GvHD bezeichnet und ist in ihrem eigenen klinischen Erscheinungsbild vielfältig mit einem autoimmunähnlichen Charakter. Betroffen ist neben Darm, Leber, Augen und Schleimhäuten auch die Haut, was häufig von einer leder- bzw. wachsartigen Hautveränderung (Sklerodermie) gekennzeichnet ist. Die chronische GvHD kann *de novo* oder auch aus einer persistierenden oder bereits abgeklungenen akuten GvHD entstehen. Dabei ist die beste Prophylaxe zur Vermeidung einer chronischen GvHD die Verhinderung bzw. die erfolgreiche Behandlung der akuten GvHD [11, 39]. Die akute GvHD wird nach dem Ausmaß der Toxizität der betroffenen Organe in Stadien eingeteilt, die den Schweregrad der GvH-Erkrankung definieren (> Tab. 1.2).

Tabelle 1.2: Einteilung der akuten GvHD nach Organtoxizität und Schweregrad [11, 40].

Einteilung nach Toxizität einzelner Organe			
Stadium	Haut	Leber	Darm
1	Exanthem <25 % der KOF	Bilirubin 2-3 mg/dl	Diarrhoe >500 ml/d
2	Exanthem 25-50 % der KOF	Bilirubin 3-6 mg/dl	Diarrhoe >1000 ml/d
3	Exanthem >50 % der KOF	Bilirubin 6-15 mg/dl	Diarrhoe >1500 ml/d
4	Blasenbildung	Bilirubin >15 mg/dl	Blutig/Ileus
Einteilung nach Schweregrad			
Grad	Haut	Leber	Darm
I	Stadium 1-2	—	—
II	Stadium 1-3 oder	Stadium 1 oder	Stadium 1
III	Stadium 2-3 oder	Stadium 2-3 oder	Stadium 2-3
IV	Stadium 2-4 oder	Stadium 2-4 oder	Stadium 2-4

Ileus = Darmverschluss (griech. *ileós* = einschließen), KOF: Körperoberfläche.

1.2. Hämatopoetische Stammzelltransplantation

Die Entstehung der akuten GvHD gliedert sich in drei Phasen. Die Konditionierung vor hämatopoetischer SZT, bestehend aus Chemo- und/oder Chemoradiotherapie, verursacht Gewebeschäden – speziell im gastrointestinalen Trakt des Empfängers. Die dadurch bedingte Zytokinfreisetzung führt zu einer Aktivierung von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ), die empfängereigene Antigene auf ihrer Zelloberfläche präsentieren. Nach SZT führt die Antigenpräsentation zu einer T-Zell-Aktivierung und Proliferation. Während der Effektor-Phase induziert die Zytokin-, Perforin- und Granzymfreisetzung und die Bindung von Todes-Rezeptor und -Ligand (z. B. Fas/FasL) die Auslösung der Apoptose der als „fremd“ erkannten Empfängerzellen. Dies entspricht im Fall einer Lyse von residuellen Tumorzellen des Patienten dem erwünschten GvL/T-Effekt. Wird jedoch gesundes Empfängerorgewebe angegriffen, kommt es zur Entstehung einer akuten GvHD, die primär in den Organen Haut, Darm und Leber lokalisiert ist (▷ Abb. 1.3) [39–41].

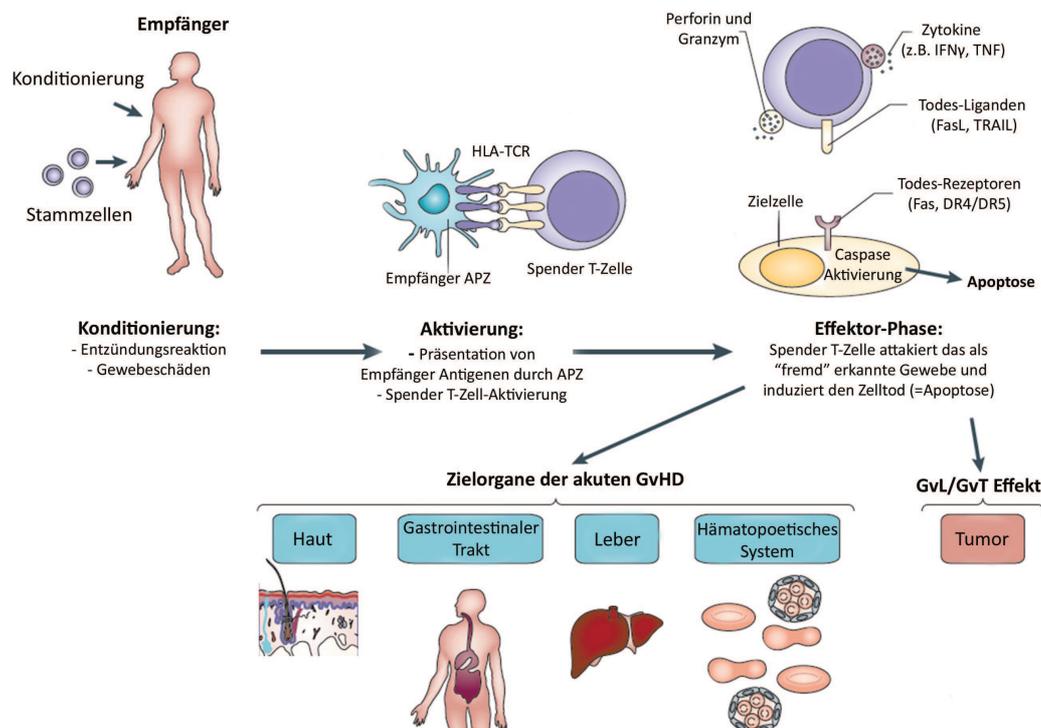


Abbildung 1.3: Pathophysiologie der akuten *Graft-versus-Host-Disease* (GvHD). Durch Gewebeschäden, die aufgrund einer intensiven Konditionierung entstehen können, kommt es zu einer Aktivierung der Empfänger-APZ, welche daraufhin Spender-T-Zellen aus dem Transplantat aktivieren und zur Proliferation anregen. Diese Effektor-Zellen attackieren sowohl Tumorzellen des Empfängers (\Rightarrow GvL/T-Effekt) als auch gesundes Gewebe der Haut, des Darms und der Leber sowie residuelle hämatopoetische Empfängerzellen (\Rightarrow GvHD). *Abkürzungen:* APZ: Antigen-präsentierende Zellen, GvL/GvT: *Graft-versus-Leukemia/Tumor* Effekt, HLA: Humanes Leukozyten Antigen, IFN: Interferon, TCR: T-Zellrezeptor, TNF: Tumornekrosefaktor (Abbildung entnommen und modifiziert aus Jenq und van den Brink, Nature Reviews Cancer 2010) [41].

Während die akute GvHD Grad I keiner Therapie bedarf, ist die GvHD \geq Grad III eine

1. Einleitung

schwere, lebensbedrohliche Erkrankung, die mit einer schlechten 5 bis 25 %igen Überlebensprognose assoziiert ist [39]. Zur GvHD-Prophylaxe und auch im Rahmen der Therapie werden die Patienten mit verschiedenen immunsuppressiven Medikamenten behandelt (▷ Kapitel 1.3). Dies beeinträchtigt jedoch die Funktion und Immunrestitution von sowohl T-Zellen als auch anderen Lymphozyten, wodurch das Risiko einer Infektion deutlich erhöht wird. Da alloreaktive Spender-T-Zellen im Rahmen einer GvHD nicht nur gesundes Fremdgewebe sondern auch residuale Tumorzellen des Empfängers als fremd erkennen und eradizieren (GvL/T-Effekt), kann eine kontrollierte GvHD \leq Grad II auch von therapeutischem Nutzen sein [42].

Graft-versus-Leukemia/Tumor Effekt (GvL/T)

Alloreaktive Spender-T-Zellen sind in der Lage residuale Leukämie- und Tumorzellen des Empfängers als fremd zu erkennen und zu eliminieren. Dies wird als der *Graft-versus-Leukemia/Tumor* (GvL/T) Effekt bezeichnet und spielt eine entscheidende Rolle auf dem Weg zur vollständigen Eradikation der Erkrankung. Unglücklicherweise sind es jedoch diese allogenen T-Zellen, welche auch gesundes Gewebe des Empfängers attackieren und so eine lebensbedrohliche GvHD auslösen können [42]. Dennoch wurden leichte GvH-Erkrankungen \leq Grad II mit einem besseren *Engraftment* und einem geringeren Rezidivauftreten beschrieben, was den engen Zusammenhang beider immunologischen Spender-Empfänger-Reaktionen verdeutlicht [43, 44]. Neben T-Zellen spielen hierbei besonders Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) eine entscheidende Rolle. Diese erkennen die HLA-Klasse-I-Moleküle der Spenderzellen mittels sog. Killer-Immunglobulin-ähnlichen Rezeptoren (*killer immunoglobuline-like receptor*, KIR). Der Mechanismus der potentiellen Alloreaktivität der NK-Zellen ergibt sich aus dem sog. „KIR-Liganden *Mismatch*“, also der fehlenden Übereinstimmung zwischen dem inhibierenden KIR der Spender-NK-Zellen und dem entsprechenden HLA-Klasse-I-Liganden der Empfängerzellen. Dieser Effekt lässt besonders im Rahmen der allogenen SZT – im Speziellen der haploidenten SZT, bei der nur die Hälfte der HLA-Moleküle zwischen Spender und Empfänger übereinstimmen – einen großen therapeutischen Nutzen erhoffen. So wurde in adulten Patienten mit myeloischer Leukämie bei haploidenter hämatopoetischer SZT in der KIR-Liganden *Mismatch* Situation ein deutlich verbessertes Überleben mit reduzierter Rezidiv- und Abstoßungsrate beschrieben [45].

Host-versus-Graft Reaktion (HvG)

Die *Host-versus-Graft* (HvG) Reaktion wird durch Empfängerlymphozyten induziert, welche die Konditionierungstherapie überlebt haben und nun die transfundierten Spender-

stammzellen aus dem Transplantat als fremd erkennen und abstoßen. Während die Transplantatabstoßung bei HLA-identen Transplantaten mit etwa 2% eher selten ist, haben HLA-differente Transplantationen ein Risiko von ca. 20 bis 30%. Speziell bei T-Zell-depletierten haploidenten Transplantaten ist das Risiko erhöht, da die Spender-T-Zellen für einen zytotoxischen Angriff gegen residuale Empfängerlymphozyten fehlen [11]. Weitere Risikofaktoren sind eine geringe Stammzellmenge im Transplantat, eine dosisreduzierte Konditionierung und eine GvHD-Prophylaxe nach SZT [46]. Die Transplantation von einer sog. Megadosis von etwa 7 bis 10×10^6 /kg KG Stammzellen hat Abstoßungsreaktionen bei der T-Zell-depletierten haploidenten SZT deutlich vermindert [21, 22]. In der in Frankfurt a. M. laufenden Studie „Allogene Stammzelltransplantation mit CD3/CD19-depletierten haploidenten Stammzellen bei pädiatrischen Patienten mit malignen und nicht malignen Systemerkrankungen“ wird eine Megadosis Stammzellen mit bis zu 1×10^5 /kg KG T-Zellen und einer hohen Menge an NK-Zellen transplantiert. Diese können gemeinsam sowohl gegen residuale Empfängerlymphozyten wirken als auch gegen residuale Leukämie- und Tumorzellen einen GvL/T-Effekt ausüben [19, 35, 47]. Ersten Anzeichen einer Abstoßungsreaktion, wie einem steigendem gemischtem Chimärismus, wird durch Herabsetzen der immunsuppressiven GvHD-Prophylaxe und der Gabe von Spender-T-Zell-Infusionen (*donor lymphocyte infusion*, DLI) entgegengewirkt. Zusammenfassend soll folgende Abbildung 1.4 die sensible Balance immunologischer Spender-Empfänger-Reaktionen und die damit verbundenen Risiken und Nutzen im Rahmen der allogenen SZT verdeutlichen.

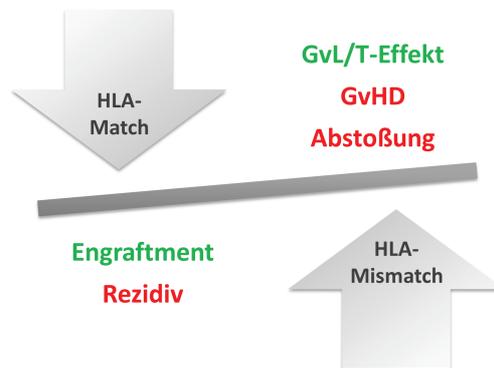


Abbildung 1.4: Immunologische Spender-Empfänger-Reaktion in Bezug auf das HLA-Matching. Eine erhöhte HLA-Inkompatibilität (*HLA-Mismatch*) führt zu einer Steigerung des gewünschten GvL/T-Effekts, bringt aber das Risiko einer GvHD und Transplantatabstoßung mit sich. Bei der HLA-identen (*HLA-Match*) Situation besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit des *Engraftments*, also des Transplantat-Anwachsens. Die HLA-Übereinstimmung bringt jedoch keinen GvL/T-Effekt gegen residuale Tumorzellen mit sich, wodurch die Gefahr eines Rezidivs erhöht wird. *Abkürzungen:* GvHD: *Graft-versus-Host-Disease*, GvL: *Graft-versus-Leukemia/Tumor*, HLA: Humanes Leukozyten Antigen (Eigene Abbildung).

1. Einleitung

Infektionen

Infektionen stellen eine der häufigsten schwerwiegenden Komplikationen mit Todesfolge nach hämatopoetischer SZT dar. In Folge des Fehlens aller immunkompetenten Leukozyten während der Aplasiephase, unmittelbar nach Konditionierung und SZT, sind die Patienten besonders anfällig für jedweder Art von Infektionen. Diese sind im Speziellen jegliche bakterielle Infektionen, *Aspergillus* spp. und *Candida* spp. Pilzinfektionen sowie Infektionen mit den zu der Familie der Herpesviridae gehörenden Viren HSV (Herpes-Simplex-Virus), CMV (Cytomegalievirus) und VZV (Varizella-Zoster-Virus). Dem soll im Rahmen einer umfassenden Infektionsprophylaxe entgegengewirkt werden. Dennoch tritt bei einem Großteil der Patienten während der Aplasie nach SZT Fieber auf [46, 48, 49]. Eine immunsuppressive Therapie zur GvHD-Prophylaxe nach SZT erhöht zudem das Risiko einer Infektion, da die Immunrestitution und Funktionalität vieler immunkompetenter Zellen, insbesondere der T-Zellen, massiv eingeschränkt wird.

1.3. Immunsuppressive Therapie nach SZT

Die immunsuppressive Therapie nach hämatopoetischer SZT verfolgt im Wesentlichen zwei Ziele. Zum einen soll eine Abstoßung der transfundierten Spenderstammzellen durch den Empfänger (HvG-Reaktion) verhindert werden. Zum anderen kann im Fall der haploidenten Transplantation mit T-Zell-depletierten Transplantaten mit Hilfe einer immunsuppressiven Therapie eine durch residuale Spender-T-Zellen verursachte GvHD prophylaktisch vermieden oder eine bereits induzierte akute oder chronische GvHD behandelt werden. Die Dosierung der immunsuppressiven Therapie im Rahmen der post-Transplantations GvHD-Prophylaxe kann ein entscheidender Faktor für den Therapieerfolg der SZT darstellen. Eine zu geringe Immunsuppression bringt die Gefahr einer lebensbedrohlichen GvHD mit sich. Ist die Intensität der immunsuppressiven Therapie jedoch zu stark, korreliert dies direkt mit einem massiv erhöhten Infektionsrisiko und einer verzögerten Immunrestitution (▷ Abb. 1.5) [50]. Zudem wird durch die Immun- und Knochenmarksuppression der antitumorale GvL/T-Effekt kompromittiert, wodurch sich die Gefahr eines Rezidivs entsprechend erhöht.

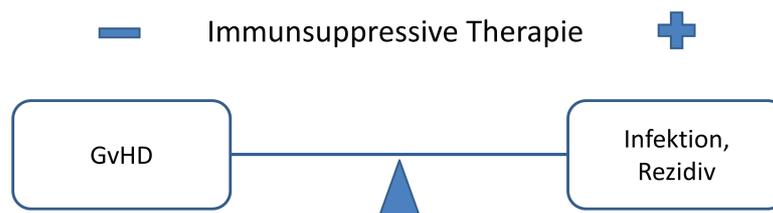


Abbildung 1.5: Die richtige Balance der Immunsuppression. Eine zu geringe Immunsuppression (–) ist von der Gefahr einer GvHD begleitet, während eine gegenteilige zu hohe Immunsuppression (+) das Immunsystem des Empfängers so weit kompromittiert, dass sowohl Infektionen begünstigt als auch das Risiko eines Rezidivs erhöht wird (Eigene Abbildung).

Zur Eliminierung residueller Spenderlymphozyten werden im Rahmen der Konditionierung monoklonale oder polyklonale Antikörper in Kombination mit hochdosierten Steroiden zur Prophylaxe von Transplantat-Abstoßungsreaktionen eingesetzt. OKT3 (Muromonab-CD3, Orthoclone OKT3®) ist ein muriner monoklonaler Antikörper gegen das CD3 Antigen (ϵ -Kette) des T-Zell-Rezeptors und führt zu einer raschen *in vivo* Depletion der CD3⁺ T-Zellen im Blut [10]. Polyklonale Antikörper wie ATG (Anti-Thymozytenglobulin) oder ALG (Anti-Lymphozytenglobulin) sind gegen eine Vielzahl von Oberflächenantigenen auf T-Zellen gerichtet, wodurch eine Funktionsmodulation und eine komplementvermittelte Lyse der T-Zellen induziert wird. Aufgrund von Homologien in den Oberflächenantigenen ist die Bindung jedoch nicht T-Zell-spezifisch, was auch eine Depletion von B-, NK- und dendritischen Zellen zur Folge hat [51].

1. Einleitung

Die GvHD-Prophylaxe bzw. -Therapie nach allogener hämatopoetischer SZT dient der Kontrolle der Aktivität und Proliferation von mit dem Transplantat verabreichten residualen Spender-T-Zellen, um schwerwiegenden Spender-Empfänger-Reaktionen entgegenzuwirken. Entsprechend des jeweiligen Therapieprotokolls werden die immunsuppressiven Medikamente einzeln oder in Kombination über unterschiedliche Zeiträume verabreicht. Im Folgenden werden die wichtigsten Immunsuppressiva kurz vorgestellt.

Zur Gruppe der Calcineurin-Inhibitoren gehören die Wirkstoffe Ciclosporin A (CsA) und Tacrolimus (FK 506) deren Wirkungsmechanismen auf einer Hemmung der Synthese von Interleukin-2 (IL-2) aber auch anderen Zytokinen und Chemokinen beruhen. Dies resultiert in einer Blockierung der Lymphozyten-Proliferation und -Aktivierung, aber auch in der Hemmung der T-Zell-vermittelten Immunantwort. Die Makrolidantibiotika Sirolimus (Rapamycin) und das halb-synthetische Derivat Everolimus gehören zu der Gruppe der mTOR-Inhibitoren. Die Inhibition der mTOR Kinase, welche eine zentrale Rolle in der Regulation der Zellproliferation ausübt, resultiert daher in einem komplexen antiproliferativen Wirkungsprofil [51]. Die große Gruppe der Antimetaboliten greift zu verschiedenen Zeitpunkten in den Replikationsprozess ein und hemmt die Zellproliferation. Alkylantien wie Cyclophosphamid führen zu einer Quervernetzung der DNA und verhindern so die im Lauf der Replikation notwendige Strangtrennung. Der Purinantagonist Azathioprin oder der Inhibitor eines zentralen Enzyms des *de novo* Purinbiosynthesewegs Mycophenolat-Mofetil (MMF) induzieren dabei eine Blockierung des Purin-Stoffwechsels, was sowohl eine Hemmung der Proliferation als auch eine Hemmung der Glykosylierung und Expression von Adhäsionsmolekülen zur Folge hat (▷ Kapitel 1.3.1) [52]. Die Wirkungsmechanismen von Corticosteroiden wie Methylprednisolon und Prednisolon sind divers und greifen auf vielfältige Weise in die zelluläre Immunreaktionen ein [10].

Die in dieser Arbeit beschriebenen Therapieprotokolle verwenden zur Konditionierung primär die Chemotherapeutika Fludarabin, Thiotepa und Melphalan in Kombination mit OKT3 (0,1 mg/kg KG, max. 5 mg/Tag, d -10 bis +3 nach SZT) oder ATG (insg. 60 mg/kg KG, d -4 bis -1) zur *in vivo* T-Zell-Depletion. Um daraus resultierende Zytokinbedingte Reaktionen zu vermeiden, werden dem Patienten über den Zeitraum der OKT3- bzw. ATG-Therapie zeitgleich hochdosierte Corticosteroide (Methylprednisolon, 2 mg/kg KG) verabreicht. Patienten mit CD3/CD19-depletierten haploidenten Transplantaten erhielten zudem zur Vermeidung einer GvHD das Immunsuppressivum MMF ab Tag -3 vor SZT in einer Tagesdosis von 30 mg/kg KG. Die MMF-Therapie wurde dem Bedarf individuell angepasst und entsprechend im Lauf der ersten Wochen bis Monate nach SZT reduziert, bzw. mit dem Erreichen von $100/\mu\text{l}$ CD3⁺ T-Zellen im peripheren Blut abgesetzt. Im Fall einer auftretenden GvHD wurde die Dosis ggf. erhöht (max. 2 g/Tag) und Corticosteroide (Prednisolon, 10 mg/kg KG) appliziert (▷ Diskussion, Abb. 5.2).

1.3.1. Mycophenolat-Mofetil

Mycophenolat-Mofetil (MMF, CellCept[®], Roche Pharmaceuticals) ist seit dem Jahr 1996 als Immunsuppressivum in Europa zugelassen. Im Gegensatz zu anderen Immunsuppressiva wie z. B. CsA zeigt die Behandlung mit MMF keine Neuro- oder Nephrotoxizität und ist primär von relativ milden gastrointestinalen und hämatologischen Nebenwirkungen begleitet [53, 54]. MMF wird nach oraler Verabreichung im Magen resorbiert und in den pharmakologisch aktiven Metaboliten Mycophenolsäure (*Mycophenolic acid*, MPA) umgewandelt. MPA wird in der Leber in die pharmakologisch inaktiven Abbauprodukte Mycophenolat-Glucuronid (MPAG) und 7-O-Glucosid und in das pharmakologisch aktive Acyl-Glucuronid metabolisiert. Da aus dem hepatisch sezernierten Hauptmetabolit MPAG erneut MPA gewonnen werden kann, spielt dieses eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des MPA-Plasmaspiegels (▷ Abb. 1.6). MPA ist zu 97 % an das Blutplasma-Protein Albumin gebunden, wobei nur proteinungebundenes freies MPA pharmakologisch aktiv ist [50, 51, 55].

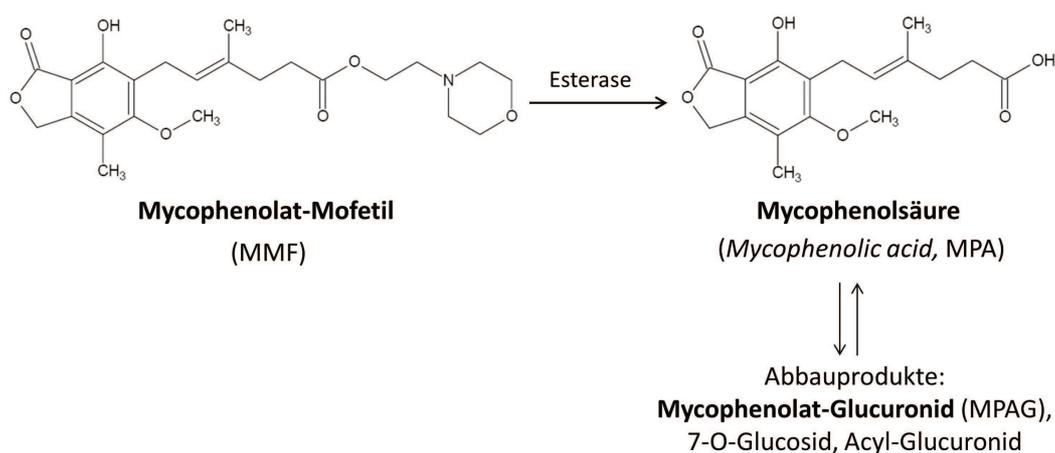


Abbildung 1.6: Chemische Struktur von Mycophenolat-Mofetil und Mycophenolsäure. Mycophenolat-Mofetil (MMF) wird durch Spaltung der Estergruppe zu dem aktiven Wirkstoff Mycophenolsäure (*Mycophenolic acid*, MPA) metabolisiert. MPA wird in die pharmakologisch inaktiven Abbauprodukte Mycophenolat-Glucuronid (MPAG) und 7-O-Glucosid und das aktive Acyl-Glucuronid metabolisiert, wobei aus MPAG erneut MPA synthetisiert werden kann (Eigene Abbildung in Anlehnung an Allison und Eugui, Immunopharmacology 2000) [56].

Mycophenolsäure ist ein halbsynthetisches Pilzderivat das erstmals im Jahr 1898 aus dem Pilz *Penicillium glaucum* isoliert wurde. MPA ist ein spezifischer, reversibler nichtkompetitiver Inhibitor der Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase (IMPDH) – eines der zentralen Enzyme der Purinbiosynthese. Der Purinmetabolismus basiert auf zwei Biosynthesewegen: dem „Salvage oder Cleavage Pathway“, bei dem Purinbasen durch Recycling von Nukleinsäuren entstehen, und dem „de novo Pathway“, der auf der Neugenerierung der

1. Einleitung

Nukleinsäuren basiert (▷ Abb. 1.7). Dabei sind zwei Schlüsselenzyme entscheidend bei der Aufrechterhaltung des Guanosin- und Adenosinnukleoid-Reservoirs beteiligt: die PRPP-Synthetase und die IMPDH. Während die meisten Zelltypen über beide Synthesewege ihre Nukleinsäuren erhalten, sind Lymphozyten vollständig von der Neugenerierung, also dem *de novo Pathway*, abhängig [57].

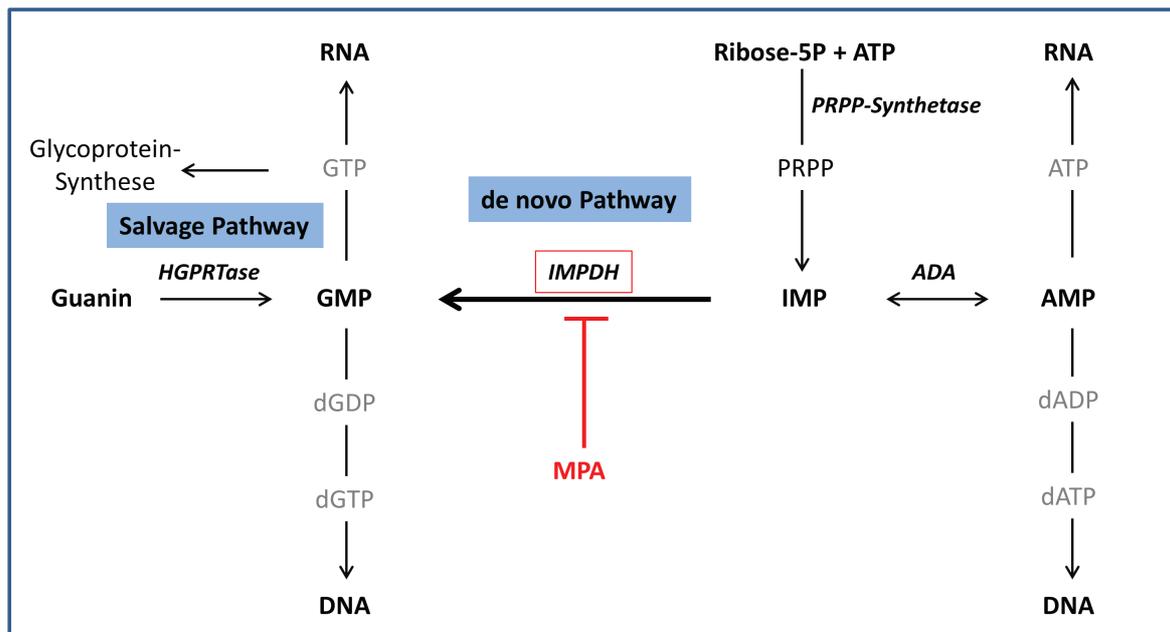


Abbildung 1.7: Purinbiosynthesewege. MPA hemmt das zentrale Enzym im *de novo Pathway* der Purinbiosynthese, die IMPDH. Somit kommt es zu einer Depletion von GMP, GTP und dGTP. Das andere geschwindigkeitsbestimmende Enzym, die PRPP-Synthetase, wird durch Adenosinnukleotide gehemmt und Guanosinnukleotide aktiviert. Durch ein Ungleichgewicht der Nukleotide und durch die Abhängigkeit vom *de novo Pathway* wird die Lymphozytenproliferation daher massiv gehemmt. *Abkürzungen:* ADA: Adenosindeaminase, ADP: Adenosin-Diphosphat, AMP: Adenosin-Monophosphat, ATP: Adenosin-Triphosphat, d: Desoxy-, DNA: Desoxyribonukleinsäure, GDP: Guanosin-Diphosphat, GMP: Guanosin-Monophosphat, GTP: Guanosin-Triphosphat, HGPRTase: Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase, IMP: Inosin-Monophosphat, IMPDH: Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase, MPA: Mycophenolsäure, PRPP: Phosphoribosylpyrophosphat, RNA: Ribonukleinsäure (Eigene Abbildung in Anlehnung an Allison und Eugui, Immunopharmacology 2000) [56].

Die Hemmung der IMPDH durch MPA hat eine Verminderung der Bildung der Guanosin-Phosphate GMP, GDP und GTP zur Folge. Dabei wird die IMPDH Typ-II-Isoform, die nur in aktivierten Lymphozyten exprimiert wird, 5-mal stärker durch MPA gehemmt als die Typ-I-Isoform, welche in den meisten anderen Zelltypen existiert. Daher und durch die vollständige Abhängigkeit von der *de novo* Purinbiosynthese hat MPA einen deutlich ausgeprägteren zytostatischen Effekt auf Lymphozyten als auf anderen Zellarten [56]. Dies führt selektiv in T- und B-Lymphozyten zu einer Hemmung der DNA- und RNA-Synthese, der Lymphozytenproliferation und der Antikörperproduktion, was die zentralen immunsup-

pressiven Wirkmechanismen von MPA darstellen [58]. Allison und Eugui *et al.* haben im Rahmen langjähriger Forschung beginnend im Jahr 1991 neben der antiproliferativen Wirkung auch zahlreiche andere Effekte von MMF auf T- und B-Lymphozyten beschrieben [52, 56, 58, 59]. So resultierte die MPA-bedingte Depletion von Guanodin-Nukleotiden in einer Hemmung des Fukose- und Mannose-Transfers auf diverse Glykoproteine, zu denen auch eine Reihe von Adhäsionsmolekülen zählen. Dies wurde sowohl in Lymphozyten als auch in Endothelzellen und Monozyten beschrieben [57, 60]. Des Weiteren wurde neben der zytostatischen Wirkung auch die Induktion von Apoptose in aktivierten humanen T-Zellen und T-Zelllinien beschrieben [61]. Zudem verursacht MMF eine selektive Hemmung der induzierbaren NO-Synthetase (iNOS) in aktivierten Makrophagen und Endothelzellen, wodurch die Reaktion von NO und Superoxid zu dem hochreaktiven Peroxynitrit unterdrückt wird und damit schwerwiegende Gewebeschäden während Entzündungsreaktionen reduziert werden [62]. Da eine verstärkte Aktivität der iNOS auch während Abstoßungsreaktionen beschrieben wurde, scheint MMF auch einer Transplantatabstoßung entgegenzuwirken. Der Einfluss von MMF bzw. MPA auf die dritte Lymphozyten Population – die NK-Zellen – ist jedoch bis heute weitestgehend ungeklärt und wurde im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht (▷ Kapitel 4.2).

Verschiedene Ansätze zum therapeutischen Monitoring ermöglichen die Bestimmung von freien und totalen MPA-Spiegeln im Patientenplasma. Die Sinnhaftigkeit eines pharmakokinetischen Monitorings von MPA-Plasmaspiegeln ist allerdings sehr umstritten und findet klinisch nur unregelmäßig Anwendung. Grund dafür ist die fehlende strenge Korrelation zwischen MMF-Dosis, MPA-Plasmaspiegeln und der Effizienz der Therapie. Zudem werden bis zu 10-fache inter- und intraindividuelle Variationen der AUCs (*area under the curve*) und Talspiegel bei identer MMF-Dosierung beobachtet. Auch beeinflusst die gleichzeitige Gabe von MMF mit anderen Immunsuppressiva signifikant die MPA-Plasmakonzentrationen (z. B. MMF+Tacrolimus → Anstieg MPA-Konzentration, MMF+CsA oder Steroide → Reduktion MPA-Konzentration) [50, 51]. Der Plasmaspiegel ist somit ein ungenügender prognostischer Faktor bezüglich der Effizienz oder zu erwartender Nebenwirkungen aber eine Methode zur Überprüfung der *Compliance*, also der konsequenten Einnahme des Immunsuppressivums [63].

1.4. Das Immunsystem – Ein Überblick

Das menschliche Immunsystem wird in zwei sich ergänzende Systeme unterteilt. Das angeborene oder natürliche unspezifische System, bestehend aus dem Komplementsystem und verschiedenen zellulären Effektorzellen wie den Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, dendritischen Zellen und NK-Zellen, vermittelt dabei eine sehr schnelle Abwehr gegen pathogene Erreger. Das adaptive erlernte Immunsystem, bestehend aus humoralen (lat. *humores* = Flüssigkeit) Bestandteilen wie den Antikörpern und den zellulären Komponenten der T- und B-Lymphozyten, reagiert hingegen langsamer, vermittelt aber dafür eine spezifische und langanhaltende Immunität (▷ Abb. 1.8) [64].

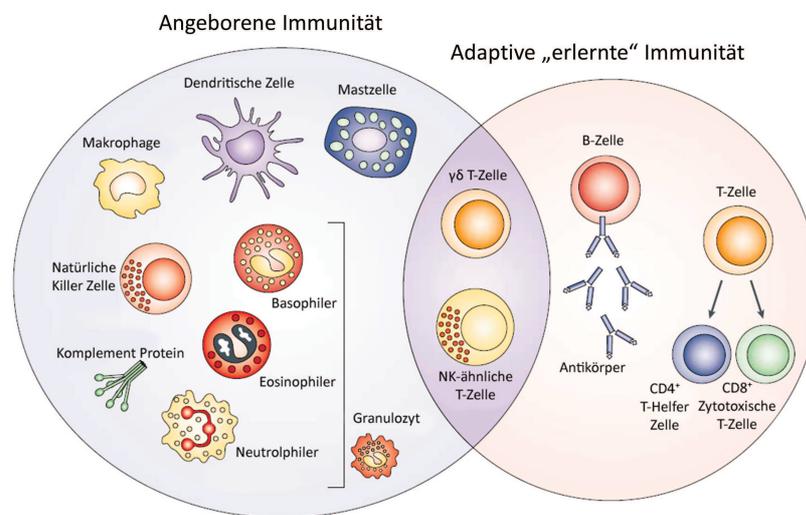


Abbildung 1.8: Angeborene und erlernte Immunität. Das angeborene Immunsystem reagiert innerhalb von wenigen Stunden auf eine Infektion, meist in Form von Lyse oder Phagozytose von Pathogenen. Es besteht aus löslichen Faktoren wie Komplement-Proteinen und aus diversen zellulären Komponenten wie Granulozyten (Neutrophile, Eosinophile, Basophile), Mastzellen, dendritischen Zellen, Monozyten/Makrophagen und den Natürlichen Killerzellen. Die in einigen Tagen bis Wochen entstehende aber langanhaltende adaptive erlernte Immunantwort wird durch Antikörper-produzierende B-Zellen, Helfer-T-Zellen und zytotoxische T-Zellen vermittelt. Zytotoxische NK-ähnliche T-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen beinhalten Funktionen beider Immunsysteme (Abbildung entnommen aus Dranoff *et al.*, Nature Reviews Cancer 2004) [64].

Die Phagozyten des angeborenen Immunsystems können Pathogene ohne eine vorherige Aktivierung erkennen und mittels Phagozytose aufnehmen und zerstören (griech. *phagein* = essen). Die Hauptpopulation der peripheren Blut Phagozyten, die Granulozyten, werden in die Hauptgruppe der Neutrophilen und die kleinen Untergruppen der Eosinophilen und Basophilen unterteilt. Die mononukleären Phagozyten werden je nach Lokalisation im Körper z. B. als Monozyten (peripheres Blut), Makrophagen (Gewebe und Organe) oder auch als Monoblasten (Knochenmark) bezeichnet. Die Gruppe der dendritischen Zellen (*dendritic cell*, DC) zählt zudem zusammen mit den mononukleären Phagozyten zu

den Antigen-präsentierenden Zellen (APZ). Dabei werden die nur etwa 0,1 % der Leukozyten ausmachenden zirkulierenden DCs des peripheren Blutes in plasmazytoide (pDC) und myeloide (mDC) DCs unterschieden. Dem Auswandern der APZ des angeborenen Immunsystems in die lymphatischen Organe folgt die Präsentation pathogener Antigene und somit die Induktion der spezifischen Immunantwort, welche durch die Zellpopulationen der B- und T-Lymphozyten gesteuert wird. Es folgt eine Antigen-spezifische klonale Expansion, was sowohl eine spezifische und effiziente Antwort als auch einen langanhaltenden Schutz durch Bildung einer Gedächtnisreaktion ermöglicht. Zytokine und Chemokine koordinieren dabei die Immunantwort durch Steuerung von Aktivierung, Differenzierung, Wachstum, Migration und Effektormechanismen der verschiedenen Zellen des angeborenen und erlernten Immunsystems in einem vielfältigem und komplexen Netzwerk [10, 14]. Details zu den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Zytokinen und Chemokinen sind im Anhang „Zytokine und Chemokine“ in Tabelle B.1 zu finden.

1.5. Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) gehören zusammen mit den B- und T-Zellen zu der Gruppe der Lymphozyten und werden dem angeborenen natürlichen Immunsystem zugeordnet. Sie umfassen etwa 10 bis 15 % der peripheren Blutlymphozyten und sind auch in Milz, Lunge, Leber, Uterus und vor allem in den Lymphknoten lokalisiert [65]. NK-Zellen und T-Zellen entstehen während der Hämatopoese aus einer gemeinsamen lymphoiden Vorläuferzelle und differenzieren sowohl im Knochenmark als auch in sekundären lymphatischen Organen wie Lymphknoten, Tonsillen und dem Thymus [66–68]. Im Unterschied zu T-Zellen können NK-Zellen über evolutionär hochkonservierte Rezeptorstrukturen virusinfizierte Zellen, Tumorzellen oder körperfremde Zellen ohne einen vorherigen Antigenkontakt eliminieren, was eine schnelle Immunreaktion ermöglicht. Während T-Zellen ihre Zielzellen durch die Expression von HLA-Molekülen auf der Zelloberfläche erkennen, welche pathogene Antigene präsentieren, vermitteln NK-Zellen die Zytolyse bei einem Fehlen oder einer fremden HLA-Expression. Um einer T-Zell-induzierten Immunantwort zu entkommen, reduzieren virusinfizierte Zellen und Tumorzellen häufig ihre HLA-Expression auf der Zelloberfläche. Diese veränderte HLA-Expression ist jedoch ein entscheidendes Signal zur Erkennung durch NK-Zellen, was die komplementäre Rolle von T- und NK-Zellen in der Immunantwort verdeutlicht [69].

NK-Zellen werden phänotypisch als $CD3^-CD56^+$ Lymphozyten charakterisiert und können durch das Vorhandensein und die Intensität der Expression der Oberflächenantigene CD56 und CD16 in zwei Hauptpopulationen unterschieden werden. Die $CD56^{\text{dim}}CD16^+$ Population hat vorwiegend zytotoxische Funktionen und stellt im peripheren Blut (PB) mit ca.

1. Einleitung

90 % die größte NK-Zellpopulation dar. Die übrigen 10 % umfassen die $CD56^{\text{bright}}CD16^{\text{dim/-}}$ NK-Zellpopulation, die durch eine potente Zytokinproduktion vorwiegend immunregulatorische Funktionen ausübt [70]. Beide Populationen exprimieren eine Vielzahl von Oberflächenmolekülen, die an Zielzellerkennung, Adhäsion, Chemotaxis und Zytotoxizität beteiligt sind und die unterschiedlichen Funktionen beider Subpopulationen widerspiegeln (▷ Abb. 1.9).

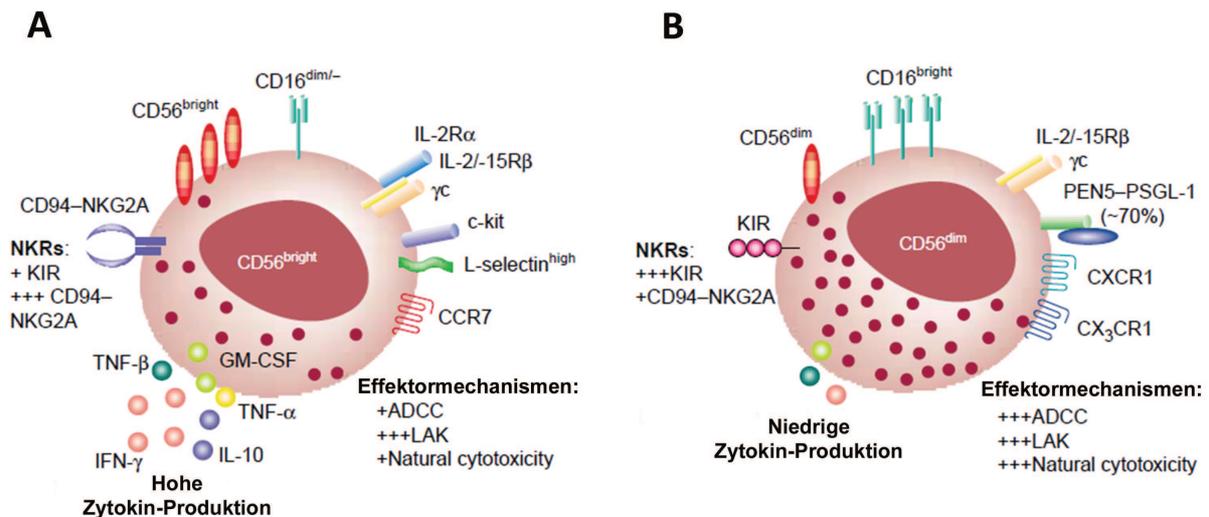


Abbildung 1.9: NK-Zell-Subpopulationen. Unterschiede in Rezeptorexpression, Effektormechanismen und Zytokin-Produktion der immunregulatorischen $CD56^{\text{bright}}$ und der zytotoxischen $CD56^{\text{dim}}$ NK-Zell-Population. **A)** $CD56^{\text{bright}}$ NK-Zellen: hohe Zytokin- und Chemokin-Produktion; immunregulatorische Funktionen; niedrige Expression von zytotoxischen Rezeptoren wie den Killer-Immunglobulin-ähnlichen Rezeptoren (KIRs) und dem $Fc\gamma$ -Rezeptor-III CD16; geringer Anteil lytischer Granula; Expression des L-Selektins CD62L und des Chemokin-Rezeptors CCR7 befähigt zum *Homing* in lymphoide Organe; Expression des hochaffinen IL-2 Rezeptors $IL-2R\alpha\beta\gamma$ ermöglicht starke Proliferation nach IL-2 Stimulation. **B)** $CD56^{\text{dim}}$ NK-Zellen: hohe KIR und CD16 Expression; vermehrtes Vorkommen lytischer Granula; dominante Rolle in der NK-Zell-Zytotoxizität; geringe Expression von CD62L und CCR7; geringe Zytokin-Produktion und Proliferationskapazität durch die Expression des schwach IL-2 affinen $IL-2R\beta\gamma$. *Abkürzungen:* ADCC: Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität, *lymphokine-activated killer* (LAK) Aktivität: Zytotoxizität nach Zytokinstimulation, *Natural cytotoxicity*: NCR-vermittelte natürliche Zytotoxizität (Abbildung entnommen aus Cooper *et al.*, TRENDS in Immunologie 2001) [70].

1.5.1. NK-Zell-Rezeptoren und Signaltransduktion

Die Regulierung der NK-Zell-Zytotoxizität erfolgt durch eine Balance von inhibierenden und aktivierenden Signalen, welche durch verschiedene Oberflächenrezeptoren vermittelt werden (▷ Abb. 1.10) [69]. Dabei kann primär zwischen drei großen Gruppen von Rezeptoren unterschieden werden.

- Die **Killer-Immunglobulin-ähnlichen Rezeptoren** (*killer-cell immunoglobulin-like receptor*, KIR) können aufgrund ihrer Funktion in inhibierende und aktivierende Rezeptoren unterteilt werden. Inhibierende KIRs haben je zwei bzw. drei Immunglobulin-ähnliche Domänen (D) und eine lange (L, engl. *long*) zytoplasmatische Domäne (KIR2DL, KIR3DL). Die Bindung von inhibierenden KIRs mit dem entsprechenden HLA-A, -B und -C Klasse-I-Molekül auf der Oberfläche der Zielzelle vermittelt bei korrekter „Selbst“-Erkennung eine Inhibierung der zytotoxischen Funktion. Aktivierende KIRs haben vorwiegend eine kurze (S, engl. *short*) zytoplasmatische Domäne (KIR2DS, KIR3DS). Da aktivierende KIRs eine geringere Affinität gegenüber den selben Liganden haben als inhibierende KIRs, spielen diese – soweit bisher bekannt – eine eher untergeordnete Rolle [71].
- Auch **C-Typ Lektin-Rezeptoren** können in inhibierende und aktivierende Rezeptoren unterschieden werden. Die inhibierenden CD94/NKG2A/B und aktivierenden CD94/NKG2C bzw. NKG2E/H Heterodimere erkennen nicht-klassische HLA-E Moleküle, welche mit Peptiden von klassischen Klasse-I-HLA-Molekülen beladen sind. Der als Homodimer vorkommende NKG2D Rezeptor ist einer der meist charakterisierten aktivierenden Rezeptoren. Die NKG2D Liganden MICA/B (*MHC class I chain-related antigens A/B*) und die UL-16-Bindeproteine 1–4 (*unique-long-16 binding protein*, ULBP) werden von stressinduzierten-, virusinfizierten- und Tumorzellen exprimiert [72, 73].
- Die **Natürlichen Zytotoxizitäts-Rezeptoren** (*natural cytotoxicity receptor*, NCR) NKp30, NKp44 und NKp46 haben aktivierende Funktionen und werden ausschließlich von NK-Zellen exprimiert. Die NCR-vermittelte Zytotoxizität kann zudem durch Zytokin-Stimulation deutlich erhöht werden [74]. Neben der Bindung von viralen Hämagglutininen sind weitere Liganden bisher noch unbekannt. Dennoch wird eine verstärkte Ligandenexpression auf transformierten Zellen vermutet, da NCRs eine wichtige Funktion in der NK-Zell-vermittelten Lyse diverser Tumorzellen zugeschrieben werden konnte [75, 76]. Der kürzlich beschriebene Ligand BAT3 auf der Oberfläche von Tumorzellen und unreifen DCs ist an der NKp30 vermittelten Lyse von unreifen DCs durch NK-Zellen beteiligt [77, 78].

1. Einleitung

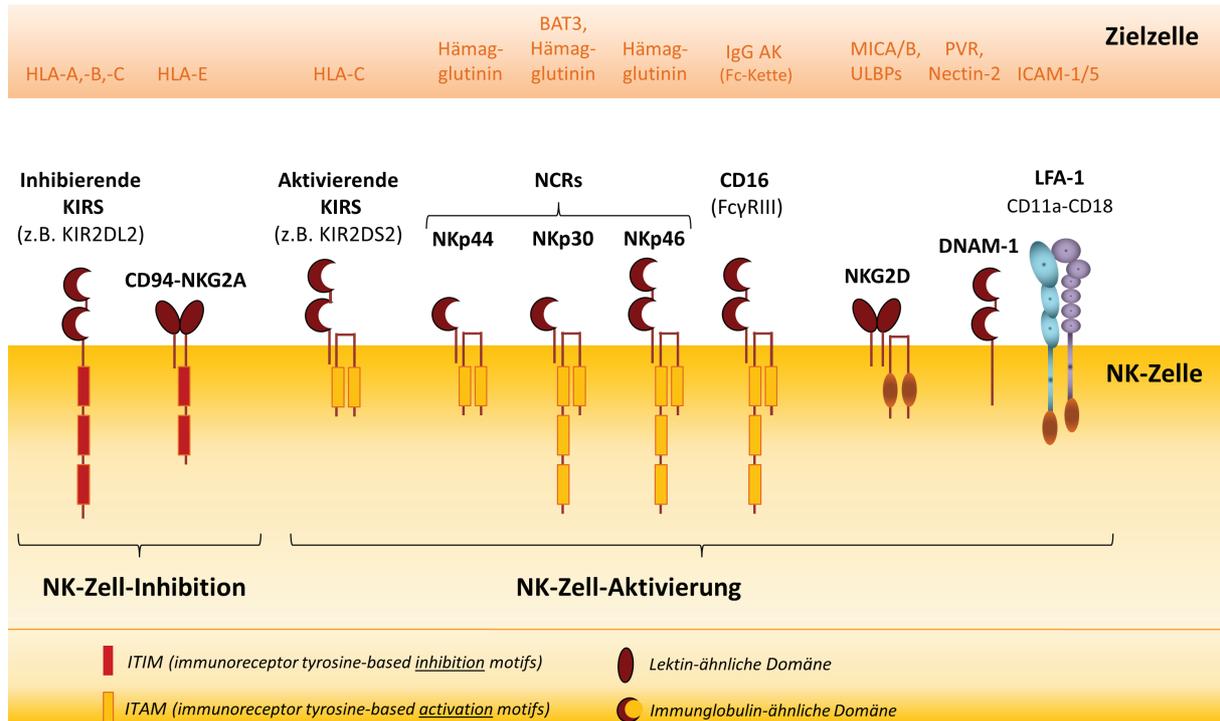


Abbildung 1.10: Aktivierende und inhibierende NK-Zell-Rezeptoren. Schematische Darstellung einiger inhibierender und aktivierender NK-Zell-Rezeptoren mit dem Schwerpunkt auf der nach Ligandenbindung induzierten Transduktion von aktivierenden Signalen. Durch Bindung der aktivierenden Rezeptoren mit dem entsprechenden Liganden auf der Zielzelle erfolgt die NK-Zell-Aktivierung, wodurch eine effektive Zielzellyse ermöglicht wird. Durch eine entsprechende Bindung inhibierender Rezeptoren wird diese NK-Zell-Aktivierung verhindert und die Selbsttoleranz gewährleistet. Abkürzungen wurden im Text erläutert außer PVR: Poliovirus Rezeptor (Eigene Abbildung) [72, 79–84].

Bei der Vermittlung aktivierender Signale spielen auch diverse Zelladhäsionsmoleküle eine wichtige Rolle. Das zur Familie der β_2 -Integrine gehörende Lymphozyten-Funktions-Antigen 1 (*lymphocyte function-associated antigen 1*, LFA-1), ein Dimer aus einer α_L (CD11a) und einer β_2 (CD18) Kette, bindet die breitexprimierten interzellulären Adhäsionsmoleküle ICAM-1 bis 5 (*intercellular adhesion molecule 1–5*) [82]. Interaktionen von LFA-1 mit ICAM sind dabei essentiell für die Ausbildung einer Immunologischen Synapse zwischen Effektor- und Zielzellen verantwortlich. Somit wird der nötige Zell-Zell-Kontakt vermittelt, der die Bindung von Rezeptor und Zielzellligand ermöglicht [85]. Die intrazelluläre Weiterleitung aktivierender Signale durch Integrine erfolgt meist im Zusammenspiel mit aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren oder Korezeptoren [86, 87]. So ist LFA-1 mit dem Leukozyten-Adhäsionsmolekül DNAM-1 (*DNAX accessory molecule-1 receptor*) assoziiert, welches an der Induktion von sowohl T- als auch NK-Zell-vermittelten zytotoxischen Aktivitäten beteiligt ist [87–89]. Auch wurde ein Zusammenhang von LFA-1 und dem Fc γ -Rezeptor III (CD16) an der gerichteten Degranulierung während der Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC) beschrieben [82].

Signaltransduktion

Die NK-Zell-Aktivierung erfolgt unter dem komplexen Zusammenspiel von aktivierenden und inhibierenden NK-Zell-Rezeptoren durch den Kontakt mit malignen Zellen und unter Einwirkung von Zytokinen. Dabei werden intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, die das Wachstum, das Zellüberleben, die Zytokin-Sekretion und die zytotoxische Aktivität der NK-Zelle regulieren [84]. Allgemein kann die Transduktion dieser diversen aktivierenden Signale über drei zentrale Signalkaskaden erfolgen. Diese werden im Folgenden kurz vorgestellt und sind in Abbildung 1.11 schematisch dargestellt. Die Signalkaskaden können sowohl durch eine Ligandenbindung aktivierender NK-Zell-Rezeptoren – auch im Zusammenspiel mit Zelladhäsionsmolekülen – aber auch durch die Zytokinbindung eines Zytokinrezeptors aktiviert werden.

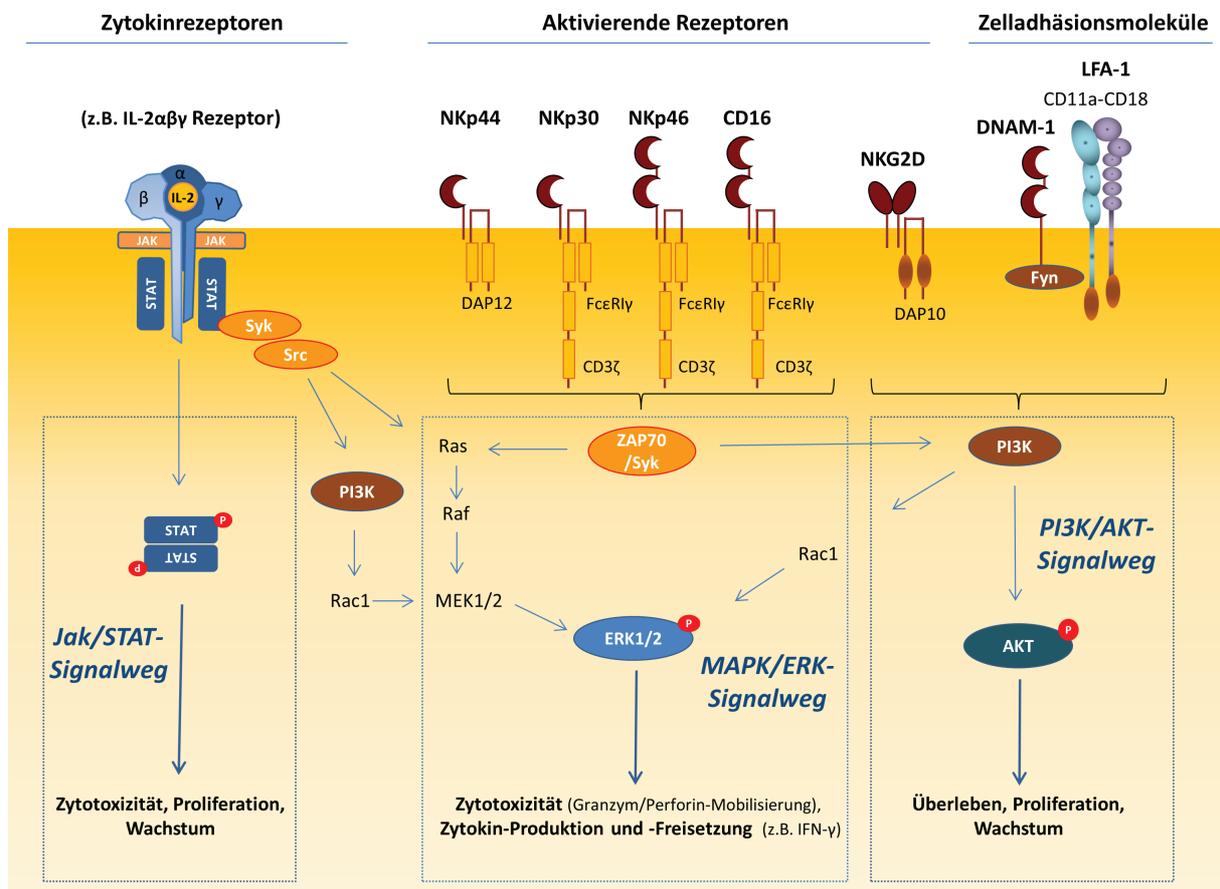


Abbildung 1.11: Schematische Darstellung der drei zentralen Signalkaskaden der NK-Zell-Aktivierung. Die Aktivierung von NK-Zellen erfolgt durch drei zentrale intrazelluläre Signalkaskaden: den Jak/STAT-Signalweg, den MAPK/ERK-Signalweg und den PI3K/AKT-Signalweg. Dies wird sowohl durch Zytokinbindung, wie hier am Beispiel des IL-2 Rezeptors gezeigt, als auch durch Ligandenbindung aktivierender Rezeptoren und Zelladhäsionsmoleküle vermittelt. Somit erfolgt die Regulierung der NK-Zell-Proliferation, des Wachstums, des Zellüberlebens sowie der zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen. Abkürzungen wurden im Text erläutert (Eigene Abbildung) [83, 84, 90–94].

1. Einleitung

Die Zytokinbindung an dem entsprechenden Zytokinrezeptor führt zur Aktivierung des **JAK/STAT-Signalwegs**, worauf die mit dem Zytokinrezeptor assoziierten Janus-Kinasen (z. B. Jak-1, -2, -3 und Tyk-2) aktiviert werden und bestimmte Tyrosin-Domänen des Rezeptors phosphorylieren. Diese dienen den im Zytosol konstitutiv vorkommenden monomeren STAT-Molekülen (*signal transducers and activators of transcription*, STAT) als Bindestelle, woraufhin die Tyrosin-Domänen (SH2-Domänen) der STAT-Moleküle ebenfalls phosphoryliert und diese somit aktiviert werden. Es folgt eine Dimerisierung der STAT-Moleküle und die Translokation in den Zellkern, wo sie als Transkriptionsfaktoren an die Promotorregion diverser durch Zytokine regulierte Gene binden und Zellprozesse wie Proliferation, Wachstum und Zytotoxizität regulieren [91]. Dabei steht z. B. STAT-3 im Zusammenhang mit T-Zell-Proliferation [95] und NK-Zell-Zytotoxizität [96], STAT-4 mit NK-Zell-spezifischer zytotoxischer Aktivität [92] und STAT-5 mit sowohl Proliferation als auch Zytotoxizität [91].

Der **MAPK/ERK-Signalweg** kann durch eine Vielzahl von Rezeptoren aktiviert werden, zu denen aktivierende NK-Zell-Rezeptoren, Integrine und Zytokinrezeptoren zählen. Die Signaltransduktion in NK-Zellen erfolgt durch evolutionär hochkonservierte zytoplasmatische Domänen der Rezeptoren. Aktivierende Rezeptoren, wie z. B. aktivierende KIRs, die NCRs (NKp30, NKp44 und NKp46) sowie der Fc γ -Rezeptor-III (CD16) vermitteln Signale durch *immunoreceptor tyrosine-based activating motifs* (ITAMs) des Adaptermoleküls DAP12, der CD3 ζ - und/oder der Fc ϵ RI γ -Kette an intrazelluläre Signalmoleküle [97]. Dabei kommt es zu einer Aktivierung der zur Gruppe der Src-Kinasen gehörenden Tyrosinkinasen, die Tyrosin-Domänen der ITAM Regionen aktivierender Rezeptoren phosphorylieren, was die Rekrutierung der zur Syk-Familie gehörenden Syk oder ZAP70 Kinase induziert [84]. Über diverse Zwischenschritte werden folgend die Proto-Onkogene Ras und Raf phosphoryliert. Dies führt zu einer Aktivierung der MAP-Kinase-Kinase MEK1/2 (*mitogen-activated protein kinase*, MAPK) und der MAP-Kinase ERK (*extracellular signal-regulated kinase*, ERK). Dabei stellen ERK1 und ERK2 Isoformen der klassischen MAP-Kinasen MAPK3 und MAPK1 dar. ERK kann daraufhin eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und so die Genexpression diverser Zielgene induzieren. Der MAPK/ERK-Signalweg reguliert dabei unter anderem den gerichteten Perforin/Granzym Granula-Transport in Richtung der Zielzelle und hat somit eine wichtige Position in der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität [94].

Der **PI3K/AKT-Signalweg** wird ebenfalls durch aktivierende NK-Zell-Rezeptoren, Integrine und Zytokinrezeptoren induziert. Die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) kann entweder wie von dem NKG2D Rezeptor-assoziierten Adaptermolekül DAP10 direkt gebunden und phosphoryliert werden [98] oder wie am Beispiel der DNAM-1- und LFA-1-vermittelten NK-Zell-Aktivierung durch eine zur Src-Familie gehörenden Kinase wie z. B.

Fyn phosphoryliert und somit aktiviert werden [88, 89]. Die PI3K aktiviert daraufhin die zentrale Proteinkinase AKT. Über den PI3K/AKT-Signalweg wird das Wachstum, die Proliferation sowie der Zellzyklus-Progress reguliert und durch die Hemmung einiger zentraler pro-apoptotischer Signale wirkt AKT zudem als einer der wichtigsten Mediatoren des Zellüberlebens [93]. Das Zellüberleben von NK-Zellen wird vor allem durch das Zytokin IL-2 gefördert. Zwar verfügt der IL-2 Rezeptor (IL-2R) nicht über eine direkte PI3K Bindestelle, die β -Untereinheit des IL-2 Rezeptors ermöglicht jedoch eine Bindung der Tyrosinkinase Syk [93]. PI3K kann aber auch über Rac1 die Aktivierung des MAPK/ERK-Signalwegs induzieren und somit neben dem Zellüberleben auch zytotoxische Funktionen vermitteln [83, 84].

1.5.2. NK-Zell-Effektormechanismen

NK-Zellen verfügen über verschiedene Effektormechanismen für eine potente Lyse von Zielzellen.

Perforin/Granzym

Neben zytotoxischen T-Zellen verfügen vor allem NK-Zellen über die Perforin/Granzym-vermittelte Zielzellyse, die durch unterschiedliche Stimuli ausgelöst werden kann. Dies ist der häufigste Weg der NK-Zell-vermittelten Zellyse. Nach der Zielzellerkennung durch Ligandenbindung aktivierender NK-Zell-Rezeptoren kommt es zu einer unmittelbaren Freisetzung intrazellulärer Granula (Exozytose), was in der Perforin/Granzym-vermittelten Zielzellyse resultiert. Dabei werden das porenformende Protein Perforin und die als Proteasen wirkende Granzyme (z. B. Granzym A und B) in den Spalt der immunologischen Synapse zwischen NK- und Zielzelle sekretiert. Die Perforinpore begünstigt den Eintritt der Granzyme ins Zellinnere woraufhin die Proteasen durch Aktivierung von Caspase-abhängigen und -unabhängigen Signalwegen die Apoptose der Zielzelle induzieren. Zudem ist auch eine Perforin-unabhängige Granzymaufnahme über den Mannose-6-Phosphat Rezeptor beschrieben worden (▷ Abb. 1.12 A) [99–101].

Todes-Rezeptor Signalweg (Fas-FasL)

Der Fas/Fas-Ligand-Signalweg ist ein Apoptose-induzierender Effektormechanismus, der von sowohl T- als auch von NK-Zellen genutzt wird. Fas-Ligand (FasL) gehört zu der TNF-Zytokin-Familie und wird von NK-Zellen, aktivierten T-Zellen, Makrophagen und Neutrophilen exprimiert. Der Fas-Rezeptor ist auf einer Vielzahl von Geweben präsent – vor allem während einer Entzündungsreaktion. Durch Bindung des auf der NK-Zelloberfläche membrangebundenen oder auch löslichen FasL (CD178) mit dem Fas-Rezeptor (CD95) der Zielzelle wird die Apoptose ausgelöst (▷ Abb. 1.12 B). Die Bindung von TRAIL (*TNF-*

1. Einleitung

related apoptosis-inducing ligand) mit dem TRAIL-Rezeptor (TRAILR, DR4/DR5) erfolgt nach dem gleichen Mechanismus [99].

IFN- γ Sekretion

NK-Zellen sezernieren eine Vielzahl von immunregulatorischen Zytokinen und Chemokinen, wie z. B. Interleukin (IL)-5, -6, -10, -13, Interferon- γ (IFN- γ), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF), Makrophagen inflammatorisches Protein-1 (MIP-1 α/β) und wirken so als wichtiges Bindeglied zum adaptiven Immunsystem. Dabei hat das Zytokin IFN- γ neben der Aktivierung von Helfer-T-Zellen und zytotoxischen T-Zellen diverse antivirale und antitumorale Funktionen. Dazu zählen z. B. antiangiogene Effekte aber auch die Induktion einer HLA-Hochregulation auf der Zelloberfläche der Tumorzelle, wodurch diese für die T-Zell-vermittelte Immunantwort angreifbar wird [81, 102].

ADCC

Die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (*antibody-dependent cell cytotoxicity*, ADCC) wird durch die Bindung von Fc γ -Rezeptor-tragenden Zellen und dem Fc-Teil von zellgebundenen IgG Antikörpern induziert. Die Erkennung einer durch IgG Antikörper markierten Zielzelle durch den von NK-Zellen exprimierten Fc-Rezeptor für IgG, Fc γ RIII (CD16), führt zur Aktivierung des Perforin/Granzym-Signalwegs, was folglich in der Perforin/Granzym-vermittelten Lyse der Zielzelle resultiert (\triangleright Abb. 1.12 C) [103].

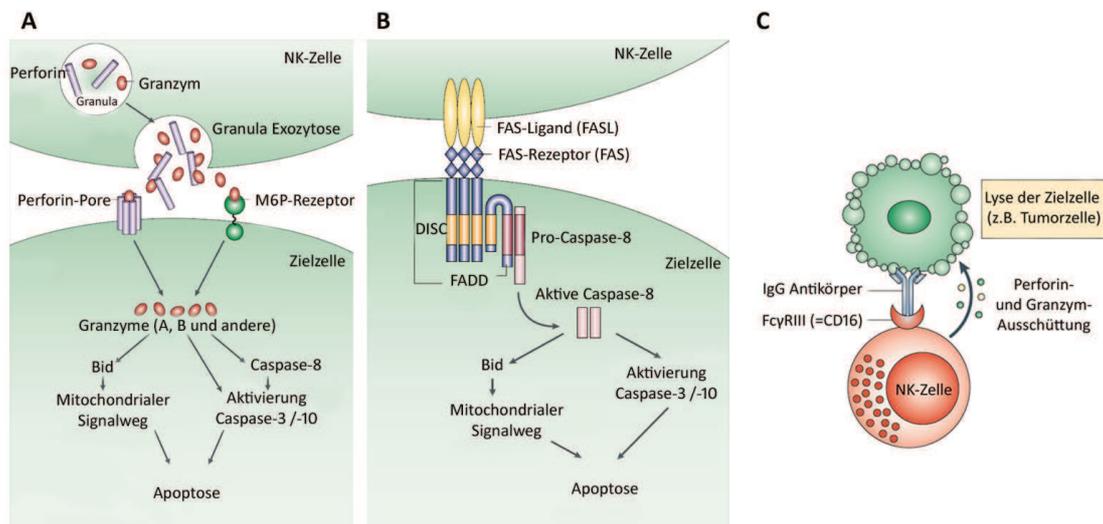


Abbildung 1.12: Zytolytische Signalwege der NK-Zelle und ADCC. A) Sekretorischer Perforin/Granzym-Signalweg. B) Nicht-sekretorischer Fas-FasL Signalweg. *Abkürzungen:* DISC: *death-inducing signalling complex*, FADD: *Fas-associated death-domain protein*, M6P: Mannose-6-Phosphat (Abbildung entnommen aus van der Brink und Burakoff, *Nature Reviews Immunology* 2002). [99] C) Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) durch Perforin- und Granzym-Sekretion (Abbildung entnommen aus Weiner *et al.*, *Nature Reviews Immunology* 2010) [103].

1.5.3. Wirkhypothesen und Selbsttoleranz

Es gibt verschiedene, sich zum Teil ergänzende Hypothesen zu den Wirkweisen von NK-Zellen. Die am weitesten verbreitete Wirkhypothese stellt die „Missing self“ Hypothese dar, die erstmalig von Kärre und Ljunggren Ende der 1980er Jahre formuliert wurde. Diese besagt, dass NK-Zellen durch ein Fehlen des entsprechenden inhibierenden NK-Zell-Liganden, also des körpereigenen HLA-Klasse-I-Moleküls, fremde oder entartete Zellen erkennen können. Demnach können Zellen mit reduzierter oder fehlender HLA-Klasse-I-Expression durch NK-Zellen lysiert werden [104, 105]. Doch allein das Fehlen des entsprechenden HLA-Klasse-I-Moleküls reicht nicht aus um eine NK-Zell-vermittelte Zytolyse zu induzieren. Es muss auch ein aktivierendes Signal, z. B. die Bindung eines von Tumorzellen exprimierten Liganden mit einem aktivierenden NK-Zell-Rezeptor, gegeben sein. Dabei können mehrere aktivierende Signale auch ein HLA-abhängiges inhibierendes Signal überwinden. Folglich wird die zytotoxische NK-Zell-Aktivität durch eine dynamische Balance von inhibierenden und aktivierenden Signalen gesteuert [69, 106].

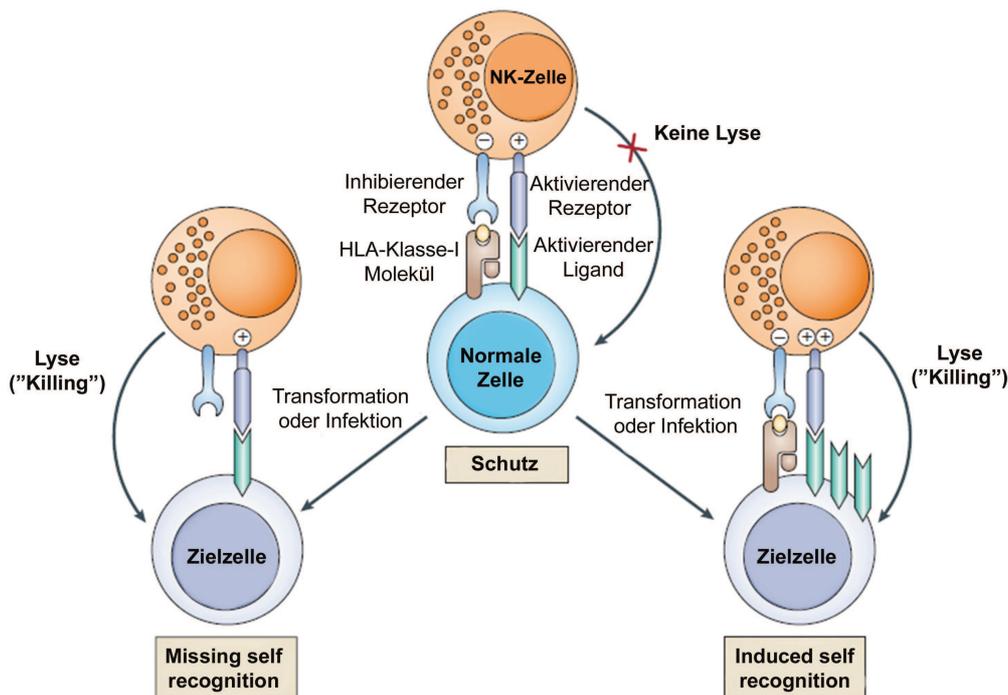


Abbildung 1.13: Die Balance inhibierender und aktivierender Signale. Gesunde Zellen sind vor einer NK-Zell-induzierten Lyse geschützt wenn eine ausgewogene Balance zwischen aktivierenden Signalen und durch HLA-Klasse-I-Moleküle vermittelten inhibierenden Signalen herrscht (→ Schutz). Eine Transformation oder Infektion resultiert häufig in einer reduzierten HLA-Klasse-I-Oberflächenexpression. Dadurch wird die Balance gestört und aktivierende Signale überwiegen, worauf die Zielzelllyse folgt (→ *Missing self recognition*). Auch aktivierende Liganden können im Lauf von Transformation oder Infektion überexprimiert werden. Überwiegen mehrere aktivierende Signale können diese auch ein HLA-abhängiges inhibierendes Signal überwinden (→ *Induced self recognition*) (Abbildung entnommen aus Raulet und Vance, Nature Reviews Immunology 2006) [107].

1. Einleitung

Mehrere Theorien befassen sich mit der Erklärung der Unterscheidung zwischen „selbst“ und „fremd“ und der Gewährleistung, dass körpereigene gesunde Zellen nicht angegriffen werden (sog. Selbsttoleranz). Nach der „*at least one*“ Theorie exprimieren NK-Zellen mindestens einen inhibierenden Rezeptor, der die Erkennung des körpereigenen HLA-Klasse-I-Moleküls und damit die Selbsttoleranz gewährleistet [108, 109]. Diese Theorie hat jedoch keine uneingeschränkte Wirksamkeit, denn verschiedene Studien haben gezeigt, dass sowohl eine kleine Subpopulation von humanen NK-Zellen existiert, die keinen inhibierenden Rezeptor tragen, als auch alle NK-Zellen in MHC-Klasse-I defizienten Mäusen, die demnach keinen inhibierenden Liganden exprimieren, keine gesteigerte Autoreaktivität aufwiesen [110, 111]. Im Gegenteil, diese NK-Zellen haben einen funktionell stark eingeschränkten Phänotyp, der als „*Hyporesponsiveness*“ bezeichnet wird. Die Entstehung dieser hyporeaktiven Zellen wird anhand verschiedener Theorien diskutiert. Nach der „*Licensing*“ Hypothese von Yokoyama *et al.* und Kim *et al.* benötigen NK-Zellen für die Entwicklung einer Reaktivität – und damit auch einer Selbsttoleranz – zu dem inhibierenden KIR auch das entsprechende HLA-Klasse-I-Molekül [112, 113]. Das heißt, nach diesem Model sind NK-Zellen die keinen inhibierenden KIR tragen auch nicht reaktiv, da eine Prägung oder „Lizenzierung“ im Lauf der NK-Zell-Entwicklung ausgeblieben ist. Raulet *et al.* gehen hingegen von einer sog. Entwaffnung, dem „*disarming*“, von bereits ausgereiften reaktiven NK-Zellen aus. Demnach ist in NK-Zellen ohne inhibierenden Rezeptor bzw. Liganden aber mit einer regulären Expression von aktivierenden Rezeptoren die Balance zwischen inhibierenden und aktivierenden Signalen derart gestört, dass die NK-Zellen durch diese Überstimulation einen Zustand der Anergie erlangen und ihre Reaktivität verlieren [107, 114]. Untersuchungen zu *ex vivo* Zytokin-stimulierten NK-Zellen zeigen hingegen, dass während der Stimulation der Anteil der KIR⁺ NK-Zell-Population zunimmt, diese aber dennoch im Vergleich zu unstimulierten NK-Zellen eine deutlich gesteigerte Zytotoxizität gegenüber malignen Zellen zeigen [115, 116]. Zusammenfassend sind Unterschiede in den Zytotoxizitätsmechanismen stimulierter im Vergleich zu unstimulierten NK-Zellen noch wenig erforscht.

1.6. Klinische Bedeutung von NK-Zellen

NK-Zellen haben in den letzten zehn Jahren sowohl im Rahmen der allogenen hämatopoetischen SZT als auch in zellulären Immuntherapien an klinischer Bedeutung gewonnen. Der Mechanismus, welcher der potentiellen Alloreaktivität zugrunde liegt, ergibt sich aus der fehlenden Übereinstimmung zwischen den inhibierenden Rezeptoren der Spender-NK-Zellen und den entsprechenden HLA-Klasse-I-Liganden der Empfängerzellen. Nach der *Missing self* Hypothese führt dieses Fehlen des korrekten inhibierenden Liganden zu

einer alloreaktiven Zielzellyse. Es wurde gezeigt, dass ein KIR-HLA-Liganden *Mismatch* zwischen NK- und Zielzelle eine Eliminierung der als fremd erkannten Leukämie- und Tumorzellen zur Folge hat [117, 118]. In der Situation der haploidenten SZT erhöht die nur halb-identische HLA-Klasse-I-Übereinstimmung zwischen Spender und Empfänger die Wahrscheinlichkeit eines KIR-Liganden *Mismatch*, was einen gesteigerten therapeutischen Nutzen erhoffen lässt. So wurde ein verbessertes Überleben mit reduzierter Rezidiv- und Abstoßungsrate speziell bei Patienten mit AML in der KIR-Liganden *Mismatch* Situation nach haploidenter SZT beschrieben [46, 117]. Ruggeri *et al.* wiesen einen positiven Einfluss auf das *Engraftment* und das Überleben der Patienten sowie eine ausgeprägte Killing-Aktivität gegen AML und CML Patientenblasten durch alloreaktive Spender-NK-Zellen im KIR-Liganden *Mismatch* nach, wobei nur eine Minderheit der ALL Blasten lysiert wurde [45]. So berichtet Ruggeri von einer Resistenz von ALL Blasten gegen alloreaktive NK-Zellen, wenn diese erniedrigte Level des auf hämatopoetischen Zellen vorkommenden Zelladhäsionsmoleküls LFA-1 auf ihrer Zelloberfläche exprimierten [45]. Leung *et al.* konnten hingegen bei pädiatrischen Patienten mit AML und ALL einen KIR-Liganden *Mismatch* induzierten GvL/T-Effekt und ein geringeres Rezidivrisiko aufzeigen [119]. Die höhere Sensitivität pädiatrischer ALL Blasten könnte im Zusammenhang mit einer, im Unterschied zu Blasten adulter Patienten, erhöhten Oberflächenpräsenz der Zelladhäsionsmoleküle LFA-1, LFA-3 und ICAM-1 stehen. Diese werden von Adhäsionsmolekülen der NK-Zellen gebunden, wodurch im Zusammenspiel mit aktivierenden Rezeptoren eine Zielzellyse induziert werden kann [88, 120]. Diese vielversprechenden Resultate waren jedoch bisher klinisch nicht uneingeschränkt reproduzierbar. So zeigten klinische Studien anderer Gruppen keinen positiven Effekt eines KIR-Liganden *Mismatch* auf das Überleben, die Rezidivrate oder eine GvHD-Entstehung nach hämatopoetischer SZT [121–124]. Dabei muss jedoch auch die enorme Heterogenität der verschiedenen Studien in Bezug zu Grunderkrankungen, Therapieprotokollen und der Transplantataufreinigung (z. B. unmanipuliert vs. T-Zell-depletiert) berücksichtigt werden.

Im Gegensatz zu T-Zellen scheinen sich NK-Zellen nicht gegen gesundes Empfängergewebe zu richten und lösen damit keine oder nur eine schwache GvHD aus. Dies vermag mit einer fehlenden Expression von aktivierenden NK-Zell-Liganden auf gesundem nicht-hämatopoetischem Gewebe im Zusammenhang zu stehen [125]. Die potente Eliminierung von residualen Tumorzellen – ohne die Gefahr der Auslösung einer schwerwiegenden GvHD – machen NK-Zellen daher zu einem vielversprechenden Werkzeug der adaptiven Immuntherapie.

1.6.1. NK-Zell-Immuntherapien nach SZT

Alloreaktive Spender-NK-Zellen könnten helfen durch die Eliminierung von residualen Empfängerlymphozyten eine Transplantatabstoßung (*Host-versus-Graft* Reaktion, HvG) zu vermeiden, das Risiko eines Rezidivs durch Lyse residualer Leukämie-/Tumorzellen zu verringern (GvL/T-Effekt) und der Entstehung einer GvHD entgegenzuwirken [126]. Dabei richten sich NK-Zellen gegen unreife aktivierte dendritische Zellen die im Lauf der Initialisierung einer GvHD eine zentrale Rolle bei der Aktivierung von Spender-T-Zellen durch Präsentation von Empfängerantigenen einnehmen [127, 128].

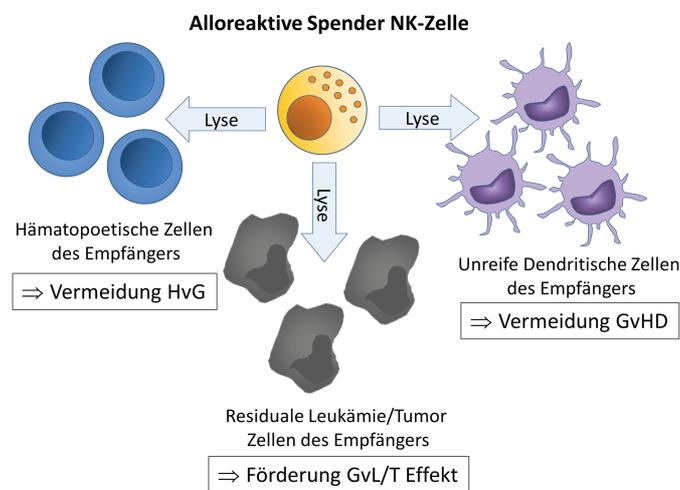


Abbildung 1.14: Mögliche Effekte von alloreaktiven NK-Zellen nach allogener SZT. Im Fall eines KIR-HLA-Klasse-I *Mismatch* nach allogener SZT könnten alloreaktive Spender-NK-Zellen dazu beitragen das Risiko eines Rezidivs, einer Transplantatabstoßung und einer GvHD deutlich zu reduzieren. *Abkürzungen:* HvG: *Host-versus-Graft* Reaktion, GvHD: *Graft-versus-Host-Disease*, GvL/T: *Graft-versus-Leukemia/Tumor* Effekt (Eigene Abbildung in Anlehnung an Velardi *et al.*, *TRENDS in Immunology* 2002) [126].

Ziel adoptiver Immuntherapien mit allogenen NK-Zellen ist es diese Effekte nach allogener SZT zusätzlich zu verstärken. Dazu werden in verschiedenen klinischen Ansätzen sowohl unstimulierte als auch durch *ex vivo* Zytokinstimulation expandierte und aktivierte Spender-NK-Zellen verabreicht oder werden im Rahmen einer *in vivo* Zytokinapplikation direkt im Patienten aktiviert und expandiert [129–132].

1.6.2. Klinische Phase I/II NK-Zell-Studie in Frankfurt a.M.

In der laufenden klinischen Phase I/II Studie in Frankfurt a. M. werden pädiatrischen Hochrisikopatienten zu drei Zeitpunkten nach haploidenter SZT hochaufgereinigte unstimulierte oder vorher durch eine *ex vivo* IL-2 Stimulation expandierte und aktivier-

te Spender-NK-Zellen verabreicht. Das Studienprotokoll der Studie „Immuntherapie mit Natürlichen Killerzellen zur Behandlung von Kindern mit malignen Erkrankungen nach HLA-haploidenter Stammzelltransplantation. Klinische Phase I/II Machbarkeits- und Toxizitäts-Studie“ (*Clinical Trials.gov* Nr. NCT 01386619) wurde in Kooperation mit Prof. Passweg (Basel, Schweiz) erstellt.

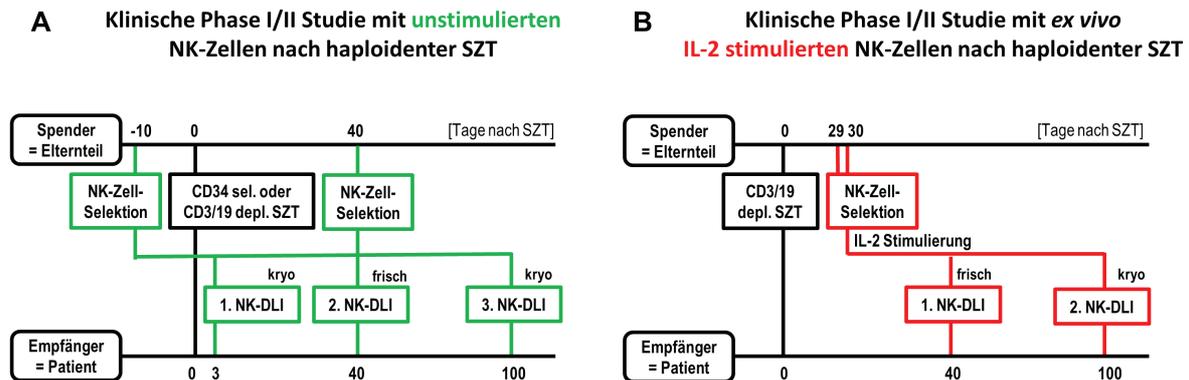


Abbildung 1.15: Studienprotokoll der klinischen Phase I/II NK-Zell-Studie. A) Studienprotokoll der Phase I/II Machbarkeits- und Toxizitäts-Studie mit unstimulierten NK-Zellen nach haploidenter SZT beginnend im Jahr 2003. B) Studienprotokoll der erweiterten Phase I/II Studie mit *ex vivo* IL-2 stimulierten NK-Zellen nach haploidenter SZT beginnend im Jahr 2007 (Eigene Abbildung in Anlehnung an Koehl *et al.*, Blood Cells, Molecules, and Diseases 2004 und an Hüenecke, Immuntherapie mit NK-Zellen nach Stammzelltransplantation, Südwestdeutscher Verlag für Hochschulschriften 2010) [129, 133].

Das primäre Ziel der Studie zu Spender-NK-Zell-Infusionen (*NK cell donor lymphocyte infusion*, NK-DLI) war es die Machbarkeit des Aufreinigungsprozesses und der *ex vivo* NK-Zell-Expansion unter GMP-Bedingungen zu zeigen. Sekundäre Ziele waren Untersuchungen zu einer potentiellen Toxizität und der Entstehung einer GvHD nach Applikation von hohen Dosen aufgereinigter NK-Zellen. Eingeschlossen in die Studie wurden pädiatrische Patienten mit malignen Erkrankungen wie Leukämien und Tumoren für die kein passender Stammzellspender verfügbar war und die folglich mit T-Zell-depletierten haploidenten Stammzellen eines Elternteils transplantiert wurden. Ausschlusskriterien waren ein Transplantatversagen oder das Vorliegen einer akuten oder chronischen GvHD vor der NK-DLI Applikation. Abbruchkriterien der Studie waren das Auftreten einer schweren GvHD \geq Grad III oder anderer Toxizitäten in mehr als drei Patienten.

Die NK-Zellen wurden aus nicht G-CSF-stimulierten Leukapherisaten der haploidenten Spender isoliert und immunomagnetisch mittels CD3-Depletion und folgender CD56-Selektion aufgereinigt. Die Zieldosis der NK-DLI lag bei 1×10^7 /kg KG NK-Zellen mit einem tolerierten Anteil von $\leq 1 \times 10^5$ /kg KG an residualen T-Zellen. Im ersten Teil der Studie erhielten die Patienten je eine unstimulierte NK-DLI an den Tagen +3, +40 und +100 nach SZT (\triangleright Abb. 1.15 A). Da die NK-Zell-Zytotoxizität durch Zytokinstimulation

1. Einleitung

deutlich gesteigert werden kann und dies eine Förderung des GvL/T-Effekts im Patienten erhoffen lässt [71, 81], wurden in der im Jahr 2007 erweiterten Phase I/II Studie die Spender-NK-Zellen vor Applikation 9 bis 14 Tage *ex vivo* mit dem für die klinische Applikation zugelassenen Zytokin Interleukin-2 (IL-2, Proleukin[®]) stimuliert. Die Patienten erhielten je eine IL-2 stimulierte NK-DLI am Tag +40 und +100 nach SZT (▷ Abb. 1.15 B). Dabei stand neben der Machbarkeit der *ex vivo* NK-Zell-Stimulation unter GMP-Bedingungen auch eine Aktivitäts- und Ertragssteigerung durch die Expansion im Vordergrund [134]. Auch sollten Einflüsse hinsichtlich einer potentiellen Steigerung des GvL/T-Effektes durch die Zytokinstimulation aber auch die Vermeidung einer GvHD untersucht werden [115, 129].

Durch den im Lauf der Studie vollzogenen Wechsel von CD34-selektierten zu CD3/CD19-depletierten Stammzellpräparaten wurden den Patienten sowohl deutlich erhöhte Mengen an NK-Zellen als auch an residualen T-Zellen mit dem Transplantat verabreicht. Um hinsichtlich der haploidenten HLA-Kompatibilität der Entstehung einer GvHD vorzubeugen, wurde das Immunsuppressivum Mycophenolat-Mofetil (MMF, Cellcept[®]) appliziert. Aufgrund der erhöhten NK-Zell-Menge im Transplantat und zur Vermeidung eines potentiell negativen Effekts von MMF auf die NK-Zell-Funktionalität wurde der frühe Zeitpunkt der ersten NK-Zell-Gabe an Tag +3 im zweiten Studienteil verworfen. Trotz stetiger Dosisreduktion war die Immunsuppression dennoch meist während der ersten klinischen NK-Zell-Applikation an Tag +40 und teilweise auch während der zweiten Applikation an Tag +100 nach SZT präsent.

2. Zielsetzung

Zelluläre Immuntherapien mit allogenen NK-Zellen können den GvL-/T-Effekt nach haploidenter SZT verstärken. In ersten Phase I/II Studien werden dabei sowohl unstimulierte als auch durch Zytokine aktivierte Spender-NK-Zellen verwendet. Es ist bekannt, dass der funktionale Einfluss der NK-Zellen durch die Zytokinstimulation verstärkt wird, jedoch gibt es bis heute kaum Daten über den Verbleib der transfundierten Zellen und den Einfluss der Immuntherapie auf zelluläre und humorale Komponenten des Immunsystems des Patienten. Des Weiteren ist noch unklar, ob eine immunsuppressive Therapie nach SZT die Funktionalität dieser hochaktivierten NK-Zellen beeinträchtigt und somit die Effektivität der Immuntherapie gefährdet. Im Rahmen einer in Frankfurt a. M. laufenden klinischen Phase I/II Studie mit unstimulierten und IL-2 stimulierten NK-Zellen (*NK cell donor lymphocyte infusion*, NK-DLI) sollen in dieser Dissertation folgende Ziele verfolgt werden:

- **Einfluss unstimulierter und IL-2 stimulierter NK-DLIs auf das Immunsystem der Patienten**

Im Rahmen eines *in vivo* Begleitmonitorings zu der klinischen NK-Zell-Studie soll hierbei der Einfluss sowohl auf zelluläre Komponenten des Immunsystems (Granulozyten, Monozyten, dendritische Zellen, T-, B- und NK-Zellen) als auch auf Zytokin- und Chemokin-Spiegel im peripheren Blut der Patienten vor und 10 min, 1 h, 4 h, 24 h nach NK-DLI untersucht werden. Im Speziellen soll mittels detaillierten phänotypischen Analysen die Verteilung der applizierten Spender-NK-Zellen aus der DLI und der endogenen patienteneigenen NK-Zellen vor und nach NK-DLI Applikation im peripheren Blut der Patienten bestimmt werden.

- **Einfluss des Immunsuppressivums MMF auf die NK-Zell-Funktionalität**

In *in vitro* Untersuchungen soll der Einfluss des Immunsuppressivums Mycophenolat-Mofetil (MMF) während der NK-Zell-Immuntherapie auf NK-Zellen ermittelt werden. Im Einzelnen soll ein potentieller Einfluss von MMF auf die Proliferation, Zytotoxizität, Rezeptor- und Zelladhäsionsmolekül-Expression, intrazelluläre Signalwege und die Zytokin- und Chemokin-Sekretion von NK-Zellen untersucht werden. Diese Analysen sollen beitragen das NK-DLI Therapieprotokoll für zukünftige NK-Zell-Studien zu optimieren.

3. Patienten, Material und Methoden

3.1. Patienten

Die klinische Studie „Immuntherapie mit Natürlichen Killerzellen zur Behandlung von Kindern mit malignen Erkrankungen nach HLA-haploidenter Stammzelltransplantation. Klinische Phase I/II Machbarkeits- und Toxizitäts-Studie“ wurde im Jahr 2003 nach Richtlinien der Ethikkommission des Frankfurter Universitätsklinikums zugelassen (Ethik-Referenz Nr. 262/03, *Clinical Trials.gov* Nr. NCT 01386619). Die Blutabnahmen zum Begleitmonitoring erfolgten nach schriftlicher Einverständniserklärung durch die Patienten und/oder Eltern oder Erziehungsberechtigten im Rahmen der Studienaufnahme.

Die Daten der Patienten, die unstimulierte NK-Zell-Infusionen (NK-DLI_{unstim}) erhalten haben (Patienten Nr. 1 bis 9) und derer, die mit IL-2 stimulierten NK-Zellen (NK-DLI_{IL-2 stim}) behandelt wurden (Patienten 8 bis 16), sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Enthalten sind Informationen zu Geschlecht, Alter, Körpergewicht, Diagnose, Konditionierung, Art der Stammzelltransplantation, GvHD, GvHD-Prophylaxe und aktuellem Status nach Transplantation.

Im Rahmen der Qualitätssicherung wurden am Ende des Herstellungsprozesses der IL-2 expandierten NK-Zell-Produkte Proben entnommen. Reste dieser Proben wurden für *in vitro* Untersuchungen zum Einfluss der immunsuppressiven Therapie auf die NK-Zell-Funktionalität verwendet. Daten der Patienten sind in Tabelle 3.2 dargestellt. Die Patienten 13 bis 15 wurden auch im Verlauf des Begleitmonitorings aufgeführt und sind daher zudem in Tabelle 3.1 erfasst. Patient Nr. 17 verstarb einen Tag vor der geplanten Gabe einer NK-DLI_{IL-2 stim} und die expandierten NK-Zell-Produkte wurden für Forschungszwecke freigegeben. Patient Nr. 18 wurde außerhalb des Studienprotokolls am Tag +119 nach SZT einmalig mit NK-DLI_{IL-2 stim} behandelt und ist daher nicht im Begleitmonitoring aufgeführt.

Tabelle 3.1: Daten der Patienten des *in vivo* Monitorings nach NK-DLI_{unstim} (Nr. 1–9) und NK-DLI_{IL-2 stim} (Nr. 8–16) Applikationen.

Nr.	Geschl., Alter	KG	Diagnose, Status	Konditionierung	SZT	GvHD- Prophylaxe	GvHD- Grad	Status post SZT
1	w, 9	21	ALL, CR2	F,T,M,OKT3	CD34	—	III-IV	+ 498 †, GvHD
2	m, 15	90	AML, NR	F,T,M,OKT3	CD34	—	—	+ 160 †, R, GF
3	w, 8	21	MH, PR	F,T,M,OKT3	CD34	—	I	+ 126 †, R
4	m, 23	50	ALL, CR2	F,T,M,OKT3	CD34	—	—	+2486, cCR
5	m, 22	62	RMS IV, NR	F,T,M,OKT3	CD3/19	MMF	IV	+ 233 †, R
6	m, 10	27	ALL, CR4	F,T,M,OKT3	CD3/19	MMF	II	+2402, cCR
7	m, 9	37	ALL, CR2	F,E,TBI,ATG	CD3/19	MMF	—	+ 259 †, R, TRM
8*	w, 18	49	NB IV, PR	F,T,M,OKT3	CD3/19	MMF	I	+1029, cCR
9*	m, 14	60	AML, NR	F,T,M,OKT3	CD3/19	MMF	I-II	+ 276 †, R
8*	w, 18	49	NB IV, PR	F,T,M,OKT3	CD3/19	MMF	I	+1029, cCR
9*	m, 14	60	AML, NR	F,T,M,OKT3	CD3/19	MMF	I-II	+ 276 †, R
10	m, 3	13	NB IV, CR2	F,T,M,OKT3	CD3/19	MMF	I	+ 184 †, R
11	m, 7	20	NB IV, CR2	F,T,M,OKT3	CD3/19	MMF	II	+1420, cCR
12	m, 8	22	NB IV, PR	F,T,M,OKT3	CD3/19	MMF	I-II	+ 198 †, TRM
13	w, 16	90	ALL, NR	F,T,M,OKT3	CD3/19	MMF	I	+ 373 †, R
14	w, 16	47	AML, NR	F,T,M,OKT3	CD3/19	MMF	—	+ 245 †, R
15	m, 15	51	AML, NR	F,T,Tr,ATG	CD3/19	MMF	—	+ 505, R
16	w, 1	7	AML, NR	F,T,Tr,ATG	CD3/19	MMF	—	+ 27 †, GF

ALL: Akute lymphatische Leukämie, AML: Akute myeloische Leukämie, ATG: Anti-Thymozytenglobulin, cCR: *continuous complete remission* (andauernde komplette Remission), CD34: CD34-selektionierte Stammzellen, CD3/19: CD3/CD19-depletierte Stammzellen, CR: *complete remission* (komplette Remission), E: Etoposid, F: Fludarabin, Geschl.: Geschlecht, GF: *graft failure* (Transplantatversagen), GvHD: *Graft-versus-Host Disease*, KG: Körpergewicht, m: männlich, M: Melphalan, MH: Morbus Hodgkin, MMF: Mycophenolat-Mofetil, NB: Neuroblastom, NR: *non remission* (keine Remission), OKT3: Muromonab-CD3/Orthoclone, PR: Partielle Remission, R: Rezidiv/Progress, RMS: Rhabdomyosarkom, SZT: Stammzelltransplantation, TRM: *treatment related mortality* (Therapieinduzierte Mortalität), T: Thiotepa, TBI: Total Body Irradiation, Tr: Treosulfan, w: weiblich, † verstorben, * diese Patienten haben unstimulierte und IL-2 stimulierte NK-DLIs erhalten (Stand 17.11.2011)

Tabelle 3.2: Daten der Patienten im Rahmen der *in vitro* Untersuchungen zum Einfluss von MMF auf die NK-Zell-Funktionalität.

Nr.	Geschl., Alter	KG	Diagnose, Status	Konditionierung	SZT	GvHD- Prophylaxe	GvHD- Grad	Status post SZT
13 [§]	w, 16	90	ALL, NR	F,T,M,OKT3	CD3/19	MMF	I	+ 373 †, R
14 [§]	w, 16	47	AML, NR	F,T,M,OKT3	CD3/19	MMF	—	+ 245 †, R
15 [§]	m, 15	51	AML, NR	F,T,Tr,ATG	CD3/19	MMF	—	+ 505, R
17	m, 4	14	NB IV, NR	F,T,Tr,OKT3	CD3/19	MMF	—	+ 70 †, R
18	m, 15	56	RMS IV, PR	F,T,M,OKT3	CD3/19	MMF	—	+ 238, cCR

ALL: Akute lymphatische Leukämie, AML: Akute myeloische Leukämie, ATG: Anti-Thymozytenglobulin, cCR: *continuous complete remission* (andauernde komplette Remission), CD34: CD34-selektionierte Stammzellen, CD3/19: CD3/CD19-depletierte Stammzellen, F: Fludarabin, Geschl.: Geschlecht, GvHD: *graft-versus-host disease*, KG: Körpergewicht, m: männlich, M: Melphalan, MMF: Mycophenolat-Mofetil, NB: Neuroblastom, NR: *non remission* (keine Remission), OKT3: Muromonab-CD3/Orthoclone, PR: Partielle Remission, R: Rezidiv/Progress, RMS: Rhabdomyosarkom, SZT: Stammzelltransplantation, T: Thiotepa, Tr: Treosulfan, w: weiblich, † verstorben, § Patienten sind auch in Tab. 3.1 aufgeführt (Stand 17.11.2011)

3.2. Material

3.2.1. Geräte und Software

Tabelle 3.3: Geräte und Software.

Bezeichnung	Hersteller
Analysewaage CP2201-OCE	Satorius, Göttingen (GER)
BD FACS Array™	BD Bioscience, San Jose (USA)
Brutschrank CO ₂ Inkubator BBD 6220	Heraeus, Hanau (GER)
CliniMACS® 3 S-R	Miltenyi, Langensfeld (GER)
Digitalkamera UC30 (0,1–0,5 s/Bild)	Olympus America, Center Valley (USA)
Durchflussszytometer FC500	Beckman Coulter, Krefeld (GER)
Durchflussszytometer NAVIOS	Beckman Coulter, Krefeld (GER)
Durchflussszytometer EPICS® XL™	Beckman Coulter, Krefeld (GER)
Gefrierschrank (–20 °C)	Liebherr, Ochsenhausen (GER)
Gefrierschrank Hera freeze (–80 °C)	Heraeus, Hanau (GER)
Hämatoszytometer Ac. T diff™	Beckman Coulter, Krefeld (GER)
Kühlschrank	Liebherr, Ochsenhausen (GER)
Lysegerät TQ-Prep™ Workstation	Beckman Coulter, Krefeld (GER)
Multipette® plus	Hirschmann, Eberstadt (GER)
Phasenkontrast- und Fluoreszenz-Mikroskop IX71	Olympus America, Center Valley (USA)
Phasenkontrast-Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss, Jena (GER)
Pipetus®	Hirschmann, Eberstadt (GER)
Pipetten Eppendorf Reference (10–1000 µl)	Eppendorf, Hamburg (GER)
Steril Tubing Welder TSCD-II	Terumo, Eschborn GER)
Sterilbank HERAsafe®	Heraeus, Hanau (GER)
The Big Easy silver magnet	Stemcell Technologies, Vancouver (CAN)
Tischzentrifuge MiniSpin®	Heraeus, Hanau (GER)
Vortexgerät Ika® MS1 Minishaker	IKA, Staufen (GER)
Zentrifuge Multifuge® 3 S-R	Heraeus, Hanau (GER)
Zentrifuge Multifuge® 4KR	Heraeus, Hanau (GER)
CXP System II (2.2)	Beckman Coulter, Krefeld (GER)
cellSens Dimension	Olympus America, Center Valley (USA)
FCAP Array™ (1.0.1)	BD Bioscience, San Jose (USA)
FlowJo (7.6.4)	Tree Star Inc., Ashland (USA)
GraphPad Prism (5.03)	GraphPad Software, San Diego (USA)
Microsoft® Office (2010)	Microsoft, Unterschleißheim (GER)
TeXnic Center (2.0 alpha 3)	Open Source Software
JabRef (2.6)	Open Source Software

3.2.2. Chemikalien, Medien, Puffer, Lösungen und Kits

Tabelle 3.4: Chemikalien, Medien, Puffer und Kits.

Produkt	Hersteller
7-AAD	Beckman Coulter, Marseille (FRA)
<i>Aqua ad iniectabila</i>	B. Braun, Melsungen (GER)
Biocoll Separating Solution	Biochrom AG, Berlin (GER)
CellTrace™ CFSE Proliferation Kit	Molecular Probes™, Eugene (USA)
Coulter Clenz®	Beckman Coulter, Marseille (FRA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Molecular Probes™, Eugene (USA)
DesoMed Rapid AF Schnelldesinfektion	Dr. Trippen GmbH, Freiburg (GER)
EasySep® Human NK Cell Enrichment Kit	Stemcell Technologies, Vancouver (CAN)
FACS Clean	BD Biosciences, San Jose (USA)
FACS Flow	BD Biosciences, San Jose (USA)
FCS (Fetal calf serum)	PAA Laboratories, Pasching (AT)
Flow-Check™ Fluorespheres	Beckman Coulter, Marseille (FRA)
Flow-Count™ Fluorespheres	Beckman Coulter, Marseille (FRA)
Humanes Plasma (HP)	DRK-Blutspendedienst, Frankfurt (GER)
Humanes Serum Albumin (HSA)	DRK-Blutspendedienst, Frankfurt (GER)
Human Soluble Protein Master Buffer Kit	BD Biosciences, San Jose (USA)
Immunoprep™ Reagent-System	Beckman Coulter, Marseille (FRA)
Immuno-Trol™ Cells	Beckman Coulter, Marseille (FRA)
IOTest®3 Fixative Solution (8% Formaldehyd)	Beckman Coulter, Marseille (FRA)
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Biochrome AG, Berlin (GER)
IsoFlow™ Sheat Fluid	Beckman Coulter, Marseille (FRA)
Methanol	Fluka, Sigma-Aldrich, Taufkirchen (GER)
Mycophenolic acid (MPA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (GER)
Octeniderm®	Schülke & Mayr, Norderstedt (GER)
PBS Dulbecco (ohne Ca+Mg)	PAA Laboratories, Pasching (AT)
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (GER)
Proleukin®S (Aldesleukin, IL-2)	Novartis Pharma, Nürnberg (GER)
Quantum™ Simply Cellular® anti-Mouse Kit	Bangs Laboratories, Fishers (USA)
RPMI 1640 + GlutaMAX™-I	Invitrogen, Paisley (UK)
VersaLyse™ Lysing Solution	Beckman Coulter, Marseille (FRA)
X-VIVO 10 (ohne Phenolrot)	Cambrex, Verviers (BEL)
X-VIVO 10 (mit Phenolrot)	Cambrex, Verviers (BEL)

3.2.3. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3.5: Verbrauchsmaterialien.

Produkt	Hersteller
Assay 96 Well Plate (Rundboden)	Becton Dickinson, Pont de Claix (FRA)
Auslaufpipetten (1, 2, 5, 10, 25, 50 ml)	Costar, New York (USA)
Cellstar Tubes, konisch (15, 50 ml)	Greiner Bio-One, Nürtingen (GER)
Tissue culture chamber/slides	Lab-Tek, Miles Scientific, Illinois (USA)
Cryo.s™ Einfrierröhrchen	Greiner Bio-One, Nürtingen (GER)
Drei-Wegehahn	MiroMed, Tuttlingen (GER)
Drei-Wegehahnbank	MiroMed, Tuttlingen (GER)
Eppendorf Gefäß (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg (GER)
FACS-Röhrchen (5 ml, 75 × 12 mm)	Sarstedt, Nürnberg (GER)
Heidelberger Verbindungen (Luer-Lock)	MiroMed, Tuttlingen (GER)
Mikroröhre (0,5 ml)	Sarstedt, Nürnberg (GER)
Polystyrene Round-Bottom Tubes (14 ml)	Becton Dickinson, Pont de Claix (FRA)
Pipettenspitzen TipOne Filter Tips (10–1000 µl)	Starlab, Ahrensburg, GER
Zellkulturbeutel VueLife™	CellGenix Technology, Freiburg (GER)
Zellkulturflaschen Cellstar® (25, 75, 175 cm ²)	Greiner Bio-One, Nürtingen (GER)
Zellkulturflaschen ® (12,5 cm ²)	Becton Dickinson, Pont de Claix (FRA)

3.2.4. Zellkulturen

Tabelle 3.6: Zellkulturen.

Zelle	Beschreibung	Morphologie	Quelle
Primäre Zellen	Humane NK-Zellen	Zellkolonien, Suspension	Isolat gesunder Spender
Primäre Tumorzellen	Humane NB-Zellen	Tumorzell-Sphäroide, Suspension	Patientenisolat aus Tumormetastase [135]
Tumorzelllinie	Humane CML-Zelllinie K-562	Einzelzellen, Lymphoblast, Suspension	ATCC® No. CCL-243™

CML: Chronische Myeloische Leukämie, NB: Neuroblastom, NK: Natürliche Killerzelle

3.2.5. Antikörper

Tabelle 3.7: Antikörper Durchflusszytometrie.

Antikörper	Fluorochrom	Klon	Subtyp	Hersteller
Anti-CD3	PE, ECD, PC5	UCHT1	IgG ₁	Beckman Coulter
Anti-CD3	PE	SK7	IgG ₁	BD Biosciences
Anti-CD4	PE	SFCI12T4D11	IgG ₁	Beckman Coulter
Anti-CD8	ECD	SFCI21Thy2D3	IgG ₁	Beckman Coulter
Anti-CD11a	FITC	HI111	IgG ₁	BD Biosciences
Anti-CD11b	FITC	BEAR-1	IgG ₁	Beckman Coulter
Anti-CD14	FITC, PC7	RMO52	IgG _{2a}	Beckman Coulter
Anti-CD16	FITC, PE, ECD, PC7	3G8	IgG ₁	Beckman Coulter
Anti-CD19	ECD	J3-119	IgG ₁	Beckman Coulter
Anti-CD25	PE	B1.45.9	IgG _{2a}	Beckman Coulter
Anti-CD33	PC5	D3HL60.251	IgG ₁	Beckman Coulter
Anti-CD45	FITC, PC7	J.33	IgG ₁	Beckman Coulter
Anti-CD54	PE	84H10	IgG _{2a}	Beckman Coulter
Anti-CD56	PE, PC7	N901	IgG ₁	Beckman Coulter
Anti-CD56	PC7	NCAM16.2	IgG _{2b}	BD Biosciences
Anti-CD62L	FITC	DREG56	IgG ₁	Beckman Coulter
Anti-CD69	PE, PC5	TP1.55.3	IgG _{2b}	Beckman Coulter
Anti-CD81	PE	JS64	IgG _{2a}	Beckman Coulter
Anti-CD85k	PE	ZM3.8	IgG ₁	Beckman Coulter
Anti-CD123	PC5	107D2	IgG ₁	Beckman Coulter
Anti-CD159a (NKG2A)	PE	Z119	IgG _{2b}	Beckman Coulter
Anti-CD183 (CXCR3)	PE	1C6/CXCR3	IgG ₁	BD Biosciences
Anti-CD195 (CCR5)	FITC	2D7/CCR5	IgG _{2a}	BD Biosciences
Anti-CD226 (DNAM-1)	FITC	DX11	IgG ₁	BD Biosciences
Anti-CD314 (NKG2D)	PE	ON72	IgG ₁	Beckman Coulter
Anti-CD335 (NKp46)	PE	BAB281	IgG ₁	Beckman Coulter
Anti-CD336 (NKp44)	PE	Z231	IgG ₁	Beckman Coulter
Anti-CD337 (NKp30)	PE	Z25	IgG ₁	Beckman Coulter
Anti-HLA-DR	ECD	Immu-357	IgG ₁	Beckman Coulter
Anti-p-AKT (Ser473)	FITC	P-Tyr-100	IgG [#]	Beckman Coulter
Anti-p-ERK1/2 (T202/Y204)	FITC	E-10	IgG ₁	Beckman Coulter
Anti-p-STAT-3 (Tyr705)	FITC	D3A7	IgG [#]	Beckman Coulter
Anti-p-STAT-4 (Y693)	FITC	38	IgG ₁	BD Biosciences
Anti-p-STAT-5 (Y694)	FITC	47	IgG ₁	BD Biosciences

[#]Rabbit-anti-Human-IgG. Alle anderen: monoklonale Mouse-anti-Human-IgG. Beckman Coulter, Marseille (FRA); bzw. BD Biosciences, San Jose (USA)

3. Patienten, Material und Methoden

Tabelle 3.8: Antikörper Cytometric Bead Array (CBA).

Bezeichnung	Bead Position	Hersteller
Human FasL CBA Flex Set	C6	BD Biosciences, San Jose (USA)
Human G-CSF CBA Flex Set	C8	BD Biosciences, San Jose (USA)
Human GM-CSF CBA Flex Set	C9	BD Biosciences, San Jose (USA)
Human IFN- γ CBA Flex Set	E7	BD Biosciences, San Jose (USA)
Human IL-1 β CBA Flex Set	B4	BD Biosciences, San Jose (USA)
Human IL-2 CBA Flex Set	A4	BD Biosciences, San Jose (USA)
Human IL-4 CBA Flex Set	A5	BD Biosciences, San Jose (USA)
Human IL-6 CBA Flex Set	A7	BD Biosciences, San Jose (USA)
Human IL-7 CBA Flex Set	A8	BD Biosciences, San Jose (USA)
Human IL-8 CBA Flex Set	A9	BD Biosciences, San Jose (USA)
Human IL-12/IL-23p40 CBA Flex Set	B5	BD Biosciences, San Jose (USA)
Human IL-13 CBA Flex Set	E6	BD Biosciences, San Jose (USA)
Human IP-10 CBA Flex Set	B5	BD Biosciences, San Jose (USA)
Human MCP-1 CBA Flex Set	D8	BD Biosciences, San Jose (USA)
Human MIP-1 α CBA Flex Set	B9	BD Biosciences, San Jose (USA)
Human MIP-1 β CBA Flex Set	E4	BD Biosciences, San Jose (USA)
Human RANTES CBA Flex Set	D4	BD Biosciences, San Jose (USA)
Human TNF- α CBA Flex Set	C4	BD Biosciences, San Jose (USA)
Human TNF- β CBA Flex Set	D5	BD Biosciences, San Jose (USA)

Bead Position: Position des fluoreszierenden „Capture Bead-Zytokine/Chemokine-Antikörper-Komplexes“ im BD FACSAarray™ entsprechend der Fluoreszenzintensität (▷ Kapitel 3.3.5)

3.3. Methoden

3.3.1. Isolation und Aufreinigung primärer humaner NK-Zellen

Isolation mononukleärer Zellen mittels Ficoll-Separation

Die Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation ist ein Verfahren zur Fraktionierung von humanem peripheren Blut. Als Ausgangsmaterial wurden vorwiegend untergewichtige Vollblutkonserven (inkl. Antikoagulanzen ACD) (DRK-Blutspendedienst, Baden-Württemberg Hessen, Frankfurt) oder heparinisiertes Vollblut gesunder Spender verwendet. Für die Zellseparation wurde die Ficoll-Hypaque-Polymer-Lösung mit einer Dichte von 1,077 g/ml vorsichtig mit Blut (1 : 2 verdünnt mit PBS) überschichtet. Dabei war darauf zu achten, dass es nicht zu einer Vermischung mit der zytotoxisch wirkenden Ficoll-Lösung kommt. Durch Zentrifugation (40 min, 700 × g, ohne Bremse, RT) wurden die Blutbestandteile mit höherer Dichte (Erythrozyten, Granulozyten) am Boden pelletiert. Mononukleäre Zellen (MNZ) – bestehend aus Lymphozyten und Monozyten – wurden aufgrund ihrer geringeren Dichte oberhalb der Ficoll-Lösung in einer schmalen, milchigen Schicht angereichert. Thrombozyten verblieben dabei wegen ihrer geringen Dichte in der Plasmafraktion. Die mononukleäre Zellschicht wurde herauspipettiert und zwei Mal mit PBS gewaschen, um eventuelle Ficoll-Verunreinigungen zu entfernen (10 min, 400 × g, RT).

NK-Zell-Isolierung im Labormaßstab

Für die Aufreinigung von humanen NK-Zellen im Labormaßstab wurde das EasySep[®] Zellseparations-System verwendet (Stemcell Technologies). Das hier zur Negativselektion von NK-Zellen verwendete System (*Human NK cell enrichment kit*) basiert auf einer säulenfreien Isolation der gewünschten NK-Zell-Fraktion mittels Markierung aller unerwünschten Zellen durch immunomagnetisch-gekoppelte Antikörper-Komplexe. Nach Bildung des bispezifischen Tetramer-Antikörper-Komplexes, bestehend aus einem spezifischen monoklonalen anti-Zell-Antikörper, welcher an einen Magnetpartikel-bindenden anti-Dextran-Antikörper gekoppelt ist, werden die so markierten Zellen im Magneten zurückgehalten (▷ Abb. 3.1). Die in diesem Kit enthaltenen Antikörper-Komplexe sind gegen die zellulären Antigene CD3, CD4, CD14, CD19, CD36, CD66b, CD123, HLA-DR und Glycophorin A gerichtet. Von großem Vorteil ist dabei, dass die zu untersuchende NK-Zell-Population somit unmarkiert bleibt und so eine potentielle Beeinflussung der zellulären Funktion durch eine Antikörperbindung vermieden wird.

Dafür wurden die mittels Ficoll-Hypaque-Dichtezentrifugation isolierten mononukleären Zellen in PBS (+0,5 % humanem Serum Albumin, HSA) auf eine Konzentration von 50×10^6 Zellen/ml eingestellt.

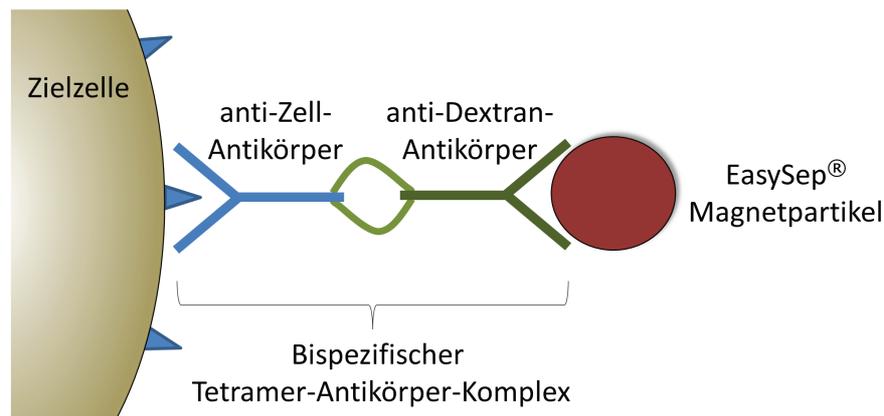


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des EasySep® Funktions-Prinzips. Unerwünschte Zielzellen werden durch spezifische Antikörper gegen zelluläre Antigene markiert und durch den bispezifischen Tetramer-Antikörper-Komplex an einem Magnetpartikel gekoppelt. Somit werden die markierten Zellen im Isolationschritt im Magneten zurückgehalten (Eigene Abbildung in Anlehnung an Stemcell Technologies) [136].

Nach 10-minütiger Inkubation bei RT mit dem Antikörpermisch (50 $\mu\text{l}/\text{ml}$ Zellsuspension) wurden die gutdurchmischten Magnetpartikel hinzugegeben (100 $\mu\text{l}/\text{ml}$ Zellsuspension) und erneut bei RT für 5 min inkubiert. Währenddessen bildet sich der Zell-Antikörper-Magnetpartikel-Tetramer-Komplex. Entsprechend der absoluten Zellkonzentration wurde auf 5 ml ($< 1 \times 10^8$ Zellen abs.) oder 10 ml (1 bis $4,25 \times 10^8$ Zellen abs.) mit PBS (+0,5% HSA) aufgefüllt. Um den gebildeten Tetramer-Komplex nicht zu zerstören, wurde vorsichtig gemischt und das Röhrchen unverschlossen in den Magneten gestellt. Nach 2,5 min wurde der gesamte Magnet umfasst und in einer fließenden Bewegung die unmarkierten NK-Zellen in ein neues Gefäß überführt. Die unerwünschte markierte Zellfraktion wurde dabei im Magneten zurückgehalten. Um eine möglichst hohe Reinheit an Zielzellen zu erhalten, sollte dabei nicht geklopft oder geschüttelt werden. Nach einem Zentrifugationschritt wurden die Zellen in dem entsprechenden Medium in gewünschter Zellkonzentration aufgenommen.

NK-Zell-Isolierung im klinischen Maßstab

Für die Aufarbeitung von NK-Zellen im Rahmen der klinischen Phase I/II NK-Zell-Studie wurden unstimulierte Leukapherisate des Stammzellspenders, also des entsprechenden Elternteils, verwendet. Im Unterschied zur SZT wurde den Spendern vorab nicht der Wachstumsfaktor G-CSF (Neopogen®) appliziert, da zum einen eine Mobilisierung der Stammzellen aus dem Knochenmark nicht erforderlich war und zum anderen beschrieben wurde, dass G-CSF die zelluläre Funktionalität von NK-Zellen beeinflussen kann [137]. Die kli-

nische Aufbereitung der Leukapherisate und die darauf folgende NK-Zell-Expansion wurde in den Reinräumen des DRK-Blutspendedienstes Frankfurt unter GMP-Bedingungen durchgeführt. Die Aufreinigung der NK-Zellen erfolgte mittels der magnetischen Zellisolation durch das CliniMACS System (Miltenyi Biotec) nach dem gleichen Funktionsprinzip wie zur Stammzellisolation (▷ Einleitung Kapitel 1.2.3). In einem 2-Stufen-Verfahren wurden zuerst die T-Zellen durch anti-CD3 Antikörper-beschichtete Magnetpartikel innerhalb eines Magnetfeldes zurückgehalten und somit von den übrigen Zellen depletiert. Die verbleibende Zellsuspension wurde im folgenden Schritt mit anti-CD56 Antikörper-beschichteten Magnetpartikeln inkubiert und mittels Positivselektion magnetisch isoliert (CD3-Depletion/CD56-Selektion). Die hochaufgereinigten CD3⁻CD56⁺ NK-Zellen wurden für eine unstimulierte NK-Zell-Applikation (NK-DLI_{unstim}) dem Patienten entweder direkt „frisch“ verabreicht oder für spätere Applikationen 1:2 mit 20%igem Dimethylsulfoxid (DMSO) verdünnt und bei -80°C in Flüssigstickstoff kryokonserviert. Dabei verhindert DMSO als Gefrierschutzmittel die Ausbildung von Eiskristallen in den Zellen [11]. Für IL-2 stimulierte NK-Zell-Applikationen (NK-DLI_{IL-2 stim}) wurden die Zellen in Nährmedium gelöst und im Folgenden kultiviert [129, 138].

3.3.2. Kultivierung und Expansion humaner Zellen

Kultivierung und Expansion primärer humaner NK-Zellen

Für die Expansion der im Labormaßstab aufgereinigten primären NK-Zellen wurden die Zellen in einer optimalen Dichte von 1 bis 2×10^6 Zellen/ml in Zellkulturflaschen verschiedener Größe kultiviert. Die in Suspension wachsenden NK-Zellen bilden während ihrer Kultivierung bevorzugt Zellkolonien aus, welche zum Teil auch leicht adhären können. Als Nährmedium wurde X-VIVO 10 Medium verwendet, das mit 5% hitzeinaktiviertem humanem Plasma (HP) und 1000 U/ml IL-2 versetzt wurde. Dem Medium wurden keine Antibiotika zugesetzt, um eine potentielle Beeinflussung der NK-Zellen zu vermeiden. Alle drei Tage erfolgte eine morphologische Kontrolle und die Zugabe von etwa einem Drittel des Gesamtvolumens an frischem Nährmedium über einen Expansionszeitraum von etwa neun Tagen. In einzelnen Versuchen wurde die Expansionsdauer auf bis zu 21 Tage ausgedehnt. Die Zellen wurden so auf die verschiedenen Zellkulturflaschen aufgeteilt, dass für alle Analysen des entsprechenden Versuchstages die gesamten Zellen „geerntet“ werden konnten. Zellen in Kulturflaschen für Untersuchungen an späteren Versuchstagen blieben dabei unberührt, um das Zellwachstum und die Koloniebildung nicht zu stören. Die Kultivierung der NK-Zellen erfolgte unter strikten sterilen Zellkulturbedingungen bei 37°C , 5% CO_2 und 90% Luftfeuchte.

Die Kultivierung und Expansion der NK-Zellen zur klinischen Applikation erfolgte unter

3. Patienten, Material und Methoden

GMP-Bedingungen in den Reinräumen des DRK-Blutspendedienstes Frankfurt. Im Unterschied zu den im Labormaßstab generierten NK-Zellen wurden hier Zellkulturbeutel verschiedener Volumina verwendet. Dabei wurde frisches Nährmedium alle drei Tage über ein Luer-Lock-Schlauchsystem vorsichtig in die Beutel geleitet. Die übrige Handhabung verlief gleich. Am Ende der Expansion nach 9 bis 14 Tagen erfolgten ausführliche phänotypische und funktionelle Analysen im Rahmen der Qualitätssicherung. Zur klinischen Applikation wurden die IL-2 stimulierten NK-Zellen (NK-DLI_{IL-2 stim}) dem Patienten entweder direkt am Ende der Expansion „frisch“ verabreicht oder wurden für spätere Applikationen 1:2 mit 20%igem DMSO verdünnt und bei -80°C in Flüssigstickstoff kryokonserviert.

Kultivierung primärer Tumorzellen und Tumorzelllinien

Sowohl im Rahmen der klinischen Qualitätssicherung der NK-Zell-Produkte als auch in den experimentellen Versuchen wurde die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen gegen die erythroleukämische Zelllinie K-562 untersucht. Die Zellen wurden ursprünglich aus dem Knochenmark eines Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie (CML) isoliert [139]. Diese HLA-Klasse-I und -II negative Zelllinie verfügt zudem über die Expression einiger Liganden aktivierender NK-Zell-Rezeptoren [140, 141] und gilt damit als eine Standardzelllinie für die Untersuchung der NK-Zell-Zytotoxizität. Die Kultivierung dieser als Einzelzellen in Suspension wachsenden Zellen erfolgte in RPMI 1640 Nährmedium (+10 % FCS und 2 nM Glutamin) bei 37°C , 5 % CO_2 und 90 % Luftfeuchte. Zum Passagieren wurden die Zellen im einwöchentlichen Rhythmus entsprechend ihrer Wachstumsdichte gesplittet.

Die für die Langzeit-Mikroskopie verwendeten primären Tumorzellen stammen aus einer chirurgisch entfernten Metastase eines 4-jährigen Neuroblastom Stadium IV Patienten. Die Isolierung und Inkulturnahme der Tumorzellen erfolgte durch Fr. Dr. Esser [135], die diese freundlicherweise für Versuchszwecke zur Verfügung stellte. Die Kultivierung dieser als Tumor-Sphäroide wachsenden primären Tumorzellen erfolgte in IMDM Nährmedium, welches mit 100 U/ml Penicillin und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin versetzt wurde.

3.3.3. Herstellung und Verwendung der Mycophenolsäure-Lösung

Mycophenolsäure (*Mycophenolic acid*, MPA) wurde entsprechend der Herstellerangaben gelöst und gelagert. Es wurden 32 mg der Trockensubstanz mit dem Molekulargewicht von 320,34 g/mol in 1 ml Methanol gelöst. Diese 100 mM Stocklösung wurde in 10 μl Aliquots bei -20°C gelagert. Das Immunsuppressivum wurde in den finalen Konzentrationen von 100 nM, 1 μM , 10 μM und 100 μM in der Zellkultur eingesetzt. Die Vorverdünnung wurde mit frischem X-VIVO 10 Zellkulturmedium (+5 % HP und 1000 U/ml IL-2) in

sterilen Reaktionsgefäßen angesetzt. Um das Endvolumen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollkultur möglichst gering zu halten, erfolgte der finale Verdünnungsschritt mit der eigentlichen Zellsuspension. Abhängig von der Fragestellung wurden die Zellen entweder vom Beginn der Kultivierung (ab Tag 0; d0) oder erst nach einigen Tagen mit der MPA-Lösung inkubiert. Alle drei Tage erfolgte die Zugabe von etwa einem Drittel des Gesamtvolumens an frischem Nährmedium, welches zuvor auf die entsprechende MPA-Konzentration eingestellt wurde. Somit wurde eine konstante MPA-Konzentration über den gesamten Versuchszeitraum gewährleistet. Dies wurde exemplarisch durch eine quantitative Bestimmung von MPA im Zellkulturüberstand durch das Zentrallabor des J.W. Goethe-Universitätsklinikums überprüft. Mit Hilfe eines Enzym-Rezeptor-Assays (Total MPA (TMPA) Test, Roche Diagnostics) wird dabei *ex vivo* die MPA-bedingte Hemmung der IMPDH Typ II *in vivo* imitiert. Die MPA-Konzentration ist dabei umgekehrt proportional zur Enzymfunktion. Um eine verlässliche Aussage über den Einfluss von MPA auf die NK-Zell-Funktionalität zu erhalten, wurden alle anderen Versuchsbedingungen exakt gleich wie in der unbehandelten Zellkultur gehandhabt.

3.3.4. Durchflusszytometrische Methoden

Die Durchflusszytometrie ist ein optisches Verfahren zur spezifischen Charakterisierung von einzelnen Zellen in einer Suspension. Das Messprinzip des Durchflusszytometers (*Fluorescence-activated-cell-sorter*, FACS) basiert dabei auf der Aussendung von monochromatischem Licht eines Lasers, das durch das Auftreffen auf eine Zelle in der Messküvette gestreut wird. Dabei geben die nach vorne laufenden Strahlen Auskunft über die Größe der Zelle (Vorwärts-Streulicht, *Forwardscatter*, FSC) und die zur Seite abgelenkten Strahlen sind ein Maß für die Zellgranularität (Seitwärts-Streulicht, *Sidescatter*, SSC). Des Weiteren lässt sich mit Hilfe Fluorochrom-gekoppelter Antikörper die Expression verschiedener Antigene bestimmen, wobei die Fluoreszenzintensität mit der Antigenexpression korreliert. Dabei wird ein Teil des durch den Laser ausgestrahlten Lichtes von dem entsprechenden Fluorochrom absorbiert und als Fluoreszenzlicht einer höheren Wellenlänge emittiert [142]. Die Zellen werden durch den Überdruck im Flüssigkeitssystem des Geräts durch die Kapillare gesaugt, sodass jede Zelle einzeln den Laserstrahl in der Messküvette passiert. Durch ein komplexes optisches System, bestehend aus verschiedenen Linsen, Spiegeln und Filtern, werden die emittierten Lichtsignale getrennt. Bei der Detektion der einzelnen Fluoreszenzen werden die Filter so eingesetzt, dass sie möglichst viel emittiertes Licht eines Fluorochroms von einer Wellenlänge durchlassen und dabei das Licht anderer Wellenlängen herausfiltern. Sogenannte Bandpassfilter lassen dabei nur Licht einer bestimmten Wellenlänge hindurch, wogegen Longpassfilter nur Licht oberhalb einer be-

3. Patienten, Material und Methoden

stimmten Wellenlänge passieren lassen. Das von den Detektoren erfasste Licht wird durch sog. *Photomultiplier* in elektrische Signale umgewandelt, entsprechend verstärkt und gespeichert (▷ Abb. 3.2) [143, 144].

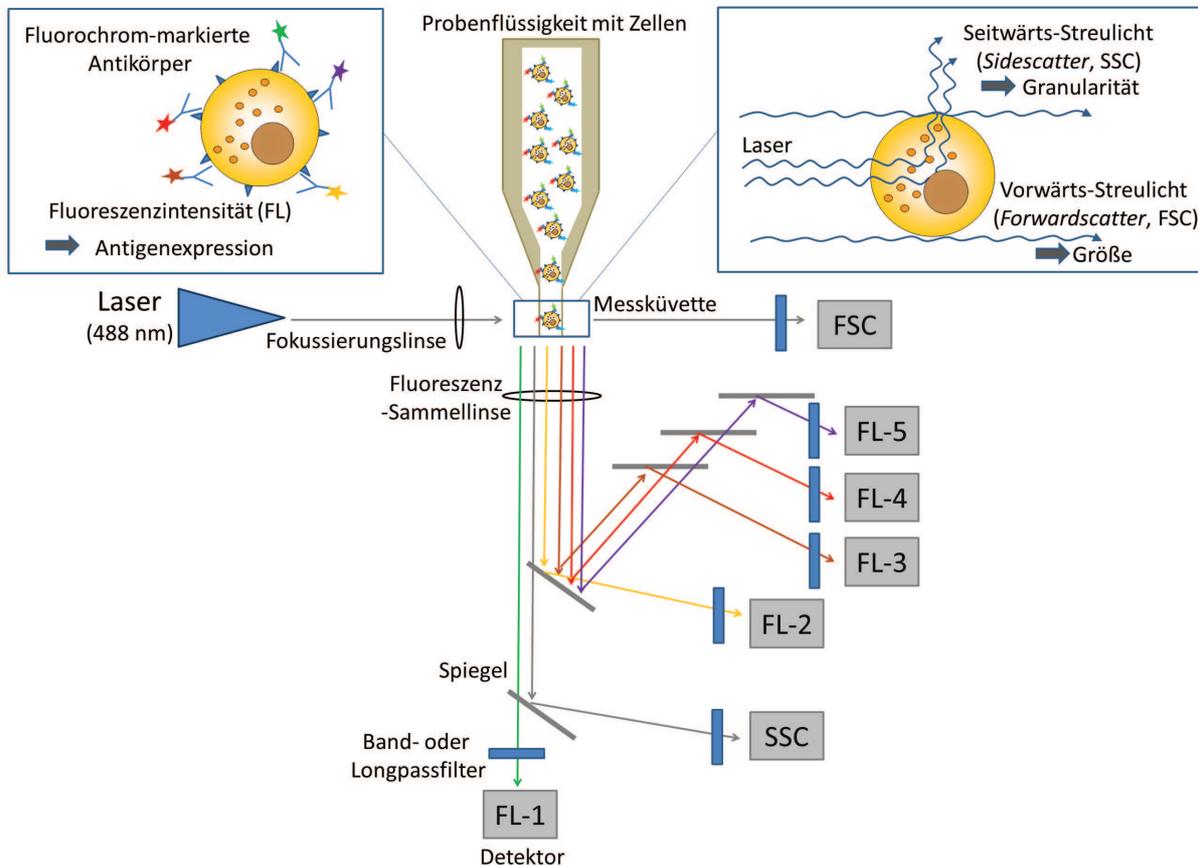


Abbildung 3.2: Schematisches Beispiel für den Aufbau und die Messmethodik eines Durchflusszytometers. Trifft der Laserstrahl auf eine einzelne Zelle im Probenstrom, so wird das Licht gestreut und gibt Auskunft über die Zellgröße (FSC), Granularität (SSC) und die Expression von bis zu fünf verschiedenen fluoreszenzmarkierten Antigenen. Ein komplexes optisches System aus Spiegeln und Filtern leitet dabei das Licht zu spezifischen Detektoren für die verschiedenen Fluoreszenzen FL-1 bis FL-5, die das Signal verstärken und digitalisieren (Eigene Abbildung in Anlehnung an Luttmann *et al.* „Der Experimentator Immunologie“ und Sack *et al.* „Zelluläre Diagnostik“) [142, 143].

In dieser Arbeit wurde primär das Durchflusszytometer Cytomics FC500 (Beckman Coulter) verwendet mittels dessen, nach Anregung mit einem Argon-Ionen-Laser bei 488 nm, die Analyse von bis zu fünf Fluoreszenzsignalen möglich ist (▷ Tab. 3.9). Zur Diskriminierung von toten Zellen wurden die Zellviabilitäts-Farbstoffe Propidiumiodid (PI) oder 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) verwendet. Diese Farbstoffe passieren geschädigte Zellmembranen und färben als DNA-Interkalator doppelsträngige DNA an. Nach Anregung mit monochromatischem Licht emittieren Fluorochrome Licht unterschiedlicher Wellenlängen. Dabei entstehen jedoch auch spektrale Überlappungsbereiche die zu falsch-positiven Signalen in der durchflusszytometrischen Messung führen können (▷ Abb. 3.3).

Diese Problematik wird zum einen durch die Filterung des Lichtes mit den beschriebenen Filtern gelöst und zum anderen können durch Kompensationseinstellungen spektrale Überlappungen verrechnet werden.

Tabelle 3.9: Fluoreszenzfarbstoffe.

FL-Kanal	Fluorochrom	Emissionsmaximum [nm]
FL-1	FITC (Fluorescein-Isothiocyanat)	519 nm (gelb-grün)
FL-2	PE (Phycoerythrin)	578 nm (orange)
FL-3	ECD (PE-Texas Red)	615 nm (orange-rot)
FL-4	PE-Cy5/PC5 (PE-Cyanin 5)	667 nm (rot)
FL-5	PE-Cy7/PC7 (PE-Cyanin 7)	785 nm (rot-violett)
FL-1	CFSE (Carboxyfluoreszein-Succinimidyl-Ester)	517 nm (stark gelbgrün)
FL-2	PI (Propidiumiodid)	617 nm (orange/rot-violett)
FL-4	7-AAD (7-Amino-Actinomycin D)	647 nm (rot/rot-violett)

Emissionsmaxima der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe bei Anregung mit dem blauen Argon-Ionen-Laser der Wellenlänge 488 nm [143]. Das verwendete FC500 Durchflusszytometer ist mit 525, 575, 620, 675, 755 nm Bandpassfiltern ausgestattet. *Abkürzungen:* FL: Fluoreszenz.

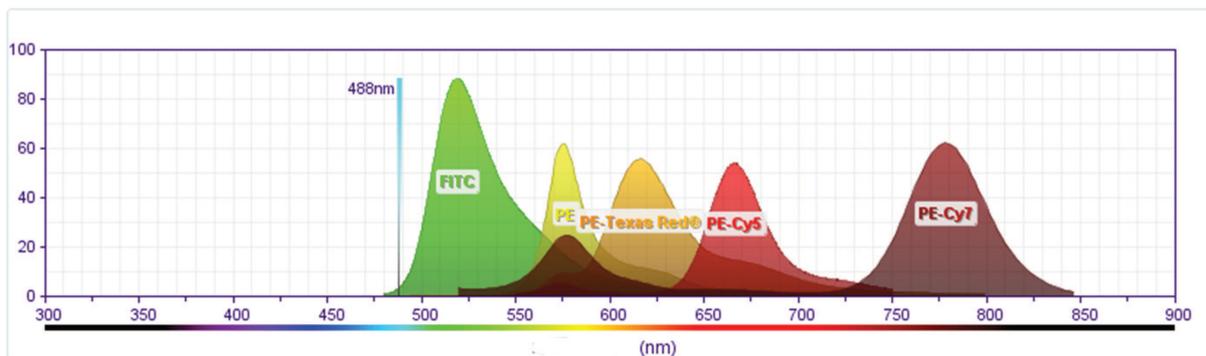


Abbildung 3.3: Emissionsspektren verschiedener Fluorochrome. Bei Anregung durch den blauen Argon-Ionen-Laser mit monochromatischem Licht der Wellenlänge 488 nm ergeben sich hier dargestellte Emissionsspektren und spektrale Überlappungsbereiche der verwendeten Fluorochrome FITC, PE, PE-Texas Red (ECD), PC5 und PC7 (Abbildung gestaltet mit Hilfe des BD Fluorescence Spectrum Viewer, www.bdbiosciences.com).

Die Auswertung und Darstellung der Daten erfolgte mit Hilfe der CXP System II Software (Beckman Coulter). Abbildung 3.4 zeigt exemplarisch einige Möglichkeiten der Datenanalyse. Dabei ermöglicht die individuelle Lichtstreuung und Fluoreszenzintensität eine präzise Charakterisierung und Unterscheidung der Zellen. Anhand definierter zellcharakteristischer Eigenschaften (z. B. NK-Zellen sind kleine, ungranuläre CD3⁻CD56⁺ Zellen) erfolgt die Einteilung in spezielle Regionen, die sich in der Kombination als sog. *Gates* zu einer *Gating* Strategie zusammenfassen lassen.

3. Patienten, Material und Methoden

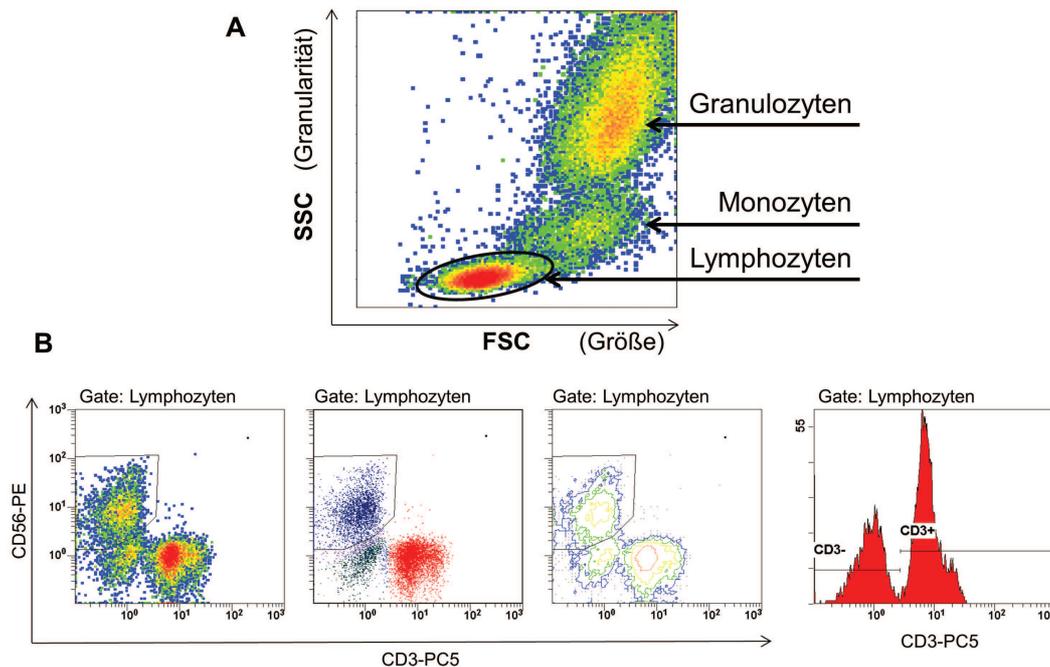


Abbildung 3.4: Darstellung durchflusszytometrischer Daten. A) Charakterisierung anhand der Lichtstreuung von kleinen, ungranulären Lymphozyten bis zu großen, granulären Granulozyten in einer PB Probe. B) Charakterisierung anhand Fluorochrom-konjugierter AK gegen zelluläre Antigene. Gezeigt sind verschiedene Möglichkeiten zur Darstellung zweidimensionaler Diagramme (engl. *plots*) von CD56 und CD3 markierten Lymphozyten. Von links nach rechts: *Density plot* (Dichte-Diagramm, rot: höchste Dichte, blau: niedrigste Dichte), *Dot plot* (Punkt-Diagramm) mit spezifischer Farbzweisung der einzelnen Populationen, *Contour plot* (Kontur-Diagramm) zur Darstellung der Dichteverteilung mittels Höhenlinien. Zur eindimensionalen Darstellung eignet sich ein *Histogram plot* (rechts), der hier die Lymphozytenpopulation in CD3⁻ und CD3⁺ Zellen aufgliedert. *Histogram plots* können auch durch Überlagerung als sog. *Overlay plots* kombiniert werden (Eigene Abbildung).

Phänotypisierung von Immunzellen

Die Immunphänotypisierung basiert auf der charakteristischen Expression verschiedener Oberflächenantigene auf Immunzellen die in einer CD-Nomenklatur (*Clusters of differentiation*, CD) zusammengefasst sind. Mit Hilfe von Fluorochrom-konjugierten monoklonalen Antikörpern (Tab. 3.7) können diese Oberflächenantigene markiert und durchflusszytometrisch unterschieden werden. Die so erhaltenen Antigenmuster ermöglichen eine Zuordnung zu einer bestimmten Leukozytensubpopulation. Zudem kann die Expression spezifischer Oberflächenantigene, aber auch intrazellulärer Moleküle, Informationen über den Aktivierungs- oder Differenzierungsgrad der Zelle erbringen.

Für die Analysen des *in vivo* Begleitmonitorings wurde in EDTA-Monovetten gesammeltes Vollblut verwendet. Analysen der *in vitro* Laborexperimente und der klinischen NK-Zell-Präparate erfolgten aus der Zellsuspension. Zur Bestimmung der Absolutzellzahlen wurden zwei alternative Verfahren verwendet. Bei der *dual platform* Analyse wurden die absoluten Leukozytenzahlen/ μl mit Hilfe eines hämatologischen Zellzählgerätes

(Hämatozytometer) ermittelt. Nach Ermittlung des prozentualen Anteils der spezifischen Leukozytensubpopulationen am Durchflusszytometer konnten so die Absolutzellzahlen der jeweiligen Subpopulation manuell errechnet werden. Bei der *single platform* Analyse erfolgte die Zellzahlbestimmung/ μl direkt während der durchflusszytometrischen Messung. Hierfür wurde ein interner Zählstandard (Flow-Count™ Fluorespheres) verwendet. Diese Methode ermöglicht mit Hilfe einer definierten Anzahl von Latexpartikeln (sog. Beads) in einer bestimmten Volumeneinheit die genaue Bestimmung der Zellzahl auch in sehr geringen Zellkonzentrationen. Wird das gleiche Volumen von Probe und Beads mittels reverser Pipettiertechnik vermischt, kann somit anhand der definierten Bead-Konzentration die Zellzahl/ μl der Probe intern berechnet und abgelesen werden.

Analysen im Rahmen des klinischen Begleitmonitorings zur NK-Zell-Studie

Im Rahmen des Phase I/II NK-Zell-Studien-begleitenden *in vivo* Monitorings wurden die Leukozytensubpopulationen im peripheren Blut der Patienten vor und 10 min, 1 h, 4 h und 24 h nach NK-Zell-Applikation analysiert (\triangleright Abb. 3.5). Dazu wurden Zellzahlen der eosinophilen und neutrophilen Granulozyten, Monozyten, dendritischen Zellen (mDC, pDC) und der Lymphozytensubpopulationen T-, B- und NK-Zellen prozentual und absolut bestimmt. Zudem wurde eine spezifische Charakterisierung von NK-Zellen durchgeführt (\triangleright folgendes Kapitel).

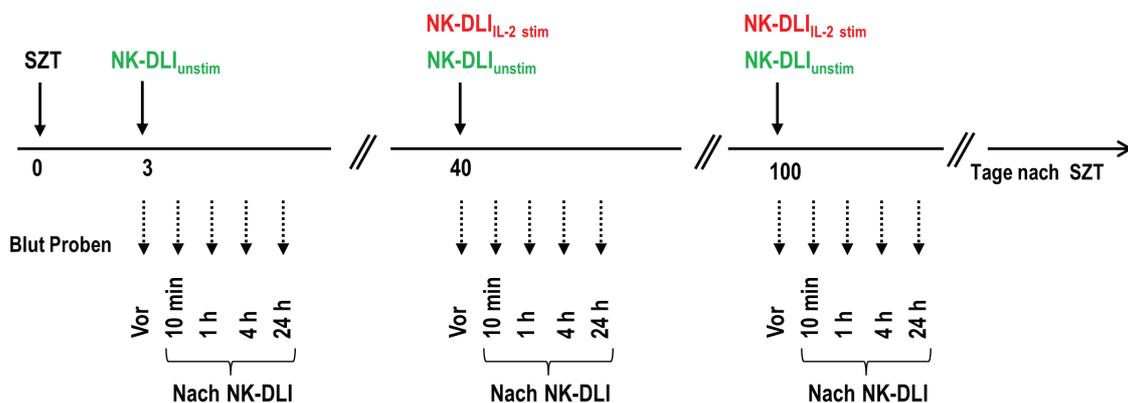


Abbildung 3.5: Verlauf der Blutabnahmen des Begleitmonitorings zur NK-Zell-Studie. Am jeweiligen Tag der NK-DLI (d 3, d 40, d 100) erfolgte die Abnahme von peripherem EDTA-Vollblut nach einem genauen zeitlichen Ablauf vor und 10 min, 1 h, 4 h, 24 h nach dem Ende der NK-Zell-Infusion. *Abkürzungen:* NK-DLI_{IL-2 stim}: IL-2 stimulierte Spender-NK-Zell-Infusion, NK-DLI_{unstim}: unstimulierte Spender-NK-Zell-Infusion, SZT: Stammzelltransplantation (Eigene Abbildung).

Die Analyse erfolgte direkt aus EDTA-Vollblut ohne Waschschrte als sog. *no wash* Verfahren. Dazu wurden nach Herstellerangaben je 5 bis 10 μl der Fluorochrom-konjugierten Antikörper verwendet und mit 100 μl Blut nach kurzem Durchmischen für 15 min bei RT

3. Patienten, Material und Methoden

im Dunkeln inkubiert. Zur Erythrozyten-Lyse wurde die automatisierte TQ-Prep™ Workstation mit dem aus drei verschiedenen Lösungen bestehendem Immunoprep™ Reagent-System (Beckman Coulter) verwendet. Lösung A (CH_2O_2 Ameisensäure) dient dabei der Lyse der Erythrozyten, Lösung B (Na_2CO_3 , NaCl , Na_2SO_4) stoppt die Lysereaktion und fungiert als Puffer und Lösung C (Paraformaldehyd) wird zur Leukozytenfixierung eingesetzt, um die zu analysierenden Oberflächenantigene zu stabilisieren. Nach Ablauf der Lysereaktion wurden die Zellen am 5-Farb-Durchflusszytometer FC500 gemessen und mit Hilfe der CXP System II Software ausgewertet. Die Bestimmung der Zellzahl/ μl der DCs erfolgte als *single platform* Analyse, da diese Zellpopulationen nur mit etwa 5 bis 40 Zellen/ μl im PB vertreten sind. Alle anderen Absolutzellzahlen/ μl wurden als *dual platform* Analyse bestimmt.

Spezifische Charakterisierung von NK-Zellen

Eine spezifische Charakterisierung von NK-Zellen wurde sowohl während des Studien-Begleitmonitorings anhand von peripheren Blutproben der Patienten durchgeführt als auch im Rahmen der *ex vivo* Untersuchungen zum Einfluss immunsuppressiver Therapie auf die Funktionalität primärer NK-Zellen und zur Qualitätskontrolle der klinischen NK-Zell-Produkte. Neben der An- und Abwesenheit eines bestimmten Antigens, was als „+“ und „-“ ausgedrückt wird, wurde die Intensität der Antigenexpression von niedrig/schwach als „dim“ und eine hohe/starke Expression als „bright“ bezeichnet. Die zwei Hauptsubpopulationen der $\text{CD3}^-\text{CD56}^+$ NK-Zellen wurden somit als $\text{CD56}^{\text{dim}}\text{CD16}^+$ und $\text{CD56}^{\text{bright}}\text{CD16}^{\text{dim/-}}$ charakterisiert (\triangleright Abb. 3.6).

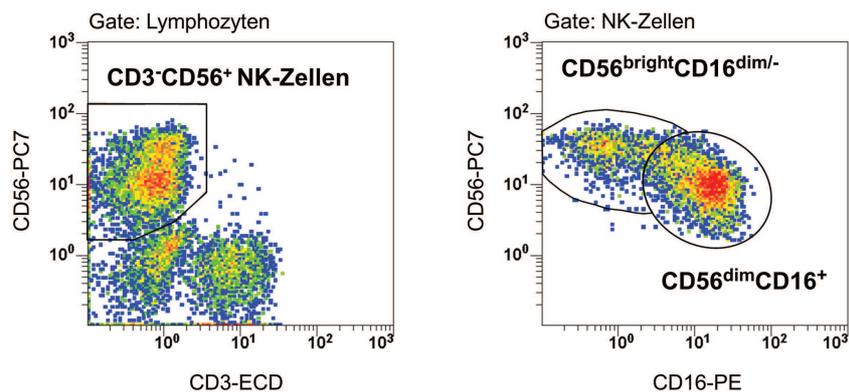


Abbildung 3.6: Charakterisierung der NK-Zell-Subpopulationen. Durchflusszytometrische Charakterisierung der $\text{CD3}^-\text{CD56}^+$ NK-Zellen in die zwei Hauptsubpopulationen $\text{CD56}^{\text{dim}}\text{CD16}^+$ und $\text{CD56}^{\text{bright}}\text{CD16}^{\text{dim/-}}$ (Eigene Abbildung).

Anhand der Expression spezifischer Antigene konnte die NK-Zell-Gesamtpopulation inklusive Subpopulationen hinsichtlich ihres Aktivierungs- und Differenzierungsstatus näher

charakterisiert werden. Dazu wurden z. B. Antikörper gegen die Antigene CD69 und HLA-DR (früher und später Aktivierungsmarker), CD62L („Lymphknoten *Homing* Rezeptor“), CD25 (α -Untereinheit des IL-2 Rezeptors) und NKp44 (einer der Natürlichen Zytotoxizitäts-Rezeptoren, NCR) verwendet. Zur Diskriminierung von toten Zellen wurde mit dem Viabilitätsfarbstoff 7-AAD gearbeitet. Zudem wurde zur möglichst exakten Bestimmung der Zellzahlen/ μl in allen Messungen die *single platform* Analyse verwendet. Dazu wurden 100 μl Blut oder Zellsuspension in reverser Pipettiertechnik mit den entsprechenden Antikörpern für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Mit der automatisierten TQ-Prep™ Workstation und dem Immunoprep™ Reagent-System (Beckman Coulter) wurden die Erythrozyten der Blutproben lysiert und die Leukozyten für nachfolgende Messungen fixiert. Bei isolierten NK-Zellsuspensionen wurde dieser Schritt entsprechend übersprungen. Nach Zugabe von 100 μl der gutdurchmischten Zählbeads (Flow-Count Fluorespheres) mit gleicher reverser Pipettiertechnik erfolgte unmittelbar die Analyse am 5-Farb-Durchflusszytometer FC500.

Quantitative Bestimmung der Rezeptordichte auf NK-Zellen

Zur quantitativen Bestimmung der Oberflächenexpression der Natürlichen Zytotoxizitäts-Rezeptoren NKp30, NKp44, NKp46 und dem NKG2D Rezeptor wurde das Quantum™ Simply Cellular® Kit der Firma Bangs Laboratories verwendet. Dabei werden spezielle Latex-Mikropartikel (sog. Beads) verwendet, die in unterschiedlicher Intensität mit Bindungs-Antikörpern beschichtet sind, welchen den Fc-Teil von monoklonalen Antikörpern binden können. Hierbei werden fünf verschiedene Bead-Populationen eingesetzt (von *Blank* (engl. = leer) über 1, 2, 3 und 4), die aufsteigend über eine zunehmende Antikörper-Bindungs-Kapazität (*antibody binding capacity*, ABC) verfügen. Mit Hilfe der kalibrierten ABC der Beads lässt sich die quantitative Dichte der Oberflächenrezeptoren auf der entsprechenden Zelle bestimmen. Hierbei wird die gemessene Fluoreszenzintensität der Mikropartikel (z. B. NKp46-PE markierte Beads in FL-2) mit der bekannten ABC der Partikel korreliert. Anhand der so erstellten Kalibrierungsgeraden kann im Folgenden die jeweilige unbekannte ABC, die der Rezeptorexpression (ebenfalls NKp46-PE) auf der Zielzelle entspricht, ermittelt werden (▷ Abb. 3.7). Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass im Unterschied zur der Angabe der mittleren Fluoreszenzintensität (*mean fluorescence intensity*, MFI) die ABC einen definierten Wert liefert, welcher sich dabei unabhängig von den verwendeten Zytometereinstellungen mit externen Resultaten vergleichen lässt.

Dazu wurden die zu untersuchenden NK-Zellen auf eine Zellzahl von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Bei der Versuchsdurchführung war darauf zu achten, dass die mit dem gleichen Antikörper gefärbten Zellen und die Latex-Beads bezüglich Inkubationsdauer, Wasch-

3. Patienten, Material und Methoden

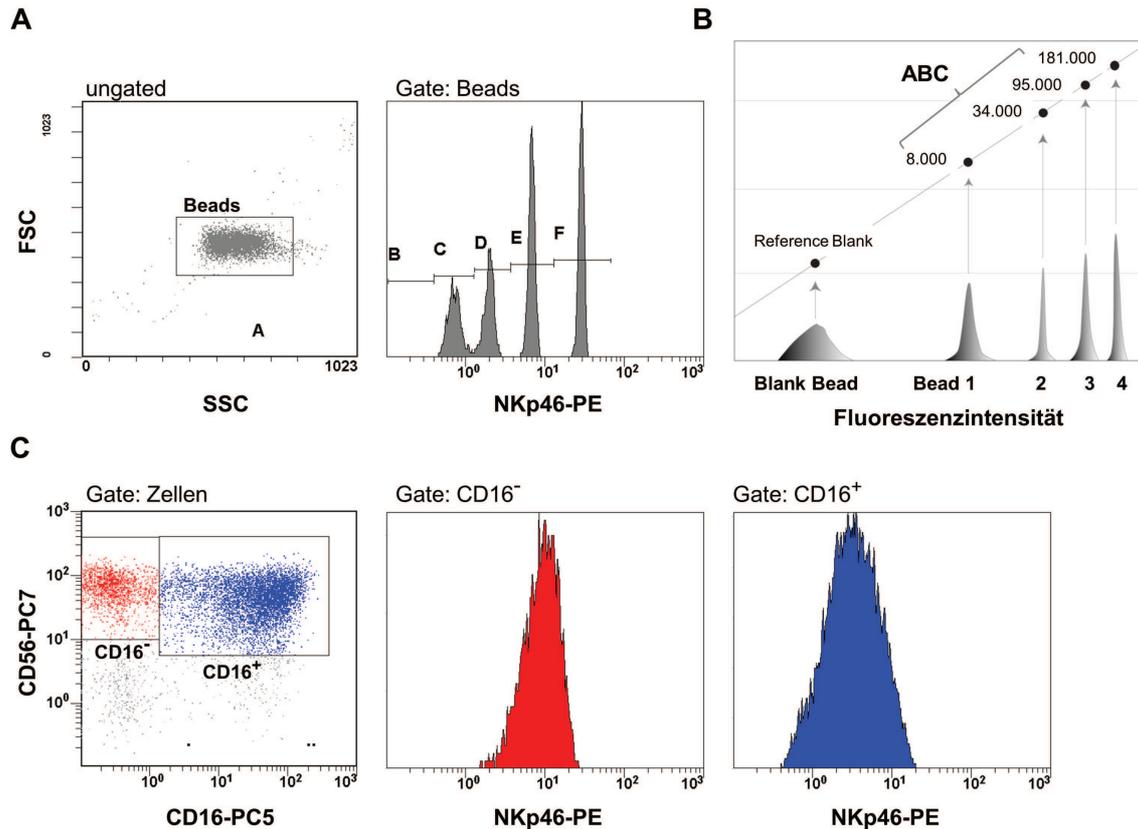


Abbildung 3.7: Messprinzip der quantitativen Bestimmung der Rezeptordichte auf NK-Zellen. **A)** Bei der durchflusszytometrischen Analyse wird die NKp46-PE markierte Gesamt-Bead-Population anhand ihrer Fluoreszenzintensität im Histogramm Plot in vier Populationen aufgeschlüsselt (Blank Beads in Region B hier nicht dargestellt). **B)** Anhand der Kalibrierungsgeraden lässt sich somit die Fluoreszenzintensität mit der entsprechenden ABC der jeweiligen Population vergleichen. Dabei hat z. B. die Bead-Population 1 die Kapazität zur Bindung von 8.000 AK (ABC=8.000) und die Population 4 von 181.000 AK (ABC=181.000). **C)** NK-Zellen können anhand ihrer CD56 und CD16 Expression in zwei Populationen unterteilt werden. Hier dargestellt sind neun Tage IL-2 stimulierte NK-Zellen mit dem typischen CD56^{bright} Phänotyp. Die Fluoreszenzintensität kann folgend mit der ermittelten ABC verglichen werden und ermöglicht so eine quantitative Aussage über die NKp46 Oberflächenexpression (Eigene Abbildung, Kalibrierungsgerade modifiziert nach Bangs Laboratories) [145].

schritten und Lichtexposition exakt identisch gehandhabt und bei gleicher Verstärkung am Durchflusszytometer gemessen werden. Die Lichtexposition war dabei so gering wie möglich zu halten. Es wurde entsprechend des in Tabelle 3.10 dargestellten Pipettierschemas verfahren. Nach gründlichem Vortexen wurde für 30 min dunkel bei RT inkubiert. Es folgten drei Wasch-Zentrifugationsschritte ($400 \times g$, 4 min, RT) mit je 2 ml PBS, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Final wurden die Zellen in je $500 \mu\text{l}$ PBS aufgenommen und in direkt folgender durchflusszytometrischen Analyse gemessen. Durch Einsatz der NK-Zell-charakterisierenden Antikörper CD56 und CD16 ließ sich zudem die Rezeptordichte auf den entsprechenden NK-Zell-Subpopulationen CD56^{bright}CD16^{dim/-} und CD56^{dim}CD16⁺ bestimmen.

Tabelle 3.10: Pipettierschema Rezeptordichte-Bestimmung.

	Blank Beads	Beads 1-4	Ko. NK-Zellen	Dichte NK-Zellen
Zellen	—	—	50 μ l	50 μ l
Beads Blank	50 μ l	—	—	—
Beads 1-4	—	je 25 μ l	—	—
PBS	50 μ l	50 μ l	—	—
PE-Antikörper	—	20 μ l	—	20 μ l
CD16-PC5	—	—	10 μ l	10 μ l
CD56-PC7	—	—	10 μ l	10 μ l

Verwendete PE-Antikörper: NKp30, NKp44, NKp46, NKG2D. Da im Rahmen dieser Arbeit die Rezeptordichte von IL-2 stimulierten NK-Zellen im Vergleich zu MPA- und Plasma-behandelten NK-Zellen untersucht wurde, ist das Pipettierschema entsprechend erweitert worden. *Abkürzungen:* Ko.: Kontrolle, entspricht der Fluoreszenz der nicht PE-markierten Zellen.

Intrazelluläre Färbung von Signalmolekülen

Die Antikörpermarkierung von intrazellulären Antigenen bedarf einer vorherigen Fixierung und Permeabilisierung der Zellmembran. Die Fixierung ermöglicht eine Momentaufnahme der intrazellulären Prozesse zum aktuellen Zeitpunkt, während die Permeabilisierung ein Eindringen der Fluorochrom-gekoppelten Antikörper ins Zellinnere gewährleistet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob Mycophenolsäure einen Einfluss auf die Phosphorylierung – und damit Aktivierung – zentraler intrazellulärer Signalmoleküle ausübt. Es wurden die Signalmoleküle STAT-3, -4, -5, AKT und ERK1/2 gewählt, die zentrale Rollen in den Signalwegen für Proliferation, Zytotoxizität und Überleben beinhalten. Dazu wurden frisch aufgereinigte NK-Zellen für unterschiedliche Inkubationszeiträume von 15 min bis zu 20 d mit IL-2 (1000 U/ml) stimuliert. Nach Ablauf der Stimulation wurden die Zellen in einer Dichte von ca. 1×10^6 /ml in einer Finalkonzentration von 1 bis 2% Formaldehyd für 10 min bei 37 °C fixiert. Zudem wurde auch immer eine frisch isolierte unstimulierte Probe fixiert, um die endogene Aktivität des Signalmoleküls ohne externen Stimulus als Ausgangswert zu erhalten. Nach 1 min auf Eis folgte ein Waschzentrifugationsschritt (400 \times g, 5 min) und das Zellpellet wurde in 90%igem Methanol resuspendiert. Während einer 30-minütigen Inkubation auf Eis oder bei 2 bis 8 °C wurde die Zellmembran permeabilisiert. Die Zellen konnten entweder direkt gefärbt oder für spätere Analysen bei –20 °C gelagert werden.

Für die Färbung wurden je 5×10^5 Zellen verwendet. Die Zellen wurden durch Zugabe von 2 ml Inkubationspuffer (PBS +0,5% HSA) und folgendem Zentrifugationsschritt (400 \times g, 5 min) gewaschen. Nach erneutem Waschschrift wurde das Zellpellet in 90 μ l Inkubationspuffer resuspendiert. Es folgte für 10 min eine Blockierung unspezifischer Bindestellen durch das im Inkubationspuffer enthaltene Protein. Die Zellen wurden pro Ansatz mit

3. Patienten, Material und Methoden

10 μl spezifischem Antikörper für 60 min im Dunkeln inkubiert. Es wurde zudem eine Kontrolle ohne Antikörper-Färbung mitgeführt, um die Autofluoreszenz der Zellen zu ermitteln. Nach abschließendem Waschzentrifugationsschritt, zur Entfernung von überschüssigen ungebundenen Antikörpern, wurden die Zellen in 500 μl PBS resuspendiert und am Durchflusszytometer analysiert.

CFSE-Proliferationsassay

Zusätzlich zur Zellzahlbestimmung während der Expansion wurde die Proliferation der NK-Zellen mittels CFSE-Färbung untersucht. Hierfür wurden die Zellen zu Beginn der Inkulturnahme mit dem Carboxyfluoreszein-Diazetat-Succinimidyl-Ester (CFDA-SE) gefärbt. Dieser membrangängige Farbstoff diffundiert passiv durch die Zellmembran und wird von zellulären Esterasen in den starkfluoreszierenden Carboxyfluoreszein-Succinimidyl-Ester (CFSE) gespalten. Dieser bindet kovalent an zytoplasmatische Proteine, sodass bei jeder Zellteilung gleichmäßig die Hälfte der Fluoreszenzintensität an beide Tochterzellen weitergegeben wird (\triangleright Abb. 3.8). Der Verlauf der Fluoreszenzreduktion über den Expansionszeitraum kann durchflusszytometrisch bestimmt werden und ermöglicht Rückschlüsse auf die vollzogenen Zellteilungen [146, 147].

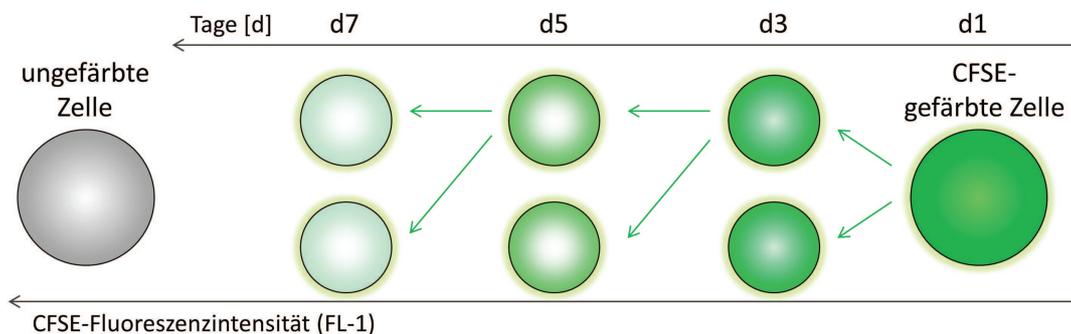


Abbildung 3.8: Funktionsprinzip der CFSE-Färbung. Der kovalent an zytoplasmatische Proteine gebundene CFSE-Farbstoff wird während der Zellteilung zu gleichen Teilen an die nächste Generation weitergegeben, wodurch sich die Fluoreszenzintensität jeweils halbiert. Es können etwa acht bis zehn Zellteilungen verfolgt werden bis die CFSE-Strahlung der Autofluoreszenz (Eigenfluoreszenz) ungefärbter Zellen entspricht (Eigene Abbildung).

Die Versuchsdurchführung erfolgte nach Anleitung von Quah und Parish *et al.*, die sowohl die Vorzüge als auch die Komplexität dieser Methode ausführlich untersucht und im Jahr 2007 in *Nature Protocols* beschrieben haben [146]. Es wurde mit einer 5 mM CFSE-Stock-Lösung gearbeitet (gelöst in DMSO, Lagerung $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Die aufgereinigten NK-Zellen wurden gut resuspendiert und unabhängig ihrer Zellzahl in 1 ml PBS (+5% FCS) aufgenommen. Um eine optimale Färbung zu erzielen, sollten ca. 50×10^6 Zellen/ml

mit einer Endkonzentration von $5 \mu\text{M}$ CFSE gefärbt werden. Ist die Zellzahl geringer, sollte die CFSE-Endkonzentration auf 1 bis $2,5 \mu\text{M}$ durch Vorverdünnung der Stock-Lösung mit PBS angepasst werden. Da CFSE schnell mit aquatischen Lösungen reagiert, sollte es rasch mit der Zellsuspension vermischt werden. Dazu wurde die 1 ml Zellsuspension auf den Boden eines konisch verlaufenden Röhrchens (z. B. 15 ml Falcon Tube) pipettiert ohne dabei den Rand zu befeuchten. In einer fast horizontalen Position wurde ein $110 \mu\text{l}$ PBS-Tropfen an den oberen Rand des Röhrchens gesetzt, ohne dass dieser sich mit der Zellsuspension vermischt. Folgend wurden $1,1 \mu\text{l}$ der 5 mM CFSE-Stock-Lösung vorsichtig in den PBS-Tropfen pipettiert. Das Röhrchen wurde verschlossen und durch wiederholtes Kippen und kurzes Vortexen wurden die Zellen mit der CFSE-Lösung vermischt. Nach 5 min Inkubation bei RT im Dunkeln wurden die Zellen mit 10-fachem Volumen PBS +5% FCS gewaschen und bei $330 \times g$ für 5 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert um einen Zellverlust zu vermeiden und der Waschvorgang zwei weitere Male wiederholt, um ungebundenen Farbstoff aus der Zellsuspension zu entfernen.

Durch Anregung (Laser, 488 nm) emittiert CFSE grünes Licht mit einem Emissionspeak bei 517 nm der im ersten Fluoreszenzkanal (FL-1) detektiert wird. Da das Fluoreszenzsignal besonders zu Beginn der Expansion sehr stark ist und ein hoher Übertrag in die anderen Fluoreszenzkanäle erfolgen kann, muss entsprechend kompensiert und ggf. der zweite Fluoreszenzkanal ausgespart werden. Innerhalb der ersten 24 h wird ein großer Teil des intrazellulären ungebundenen Farbstoffs von den Zellen sekretiert und es kommt zu einer deutlichen Verschiebung im Fluoreszenzsignal (\triangleright Abb. 3.9 A). Daher erfolgte die Ausgangsmessung für die Proliferation immer am Tag 1 (d 1). Zur genauen Analyse der NK-Zell-Proliferation wurden wiederholte Messungen während des Expansionszeitraums durchgeführt (z. B. d 1, d 3, d 6, d 9). Dabei wurde immer die entsprechende Zellkulturflasche gesamt „geerntet“ um alle gebildeten Zellkolonien zu erfassen und zu vereinzeln. Die Zellkulturflaschen für spätere Zeitpunkte wurden in ihrem Wachstum nicht gestört. Zudem wurde eine ungefärbte Probe analysiert um die Autofluoreszenz der Zellen zu ermitteln. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität über den Expansionszeitraum entspricht der jeweiligen Zell-Proliferation. Dabei ist jedoch zu beachten, dass sich das Fluoreszenzsignal von sich nicht teilenden Zellen ebenfalls leicht verschiebt, da die Fluoreszenz über den Versuchszeitraum durch Lichtexposition langsam abnehmen kann. Die durchflusszytometrische Auswertung erfolgte mittels Histogramm *Overlay plots* (CXP 2.2 Software, Beckman Coulter), womit der Verlauf der Fluoreszenz im Vergleich zu Ausgangswert und Autofluoreszenz dargestellt werden konnte (\triangleright Abb. 3.9 B, links). Mit Hilfe der FlowJo Software (Tree Star, Inc.) konnten zudem der Anteil der vollzogenen Zellteilungen anhand einzelner Generationen prozentual ermittelt werden (\triangleright Abb. 3.9 B, rechts). Wie an

3. Patienten, Material und Methoden

diesem Beispiel zu sehen, haben sich 26 % der Zellen nicht geteilt (Generation 0, rot), während die übrigen Zellen im Lauf der 9-tägigen Expansion bis zu sieben Tochtergeneration erreicht.

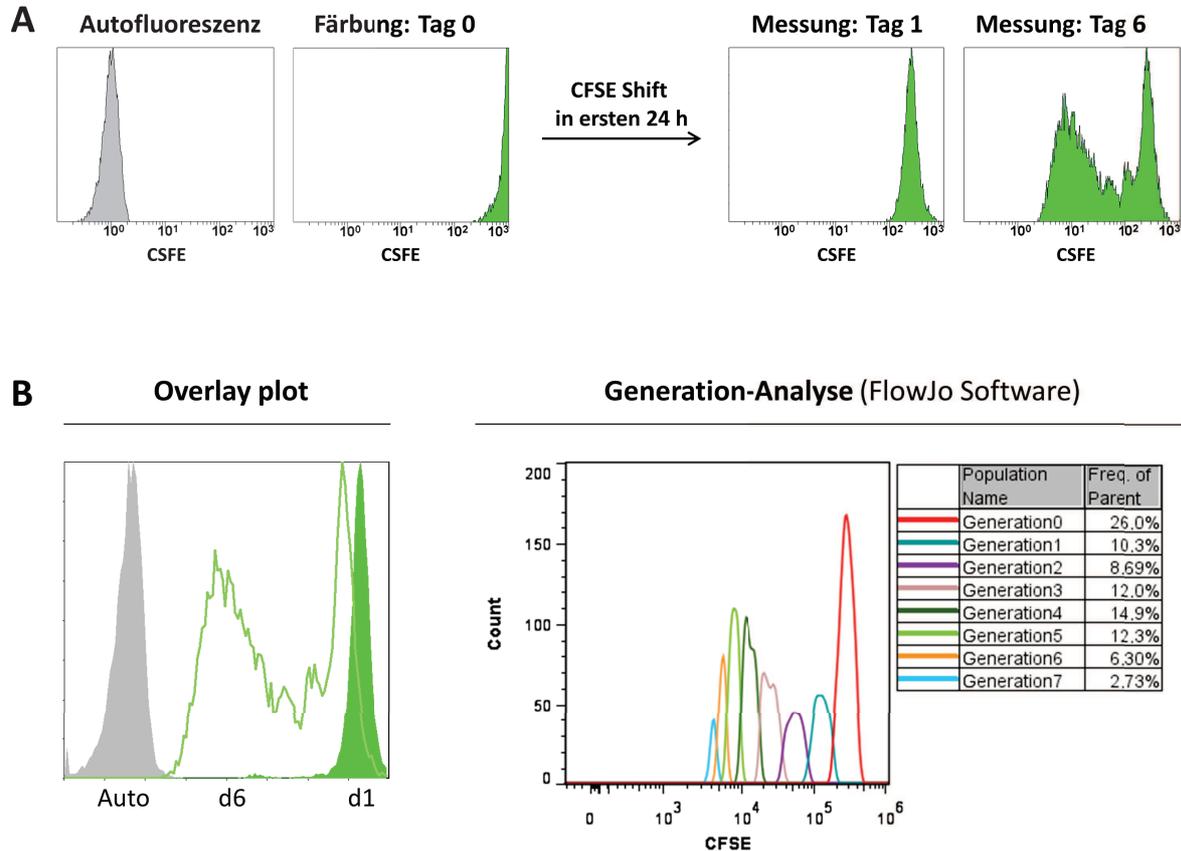


Abbildung 3.9: Proliferationsanalyse CFSE-markierter Zellen. A) In den ersten 24 h nach CFSE-Färbung kommt es zur Sekretion des intrazellulären ungebundenen Farbstoffs, was in einer deutlichen Linksverschiebung des Fluoreszenzsignals resultiert (CFSE-Shift). Daher erfolgte die Ausgangsmessung für die Proliferationsanalyse immer am Tag 1. Die Messung an Tag 6 zeigt hier die Proliferation von CFSE-markierten mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMNZ). Für die Bestimmung der Autofluoreszenz (grau) wurden ungefärbte Zellen analysiert. **B)** Die Auswertung erfolgte mittels *Overlay plots* (grau: Autofluoreszenz, grün gefüllt: CFSE-markierte Zellen an Tag 1, grün: proliferierte, CFSE-markierte Zellen nach 6-tägiger Stimulation) und mit Hilfe der FlowJo Software durch eine prozentuale Analyse der während der Proliferation entstandenen Zellgenerationen (Eigene Abbildung).

Bestimmung der NK-Zell-Zytotoxizität

Die zellvermittelte Zytotoxizität von NK-Zellen wurde zum einen im Rahmen der Qualitätskontrolle der klinischen NK-Zell-Produkte untersucht. Zum anderen wurde der Einfluss von immunsuppressiver Therapie auf die zytotoxische Aktivität IL-2 stimulierter NK-Zellen betrachtet. Die Bestimmung der Zytotoxizität erfolgte in einer durchflusszytometrischen Analyse [148]. Dazu wurden aufgereinigte NK-Zellen, folgend als Effektor-Zellen definiert, mit den HLA-Klasse-I und -II negativen erythroleukämischen Tumorzellen der K-562 Zelllinie (Target-Zellen) coinkubiert. Durchflusszytometrisch wurden die kleineren NK-Zellen durch die CD56 Antigenexpression identifiziert, während die großen K-562 Zellen durch eine CD81 Expression charakterisiert werden konnten. Zur Diskriminierung von toten Zellen wurde der DNA-interkalierende Farbstoff Propidiumiodid (PI, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) verwendet. Die Abbildung 3.10 zeigt das durchflusszytometrische Protokoll der NK-Zell-Zytotoxizitäts-Bestimmung. Im Unterschied zu anderen Zytotoxizitäts-Assays kann mit dieser Methode nicht nur der gesamte Anteil an toten Zellen ermittelt, sondern auch spezifisch zwischen toten Target- und Effektor-Zellen unterschieden werden. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte dabei durch einen internen Zählstandard (Flow-Count™ Fluorespheres) im Rahmen der *single platform* Analyse. Die Inkubation erfolgte in den Effektor zu Target (E:T) Ratios 1:1, 5:1 und 10:1 über einen Inkubationszeitraum von 4 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchte. Um möglichst exakte Effektor zu Target Ratios zu erhalten, wurde mit reverser Pipettiertechnik gearbeitet. Mittels der *single platform* Analyse in Kombination mit PI als Viabilitätsfarbstoff, erfolgte die finale Angabe der Zellzahlen als vitale Effektor- und Target-Zellen in Absolutzellzahlen. Sowohl Effektor- als auch Target-Zellen wurden über den gesamten Versuchszeitraum zu gleichen Bedingungen als Einzelkultur mitgeführt und nach Ablauf der Inkubationszeit analysiert. Der Anteil an ohne Effektor-Target-Kontakt spontan absterbenden Zellen beider Populationen wurde nachfolgend mit eingerechnet (Spontanveränderungen). Somit konnte die tatsächliche Reduktion an Target-Zellen durch eine zellvermittelte Zytotoxizität ermittelt werden. Die zytotoxische Aktivität wurde als der prozentuale Verlust an lebenden Target-Zellen, abzüglich der Spontanveränderungen, definiert. Eine zytotoxische Aktivität von 80 bedeutet also, dass 80 % der Target-Zellen im Inkubationszeitraum von den Effektor-Zellen abgetötet wurden.

3. Patienten, Material und Methoden

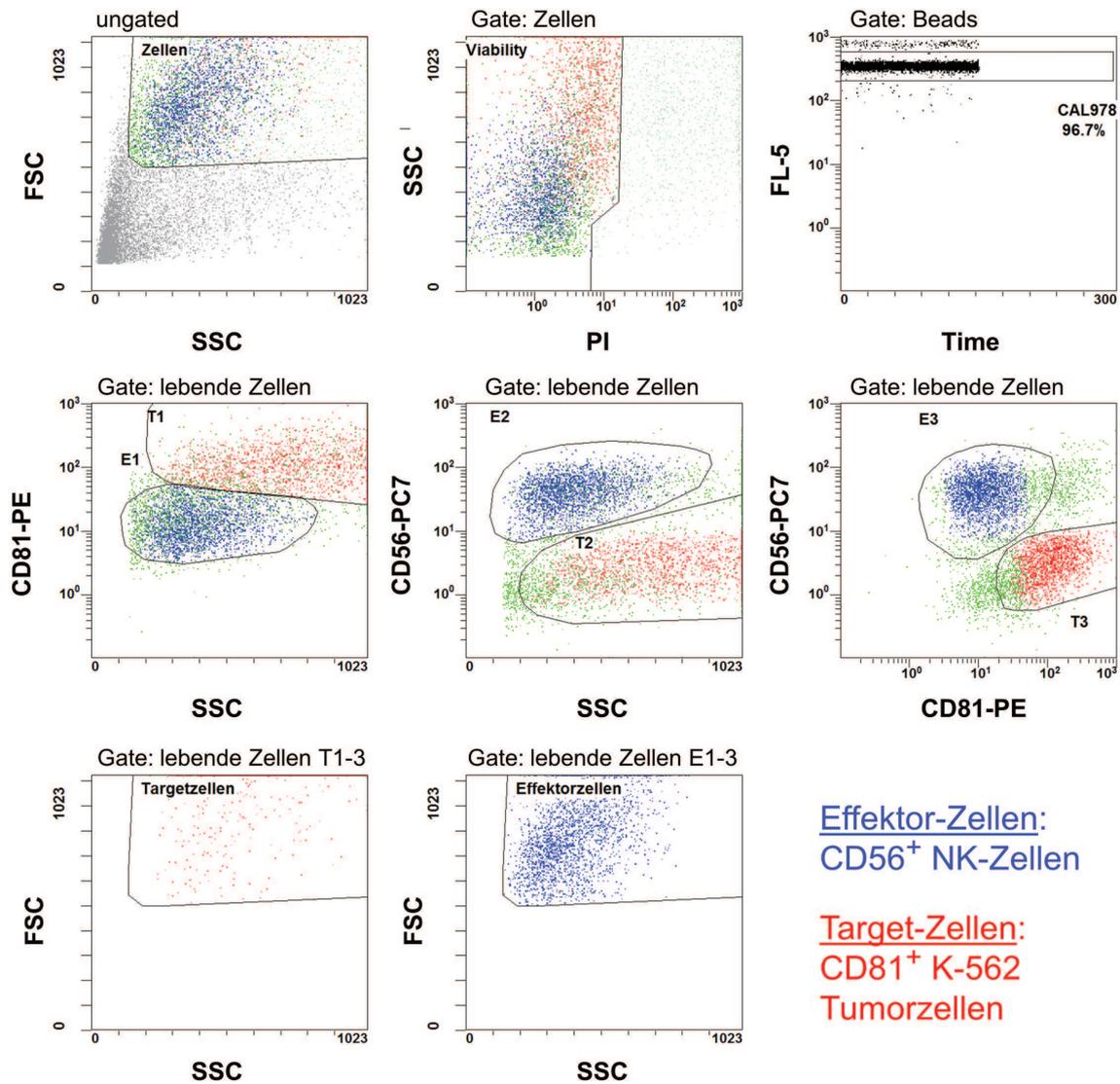


Abbildung 3.10: Durchflusszytometrische Bestimmung der NK-Zell-Zytotoxizität gegen K-562 Tumorzellen. Überblick über die *Gating* Strategie: die Trennung von Effektor-Zellen (NK-Zellen) und Target-Zellen (K-562 Tumorzellen) erfolgte durch unterschiedliche Scattereigenschaften und eine jeweils unterschiedliche Expression der CD56 und CD81 Antigene. Die Effektor-Zellen wurden dabei als PI⁻ vitale CD56⁺ Zellen in den Regionen E1–3 definiert, während die Target-Zellen als PI⁻ vitale CD81⁺ Zellen in den *Gates* T1–3 definiert wurden. *Abkürzungen:* FSC: *Forwardscatter* (Vorwärts-Streulicht) SSC: *Sidescatter* (Seitwärts-Streulicht), PI: Propidiumiodid (Eigene Abbildung).

3.3.5. Zytokin- und Chemokin-Analysen

Zur quantitativen Bestimmung der Zytokin- und Chemokin-Konzentration wurde das BD™ *Cytometric Bead Array* (CBA) von BD Biosciences verwendet. Diese Bead-basierte Multiplex-Analyse beruht auf der Ausbildung eines Bead-Zytokin-Antikörper-Komplexes, der mittels PE-Markierung durchflusszytometrisch analysiert werden kann. Das zu untersuchende Zytokin bindet dabei an kleine fluoreszierende Mikropartikel, sog. *Capture-Beads*, die mit Zytokin/Chemokin-spezifischen Antikörpern beschichtet sind. Nach Bindung von PE-markierten Detektions-Antikörpern kann der Sandwich-Komplex durchflusszytometrisch analysiert werden. Da jedes *Capture-Bead* eine ganz bestimmte Fluoreszenzintensität besitzt, können mehrere Zytokine/Chemokine simultan in einer Probe unterschieden und analysiert werden. Über die Intensität des PE-Signals hingegen kann mit Hilfe einer Standardkurve quantitativ die Konzentration des entsprechenden Zytokins/Chemokins in der Probe ermittelt werden (▷ Abb. 3.11).

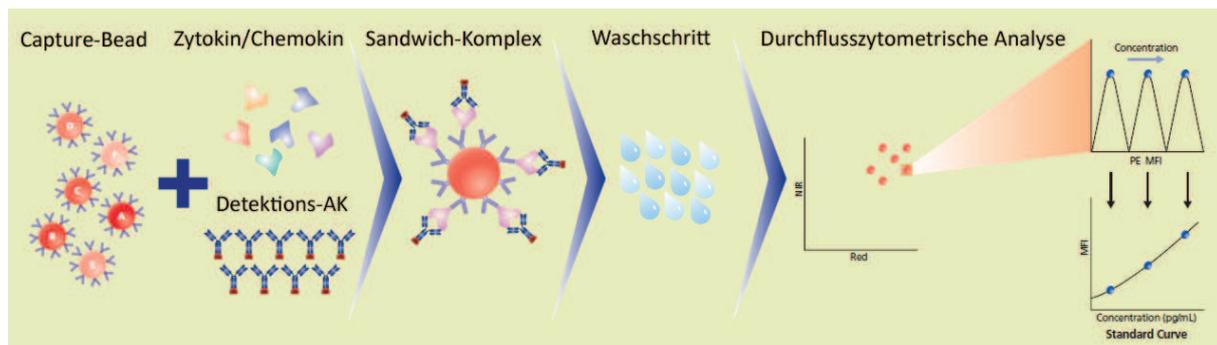


Abbildung 3.11: Funktionsprinzip des BD Cytometric Bead Array (CBA). Fluoreszierende *Capture-Beads* mit unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten sind mit Zytokin/Chemokin-spezifischen AK beschichtet. Nach Zytokin/Chemokin-Bindung und Markierung mit spezifischen PE-markierten AK kommt es zur Ausbildung des Sandwich-Komplexes. Ein Waschschritt entfernt ungebundene AK. In der durchflusszytometrischen Analyse kann anhand der Eigenfluoreszenz der *Capture-Beads* zwischen den Zytokinen/Chemokinen unterschieden werden. Folgend kann durch das jeweilige PE-Signal des Zytokin-Bead-Komplexes anhand einer Standardkurve die Konzentration errechnet werden (Abbildung entnommen aus BD CBA Brochure) [149].

Die Analyse der Zytokin- und Chemokin-Konzentrationen erfolgte im Rahmen des *in vivo* Begleitmonitorings vor und 10 min, 1 h, 4 h, 24 h nach NK-DLI Applikation in den Plasmaüberständen der peripheren Blutproben der Patienten. Zudem erfolgten Messungen der Zellkulturüberstände der klinischen NK-Zell-Produkte und von NK-Zellen, die in Ab- und Anwesenheit von MPA *ex vivo* kultiviert wurden. Dazu wurden die PB- bzw. Zellkultur-Proben bei $1650 \times g$ für 5 min zentrifugiert und der Überstand bis zur Analyse bei -80°C gelagert. Es wurden CBA Flex Sets zur Bestimmung von humanem IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IP-10, IL-12/IL-23p40, IL-13, IFN- γ , MCP-1, MIP-1 α/β , RANTES und TNF- α/β , FasL, G-CSF und GM-CSF verwendet. Die Versuchsdurchführung

3. Patienten, Material und Methoden

erfolgte exakt nach Herstellerangaben. Die Messung erfolgte am BD FACSAarray™ mit der BD FACSAarray™ System-Software und die Auswertung mit Hilfe der BD FCAP Array™ Software [142, 149].

3.3.6. Langzeit-Mikroskopie

Mittels Langzeit-Mikroskopie (oder *Time laps*-, Zeitraffer-Video-, Intervall-Mikroskopie) können morphologisch dynamische Zellprozesse wie Migration, Proliferation und Zytotoxizität im Zeitverlauf an Lebendzellen untersucht werden. In diesem Versuch wurde der Einfluss von Mycophenolsäure auf die NK-Zell-Morphologie und -Mobilität zu Tumorzellen in einer Klimakammer (37 °C, 5 % CO₂, 90 % Luftfeuchte) eines Phasenkontrast-Mikroskops (Olympus IX71) beobachtet. Dazu wurden als Tumor-Sphäroide wachsende primäre humane Neuroblastomzellen im *Chamber Slide*™ System kultiviert. Es folgte eine etwa 6-stündige Kokultivierung der Tumor-Sphäroide mit zehn Tage IL-2 stimulierten NK-Zellen (1×10^6 in 1 ml) oder mit für 24 h mit Mycophenolsäure (10 µM) vorbehandelten stimulierten NK-Zellen. Die Dokumentation erfolgte durch eine automatisierte Auslösung eines Bildes alle 30 Sekunden durch die mit dem Mikroskop kombinierte Digitalkamera (UC30, 0,1–0,5 sec/Bild Belichtungsdauer). Durch Aneinanderreihung der Einzelbilder zu einer Serie mittels cellSens Dimension Software konnte eine dynamische Abfolge der Vorgänge in der Zellkultur in Form eines Zeitraffer-Films erstellt werden. Die Bereitstellung des Kontroll-Filmes (IL-2 stim. NK-Zellen vs. NB Tumor-Sphäroide) und die Unterstützung bei der Versuchsdurchführung erfolgte freundlicherweise durch Dr. S. Klöß [150].

3.3.7. Statistik

Für die Bestimmung statistischer Signifikanzen wurden mittels nicht-parametrischer Testverfahren gepaarte (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test) bzw. ungepaarte Stichproben (Mann-Whitney-U-Test) unabhängig von der Annahme der Gauß'schen Normalverteilung verglichen. Bei Normalverteilung der Daten wurde entsprechend der parametrische Student's t-Test angewendet [151]. Für die Berechnung aller Signifikanzen wurde die Software GraphPad Prism (Version 5.03, GraphPad Software) verwendet. Unterschiede wurden als signifikant betrachtet und entsprechend gekennzeichnet wenn $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***).

4. Ergebnisse

4.1. Einfluss unstimulierter und IL-2 stimulierter NK-DLIs auf das Immunsystem

Es wurde der Einfluss der Infusion von unstimulierten NK-Zellen (NK-DLI_{unstim}) im Vergleich zu *ex vivo* IL-2 stimulierten NK-Zell-Applikationen (NK-DLI_{IL-2 stim}) im Rahmen der klinischen Phase I/II NK-Zell-Studie nach haploidenter SZT betrachtet und miteinander verglichen. Dabei wurden in einem engmaschigen *in vivo* Immunmonitoring sowohl die zellulären Bestandteile des Immunsystems durchflusszytometrisch untersucht als auch die Zytokin- und Chemokin-Level in der DLI und im peripheren Blut der Patienten bestimmt.

4.1.1. Vergleich der Patientengruppen mit NK-DLI_{IL-2 stim} und NK-DLI_{unstim}

Um Unterschiede in den Effekten unstimulierter und IL-2 stimulierter NK-Zell-Infusionen entsprechend zu interpretieren, wurden die beiden Patientengruppen hinsichtlich verschiedener Einflussgrößen miteinander verglichen. Im Rahmen der klinischen Phase I/II Studie wurden insgesamt 16 pädiatrische Patienten mit haploidenten NK-DLIs an den Tagen (+3), +40 und +100 nach SZT behandelt. Sieben der 16 Patienten erhielten NK-DLI_{unstim} (Gruppe I, Nr. 1 bis 7), weitere sieben NK-DLI_{IL-2 stim} (Gruppe II, Nr. 10 bis 16) während zwei Patienten (Nr. 8 und 9) mit unstimulierten und stimulierten NK-Zellen behandelt wurden. Alle Patientendaten sind in Tabelle 3.1 im Abschnitt „Patienten, Material und Methoden“ zusammengefasst.

Stammzelltransplantation (▷ **Tab. 4.1**): Beide Patientengruppen wurden mit einer vergleichbaren Stammzellmenge von 12,3 bzw. $10,0 \times 10^6$ /kg KG CD34⁺ Zellen transplantiert. Die Menge der mit dem Transplantat verabreichten T-Zellen war dabei in Gruppe II im Vergleich zu Gruppe I um ein 6-faches höher (84,5 vs. $13,5 \times 10^3$ /kg KG). Diese Erhöhung stand im direkten Zusammenhang mit der Änderung in der Methodik der Stammzellaufreinigung von CD34-Selektionen zu CD3/CD19-Depletionen. In beiden Gruppen, außer bei Patient Nr. 2 und Nr. 16, erfolgte die zelluläre Regeneration aus den Spenderstammzellen (*Engraftment*) im Median nach sieben Tagen (*range* 1 bis 26) für Thrombozyten $> 50.000/\mu\text{l}$ und im Median nach 12 Tagen (*range* 6 bis 24) für Leukozyten $> 1.000/\mu\text{l}$ im peripheren Blut. Chimärismus-Analysen aus dem peripherem Blut

4. Ergebnisse

und Knochenmark der Patienten ergaben einen vollständigen Chimärismus in 14 von 16 Patienten an Tag +40 und in 14 von 15 Patienten an Tag +100 nach SZT.

Tabelle 4.1: Stammzell-Applikationen. Angaben zu allen Stammzell-Applikationen der Patienten mit NK-DLI_{unstim} (Nr. 1–9, Gruppe I) und NK-DLI_{IL-2 stim} (Nr. 8–16, Gruppe II).

Nr.	SZT	CD34 ⁺	CD3 ⁻ CD56 ⁺	CD3 ⁺	Chimärismus (PB+KM)	
		[10 ⁶ /KG]	[10 ⁶ /KG]	[10 ³ /KG]	+40 ±10 d	+100 ±10 d
1	CD34	12,7	0,1	7,1	CC	CC
2	CD34	13,6	0,5	7,0	AR	CC
3	CD34	29,6	< 0,1 [§]	13,5	CC	CC
4	CD34	10,3	< 0,1 [§]	4,4	CC	CC
5	CD3/19	7,7	12,2	162,1	CC	CC
6	CD3/19	18,4	17,4	100,0	CC	CC
7	CD3/19	7,0	14,2	< 0,5 [§]	CC	CC
8*	CD3/19	10,0	7,2	96,8	CC	CC
9*	CD3/19	12,3	10,1	84,5	CC	CC
Median		12,3	7,2	13,5	8/9	9/9
8*	CD3/19	10,0	7,2	96,8	CC	CC
9*	CD3/19	12,3	10,1	84,5	CC	CC
10	CD3/19	16,8	61,7	50,0	CC	CC
11	CD3/19	13,8	13,8	29,4	CC	CC
12	CD3/19	9,7	12,6	24,9	CC	CC
13	CD3/19	8,0	5,8	92,6	CC	CC
14	CD3/19	8,4	55,8	143,4	CC	MC 1-5 %
15	CD3/19	5,5	25,9	100,1	CC	CC
16	CD3/19	12,7	17,9	44,4	n.s.	†
Median		10,0	13,8	84,5	8/9	7/8

AR: Autologe Rekonstitution, PB: peripheres Blut, CC: *complete chimerism* (kompletter Donor Chimärismus), CD34: CD34-selektionierte Stammzellen, CD3/19: CD3/CD19-depletierte Stammzellen, d: Tage, KG: kg/Körpergewicht, KM: Knochenmark, MC: *mixed chimerism* (gemischter Donor Chimärismus), n.s.: nicht spezifiziert, SZT: Stammzell-transplantation, † verstorben, § unterhalb der Nachweisgrenze, * diese Patienten haben unstimulierte und IL-2 stimulierte NK-DLIs erhalten

NK-Zell-Applikation (▷ **Tab. 4.2**): Patienten in Gruppe I erhielten insgesamt 14 unstimulierte NK-Zell-Gaben von denen sechs direkt nach dem NK-Zell-Aufreinigungsprozess dem Patienten an Tag +40 verabreicht wurden (“frisch“), während acht nach vorheriger Kryokonservierung am Tag +3 und Tag +100 appliziert wurden (“kryo“). Von insgesamt 15 *ex vivo* IL-2 stimulierten NK-Zell-Gaben in Gruppe II wurden acht an Tag +40 dem Patienten direkt nach Ende des Expansionsprozesses frisch infundiert, während sieben für die Applikation an Tag +100 kryokonserviert wurden. Die Patienten beider Gruppen erhielten eine ähnliche Dosis von im Median 14,6 und 13,1 × 10⁶/kg KG CD3-CD56⁺ NK-Zellen. Die NK-Zell-Produkte der Gruppe I im Vergleich zu Gruppe II Patienten enthielten im Median 4,3 und 34,6 × 10³/kg KG CD3⁺ T-Zellen. Zwei Drittel der T-Zellen konnte

4.1. Einfluss unstimulierter und IL-2 stimulierter NK-DLIs auf das Immunsystem

der Gruppe der CD3⁺CD56⁺ NK-ähnlichen T-Zellen zugeteilt werden. Funktionell zeigten IL-2 stimulierte NK-Zellen im Vergleich zu unstimulierten NK-Zellen *in vitro* eine deutlich höhere Zytotoxizität gegen K-562 Tumorzellen (▷ Abb. 4.1) und eine Neuroblastom-Zelllinie, was zudem mit einer Erhöhung der aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren und der Sekretion verschiedener Zytokine und Chemokine assoziiert war [115].

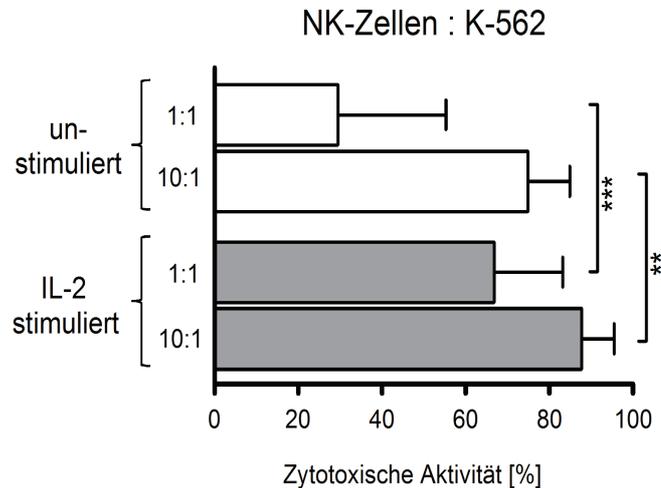


Abbildung 4.1: Zytotoxizität unstimulierter und IL-2 stimulierter NK-Zellen. Die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen in der NK-DLI wurde durch *ex vivo* IL-2 Stimulation (9 d, 1000 U/ml IL-2) in den untersuchten Effektor-zu-Target Ratios 1 : 1 ($p < 0,001$) und 10 : 1 ($p < 0,01$) signifikant erhöht ($n=12$). Die Zytotoxizität der NK-DLI_{unstim} und NK-DLI_{IL-2 stim} wurde direkt vor Applikation und/oder vor dem Kryokonservierungs-Prozess bestimmt und als Verlust von vitalen Target-Zellen definiert.

Alle Patienten tolerierten die NK-Zell-Behandlung ohne schwerwiegende Nebenwirkungen, jedoch waren IL-2 stimulierte NK-Zell-Gaben von leichtem transienten Fieber und Schüttelfrost begleitet. In zwei Patienten (Nr. 9 und 13) kamen zudem Erbrechen und leichte Blutdruckschwankungen hinzu, sodass kurzzeitig Steroide verabreicht wurden. In zwei Patienten der Gruppe I trat eine GvHD > Grad II auf, die in einem Fall auf eine hohe CD3⁺ T-Zell-Menge im Transplantat (▷ Tab. 4.1 Patient Nr. 5: $160,2 \times 10^3$ /kg KG) und im anderen Fall vermutlich auf die in der NK-DLI enthaltenen T-Zellen (▷ Tab. 4.2 Patient Nr. 1: $53,4 \times 10^3$ /kg KG) zurückzuführen waren. Nach IL-2 stimulierten NK-Zell-Infusionen in Gruppe II konnte trotz teilweise deutlich höheren T-Zell-Mengen nur partiell eine milde GvHD ≤ Grad II beobachtet werden, die sich in leichten Rötungen der Haut (unspezifisches makuläres Exanthem) äußerte.

4. Ergebnisse

Tabelle 4.2: NK-Zell-Applikationen. Angaben zu allen NK-Zell-Applikationen der Patienten mit NK-DLI_{unstim} (Nr. 1–9, Gruppe I) und NK-DLI_{IL-2 stim} (Nr. 8–16, Gruppe II).

Nr.	Tag DLI post SZT	frisch (f) kryo (k)	Vol. [ml]	CD3 ⁻ CD56 ⁺ [10 ⁶ /KG]	CD3 ⁺ CD56 ⁺ [10 ³ /KG]	CD3 ⁺ CD56 ⁻ [10 ³ /KG]	total CD3 ⁺ [10 ³ /KG]	KIR MM GvL/T	KIR MM HvG
1	+ 2	k	261	24,7	n.s.	n.s.	53,4	2	1
2	+ 3	k	499	13,5	n.s.	n.s.	4,5	1	1
3	+ 2	k	168	32,3	n.s.	n.s.	1,8	1	1
	+ 54	f	77	15,5	n.s.	n.s.	8,2		
4	+ 2	k	154	6,6	n.s.	n.s.	0,8	–	1
	+ 49	f	143	12,7	n.s.	n.s.	8,1		
	+103	k	75	3,2	n.s.	n.s.	0,4		
5	+ 3	k	198	9,9	n.s.	n.s.	0,6	1	–
	+ 42	f	115	7,7	n.s.	n.s.	4,1		
6	+ 2	k	152	6,9	n.s.	n.s.	4,8	–	1
7	+ 42	f	92	38,3	n.s.	n.s.	2,3	–	1
	+ 92	k	60	12,5	n.s.	n.s.	0,8		
8*	+ 50	f	129	8,7	15,8	< 0,5 [§]	15,8	1	–
9*	+ 47	f	210	30,0	37,6	10,4	48,0	2	–
Median total		14	148	13,1	n.s.	n.s.	4,3	6/9	6/9
Median frisch		6	122	14,1	n.s.	n.s.	8,2		
Mean frisch			128	18,8	n.s.	n.s.	14,4		
8*	+ 70	k	183	20,6	81,0	17,3	98,3	1	–
	+116	k	187	8,4	31,3	12,4	43,7		
9*	+101	f	1155	30,6	18,5	16,1	34,6	2	–
10	+ 40	f	1000	45,1	50,0	7,5	57,5	1	1
	+126	k	376	41,4	43,0	6,9	49,9		
11	+ 35	f	288	7,8	6,0	7,3	13,3	1	2
	+109	k	306	13,5	9,6	13,0	22,6		
12	+ 39	f	800	19,1	39,5	8,1	47,6	1	1
	+ 96	k	148	6,0	22,3	15,3	37,6		
13	+ 41	f	2296	15,0	29,3	2,4	31,7	1	–
14	+ 54	f	319	6,6	8,8	0,3	9,1	–	1
	+ 96	k	240	6,1	7,3	8,2	15,5		
15	+ 54	f	684	14,6	11,3	4,1	15,4	1	1
	+ 98	k	210	7,3	5,7	2,0	7,7		
16	+ 11	f	55	14,9	20,9	31,6	52,5	1	1
Median total		15	306	14,6	18,5	8,1	34,6	8/9	6/9
Median frisch		8	742	15,0	14,9	7,4	33,2		
Mean frisch			825	19,2	20,2	9,7	32,7		

DLI: *donor lymphocyte infusion* (Spender-Lymphozyten-Infusion) f: frisch aufgereinigt, HvG: *host-versus-graft*, GvL/T: *graft-versus-leukemia/tumor effect*, k: kryokonserviert, KG: kg/Körpergewicht, KIR: *killer cell immunoglobulin-like* Rezeptor, Mean: Mittelwert, MM: *mismatch*, n.s.: nicht spezifiziert, SZT: Stammzelltransplantation, Vol.: Volumen der DLI, § unter dem Detektionslimit, * diese Patienten haben unstimulierte und IL-2 stimulierte NK-DLIs erhalten

Immunrekonstitution der NK- und T-Zellen nach SZT: Die Regeneration von Immunzellen im peripheren Blut der Patienten nach haploidenter SZT wurde in einem engmaschigen durchflusszytometrischen Immunmonitoring kontrolliert. Dies erfolgte innerhalb der ersten drei Monate wöchentlich, bis zum sechsten Monat nach SZT zweiwöchentlich, was von monatlichen Analysen gefolgt war. Zum Zeitpunkt der NK-DLI an Tag +40 (Monat 2) und Tag +100 (Monat 4) zeigten beide Patientengruppen eine vergleichbare Immunrekonstitution der $CD3^+CD56^+$ NK-Zellen und der $CD3^+$ T-Zellen im peripheren Blut (\triangleright Abb. 4.2). Leicht geringere Zellzahlen der Gruppe II Patienten waren zu diesem Zeitpunkt statistisch nicht signifikant.

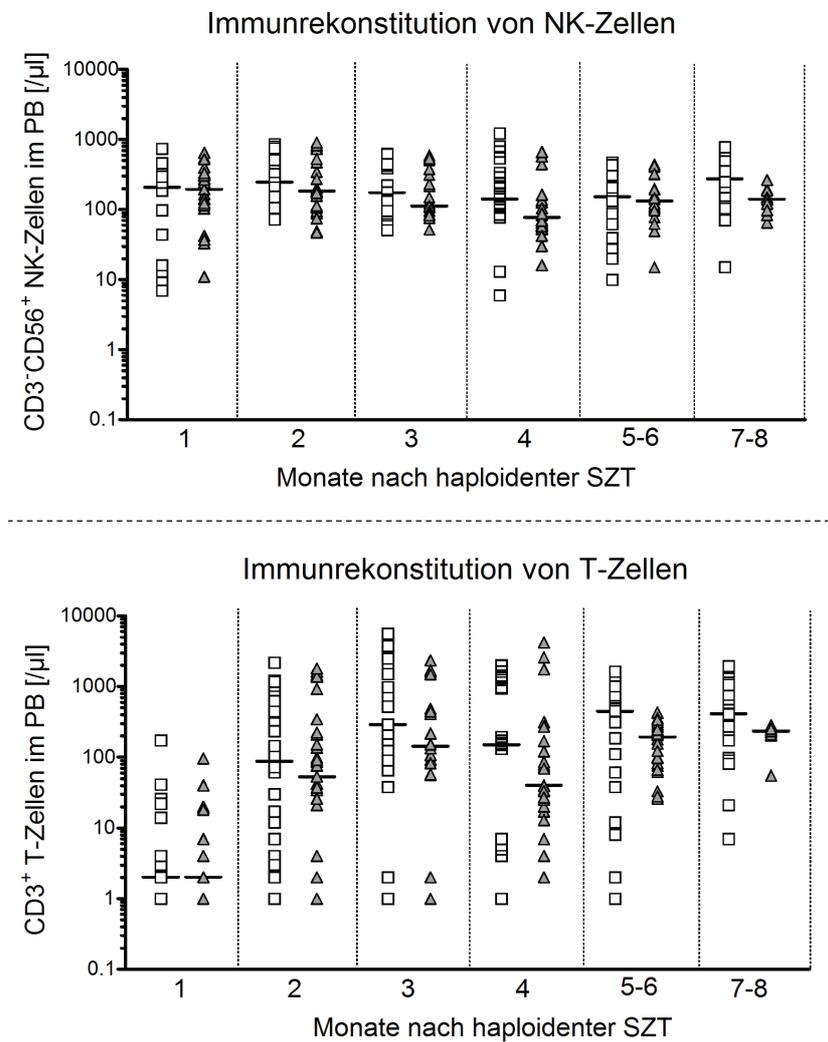


Abbildung 4.2: Immunrekonstitution der NK- und T-Zellen nach haploidenter SZT. In beiden Patientengruppen (Gruppe I: $NK-DLI_{unstim}$, weiß, $n=7$ und Gruppe II: $NK-DLI_{IL-2\ stim}$, grau, $n=6$) konnte innerhalb der ersten acht Monate nach SZT eine vergleichbare Immunrekonstitution der $CD3^+CD56^+$ NK-Zellen und der $CD3^+$ T-Zellen im peripheren Blut beobachtet werden. Gezeigt sind Median und alle Analysen des entsprechenden Monats innerhalb des ersten Jahres nach haploidenter SZT.

4.1.2. Monitoring von NK-Zellen im peripheren Blut

Im Rahmen des *in vivo* Begleitmonitorings wurde über einen Zeitraum von 24 h der Anteil an CD3⁺CD56⁺ NK-Zellen im peripheren Blut der Patienten bestimmt. Unmittelbar 10 min nach Ende der NK-DLI_{IL-2 stim} Applikation wurde eine signifikante Reduktion der NK-Zellen in der peripheren Blutzirkulation der Patienten festgestellt (grau, n=7, p<0,05) (▷ Abb. 4.3 A). Im Gegensatz dazu verursachte die Infusion von unstimulierten NK-Zellen keinen vergleichbar starken Effekt und resultierte in einer nur leichten Reduktion (weiß). Die Zellzahlen kehrten im Lauf des Monitorings innerhalb der nächsten 24 h wieder zu den Ursprungswerten vor der NK-DLI zurück.

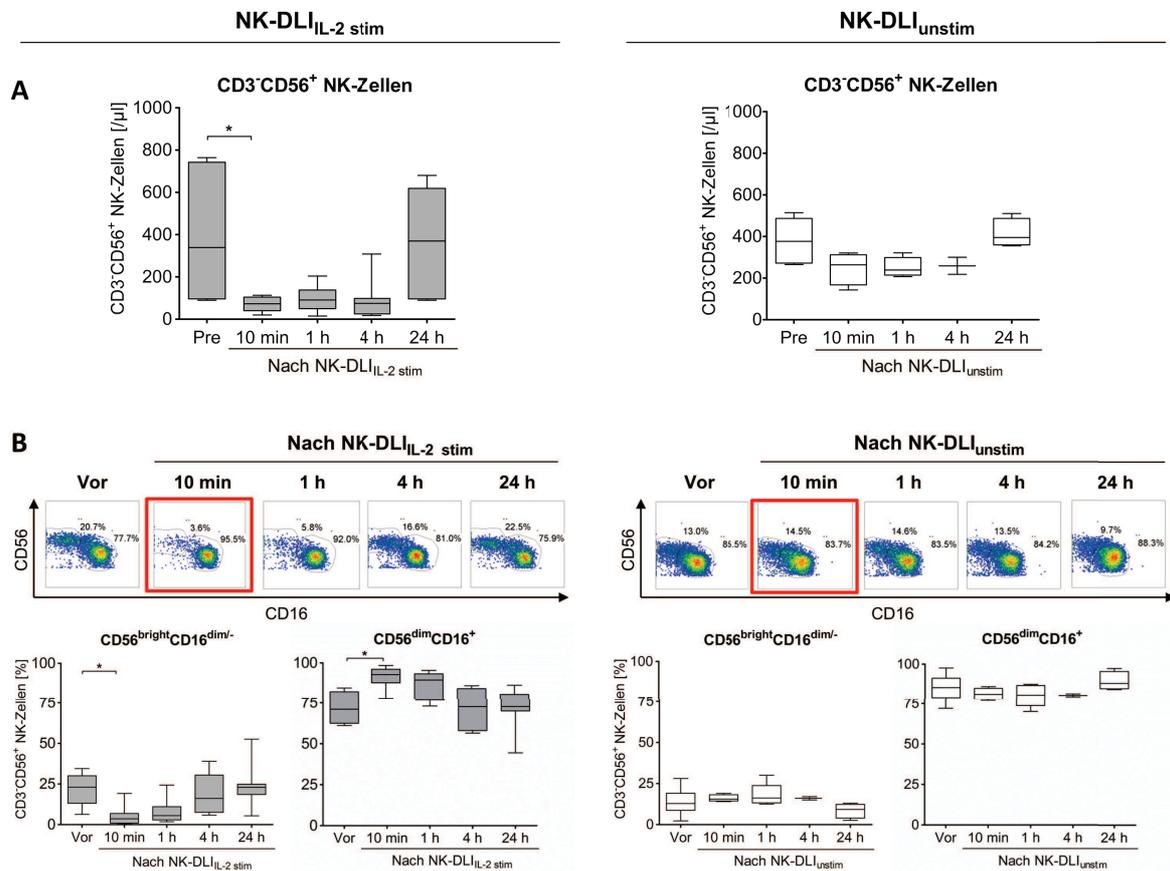


Abbildung 4.3: Monitoring der NK-Zellen nach frischer NK-DLI. A) 10 min nach frischer NK-DLI_{IL-2 stim} Applikation (grau, n=7) wurde eine signifikante Reduktion der CD3⁺CD56⁺ NK-Zellen/µl im PB der Patienten beobachtet (p<0,05). NK-DLI_{unstim} Infusionen (weiß, n=6) zeigten hingegen eine nur leichte, statistisch nicht signifikante Zellzahlreduktion. Die Zellzahlen normalisierten sich innerhalb von 24 h wieder zu den Werten vor der NK-DLI. B) Signifikante prozentuale Verschiebung in den NK-Zell-Subpopulationen durch eine Reduktion der CD56^{bright}CD16^{dim/-} Population unmittelbar nach NK-DLI_{IL-2 stim} (grau, n=7, *Density plots* Kasten). NK-DLI_{unstim} zeigten keinen Effekt (weiß, n=6).

4.1. Einfluss unstimulierter und IL-2 stimulierter NK-DLIs auf das Immunsystem

Zudem hatte die Applikation von NK-DLI_{IL-2 stim} eine prozentuale Verschiebung in der Verteilung der NK-Zell-Subpopulationen zur Folge. Unmittelbar nach der Infusion der IL-2 stimulierten NK-Zellen verschwand die immunregulatorische CD56^{bright}CD16^{dim/-} Subpopulation fast vollständig aus dem peripheren Blut der Patienten (▷ Abb. 4.3 B, grau). Bei der Analyse der Absolutzellzahlen war 10 min nach frischer NK-DLI_{IL-2 stim} Applikation eine 20-fache Reduktion der kleineren CD56^{bright}CD16^{dim/-} und eine 4-fache Reduktion der großen CD56^{dim}CD16⁺ Hauptpopulation im Vergleich zu vorher zu verzeichnen. Trotz Abnahme beider Populationen war die Ursache der prozentualen Verschiebung innerhalb der Subpopulationen auf eine stärkere Reduktion der CD56^{bright}CD16^{dim/-} NK-Zellen zurückzuführen. Unstimulierte NK-Zell-Infusionen zeigten hingegen keinen vergleichbaren Effekt.

Um eventuelle Kryokonservierungs-bedingte Einflüsse auf die Verteilung der NK-Zellen im peripheren Blut auszuschließen, wurden in Abbildung 4.3 nur Effekte frischer NK-Zell-Applikationen dargestellt. Nach Inklusion der kryokonservierten Produkte zeigten sich ähnliche, jedoch zum Teil leicht abgeschwächte Effekte. So war die Reduktion der NK-Zellzahl im peripheren Blut im Vergleich zu dem schnellen Effekt nach frischer NK-DLI_{IL-2 stim} (n=7) nach Inklusion aller kryokonservierten Produkte (gesamt n=13) weiterhin statistisch signifikant, jedoch zeitlich verzögert (▷ Abb. 4.4 A). Auch die prozentuale Verschiebung der CD56^{bright}CD16^{dim/-} und der CD56^{dim}CD16⁺ NK-Zell-Subpopulationen wurde im gleichen Ausmaß wie nach frischer NK-DLI_{IL-2 stim} beobachtet (▷ Abb. 4.4 B).

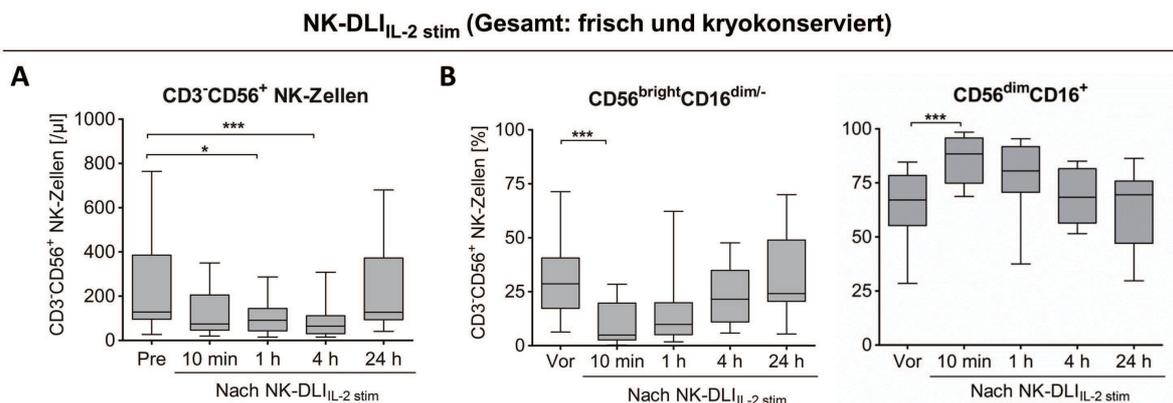


Abbildung 4.4: Monitoring der NK-Zellen nach frischer und kryokonservierter NK-DLI_{IL-2 stim}. **A)** Auch nach Inklusion aller kryokonservierten NK-DLI_{IL-2 stim} Applikationen (gesamt n=13) wurde eine signifikante Reduktion der CD3⁺CD56⁺ NK-Zellen/µl im PB der Patienten beobachtet. Diese war jedoch im Vergleich zu frischen NK-DLI_{IL-2 stim} Applikationen (▷ Abb. 4.3 grau) zeitlich leicht verzögert (1 h nach NK-DLI_{IL-2 stim} p<0,05; 4 h nach NK-DLI_{IL-2 stim} p<0,001). **B)** Identische signifikante prozentuale Verschiebung in den NK-Zell-Subpopulationen durch eine Reduktion der CD56^{bright}CD16^{dim/-} Population nach Inklusion von kryokonservierten NK-DLI_{IL-2 stim} (gesamt n=12, p<0,001) im Vergleich zu in Abbildung 4.3 gezeigten frischen Applikationen.

4. Ergebnisse

Die nach der NK-DLI_{IL-2 stim} Applikation beobachtete 5,5-fache Abnahme der NK-Zellen im peripheren Blutkreislauf war zudem nicht auf einen möglichen Verdünnungseffekt durch eine artifizielle Infusions-bedingte Erhöhung des peripheren Blutvolumens zurückzuführen, da das Volumen der NK-Zell-Infusionen im Mittel maximal 20 % des Blutvolumens des Patienten betrug (▷ Abb. 4.5). Das Blutvolumen wurde nach Literaturangaben mit 80 ml/kg KG bestimmt [32, 152]. Um zu ermitteln ob das „Nicht-Wiederfinden“ der infundierten NK-Zellen mit einer verschwindend geringen Menge infundierter Zellen im Vergleich zu einer um ein Vielfaches höheren Menge an peripheren patienteneigenen NK-Zellen assoziiert ist, wurde die absolute NK-Zell-Konzentration der Patienten am Tag der NK-DLI mit Hilfe des entsprechenden Blutvolumens des Patienten berechnet. Betrachtet man in der rechten Grafik der Abbildung 4.5 die im Mittel verabreichte NK-Zell-Dosis in der DLI im Vergleich zur am selben Tag präsenten NK-Zell-Menge im peripheren Blut, so wird die hohe NK-Zell-Dosis verdeutlicht. Demnach hätten die infundierten NK-Zellen im peripheren Blut sichtbar sein müssen, was die Vermutung einer tatsächlichen Abnahme der NK-Zellen unterstützt.

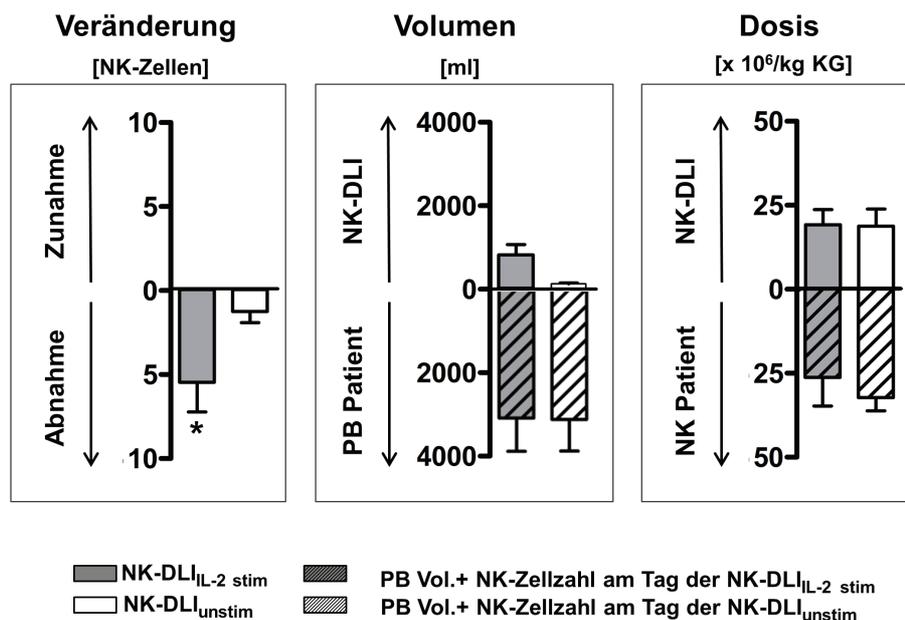


Abbildung 4.5: NK-Zell-Reduktion im Vergleich zu Volumen und Dosis der NK-DLI. Mittelwert \pm SEM aller frisch applizierten NK-DLI_{IL-2 stim} (grau, n=7) und NK-DLI_{unstim} (weiß, n=6) an Tag +40 nach SZT. Gestreifte Balken illustrieren das gemittelte PB-Volumen und die NK-Zell-Menge/kg KG der Patienten zum Zeitpunkt der DLI. **Links:** Eine 5,5-fache Abnahme der NK-Zellen nach NK-DLI_{IL-2 stim} im Vergleich zu einer 1,2-fachen Abnahme nach NK-DLI_{unstim} ($p < 0,05$). **Mitte:** Verhältnis von infundiertem DLI-Volumen im Vergleich zu dem PB-Volumen der Patienten am Tag der Gabe (NK-DLI_{IL-2 stim}: 825 ml \pm 249 DLI zu 3060 ml \pm 789 PB Vol.; NK-DLI_{unstim}: 128 ml \pm 19 zu 3093 ml \pm 749 PB Vol.). **Rechts:** Verabreichte NK-Zell-Dosis $\times 10^6$ /kg KG in der DLI im Vergleich zu den am Zeitpunkt der Gabe an Tag +40 peripheren NK-Zellen des Patienten (NK-DLI_{IL-2 stim}: 19,2 \pm 4,5 zu 26,0 \pm 8,5; NK-DLI_{unstim}: 18,8 \pm 5,1 zu 31,9 \pm 4,0).

4.1. Einfluss unstimulierter und IL-2 stimulierter NK-DLIs auf das Immunsystem

Wie auch von Huenecke *et al.* im Rahmen dieser NK-Zell-Studie beschrieben, kommt es durch die IL-2 Stimulation zu einer Veränderung der Expression einiger Oberflächenantigene auf NK-Zellen. Während das Oberflächenmolekül CD56, der frühe Aktivierungsmarker CD69 und die Natürlichen Zytotoxizitäts-Rezeptoren (wie z. B. NKp44) durch die Stimulation stärker an der Zelloberfläche exprimiert werden, zeigt das Lymphknoten *Homing* Molekül CD62L einen Verlust der Expression. So zeigten NK-Zellen nach 9-tägiger *ex vivo* IL-2 Stimulation einen CD3⁻CD56^{bright}CD16^{+/-}CD69⁺NCR^{high}CD62L⁻ Phänotyp (▷ Abb. 4.6 A). Mittels dieser charakteristischen Antigenexpression konnte zwischen stimulierten NK-Zellen aus der NK-DLI_{IL-2 stim} und patienteneigenen NK-Zellen im peripheren Blut mit dem Phänotyp CD3⁻CD56^{dim/bright}CD16^{+/-}CD69⁻NCR^{low}CD62L⁺ unterschieden werden. Interessanterweise konnte der IL-2 stimulierte NK-Zell-Phänotyp zu keinem Zeitpunkt des *in vivo* Monitorings nach NK-Zell-Infusion nachgewiesen werden – weder unmittelbar nach Ende der Infusion noch nach 24 h (▷ Abb. 4.6 B, rote Kreise). Dies deutet auf ein rasches Verlassen der infundierten Zellen aus der peripheren Blutbahn hin, ohne dass diese Zellen in die Zirkulation zurückkehren. Zudem zeigt diese Abbildung, dass die Reduktion an CD56⁺ NK-Zellen nicht durch einen Verlust der CD56 Expression bedingt war, da keine Zunahme einer CD56⁻ Population beobachtet wurde (▷ Abb. 4.6 B, erste Reihe, Gate auf CD3⁻CD19⁻ Lymphozyten um T- und B-Zellen auszuschließen). Begleitend wurde 10 min nach der NK-DLI_{IL-2 stim} Applikation eine deutliche Reduktion der CD62L⁺, also der patienteneigenen rekonstituierten NK-Zellen, im peripheren Blut der Patienten beobachtet (▷ Abb. 4.6 C, blaue Kästen), die jedoch nach 24 h wieder zu den Ursprungswerten zurückkehrten. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Reduktion der NK-Zellzahl in der Blutzirkulation sowohl auf stimulierte NK-Zellen aus der DLI als auch auf Patienten-NK-Zellen aus dem peripheren Blut zurückzuführen war. Die Normalisierung der Zellzahlen nach 24 h war jedoch nur auf eine „Rückkehr“ der patienteneigenen NK-Zellen beschränkt.

4. Ergebnisse

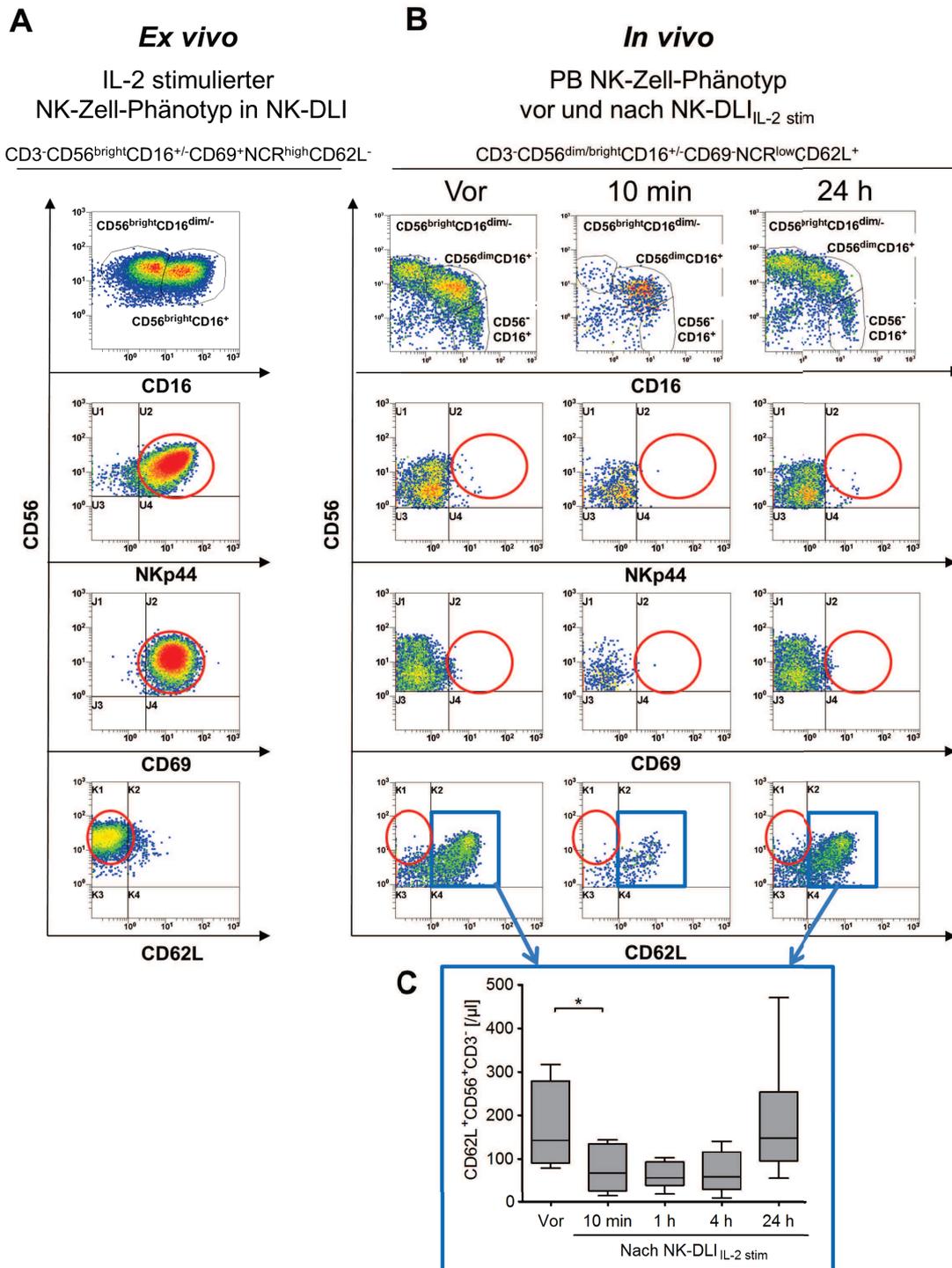


Abbildung 4.6: Unterschiedliche NK-Zell-Phänotypen im peripheren Blut und der NK-DLI. **A)** NK-Zellen in der NK-DLI_{IL-2 stim} zeigten nach 9-tägiger *ex vivo* IL-2 Stimulation einen CD3⁺CD56^{bright}CD16^{+/-}CD69⁺NCR^{high}CD62L⁻ Phänotyp. **B)** Dieser Phänotyp konnte nach NK-DLI_{IL-2 stim} Applikation zu keinem Zeitpunkt im PB der Patienten detektiert werden (Kreise). Patienteneigene NK-Zellen im PB zeigten hingegen einen CD3⁺CD56^{dim/bright}CD16^{+/-}CD69⁻NCR^{low}CD62L⁺ Phänotyp. Anhand der divergenten CD62L Expression konnte auch eine Reduktion der patienteneigenen NK-Zell-Population unmittelbar nach NK-DLI_{IL-2 stim} gezeigt werden (Kästen). Die Rückkehr der Zellen nach 24 h war jedoch nur auf patienteneigene, nicht auf stimulierte NK-Zellen aus der DLI, beschränkt. **C)** 10 min nach NK-DLI_{IL-2 stim} kam es zu einer signifikanten Reduktion der CD62L⁺ NK-Zellen/μl aus dem PB des Patienten, die erst nach 24 h wieder die Ursprungswerte erreichten (grau, frische und kryokonservierte Applikationen n=8, p< 0,05).

4.1.3. Monitoring Antigen-präsentierender Zellen, Granulozyten, B- und T-Zellen

Die Applikation von NK-DLI_{IL-2 stim} verursachte in allen Patienten eine rasche und drastische Reduktion der Monozyten in der peripheren Blutzirkulation (▷ Abb. 4.7). Das fast vollständige Verschwinden 10 min nach Ende der NK-Zell-Infusion war mit einer 15-fachen Reduktion der Monozyten von im Median 390/ μ l auf 15/ μ l assoziiert (n=13, p<0,001). Die Monozytenzahl kehrte innerhalb der nächsten 24 h wieder zu den ursprünglichen Werten zurück. Diese transiente Monozytopenie war nach Applikation von NK-DLI_{unstim} nicht zu beobachten.

Ähnliches wurde bei dem Monitoring der myeloiden (mDC) und plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC) beobachtet. Nach signifikanter Zellzahlreduktion 10 min nach NK-DLI_{IL-2 stim} Applikation (n=13, p<0,01) normalisierten sich die Werte im Lauf der nächsten 24 h bis hin zu einer Woche (▷ Abb. 4.8). Dieser Effekt konnte nach unstimulierten NK-Zell-Infusionen nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Trotz der geringen physiologischen Anzahl von DCs im PB (< 12/ μ l) ermöglichte die Messung mit der *single platform* Analyse bei einer Nachweisgrenze von ca. 1 Zelle/ μ l eine genaue Bestimmung der Absolutzellzahlen.

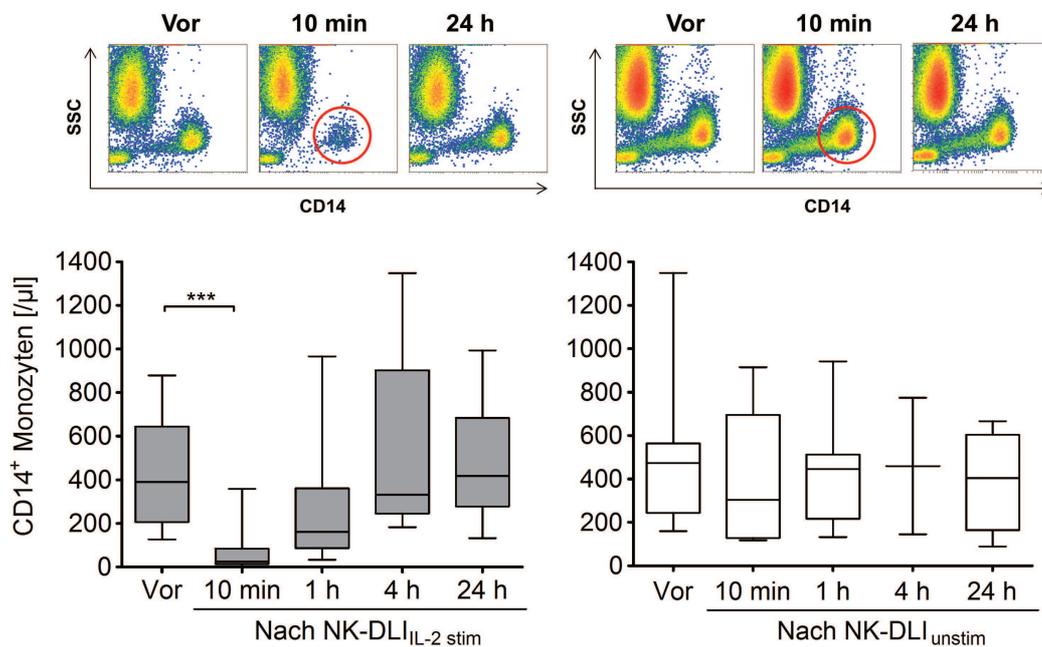


Abbildung 4.7: Monitoring der Monozyten nach NK-DLI. Nach Infusion von NK-DLI_{IL-2 stim} wurde eine signifikante Reduktion der CD14⁺ Monozyten im PB der Patienten beobachtet (grau, n=13, p<0,001; *Density plots* Kreis). Unstimulierte NK-Zell-Infusionen zeigten hingegen keinen signifikanten Einfluss auf die Monozytenverteilung im PB (weiß, n=8). Gezeigt sind alle frischen und kryokonservierten NK-DLI Applikationen.

4. Ergebnisse

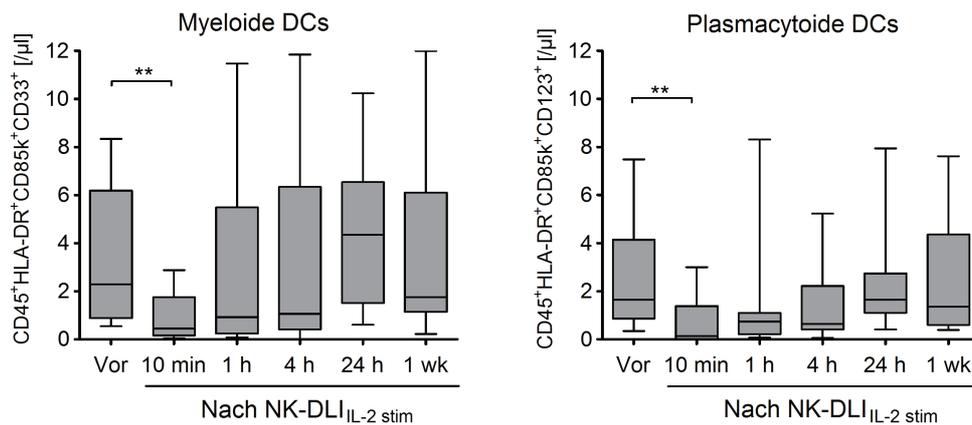


Abbildung 4.8: Monitoring der dendritischen Zellen nach NK-DLI. Nach Infusion von NK-DLI_{IL-2 stim} konnte trotz sehr geringer physiologischer Zellzahlen eine signifikante Reduktion der myeloide (mDC, CD45⁺CD14⁻CD16⁻HLA-DR⁺CD85k⁺CD33⁺) und plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC, CD45⁺CD14⁻CD16⁻HLA-DR⁺CD85k⁺CD123⁺) im PB der Patienten beobachtet werden (grau, n=13, p<0,01). Gezeigt sind alle frischen und kryokonservierten NK-DLI Applikationen.

Untersuchungen der eosinophilen und neutrophilen Granulozyten zeigten gegensätzliche Effekte. Während eine signifikante Verminderung der eosinophilen Granulozyten (Eosinopenie) 10 min nach NK-DLI_{IL-2 stim} beobachtet wurde (n=13, p<0,001), kam es zu einem massiven Anstieg der neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut (n=13, p<0,001) (> Abb. 4.9). Die transiente Neutrophilie kam 4 h nach Infusionsende mit einem im Schnitt 4-fachen Anstieg zu ihrem Höhepunkt und normalisierte sich im Lauf der nächsten 24 h bis zu einer Woche. Unstimulierte NK-Zell-Infusionen bewirkten hingegen keine Änderung der Granulozytenverteilung im peripheren Blutkreislauf (Daten nicht gezeigt).

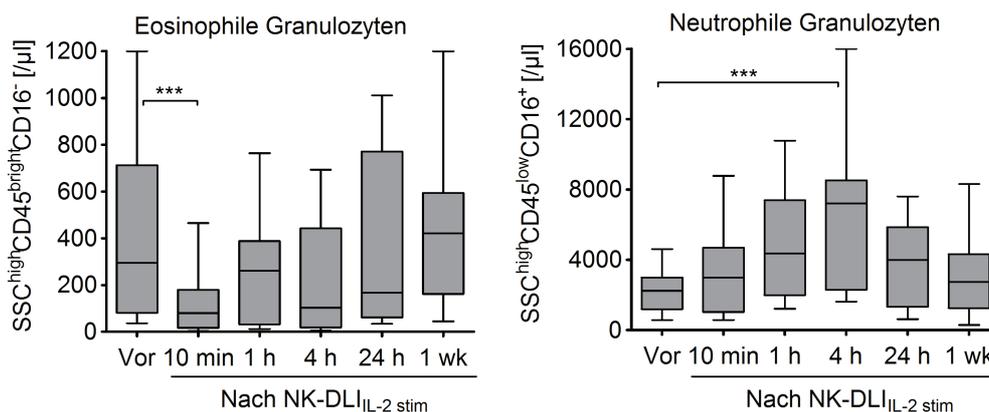


Abbildung 4.9: Monitoring der Granulozyten nach NK-DLI. Die Applikation von NK-DLI_{IL-2 stim} verursachte eine rasche, signifikante Reduktion der eosinophilen Granulozyten (SSC^{high}CD45^{bright}CD16⁻) in der PB Zirkulation der Patienten (grau, n=13, p<0,001). Gegensätzlich kam es zu einem massiven Anstieg der neutrophilen Granulozyten Population (SSC^{high}CD45^{low}CD16⁺) innerhalb von 4 h nach NK-Zell-Infusion (grau, n=13, p<0,001). Beide Populationen kehrten innerhalb von 24 h bis einer Woche zu den Ursprungszellzahlen zurück. Gezeigt sind alle frischen und kryokonservierten NK-DLI Applikationen.

4.1. Einfluss unstimulierter und IL-2 stimulierter NK-DLIs auf das Immunsystem

NK-Zellen sind die erste regenerierende Lymphozytenpopulation nach allogener SZT. Im Vergleich zu der schnellen NK-Zell-Immunkonstruktion innerhalb von zwei bis drei Wochen nach SZT verläuft die Regeneration von T- und B-Zellen deutlich langsamer [153]. Daher waren zu dem frühen Zeitpunkt an Tag +40 nach SZT nur relativ geringe Mengen dieser Lymphozyten im peripheren Blut nachweisbar (Median 50/ μ l CD3⁺ T-Zellen, 58/ μ l CD19⁺ B-Zellen). Die NK-DLI_{IL-2 stim} Applikation verursachte innerhalb von vier Stunden eine leichte, statistisch nicht signifikante Reduktion der T-Zellen, während die B-Zellzahl unbeeinflusst blieb. NK-DLI_{unstim} zeigten keinerlei Einfluss (Daten nicht gezeigt).

4.1.4. Monitoring der Zytokin- und Chemokin-Konzentration

Im Rahmen der studienbegleitenden Untersuchungen wurden die Zytokin- und Chemokin-Konzentrationen sowohl in den *ex vivo* IL-2 stimulierten NK-Zell-Produkten als auch *in vivo* vor und 10 min, 1 h, 4 h und 24 h nach NK-DLI im peripheren Blutplasma der Patienten bestimmt. Die *ex vivo* IL-2 Stimulation der Spender-NK-Zellen war von der Sekretion hoher Mengen der auf Leukozyten aktivierend und chemotaktisch wirkenden Chemokine IL-8, MCP-1, MIP-1 β , IP-10 und RANTES begleitet (\triangleright Abb. 4.10 A). Zudem wurde das immunregulatorisch vielfältig wirkende Zytokin IFN- γ in hohem Maße sekretiert. Im Gegensatz dazu lag die Konzentration des proinflammatorischen Zytokins IL-6, welches einer der wichtigsten Mediatoren von Fieber und der „Akuten-Phase Antwort“ darstellt, im Mittel unterhalb von 10 pg/ml. Die hohe IL-2 Konzentration war durch die Zytokinzufuhr alle drei Tage während der *ex vivo* Expansion bedingt.

Um einen Zellverlust zu vermeiden, wurden die expandierten NK-Zell-Produkte entsprechend des Studienprotokolls vor Applikation nicht gewaschen. Somit wurden die gesamten im Lauf der Expansion produzierten Zytokine und Chemokine dem Patienten mit der DLI verabreicht. Unmittelbar nach NK-DLI_{IL-2 stim} kam es zu einem signifikanten Anstieg von IL-6, MIP-1 β , IFN- γ , IL-8, MCP-1 und IL-2 im peripheren Blutplasma der Patienten (\triangleright Abb. 4.10 B links). Dieser Anstieg war bis zu 4 h nach Infusion nachweisbar und kehrte erst im Lauf von 24 h zum Ursprungslevel zurück. Obgleich Plasmaproben von nur zwei Patienten verfügbar waren hatte die NK-DLI_{unstim} Applikation im Gegensatz dazu keinerlei Einfluss auf die *in vivo* Zytokin- und Chemokin-Konzentration (\triangleright Abb. 4.10 B rechts). Die Chemokine IP-10 und RANTES zeigten bereits hohe endogene Basallevel, die durch die NK-DLI_{IL-2 stim} nicht beeinflusst wurden. TNF- α , TNF- β , GM-CSF, MIP-1 α , FasL und IL-13 wurden während der *ex vivo* NK-Zell-Expansion sekretiert, konnten aber entweder *in vivo* nicht detektiert werden oder die Infusion führte zu keiner Veränderung der Plasmakonzentration. IL-1 β , IL-4, IL-7, IL-10, IL-12/IL-23p40 und G-CSF wurden hingegen weder in der NK-DLI noch im Plasma der Patienten detektiert.

4. Ergebnisse

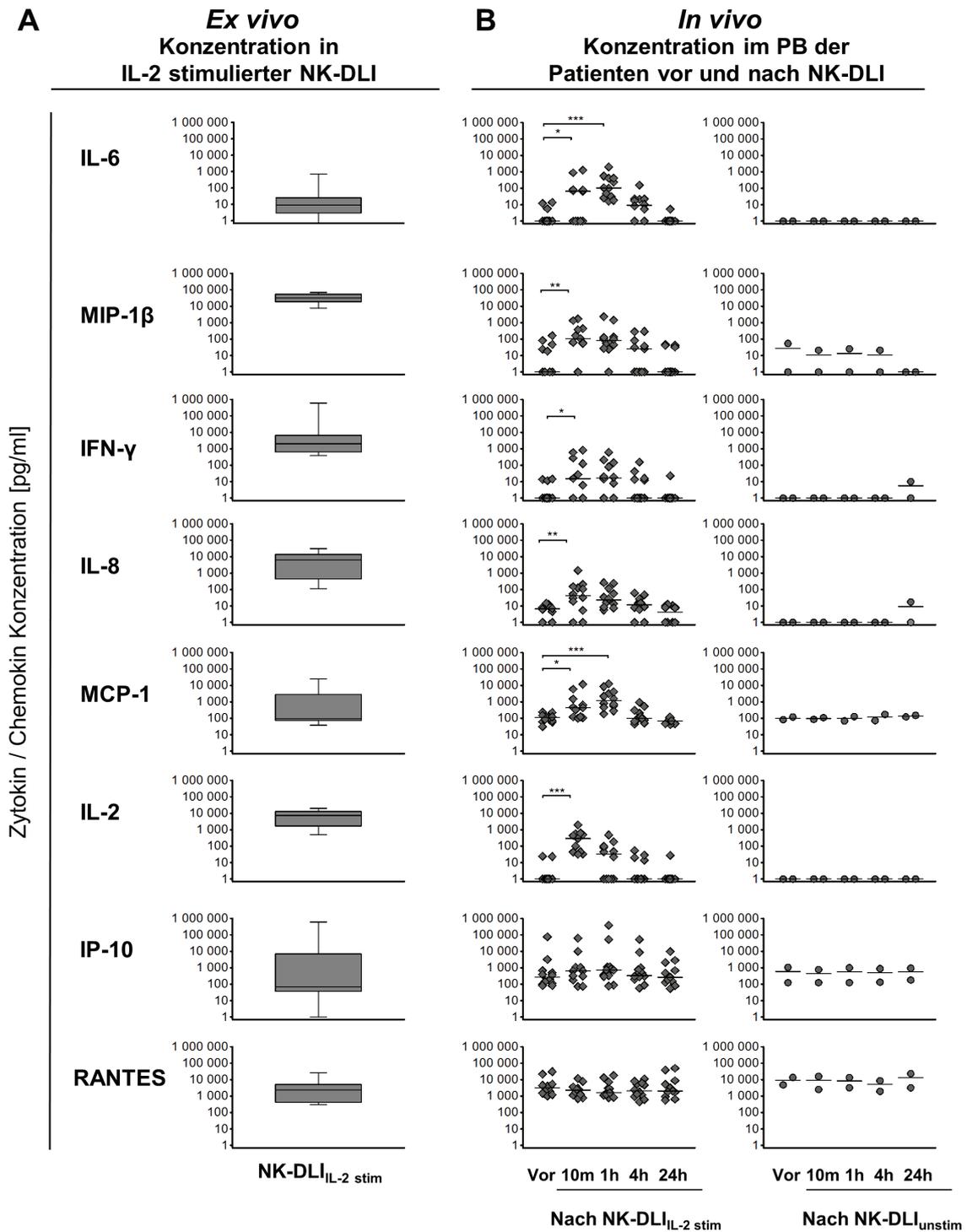


Abbildung 4.10: Monitoring der *ex vivo* und *in vivo* Zytokin- und Chemokin-Konzentration vor und nach NK-DLI. **A)** Konzentration der während der 9- bis 14-tägigen *ex vivo* IL-2 Stimulation von NK-Zellen sekretierten Zytokine und Chemokine in der NK-DLI_{IL-2 stim} (n=12). **B)** *In vivo* Konzentration vor und 10 min, 1 h, 4 h, 24 h nach IL-2 stimulierter (links, n=12, frische und kryokonservierte NK-DLI Applikationen) und unstimulierter (rechts, n=2) NK-DLI Applikation.

4.1. Einfluss unstimulierter und IL-2 stimulierter NK-DLIs auf das Immunsystem

Die Berechnung der während der *ex vivo* IL-2 Stimulation von NK-Zellen sekretierten Zytokine/Chemokine erlaubte auf Grund von Faktoren wie Zytokin-Stabilität, -Ausscheidung und Verdünnungseffekten keinen direkten Vergleich zu den gemessenen *in vivo* Spiegeln nach NK-DLI_{IL-2 stim}. Dennoch war auffällig, dass hohe Mengen von IFN- γ , IL-8, MCP-1, IL-2 und besonders MIP-1 β 10 min nach Infusion um ein Vielfaches reduziert (bis zu 175-fach) im Plasma detektiert wurden (\triangleright Abb. 4.10). Im Gegensatz dazu folgte auf die Infusion einer geringer Menge IL-6 aus der NK-DLI_{IL-2 stim} ein 10- bis 100-facher Anstieg im peripheren Blut der Patienten, was auf eine sekundäre Produktion durch den Patienten hindeutet.

4.1.5. Fallbeispiel einer NK-DLI_{IL-2 stim} nach Zytokin-Entfernung

Einer der in dieser klinischen NK-Zell-Studie behandelten Patienten erhielt eine kryokonservierte IL-2 stimulierte NK-DLI, die vor der Applikation gewaschen wurde (NK-DLI_{IL-2 stim + wash}, Patient Nr. 14). Die Indikation zum Waschen wurde gestellt, da der Patient vormals schwere Reaktionen auf das Kryokonservierungsagens DMSO zeigte. Nach dem Waschvorgang wurde das NK-Zell-Präparat erneut mit 1000 U/ml IL-2 versetzt. Da durch den Waschvorgang das gesamte *ex vivo* produzierte Zytokin/Chemokin-Milieu entfernt wurde, ermöglichte dies eine unabhängige Betrachtung der Effekte von IL-2 alleine im Vergleich zu dem gesamten Zytokin/Chemokin-Gemisch (\triangleright Tab. 4.3).

Tabelle 4.3: Übersicht der Effekte von NK-DLI_{IL-2 stim}, NK-DLI_{unstim} und NK-DLI_{IL-2 stim + wash} auf die Zusammensetzung des peripheren Blutes der Patienten.

PB der Patienten	NK-DLI _{IL-2 stim} (+IL-2 / +Zytokine)	NK-DLI _{unstim} (-IL-2 / -Zytokine)	NK-DLI _{IL-2 stim+wash} (+IL-2 / -Zytokine)
NK-Zellen [μ l]	↓	↘	↘
CD56 ^{bright} [% + / μ l]	↓	→	↘
Monozyten [μ l]	↓	→	→
Granulozyten [μ l]	↑	→	→
Neutrophile [μ l]	↑	→	→
Eosinophile [μ l]	↓	→	→
Zytokine/Chemokine [pg/ml]	↑	→	→

↑: Anstieg, ↓: Reduktion, ↘: leichte Reduktion, →: keine Veränderung, PB: peripheres Blut, stim.: IL-2 stimuliert, unstim.: unstimuliert, wash: gewaschene IL-2 stimulierte NK-DLI

Die Infusion der NK-DLI_{IL-2 stim + wash} verursachte eine leichte Reduktion der NK-Zellen im peripheren Blut der Patienten. Des Weiteren wurde sowohl eine Reduktion der Zellzahl als auch eine prozentuale Verschiebung der CD56^{bright}CD16^{dim/-} Subpopulation beobachtet. Zellzahlen anderen Leukozytenpopulationen (Monozyten, Granulozyten) wurden nicht beeinflusst. Zudem führte die Infusion neben einem zu erwartenden IL-2 Anstieg zu keiner Veränderung der Zytokin/Chemokin-Konzentration im peripheren Blut des Patienten.

4.2. Einfluss des Immunsuppressivums MMF auf die NK-Zell-Funktionalität

Nach haploidenter Stammzelltransplantation mit CD3/CD19-depletierten Stammzelltransplantaten ist eine immunsuppressive Therapie zur Vermeidung von schweren Abstoßungsreaktionen wie dem Auftreten einer GvHD dringend erforderlich. Dabei ist jedoch unklar, ob diese Immunsuppression die Funktionalität und Effektivität der hochaktivierten NK-Zellen im Rahmen der klinischen Phase I/II NK-Zell-Studie beeinträchtigt. Daher wurde in vorliegender Arbeit der Einfluss des primär verabreichten immunsuppressiven Medikaments Mycophenolat-Mofetil (MMF), bzw. des aktiven Metaboliten Mycophenolsäure (*Mycophenolic acid*, MPA), auf die Funktionalität von NK-Zellen untersucht. Im Speziellen wurden dabei Effekte auf die Proliferation, die Zytotoxizität, die Zytokin- und Chemokin-Sekretion, die Adhäsion und Mobilität sowie auf die Aktivierung intrazellulärer Signalmoleküle betrachtet.

4.2.1. Proliferation

MPA hat *in vitro* in den Konzentrationen von 1 bis 10 μM einen anti-proliferativen Effekt auf humane PBMNZ gezeigt [58]. Um eine auf die Proliferation von NK-Zellen effektiv wirkende MPA-Konzentration zu ermitteln, wurden NK-Zellen während der *ex vivo* IL-2 Stimulation zusätzlich mit vier verschiedenen Konzentrationen MPA im Bereich von 100 nM bis 100 μM behandelt. Dabei konnte eine dosisabhängige Hemmung der NK-Zell-Proliferation beobachtet werden (\triangleright Abb. 4.11 A). Die Behandlung mit der niedrigsten Dosis von 100 nM zeigte keine reduzierte Proliferation im Vergleich zu den unbehandelten IL-2 stimulierten NK-Zellen (Positiv-Kontrolle, schwarz). Als Negativ-Kontrolle dienten unstimulierte NK-Zellen am Tag 0 (grau). Während die Inkubation mit 1 μM in einer partiellen Hemmung resultierte, verursachten 10 μM und 100 μM MPA hingegen eine vollständige Inhibierung der IL-2 induzierten NK-Zell-Proliferation (rot). Da die MPA-Konzentration von 10 μM die niedrigste Dosis mit der effektivsten Proliferations-Hemmung darstellte, wurde diese für folgende *in vitro* Untersuchungen verwendet. Dies entsprach zudem therapeutisch relevanten *in vivo* MPA-Plasmakonzentrationen im Patienten [53, 54, 154].

Wie im Rahmen dieser NK-Zell-Studie gezeigt wurde, kommt es während der *ex vivo* Kultivierung von NK-Zellen innerhalb der ersten drei Tage zu einer anfänglichen Reduktion von vitalen Zellen. Dies ist im weiteren Expansionszeitraum von einer deutlichen Proliferation der NK-Zellen gefolgt [134]. Während einer 9-tägigen IL-2 Stimulation konnte im Mittel eine etwa 3-fache Expansion der NK-Zellen erzielt werden. Die zusätzliche Be-

4.2. Einfluss des Immunsuppressivums MMF auf die NK-Zell-Funktionalität

handlung mit 10 μM MPA führte hingegen zu einer absoluten Reduktion an lebenden NK-Zellen in der Kultur (\triangleright Abb. 4.11 B). Zudem wurde die sowohl in dieser als auch in einer vorhergehenden Arbeit dieser Arbeitsgruppe durch eine IL-2 Stimulation beschriebene Erhöhung der CD56 Expression auf NK-Zellen durch die Behandlung mit MPA vollständig unterdrückt (\triangleright Abb. 4.11 C) [115, 138].

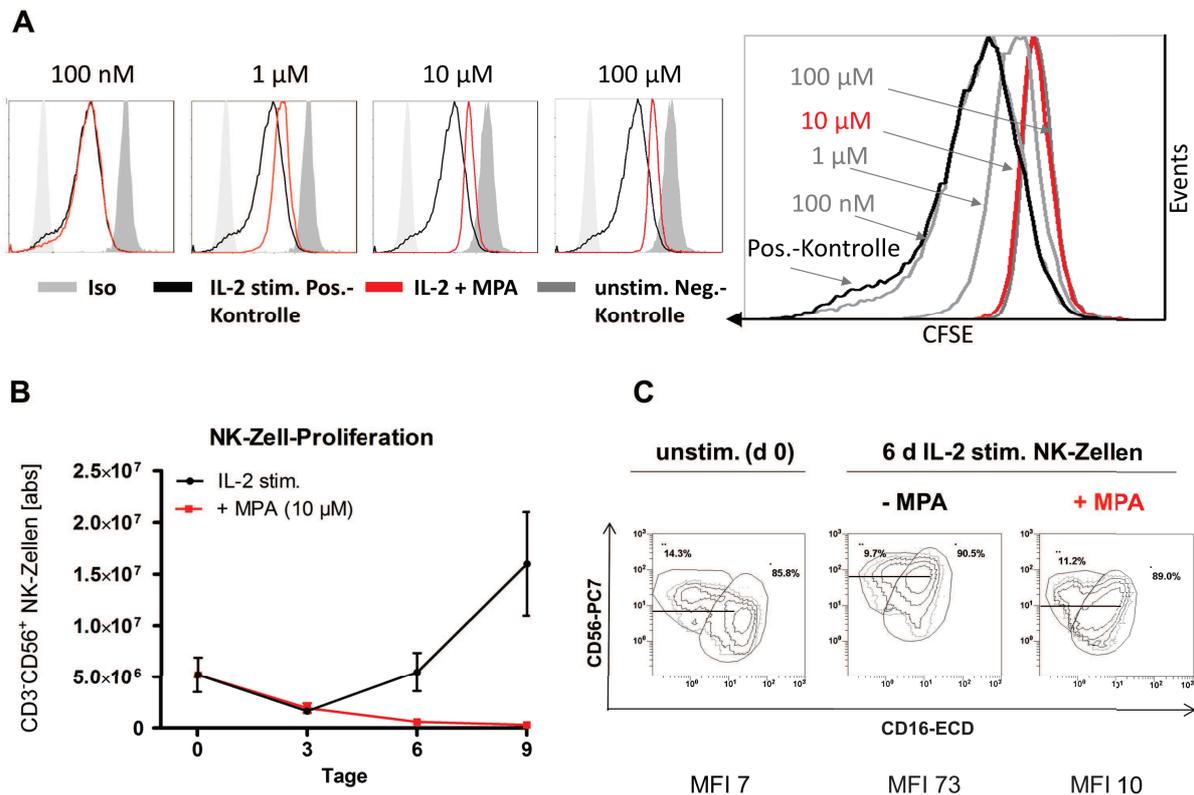


Abbildung 4.11: Dosisabhängige NK-Zell-Proliferation unter MPA-Behandlung. **A)** Dosisabhängiger Einfluss von 100 nM bis 100 μM MPA auf die Proliferation von IL-2 stimulierten (1000 U/ml, 6 d) CFSE-gefärbten NK-Zellen. 10 μM MPA war die niedrigste Dosis bei absoluter Proliferationsinhibition. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche. **B)** Während einer 9-tägigen IL-2 Stimulation konnte eine etwa 3-fache NK-Zell-Expansion erzielt werden (schwarz, $n=3$). Die Koinkubation mit 10 μM MPA verursachte eine Inhibition der Proliferation und führte zu einer Reduktion an lebenden NK-Zellen (rot). Mittelwert \pm SEM **C)** Frisch isolierte unstimulierte NK-Zellen (d 0) können anhand ihrer CD56 und CD16 Oberflächenexpression in eine große CD56^{dim}CD16⁺ und eine kleine CD56^{bright}CD16^{dim/-} Subpopulation unterteilt werden (MFI CD56=7). Nach 6-tägiger IL-2 Stimulation dominierte ein CD56^{bright} Phänotyp (MFI CD56=73). Diese IL-2 bedingte Hochregulation der CD56 Expression wurde durch die Koinkubation von 10 μM MPA vollständig inhibiert (MFI CD56=10). Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche. *Abkürzungen:* Iso: Eigen- bzw. Autofluoreszenz, MFI: Mittlere Fluoreszenzintensität.

Um das Proliferationsverhalten von NK-Zellen in An- und Abwesenheit der therapeutisch relevanten MPA-Konzentrationen von 10 μM näher zu charakterisieren, wurden hochaufgereinigte NK-Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE markiert und über einen

4. Ergebnisse

Zeitraum von neun Tagen mit IL-2 stimuliert und expandiert. Dabei konnten mit Hilfe der FlowJo-Software die im Verlauf der Expansion vollzogenen Zellteilungen anhand der erreichten Zellgenerationen exakt ermittelt werden (▷ Abb. 4.12).

NK-Zellen proliferierten deutlich unter dem IL-2 Stimulus, was durch eine Abnahme der CFSE-Intensität und einem daraus resultierendem „Links-Shift“ gekennzeichnet war. Dabei wurden innerhalb von neun Tagen bis zu sieben Zellteilungen vollzogen – also die siebte Tochtergeneration erreicht (schwarz). Die Proliferation von 10 μM MPA-behandelten NK-Zellen wurde hingegen bereits innerhalb der ersten Zellteilungen massiv gehemmt (rot). Die Hemmung der Proliferation war fast vollständig reversibel nachdem MPA am dritten Tag der Inkubation durch einen Mediumwechsel („Wash“, blau) entfernt worden war. Trotz 3-tägiger MPA-Behandlung proliferierten die NK-Zellen in den folgenden sechs Tagen und erreichten vergleichbare Tochtergenerationen wie die unbehandelte IL-2 stimulierte Positiv-Kontrolle.

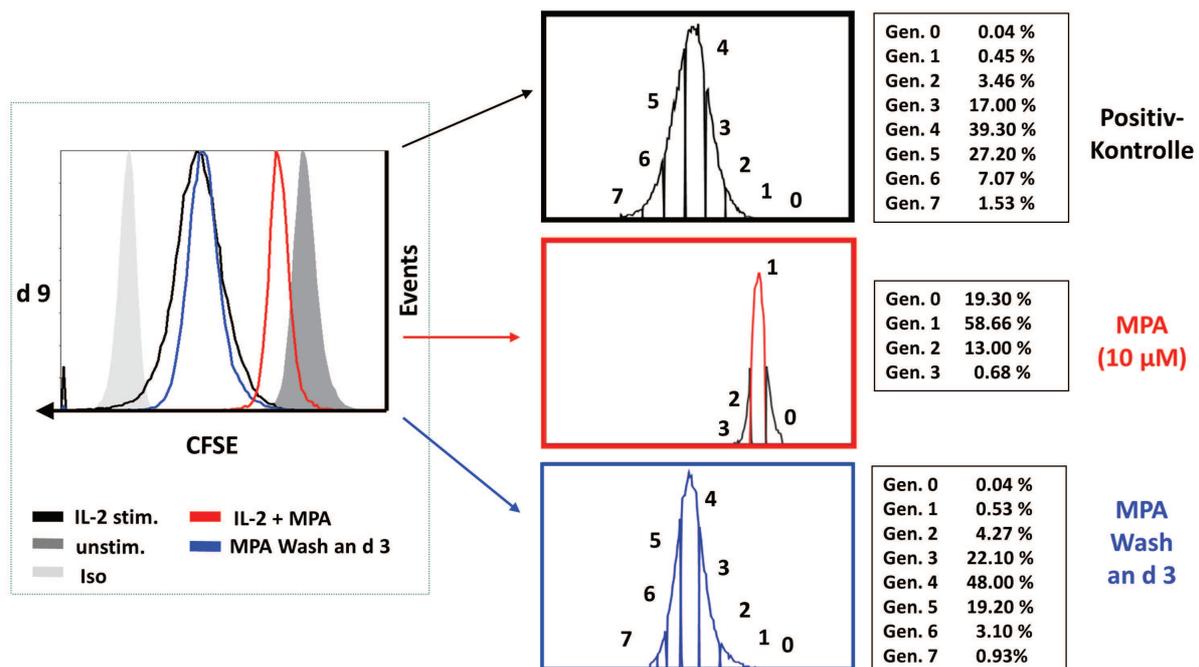


Abbildung 4.12: Proliferations-Hemmung und Reversibilität nach MPA-Behandlung. Während unbehandelte IL-2 stimulierte NK-Zellen der Positiv-Kontrolle innerhalb von neun Tagen bis zu sieben Tochtergenerationen erreichten (schwarz), wurde die Proliferation durch 10 μM MPA massiv innerhalb der ersten Zellteilungen inhibiert (rot). Die Hemmung war jedoch nach der Entfernung von MPA am dritten Inkubationstag fast vollständig reversibel („Wash“, blau). Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche. *Abkürzungen:* Gen.: Generation, Iso: Eigen- bzw. Autofluoreszenz.

Einfluss auf die T-Zell-Proliferation

Um Unterschiede in der MPA-induzierten Hemmung der Proliferation von NK-Zellen und T-Zellen zu ermitteln, wurden beide Populationen in einer Kokultur für neun Tage unter IL-2 Stimulation kultiviert. Beide Zelltypen zeigten eine ähnliche Sensitivität gegenüber 1 und 10 μM MPA (rot). Auch die Reversibilität nach Entfernung von MPA aus dem Zellkulturmedium am dritten Tag der Expansion war vergleichbar (blau). Diese Abbildung verdeutlicht zudem die nur partielle Inhibition der T- und NK-Zell-Proliferation durch die geringere MPA-Dosis von 1 μM und die dadurch bedingte schnellere Zellerholung nach Entfernung des Proliferations-Inhibitors (\triangleright Abb. 4.13).

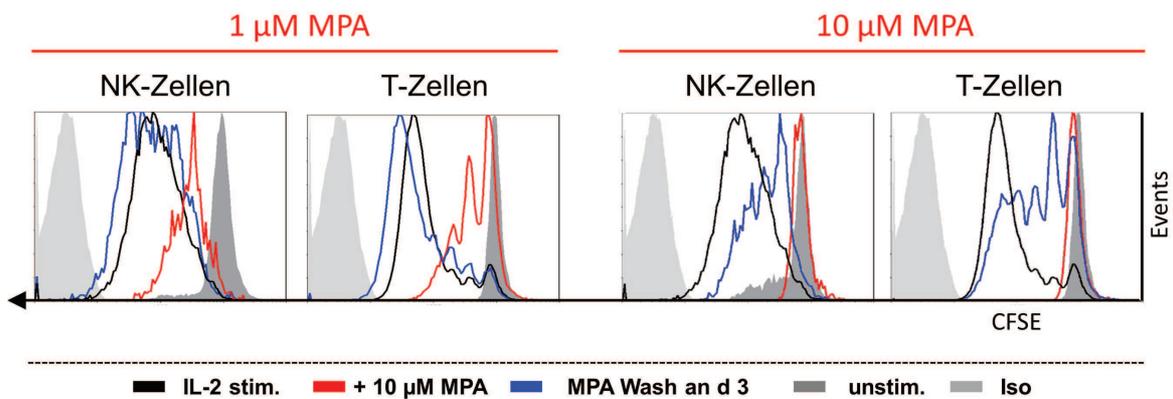


Abbildung 4.13: Vergleichbare Proliferations-Hemmung durch MPA und Reversibilität von NK- und T-Zellen. Beide Lymphozyten-Populationen zeigten während 9-tägiger IL-2 Stimulation eine ähnliche Proliferation (schwarz), eine ähnliche MPA-bedingte Hemmung der Proliferation (rot) und auch eine vergleichbare Reversibilität der Hemmung nachdem MPA nach 3-tägiger Inkubation aus dem Zellkulturmedium entfernt wurde (blau, wash). Die Abbildung ist repräsentativ für zwei unabhängige Versuche. *Abkürzungen:* Iso: Eigen- bzw. Autofluoreszenz.

4.2.2. Zytotoxizität

Wie bereits in Abbildung 4.1 gezeigt, führte die *ex vivo* IL-2 Stimulation von NK-Zellen zu einer signifikanten Erhöhung der Zytotoxizität gegen die humane Leukämie-Zelllinie K-562. Im Rahmen der laufenden NK-Zell-Studie wurde zudem als Qualitätskontrolle der NK-Zell-Produkte die erhöhte zytotoxische Aktivität von stimulierten NK-Zellen gegen eine Neuroblastom-Zelllinie demonstriert [115, 150]. Um zu ermitteln, ob die Funktionalität der im Rahmen der klinischen NK-Zell-Studie applizierten hochzytotoxischen Spender-NK-Zellen durch eine immunsuppressive Therapie mit MMF beeinflusst wird, wurden IL-2 stimulierte Spender-NK-Zellen mit der klinisch relevanten Konzentration von 10 μM MPA inkubiert (\triangleright Abb. 4.14). Die zytotoxische Aktivität der zehn Tage IL-2 stimulierten NK-Zellen wurde durch die 24-stündige MPA-Inkubation, beginnend am Tag 9, in allen getesteten Effektor-zu-Target Ratios signifikant reduziert ($n=5$, $p<0,01$). Die Reduktion betrug jedoch trotz statistischer Signifikanz im Mittel nur etwa 7% und resultierte daher in einem nur mäßigen Funktionsverlust der NK-Zellen.

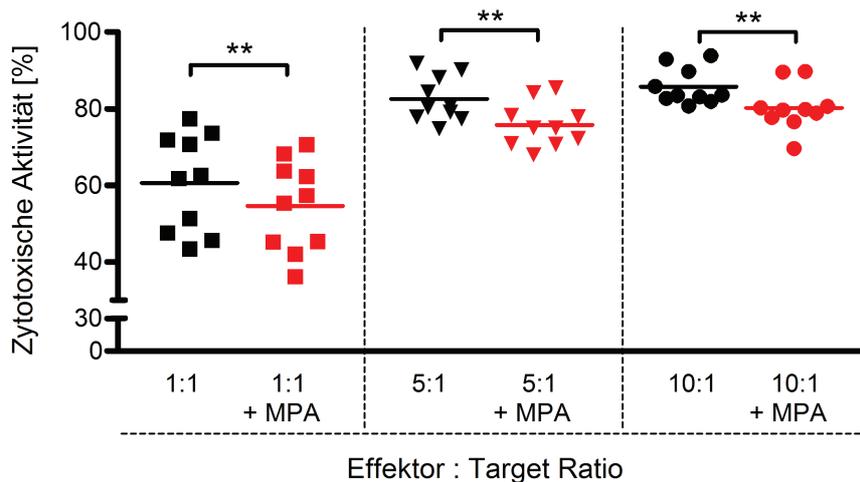


Abbildung 4.14: Einfluss des Immunsuppressivums MPA auf die NK-Zell-Zytotoxizität. Zehn Tage IL-2 stimulierte Spender-NK-Zellen zeigten in den untersuchten Effektor-zu-Target Ratios 1:1, 5:1 und 10:1 eine hohe zytotoxische Aktivität (schwarz, $n=5$, Doppelansatz). Diese wurde nach 24-stündiger Inkubation ab Tag 9 mit 10 μM MPA signifikant reduziert (rot, $n=5$, Doppelansatz, $p<0,01$). Die Reduktion betrug im Mittel etwa 7%.

Im Rahmen der klinischen NK-Zell-Studie stand zudem Blutplasma vier verschiedener Patienten (\triangleright Tab. 3.2, Patienten Nr. 13, 14, 15, 17) zur Verfügung. Dies ermöglichte die Untersuchung der Einflusses der *in vivo* MMF-Therapie auf die zytotoxische Aktivität der IL-2 stimulierten Spender-NK-Zellen. Dazu wurden Proben der für die klinische Applikation expandierten Spender-NK-Zellen am neunten Tag der Expansion für 24 h mit Patientenplasma inkubiert, welches am gleichen Tag unmittelbar vor der NK-Zell-Applikation dem Patienten entnommen wurde. Die Konstitution des peripheren Blutplasmas für den

4.2. Einfluss des Immunsuppressivums MMF auf die NK-Zell-Funktionalität

experimentellen *ex vivo* Ansatz entsprach somit der physiologischen *in vivo* Situation. Die 24-stündige Inkubation mit Patientenplasma resultierte in einer signifikanten Zytotoxizitäts-Reduktion der Spender-NK-Zellen gegen die leukämische Zelllinie K-562 in allen untersuchten Effektor-zu-Target Ratios ($n=4$, $p<0,01$) (▷ Abb. 4.15). Diese Reduktion der zytotoxischen Aktivität betrug im Mittel etwa 23 % und war somit deutlich stärker als nach alleiniger MPA-Inkubation.

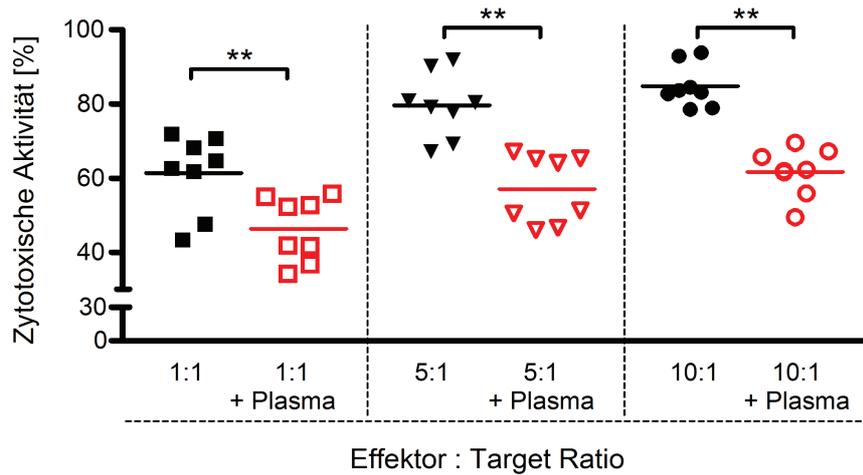


Abbildung 4.15: Einfluss von Patientenplasma auf die NK-Zell-Zytotoxizität. IL-2 stimulierte Spender-NK-Zellen wurden beginnend ab Tag 9 für 24 h mit Patientenplasma vom Tag der NK-DLI inkubiert. Die hohe zytotoxische Aktivität zehn Tage IL-2 stimulierter Spender-NK-Zellen (schwarz, $n=4$, Doppelansatz) wurde durch die Inkubation mit dem Patientenplasma in allen Effektor-zu-Target Ratios signifikant reduziert (rot, $n=4$, Doppelansatz, $p<0,01$). Die Reduktion betrug im Mittel etwa 23 %.

Zu beachten ist dabei, dass nur zwei der vier in diesem Versuch untersuchten Patienten zum Zeitpunkt der Plasmaentnahme unter immunsuppressiver Therapie mit MMF waren. Analysen durch das Zentrallabor des J. W. Goethe-Universitätsklinikums ergaben einen mittleren MPA-Plasmalevel von $1,19 \mu\text{M}$ im Vergleich zu $0,35 \mu\text{M}$ MPA im Blutplasma der unbehandelten Patienten (▷ Tab. 4.4). Innerhalb dieser kleinen Patientengruppen konnten keine Unterschiede im Ausmaß der Zytotoxizitäts-Hemmung in Abhängigkeit zu den gemessenen *in vivo* MPA-Plasmalevel beobachtet werden.

Tabelle 4.4: MPA-Konzentration im Patientenplasma.

Patient Nr.	MMF-Therapie	MPA-Plasmalevel [μM]
13	+	1,21
14	+	1,16
15	-	0,13
17	-	0,56

+ Patient hat zum Zeitpunkt der Plasmaentnahme MMF als Immunsuppressivum erhalten

- Patient hat zum Zeitpunkt der Plasmaentnahme keine immunsuppressive Therapie erhalten

4. Ergebnisse

Im Verlauf der klinischen NK-Zell-Studie entwickelte Patient Nr. 13 während der Infusion einer NK-DLI_{IL-2 stim} kurzzeitig Fieber und Schüttelfrost. Aufgrund dessen wurde in einer einmaligen Dosis das Corticosteroid Prednisolon (1×2 mg/kg KG) verabreicht. So konnte zudem der Einfluss der *in vivo* Steroidapplikation auf die NK-Zell-Funktionalität der stimulierten Spender-NK-Zellen *in vitro* untersucht werden. Die Inkubation der Spender-NK-Zellen mit dem peripheren Blutplasma des Patienten nach der Steroidapplikation verursachte die bisher stärkste Hemmung der NK-Zell-Funktionalität. Die hohe zytotoxische Aktivität der IL-2 stimulierten Zellen wurde dabei in dem Effektor-zu-Target Ratio 1:1 auf eine verbleibende NK-Zell-Zytotoxizität von nur noch 34 % reduziert ($n=1$, $p<0,01$) (▷ Abb. 4.16).

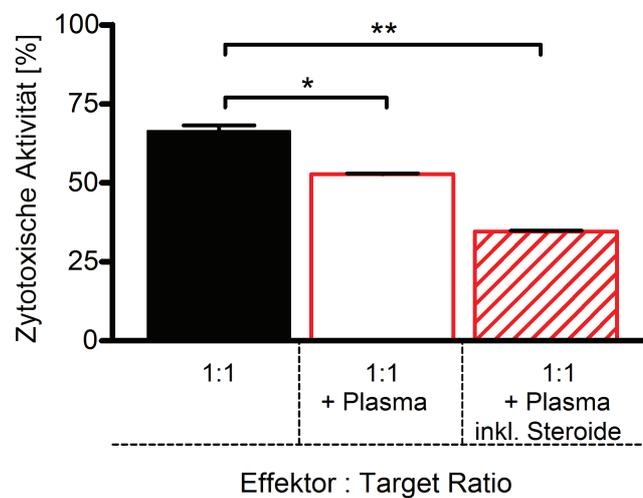


Abbildung 4.16: Einfluss einer Steroidapplikation auf die NK-Zell-Zytotoxizität. Die *in vitro* Inkubation von Spender-NK-Zellen mit Patientenplasma, welches unmittelbar nach Steroidapplikation entnommen wurde, verursachte eine massive signifikante Reduktion der zytotoxischen Aktivität. Während zehn Tage IL-2 stimulierte NK-Zellen im Effektor-zu-Target Ratio 1:1 eine hohe zytotoxische Aktivität von 66 % hatten (schwarz), wurde diese durch eine 24-stündige Inkubation mit Patientenplasma auf 53 % reduziert (rot, $p<0,05$). Eine 24-stündige Inkubation mit dem unmittelbar nach Steroidapplikation entnommenen Patientenplasma verursachte eine Reduktion auf nur noch 34 % zytotoxische Aktivität (gestreift rot, $n=1$, Doppelansatz, $p<0,01$).

4.2.3. NK-Zell-Morphologie und -Mobilität

Um die NK-Zell-Morphologie und die zytotoxische Aktivität von unbehandelten im Vergleich zu MPA-behandelten NK-Zellen visuell zu bewerten, wurden mittels Langzeit-Mikroskopie NK-Zellen in Kokultur mit primären Neuroblastom Tumorzellen beobachtet. Dafür wurden die aus einer Metastase eines 4-jährigen Neuroblastom Stadium IV Patienten isolierten [135] (▷ Tab. 3.2, Patient Nr. 17), als sog. Sphäroide wachsende Tumorzellen, für etwa 6 h mit den zehn Tage IL-2 stimulierten NK-Zellen des entsprechenden Spen-

4.2. Einfluss des Immunsuppressivums MMF auf die NK-Zell-Funktionalität

ders inkubiert. Um den Einfluss einer MPA-Behandlung zu evaluieren, wurden in einem zweiten Ansatz NK-Zellen ab dem neunten Expansionstag für 24 h mit 10 μ M MPA vorbehandelt. Die Fotoaufnahmen der jeweiligen Kokulturen im Abstand von je 30 Sekunden wurden zu je einem Zeitrafferfilm zusammengefügt. Die Abbildung 4.17 zeigt repräsentative Momentaufnahmen beider Filme.

IL-2 stimulierte NK-Zellen (links, Pfeilspitzen) zeigten einen polaren Phänotyp mit einer hohen Affinität und Mobilität in Richtung des großen Tumorsphäroids (Pfeil). Während der Koinkubation wurden massive Angriffe auf das Tumorsphäroid beobachtet, was in einer deutlichen Reduktion der Sphäroidgröße resultierte. Gegen Ende der etwa 6-stündigen Koinkubation wurde ein abgerundeten Phänotyp und eine Abnahme der Mobilität der NK-Zellen beobachtet. Dies korreliert mit einem erhöhtem Absterben der NK-Zellen am Ende der 4-stündigen Inkubationsdauer des durchflusszytometrischen Zytotoxizitäts-Assays im 1:1 Effektor-zu-Target Ratio. Die ab Tag 9 für 24 h mit MPA-vorbehandelten NK-Zellen zeigten hingegen von Beginn an einen abgerundeten und kaum mobilen Phänotyp (rechts, Pfeilspitzen). Vereinzelt Angriffe der Zellen führten dabei zu keiner deutlichen Beeinträchtigung der Tumorzellmasse des großen Sphäroids, jedoch aber zu einer Reduktion der beiden kleinen Sphäroide (Pfeile). Dies verdeutlicht trotz eingeschränkter Mobilität eine verbleibende zytotoxische Aktivität der NK-Zellen. Beide Langzeit-Mikroskopie Zeitrafferfilme sind als Audio-Video-Format auf einer beigefügten DVD im Anhang G dieser Arbeit zu finden.

IL-2 stim. NK-Zellen (10 d) \pm 10 μ M MPA (24 h) vs. primäre Neuroblastom (NB) Tumorsphäroide

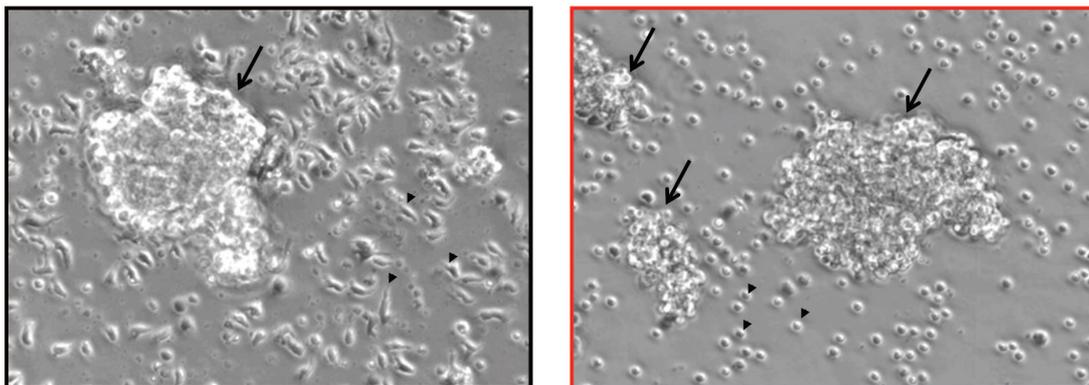


Abbildung 4.17: Morphologie und Mobilität von NK-Zellen \pm MPA in Kokultur mit Neuroblastom Tumorsphäroiden. Zehn Tage IL-2 stimulierte Spender-NK-Zellen wurden mit primären Neuroblastom Tumorsphäroiden (Pfeile) über einen Zeitraum von etwa 6 h koinkubiert. Stimulierte NK-Zellen (Pfeilspitzen) hatten einen polaren Phänotyp mit einer hohen Affinität und Mobilität in Richtung der Tumorzellen (Pfeile) (schwarz, links). Für 24 h MPA-vorbehandelte NK-Zellen zeigten hingegen einen abgerundeten und kaum mobilen Phänotyp mit geringer Affinität gegenüber den Tumorzellen (rot, rechts). Diese Abbildung zeigt repräsentative Momentaufnahmen der im Anhang G zu findenden Langzeit-Mikroskopie Zeitrafferfilme. Bilder wurden bei 200-facher Vergrößerung aufgenommen.

4.2.4. Expression verschiedener Rezeptoren auf NK-Zellen

Natürliche Zytotoxizitäts-Rezeptoren und NKG2D

Im Rahmen dieser klinischen NK-Zell-Studie konnte bereits gezeigt werden, dass die *ex vivo* IL-2 Stimulation von NK-Zellen eine signifikante Hochregulierung der Natürlichen Zytotoxizitäts-Rezeptoren (NCRs) NKp30, NKp44, NKp46 und des NKG2D Rezeptors bewirkt. Dies korrelierte direkt mit einer gesteigerten zytotoxischen Aktivität [115]. Daher wurde im Weiteren untersucht, ob die in Abschnitt 4.2.2 beschriebene Reduktion der NK-Zell-Zytotoxizität nach Inkubation der IL-2 stimulierten Spender-NK-Zellen mit MPA und Patientenplasma auf eine reduzierte Expression dieser aktivierenden zytotoxischen Rezeptoren zurückzuführen ist. Analysen der Rezeptordichte-Expression der NCRs und des NKG2D Rezeptors auf zehn Tage IL-2 stimulierten Spender-NK-Zellen zeigten jedoch, dass die Expression auf beiden NK-Zell-Subpopulationen durch eine 24-stündige Inkubation mit 10 μ M MPA nicht reduziert wurde (rot, n=5) (\triangleright Abb. 4.18).

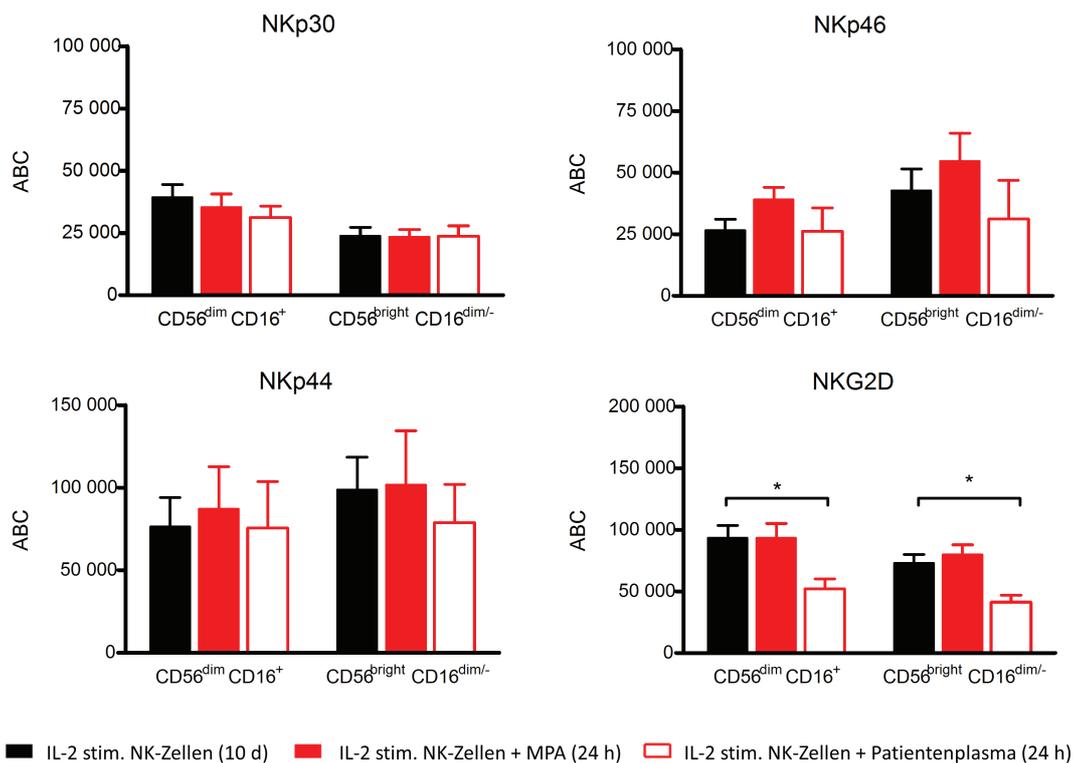


Abbildung 4.18: Rezeptordichte der Natürlichen Zytotoxizitäts-Rezeptoren und NKG2D. Zehn Tage IL-2 stimulierte NK-Zellen zeigten eine hohe Rezeptordichte der NCRs (schwarz, n=5). Die Inkubation von neun Tage IL-2 stimulierten Spender-NK-Zellen für 24 h mit 10 μ M MPA verursachte keine Reduktion der Oberflächendichte der Natürlichen Zytotoxizitäts-Rezeptoren (rote gefüllte Balken, n=5). Die 24-stündige Inkubation mit Patientenplasma resultierte hingegen in einer partiellen Reduktion der Rezeptordichte auf beiden NK-Zell-Subpopulationen mit statistischer Signifikanz bezüglich der NKG2D Expression (rote ungefüllte Balken, n=4, $p < 0,05$). Mittelwert \pm SEM. *Abkürzungen:* ABC: *antibody binding capacity* (Antikörper-Bindungs-Kapazität).

4.2. Einfluss des Immunsuppressivums MMF auf die NK-Zell-Funktionalität

Während die NKp30 und NKG2D Rezeptordichte unverändert blieb, konnte sogar eine leichte, jedoch statistisch nicht signifikante Erhöhung der NKp44 und NKp46 Dichte verzeichnet werden. Eine 24-stündige Behandlung der neun Tage IL-2 stimulierten Spender-NK-Zellen mit Patientenplasma vom Tag der NK-Zell-Gabe verursachte hingegen eine partielle Reduktion der Rezeptordichte. Diese war hinsichtlich des NKG2D Rezeptors auf beiden NK-Zell-Subpopulationen statistisch signifikant ($n=4$, $p<0,05$).

Rezeptoren involviert in NK-Zell-Aktivierung, -Migration und -Zytotoxizität

Die Aktivierung zytotoxischer Effektormechanismen wird durch ein Zusammenspiel von verschiedenen Oberflächenmolekülen reguliert, von denen die NCRs und der NKG2D Rezeptor zwar eine wichtige, aber nicht exklusive Rolle spielen. Dazu zählen neben diversen Korezeptoren auch Zelladhäsionsmoleküle, die sowohl einen Zell-Zell-Kontakt zwischen Effektor- und Zielzelle vermitteln als auch an der intrazellulären Weiterleitung aktivierender Signale beteiligt sind [79, 82]. Aufgrund dessen wurde untersucht, ob die durch MPA verursachte reduzierte Zytotoxizität und die im Abschnitt 4.2.3 beschriebene massiv eingeschränkte Mobilität in Richtung der Tumorsphäroide im Zusammenhang mit einer veränderten Expression diverser in NK-Zell-Aktivierung, -Migration und -Zytotoxizität involvierter Oberflächenmoleküle steht. Es sollte dabei zudem ein potentiell unterschiedlicher Effekt des Immunsuppressivums auf unstimulierte im Vergleich zu IL-2 stimulierten NK-Zellen untersucht werden. Dazu wurden:

- (i) frisch isolierte, unstimulierte NK-Zellen vom Beginn der Kultivierung über einen 9-tägigen Expansionszeitraum mit $10 \mu\text{M}$ MPA koinkubiert und
- (ii) sechs Tage IL-2 stimulierte NK-Zellen für weitere vier Tage bzw. neun Tage IL-2 stimulierte NK-Zellen für weitere 24 Stunden mit $10 \mu\text{M}$ MPA inkubiert.

Die 9-tägige IL-2 Stimulation verursachte eine Hochregulierung diverser Oberflächenmoleküle im Vergleich zu unstimulierten NK-Zellen zu Beginn der Expansion (\triangleright Abb. 4.19). Dabei wurde CD25, die α -Untereinheit des hochaffinen IL-2 $\alpha\beta\gamma$ -Rezeptors, deutlich durch den IL-2 Stimulus in der Expression erhöht. Nach dem Höhepunkt an Tag 6 nahm die Expression bis zum neunten Tag der Stimulation wieder ab. Da die CD25 Expression Auskunft über den Aktivierungszustand der NK-Zelle gibt, verdeutlicht dieses Expressionsmuster zudem die rasche Aktivierung der NK-Zellen im Verlauf der IL-2 Stimulierung. Die gleichzeitige Inkubation mit $10 \mu\text{M}$ MPA über den Expansionsprozess führte hingegen zu einer Hemmung der Expressionserhöhung.

Auch die auf allen Leukozyten vorkommenden und an Adhäsion und Migration von NK-Zellen beteiligten Zelladhäsionsmoleküle ICAM-1 (CD54, *intercellular adhesion molecule-*

4. Ergebnisse

1) und LFA-1 (CD11a/CD18 Heterodimer, $\alpha_L\beta_2$ Integrin, *lymphocyte function-associated antigen-1*) [87] wurden während der *ex vivo* IL-2 Stimulation in ihrer Oberflächenexpression erhöht. Dies wurde für CD54 durch die Behandlung mit MPA partiell und für CD11a sogar vollständig inhibiert.

Ebenso wurde das L-Selektin CD62L, welches eine zentrale Rolle sowohl im *Homing* von naiven Lymphozyten in lymphatisches Gewebe als auch bei den Vorgängen des „Anhaftens und Rollens“ während der Migration von Leukozyten in entzündetes Gewebe spielt [155], während der IL-2 Stimulation in seiner Expression erhöht. Diese wurde jedoch nach einem Höhepunkt an Tag 6 bis zum Ende der Expansion am neunten Tag wieder vollständig reduziert. Die 9-tägige MPA-Behandlung inhibierte die Expressionserhöhung vollständig.

Auch die in Leukozyten-Aktivierung und Chemotaxis involvierten Rezeptoren CCR5 (CC-Chemokin Rezeptor 5) und CXCR3 (CXC-Chemokin Rezeptor 3) [156, 157] wurden durch IL-2 in ihrer Oberflächenexpression erhöht, was durch eine gleichzeitige MPA-Behandlung partiell inhibiert wurde.

Die gleiche IL-2 induzierte Expressionssteigerung und MPA-bedingte Hemmung galt auch für das mit LFA-1 als Korezeptor assoziierte und an der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität beteiligte Zelladhäsionsmolekül DNAM-1 (*DNAX accessory molecule-1*) [88] sowie für den inhibierenden NK-Zell-Rezeptor NKG2A.

Zusammenfassend bewirkte die 9-tägige IL-2 Stimulation eine Hochregulierung aller untersuchten Oberflächenmoleküle mit Ausnahme von CD11b (MAC-1, *macrophage adhesion ligand-1*, CD11b/CD18 Heterodimer, $\alpha_m\beta_2$ Integrin) und dem mit den NCRs als aktivierenden Korezeptor fungierenden NKp80 Rezeptor [97] (▷ Abb. 4.19, schwarz, Verlauf d 3 bis d 9). Der Höhepunkt der durch das Zytokin IL-2 vermittelten Oberflächenexpression war meist nach 6-tägiger Stimulation zu verzeichnen und nahm im weiteren Verlauf der Expansion wieder ab. Wurden die frisch isolierten NK-Zellen jedoch zu Beginn der NK-Zell-Kultivierung mit 10 μ M MPA kokubiert resultierte dies in einer partiellen oder sogar vollständigen Inhibition der durch die IL-2 Stimulation induzierten gesteigerten Oberflächenexpression (rot, Verlauf 9 Tage MPA). Im Gegensatz dazu hatte eine 4-tägige MPA-Behandlung von sechs Tage IL-2 stimulierten NK-Zellen und auch eine 24-stündige MPA-Behandlung von bereits neun Tage stimulierten NK-Zellen keinerlei Einfluss (rot, Verlauf 4 Tage MPA bzw. 24 h MPA). Demnach scheint MPA keinen inhibitorischen Effekt auf die erhöhte Rezeptorexpression von bereits vorstimulierten NK-Zellen auszuüben.

4.2. Einfluss des Immunsuppressivums MMF auf die NK-Zell-Funktionalität

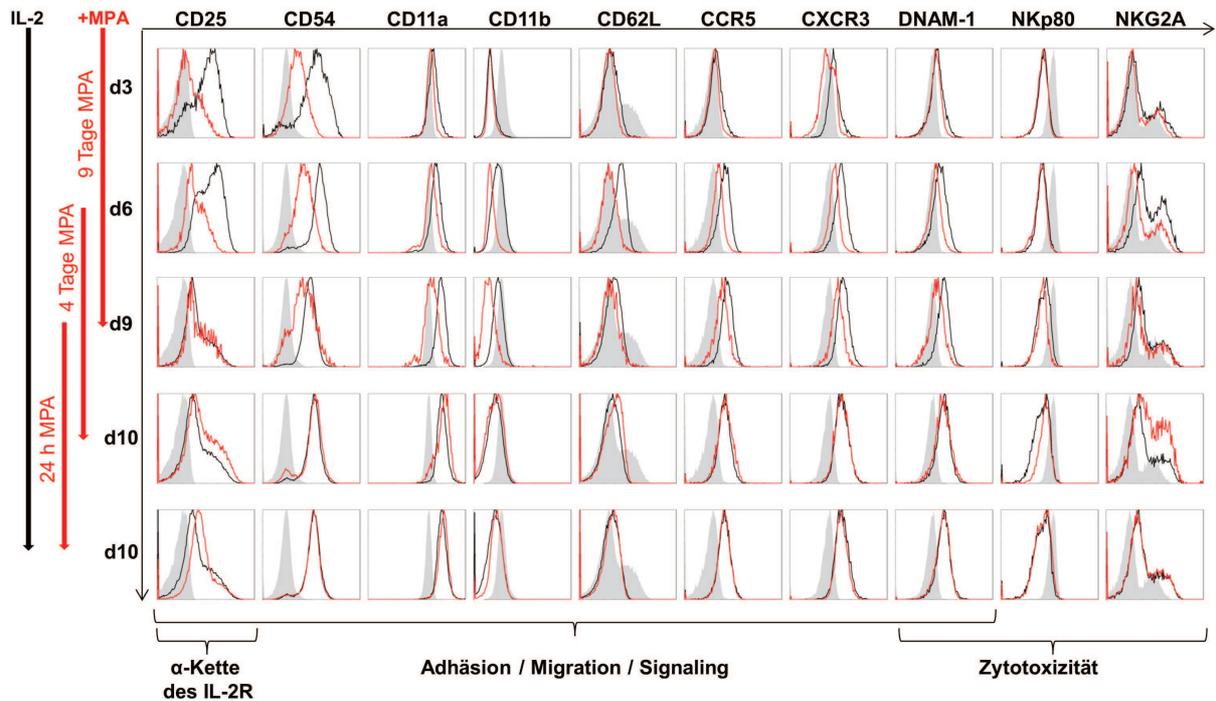


Abbildung 4.19: Expression verschiedener Oberflächenrezeptoren unter IL-2 Stimulation \pm MPA. Die *ex vivo* IL-2 Stimulation von NK-Zellen führte zu einer gesteigerten Expression aller untersuchten Oberflächenmoleküle, mit Ausnahme von CD11b und NKp80 (schwarz, Verlauf d3 bis d9). Eine Inkubation mit 10 μ M MPA über den gesamten 9-tägigen Expansionszeitraum (rot, Verlauf 9 Tage MPA) hemmte diese IL-2 bedingte Hochregulierung. Eine 4-tägige MPA-Behandlung von sechs Tage IL-2 stimulierten NK-Zellen (rot, Verlauf 4 Tage MPA) oder eine 24-stündige MPA-Inkubation von bereits neun Tage stimulierten Zellen (rot, Verlauf 24 h MPA) hatte hingegen keine Herunterregulierung zuvor hochregulierter Rezeptoren zur Folge. CD25 (α -Untereinheit des IL-2 Rezeptors IL-2R $\alpha\beta\gamma$); CD54 (*intercellular adhesion molecule-1*, ICAM-1); CD11a (α -Integrin Untereinheit des *lymphocyte function-associated antigen-1*, LFA-1); CD11b (α -Integrin Untereinheit des *macrophage adhesion ligand-1*, MAC-1); CD62L (L-Selektin, *Homing* Rezeptor); CCR5 (CC-Chemokin Rezeptor 5); CXCR3 (CXC-Chemokin Rezeptor 3); DNAM-1 (*DNAX accessory molecule-1*); NKp80 (aktivierender NCR Korezeptor); NKG2A (inhibierender NK-Zell-Rezeptor). Die Abbildung zeigt repräsentative Ergebnisse drei unabhängiger Versuche. Histogramm *Overlay plots* zeigen Events (Y-Achse) gegen Rezeptor-Expression (X-Achse), grau: unstimuliert an d0, schwarz: IL-2 stimuliert, rot: +10 μ M MPA.

4.2.5. Zytokin- und Chemokin-Sekretion

Wie bereits in Abbildung 4.11 B gezeigt, kommt es innerhalb der ersten drei Tage der NK-Zell-Kultivierung zu einer anfänglichen Reduktion an vitalen Zellen. Dies ist im anschließenden Expansionsprozess von einer deutlichen Proliferation der NK-Zellen gefolgt (▷ Abb. 4.20, weiße Balken, linke Y-Achse, n=3). Die im Rahmen vorliegender und einer früheren Arbeit beschriebenen Untersuchungen zu dieser klinischen Phase I/II NK-Zell-Studie zeigten zudem, dass NK-Zellen während der *ex vivo* IL-2 Expansion eine Vielzahl von Zytokinen und Chemokinen sekretieren [115, 138]. Die sekretierte Zytokin/Chemokin-Konzentration am jeweiligen Tag der Kultivierung wurde hier in Relation zu der entsprechenden NK-Zellzahl als grüner Würfel dargestellt (rechte Y-Achse, n=3). Dabei ist zu erkennen, dass die Zytokin/Chemokin-Konzentration im Verlauf der NK-Zell-Expansion deutlich anstieg, wobei am sechsten Tag der Expansion zumeist die höchste Konzentration im Verhältnis zu der NK-Zellzahl erreicht wurde.

Die Inkubation der NK-Zellen mit 10 μ M MPA über den 9-tägigen Expansionszeitraum resultierte hingegen in einer deutlichen Reduktion an vitalen NK-Zellen (rote Balken). Dies war zudem von einer Hemmung der Zytokin- und Chemokin-Sekretion begleitet. Während die IFN- γ , TNF- α , MCP-1 und IL-6 Sekretion fast vollständig gehemmt wurde, zeigten die MPA-behandelten NK-Zellen noch eine geringe verbleibende RANTES, MIP-1 β und IL-8 Produktion. Im Gegensatz dazu blieb die während des Expansionsprozesses zugeführte IL-2 Menge in der MPA-behandelten NK-Zell-Kultur durchweg erhöht, während die IL-2 Konzentration in der unbehandelten, proliferierenden NK-Zell-Kultur deutlich abnahm.

Des Weiteren hatte eine nachträgliche 24-stündige Inkubation von bereits neun Tage IL-2 stimulierten NK-Zellen weder Einfluss auf die Zytokin/Chemokin-Sekretion noch auf die Zellzahl der NK-Zell-Kultur. Selbst eine 4-tägige MPA Inkubation von bereits sechs Tage IL-2 stimulierten NK-Zellen hatte keinen Einfluss auf die Zytokin/Chemokin-Konzentration der NK-Zell-Kultur, führte jedoch zu einer deutlichen Reduktion der Zellzahl (n=2, Daten nicht gezeigt). Dies korreliert mit dem am sechsten Expansionstag verzeichneten Höhepunkt der Zytokin- und Chemokin-Sekretion und lässt eine bis dahin erfolgte Aktivierung von Zytokin-produzierender Signalkaskaden vermuten.

4.2. Einfluss des Immunsuppressivums MMF auf die NK-Zell-Funktionalität

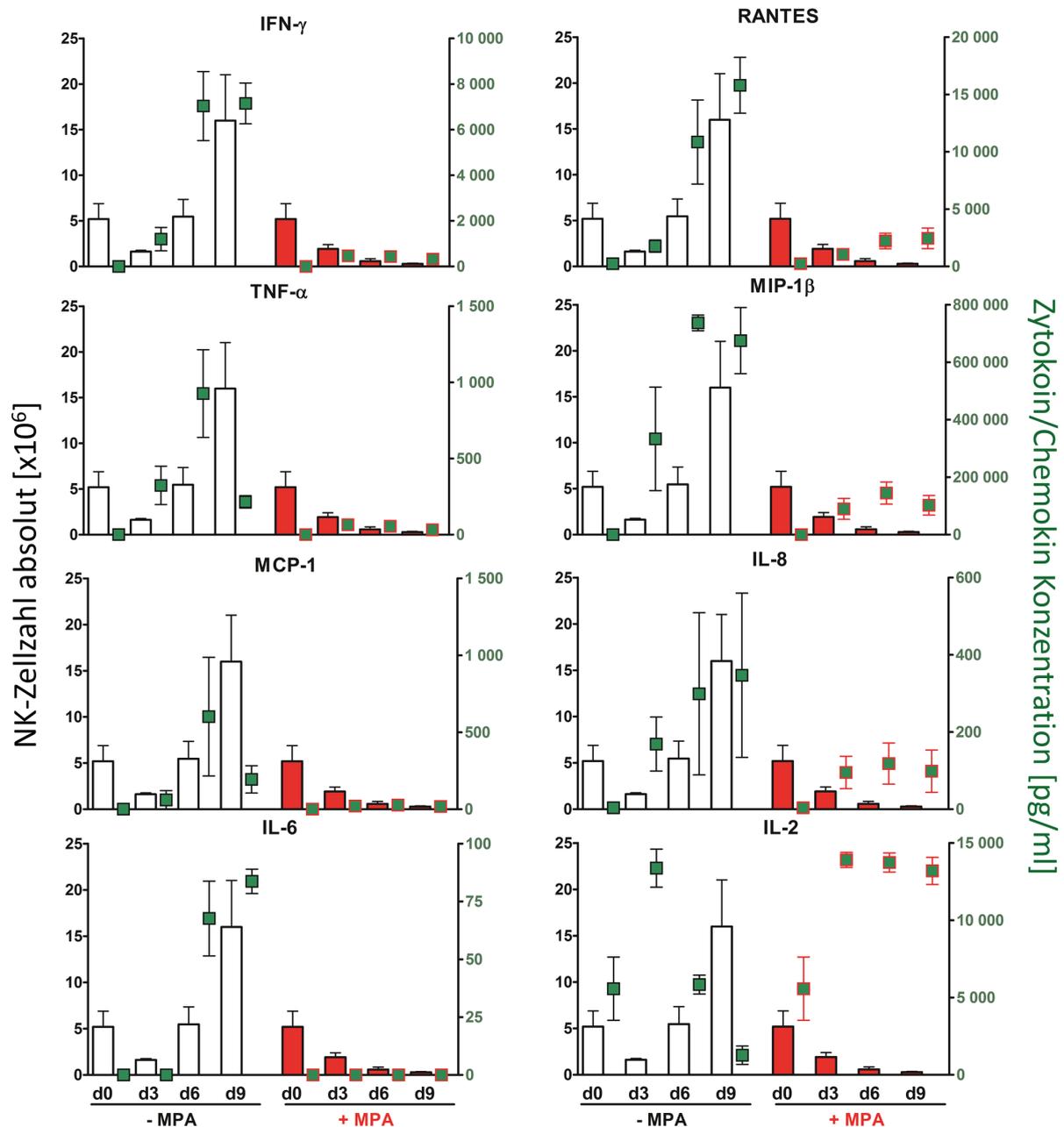


Abbildung 4.20: Ex vivo Zytokin/Chemokin-Sekretion IL-2 stimulierter NK-Zellen \pm MPA. Nach einer anfänglichen Reduktion innerhalb der ersten drei Tage der NK-Zell-Kultivierung stieg die NK-Zellzahl im weiteren Verlauf der 9-tägigen *ex vivo* IL-2 Stimulation deutlich an (weiße Balken). Die Inkubation mit 10 μ M MPA führte zu einer Hemmung der Proliferation, was von einer Reduktion an lebenden NK-Zellen begleitet war (rote Balken). Während unbehandelte NK-Zellen zudem eine Vielzahl von Zytokinen und Chemokinen sekretieren (grüne Würfel mit schwarzem Rand), wurde die Sekretion im Lauf des Expansionsprozesses durch die MPA-Behandlung fast vollständig gehemmt (grüne Würfel mit rotem Rand). Die linke schwarze Y-Achse zeigt die absolute NK-Zellzahl von 0–25 $\times 10^6$. Die rechte grüne Y-Achse zeigt die Zytokin/Chemokin-Konzentration von 0–800.000 pg/ml in unterschiedlicher Skalierung. Die X-Achse gibt den Tag der NK-Zell-Expansion (d 0 bis 9) in Abwesenheit (links) und Anwesenheit (rechts) von 10 μ M MPA an. n=3, Mittelwert \pm SEM.

4.2.6. Aktivierung und Hemmung intrazellulärer Signalmoleküle

Um herauszufinden, ob die durch MPA hervorgerufene Hemmung der Proliferation und der zytotoxischen Aktivität mit einer Hemmung der entsprechenden Signalkaskaden assoziiert ist, wurde im folgenden Schritt der Einfluss der MPA-Behandlung auf den Phosphorylierungsstatus und damit auf die Aktivierung einiger zentraler intrazellulärer Signalmoleküle untersucht. Die betrachteten Signalmoleküle haben vielfältige und zum Teil überlappende Funktionen in der Steuerung von Zellprozessen. Es wurden im Speziellen die Aktivierung der im Jak/STAT-Signalweg als Transkriptionsfaktoren fungierenden Signalmoleküle STAT-3, STAT-4 und STAT-5 untersucht, sowie die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs durch Phosphorylierung von AKT und die des MAPK/ERK-Signalwegs durch Phosphorylierung von ERK1/2 bestimmt.

Eine Phosphorylierungs-Kinetik beginnend mit einer 30-minütigen IL-2 Stimulation bis hin zu einem Inkubationszeitraum von 20 Tagen zeigte eine deutliche Aktivierung des hier exemplarisch dargestellten STAT-3 Transkriptionsfaktors (▷ Abb. 4.21 A, schwarz) im Vergleich zu den frisch isolierten, unstimulierten NK-Zellen (grau). Dabei wurde eine stetige Steigerung mit dem Höhepunkt der Phosphorylierung am sechsten Tag der IL-2 Stimulation beobachtet, was wiederum von einer Aktivierungsabnahme bis zum Tag 20 begleitet war. Dies entsprach auch dem Aktivierungsmuster der anderen untersuchten Signalmoleküle, die ebenso im Lauf der IL-2 Stimulation phosphoryliert wurden und am sechsten Expansionstag den Höhepunkt ihrer Aktivierung zeigten (▷ Abb. 4.21 B, schwarz). Die Behandlung der NK-Zellen mit 10 μ M MPA während des Expansionsprozesses verursachte eine massive Hemmung der Phosphorylierung und somit Aktivierung aller untersuchter Signalmoleküle (rot). Während AKT, STAT-3 und STAT-5 am sechsten Tag der MPA-Inkubation eine deutlich reduzierte Phosphorylierung im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zeigten, wurde die Phosphorylierung von ERK1/2 und STAT-4 sogar vollständig inhibiert. Die MPA-Behandlung der NK-Zellen erfolgte nur bis zum sechsten Expansionstag, da wie bereits gezeigt (▷ Abb. 4.11 B) eine längere MPA-Exposition mit einem verstärkten Zellsterben und eine deutlich reduzierten Zellzahl assoziiert war.

4.2. Einfluss des Immunsuppressivums MMF auf die NK-Zell-Funktionalität

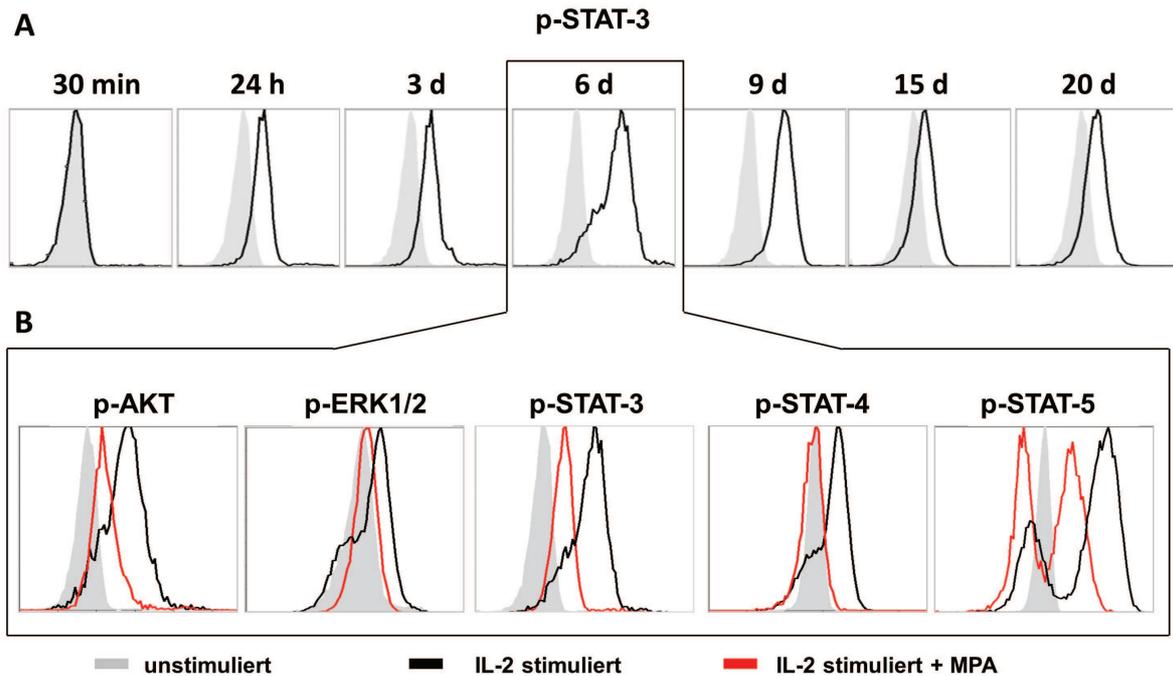


Abbildung 4.21: Hemmung der Aktivierung intrazellulärer Signalmoleküle. A) STAT-3 Phosphorylierungs-Kinetik von IL-2 stimulierten (schwarz) im Vergleich zu unstimulierten NK-Zellen (grau). Die Aktivierung erfolgte innerhalb der ersten 24 h der IL-2 Stimulation, erreichte ihren Höhepunkt am sechsten Tag der Expansion und wurde in den folgenden Tagen wieder reduziert. Dieses zeitliche Aktivierungsmuster von STAT-3 war auch repräsentativ für die Aktivierung der anderen untersuchten Signalmoleküle. B) Die Signalmoleküle AKT, ERK1/2, STAT-3, -4, -5 zeigten am sechsten Tag der IL-2 Stimulation ihren Höhepunkt der Phosphorylierung (schwarz). Die Behandlung von 10 μ M verursachte eine partielle Inhibierung der AKT, STAT-3 und STAT-5 Phosphorylierung, während die Aktivierung von ERK1/2 und STAT-4 hingegen vollständig durch das Immunsuppressivum inhibiert wurde (rot). Gefärbt wurden je 1×10^6 Zellen. Histogramm *Overlay plots* zeigen Events (Y-Achse) gegen die Expression des jeweiligen Signalmoleküls (X-Achse), grau: unstimuliert an d0, schwarz: IL-2 stimuliert, rot: +10 μ M MPA.

5. Diskussion

Die Heilungsrate pädiatrischer Patienten mit malignen Erkrankungen konnte in den letzten zehn Jahren durch konventionelle Therapieansätze deutlich verbessert werden. Dagegen ist das Überleben von Patienten mit Hochrisiko-Leukämien und soliden Tumoren wie z. B. dem Neuroblastom deutlich schlechter [5]. Daher liegt ein aktueller Fokus auf der Entwicklung neuer Immuntherapien als weitere Therapieoption für diese Hochrisikopatienten. In diesem Zusammenhang haben NK-Zellen sowohl im Rahmen der allogenen hämatopoetischen SZT als auch in zellulären Immuntherapien an klinischer Bedeutung gewonnen. Während bereits etablierte T-Zell-Immuntherapien mit einem hohen Risiko einer GvHD verbunden sind, sollen Immuntherapien mit hochaufgereinigten allogenen NK-Zellen einen verstärkten GvL/T-Effekt bewirken ohne eine schwerwiegende GvHD auszulösen. In dieser hier vorgestellten klinischen Phase I/II Studie in Frankfurt a. M. wurden bisher 16 pädiatrische Hochrisikopatienten mit unstimulierten oder mit zehn Tagen *ex vivo* IL-2 stimulierten Spender-NK-Zell-Infusionen (NK-DLIs) an Tag (+3), +40 und +100 nach haploidenter SZT behandelt. In studienbegleitenden Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei bislang ungeklärte Fragestellungen erörtert, die in den folgenden Kapiteln diskutiert werden:

1. „Welchen Einfluss haben unstimulierte im Vergleich zu *ex vivo* IL-2 stimulierten NK-DLIs auf zelluläre Bestandteile des Immunsystems sowie auf die Zytokin/Chemokin-Spiegel im peripheren Blut der Patienten?“ (⇒ Effekt NK-Zellen auf Patient)
2. „Hat die immunsuppressive Therapie mit Mycophenolat-Mofetil (MMF) zum Zeitpunkt der NK-Zell-Therapie einen Einfluss auf die Funktionalität der IL-2 stimulierten hochaktivierten NK-Zellen?“ (⇒ Effekt Patient auf NK-Zellen)

5.1. Einfluss allogener NK-Zellen auf das Immunsystem

5.1.1. In vivo Immunmonitoring nach NK-DLI

Der Frage nach dem Verbleib und dem Einfluss transfundierter Zellen im Rahmen von humanen Immuntherapien gilt bis heute großes wissenschaftliches Interesse. Einige tierexperimentelle Studien haben das Verhalten transfundierter NK-Zellen in Bezug zu der Überlebensdauer, dem Lymphknoten-*Homing*, der Migration und der Antitumoraktivität untersucht. So wurde z. B. mittels Biolumineszenz-Markierung über einen Zeitraum von

bis zu vier Wochen die Migration von NK-Zellen von der peripheren Blutbahn in die Milz, Lymphknoten, Lunge, Leber, den Gastrointestinaltrakt und zu verschiedenen Tumorkalisationen beschrieben, was zudem von einer deutlichen Reduktion der Tumorgroße begleitet war [73, 158, 159]. Ähnliches wurde auch von Brand *et al.* und Meller *et al.* in einer kleinen Studie im Menschen beobachtet, in der drei Patienten mit Nierenzellkarzinom mit Indium-111-Oxin radioaktiv markierten stimulierten allogenen NK-Zellen behandelt wurden. Nach einer anfänglichen Akkumulation in der Lunge wurden die NK-Zellen in der Milz, der Leber, im Knochenmark und in zwei von vier Lungen- und Leber-Metastasen mittels Szintigraphie detektiert [160, 161]. Eine Indium-Markierung war jedoch auch mit einem negativen Einfluss auf die Viabilität, Proliferation und Migrationskapazität von hämatopoetischen Progenitor-Zellen nach systemischer Transfusion verbunden [162]. Zwar ist in Deutschland die Transfusion von Indium-111-Oxin-markierten autologen Leukozyten in adulten Patienten zugelassen, eine Applikation von radioaktiv markierten allogenen Zellen in Kindern ist jedoch aus begründetem Anlass an strenge ethische Richtlinien gebunden und zum heutigen Zeitpunkt für die laufende klinische NK-Zell-Studie in Frankfurt a. M. nicht umsetzbar.

Das in dieser Arbeit beschriebene studienbegleitende *in vivo* Immunmonitoring stellt ein nichtinvasives Verfahren zur durchflusszytometrischen Bestimmung der zellulären Bestandteile des Immunsystems und der Zytokin- und Chemokin-Zusammensetzung im peripheren Blut der Patienten, vor und nach der Zelltherapie dar. Die vorliegenden Ergebnisse beschreiben erstmalig den unterschiedlichen Einfluss von unstimulierten und *ex vivo* IL-2 stimulierten NK-Zell-Infusionen auf Komponenten des zellulären und humoralen Immunsystems der Patienten.

5.1.2. Interpretation des selektiven Zellverlustes

Die Applikation von IL-2 stimulierten NK-Zell-Präparaten verursachte signifikante Zellmigrationsprozesse in der peripheren Blutzirkulation der Patienten. Während sich die Zahl der neutrophilen Granulozyten innerhalb von 4 h im peripheren Blut vervierfachte, wurde unmittelbar 10 min nach NK-DLI_{IL-2 stim} ein massiver Zellverlust von eosinophilen Granulozyten, Monozyten, dendritischen Zellen und vor allem NK-Zellen beobachtet. Nach einem fast vollständigen Verschwinden kehrten die Zellen innerhalb der folgenden 24 h wieder zu Normalwerten zurück. Bei der Charakterisierung der IL-2 stimulierten Spender-NK-Zellen und der patienteneigenen NK-Zellen im peripheren Blut konnten unter anderem Unterschiede hinsichtlich der Expression des Oberflächenmoleküls CD56, des Aktivierungsmarkers CD69, des Natürlichen Zytotoxizitäts-Rezeptors NKp44 und des Lymphknoten *Homing* Moleküls CD62L beobachtet werden. Somit konnten beide Popu-

5. Diskussion

lation phänotypisch durchflusszytometrisch gut unterschieden werden. Interessanterweise betraf das schnelle Abnehmen der NK-Zellzahl im peripheren Blut 10 min nach NK-DLI_{IL-2 stim} Applikation beide NK-Zell-Populationen – patienteneigene und Spender-NK-Zellen aus der NK-DLI. Die Rückkehr in die periphere Blutzirkulation nach 24 h konnte jedoch nur den patienteneigenen NK-Zellen nachgewiesen werden. Die applizierten IL-2 stimulierten Spender-NK-Zellen aus der NK-DLI wurden hingegen nicht detektiert.

In Übereinstimmung mit den hier präsentierten Beobachtungen haben frühe Studien von Lotze *et al.* und Salvo *et al.* ähnliche Effekte beschrieben. Nach einmaliger intravenöser Gabe hoher Dosen von bis zu 1×10^6 U/kg KG (bzw. $4,5 \times 10^6$ U/3 Dosen/Tag/m² KOF) rekombinantem IL-2 kam es bereits 15 min später zu einem Verlust von diversen Leukozytenpopulationen und im Speziellen von NK-Zellen aus dem peripheren Blut. Auch wurde eine Rückkehr zu Normalwerten innerhalb der folgenden 24 h beschrieben. Die Ursache für das Verschwinden der Zellen aus der peripheren Blutbahn wurde als Adhäsion der Zellen an das durch IL-2 aktivierte Endothel postuliert [163–165]. Im Vergleich zu diesen Studien können die hier beschriebenen Effekte nicht nur auf den Einfluss eines einzelnen Zytokins zurückgeführt werden. Zudem wurde IL-2 in wesentlich geringerer Höhe von etwa 1×10^4 U/kg KG mit der NK-DLI_{IL-2 stim} den Patienten verabreicht. Dennoch scheint die Koinfusion von stimulierten NK-Zellen und niedrigeren IL-2 Dosen in Kombination mit anderen Zytokinen und Chemokinen vergleichbare Effekte hervorzurufen.

Im Gegensatz zu NK-DLI_{IL-2 stim} führte die Applikationen von unstimulierten NK-Zellen zu keinem der oben beschriebenen Effekte. NK-DLI_{IL-2 stim} unterschieden sich von NK-DLI_{unstim} ausschließlich durch die *ex vivo* IL-2 Stimulation und die daraus folgende Zellaktivierung und Sekretion hoher Mengen an Zytokinen und Chemokinen. Bei gleicher NK-Zell-Dosis wurde dieses Zytokin/Chemokin-Gemisch nur Patienten appliziert, die mit NK-DLI_{IL-2 stim} behandelt wurden. Dies lässt vermuten, dass die beschriebenen Effekte entweder mit der Aktivierung der NK-Zellen selbst und/oder mit den koinfundierten Zytokinen und Chemokinen zusammenhängen.

In diesem Zusammenhang kann der Einzelfall eines unserer Patienten diskutiert werden, dessen kryokonservierte NK-DLI_{IL-2 stim} vor der Applikation gewaschen und vor Applikation erneut mit 1000 U/ml IL-2 versetzt wurde (NK-DLI_{IL-2 stim + wash}, Patient Nr. 14, d +96). Durch die durch den Waschvorgang bedingte vollständige Entfernung des *ex vivo* produzierten Zytokin/Chemokin-Gemischs erlaubte dieser Einzelfall eine unabhängige Betrachtung des Effekts von IL-2 alleine im Vergleich zu des sonst applizierten gesamten Zytokin/Chemokin-Gemischs. Die Infusion der NK-DLI_{IL-2 stim + wash} zeigte in Korrelation zu den NK-DLI_{unstim} Applikationen keinen Einfluss auf die Verteilung von Monozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten im peripheren Blut des Patienten. Auch wurde die Zytokin/Chemokin-Konstitution des peripheren Blutes, mit Ausnahme

des zu erwartenden Anstiegs an IL-2, durch die NK-DLI_{IL-2 stim + wash} nicht beeinflusst. Demgegenüber wurde eine leichte Reduktion der gesamten NK-Zellen und im Speziellen der CD56^{bright}CD16^{dim/-} Subpopulation beobachtet. Dies korrelierte mit Effekten nach NK-DLI_{IL-2 stim}, wenn auch in deutlich schwächerer Ausprägung. Demnach scheint entweder die vorherige Aktivierung der NK-Zellen selbst oder die Infusion von IL-2 das *in vivo* Verhalten der NK-Zellen zu beeinflussen. Im Gegensatz dazu wurde das rasche und ausgeprägte Zellverschwinden der NK-Zellen und die Effekte auf Monozyten und Granulozyten nach NK-DLI_{IL-2 stim} vermutlich durch die im *ex vivo* Expansionsprozess generierten Zytokine und Chemokine hervorgerufen.

In der engmaschigen Überwachung der Zytokin- und Chemokin-Level im peripheren Blut der Patienten sowohl vor als auch nach NK-DLI_{IL-2 stim} Applikation, wurde ein bis zu 4 h andauernder signifikanter Anstieg von einigen inflammatorischen und chemotaktischen Zytokinen und Chemokinen dokumentiert. Dieser Anstieg war vermutlich primär eine Folge der in hohen Mengen mit der NK-DLI koapplizierten Zytokine und Chemokine und führte zu einer drastischen Veränderung der Zytokin/Chemokin-Zusammensetzung des peripheren Blutes. Neutrophile Granulozyten gehören zu den ersten Zellen, die durch verschiedene chemotaktische Stimuli – insbesondere IL-8 – rasch entzündetes Gewebe infiltrieren [166]. Die durch die NK-DLI_{IL-2 stim} verursachte Veränderung des Zytokin-Milieus war somit vermutlich die Ursache für die massive Migration der Neutrophilen aus dem Gewebe in die Blutzirkulation. Da neutrophile Granulozyten auch potente Zytokin- und Chemokin-Produzenten sind (z. B. IL-6, IL-8, IP-10, MIP-1 α/β), könnte die über den Zeitraum von 4 h andauernde Zytokin/Chemokin-Erhöhung im peripheren Blut auch auf eine sekundäre Produktion *in vivo* hindeuten [166, 167]. Das Verschwinden der Zellen hingegen könnte durch zwei alternative oder sich ergänzende Mechanismen bedingt sein:

- (i) transiente Adhärenz der Leukozyten an das durch Zytokine und Chemokine aktivierte Endothel und/oder
- (ii) Zytokin/Chemokin-vermittelte Transmigration der Leukozyten durch das Endothel in das umliegende Gewebe

Während eines Entzündungsprozesses im Gewebe kommt es zur Ausschüttung von verschiedenen Zytokinen und Chemokinen. Durch Bindung an Glykosaminoglykane (GAGs) und/oder den Duffy-Antigen-Rezeptor für Chemokine (DARC) auf der Oberfläche von Endothelzellen kommt es zur Aktivierung des Endothels und einer erhöhten Expression von Zelladhäsionsmolekülen wie Selektinen und Interginen auf der Zelloberfläche. Dabei werden inflammatorische Chemokine und Zytokine wie z. B. IL-8, RANTES und MCP-1 mit der höchsten Affinität gebunden [168]. Nach dem rezeptorabhängigen Transport der Chemokine durch das Endothel in das periphere Blut (Transzytose), resul-

5. Diskussion

tiert die Chemokin-Bindung der Leukozyten ebenfalls in einer Zellaktivierung, was die Adhäsion an das Endothel zur Folge hat. Die darauf folgende Transmigration (Diapedese) der Leukozyten erfolgt entlang eines transzellulären oder rezeptorgebundenen Chemokin-Konzentrationsgradienten [169, 170].

Den hier beschriebenen Beobachtungen nach IL-2 stimulierter NK-DLI Applikation könnten also folgende Vorgänge zu Grunde liegen, die in Abbildung 5.1 modellhaft veranschaulicht sind. Die Koinfusion hoher Mengen an Zytokinen und Chemokinen aus der NK-DLI_{IL-2 stim} – ähnlich derer, die im Lauf einer Entzündung freigesetzt werden – führte höchstwahrscheinlich zu einer Aktivierung der Endothelzellen. Die Bindung der ebenfalls durch das Zytokin/Chemokin-Gemisch aktivierten Leukozyten könnte daher in einer Adhärenz der Zellen an das Endothel und damit in einem Verschwinden aus der peripheren Blutbahn resultieren. Naheliegender ist jedoch, dass die Zellen entlang des chemotaktischen Gradienten die periphere Blutbahn tatsächlich verlassen. Das deutlich ausgeprägtere Verschwinden der immunregulatorischen CD56^{bright}CD16^{dim/-} NK-Zell-Subpopulation aus der Blutzirkulation könnte mit einer höheren Sensitivität dieser Population gegenüber dem Zytokin/Chemokin-Stimulus zusammenhängen. Grund dafür ist eine divergente Expression von Chemokin-Rezeptoren auf beiden Subpopulationen, wie z. B. dem MIP-1 β bindenden CCR5 Rezeptor, der nur auf CD56^{bright}CD16^{dim/-} NK-Zellen vorhanden ist [156]. Bei dem Vergleich der *ex vivo* Zytokin/Chemokin-Konzentration in der NK-DLI_{IL-2 stim} und *in vivo* im peripheren Blut 10 min nach Infusion waren zudem deutliche Unterschiede auffallend. Am Beispiel des für Monozyten und Lymphozyten chemotaktisch wirkenden MIP-1 β konnte im Mittel etwa eine 175-fache Reduktion beobachtet werden. Der massive Verlust an Zytokinen/Chemokinen nach Infusion könnte mit einer Bindung an Chemokin-Rezeptoren (DARCs) und folgender Transzytose der Chemokine in das Gewebe zusammenhängen. Dadurch wäre die Entstehung eines chemotaktischen Gradienten vom peripheren Blut ins umliegende Gewebe vorstellbar, was somit Auslöser des Zellverschwindens sein könnte. Ein rascher Abbau, Abtransport oder ein Verdünnungseffekt sind jedoch auch mögliche Faktoren.

Im Gegensatz dazu, war im Fall von IL-6 ein deutlicher 10- bis 100-facher Anstieg der Konzentration 10 min und 1 h nach Infusion im peripheren Blut der Patienten im Vergleich zu der *ex vivo* Konzentration in der DLI zu verzeichnen. Dies lässt eindeutig auf eine sekundäre Produktion durch den Körper des Patienten als Reaktion auf die in der NK-DLI_{IL-2 stim} koapplizierten Zytokine und Chemokine schließen. Die *in vivo* IL-6 Produktion könnte durch Endothelzellen, neutrophile Granulozyten oder auch durch an das Endothel adhärenzte Monozyten bedingt sein. Da IL-6 einer der wichtigsten Mediatoren für Fieber und der „Akuten-Phase Antwort“ darstellt [171], korreliert dieser transiente IL-6 Anstieg mit dem klinisch bei den Patienten beschriebenen transienten Fieber nach

5.1. Einfluss allogener NK-Zellen auf das Immunsystem

NK-DLI_{IL-2 stim.}. Zudem verifiziert diese Beobachtung die biologische Aktivität der ko-applizierten Zytokine und Chemokine aus der NK-DLI.

Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse vermuten, dass die Koapplikation des während der *ex vivo* NK-Zell-Expansion sekretierten Zytokin/Chemokin-Gemischs die Extravasation der hochzytotoxischen IL-2 stimulierten Spender-NK-Zellen von der peripheren Blutzirkulation ins Gewebe fördert. Dies lässt zudem eine Ausübung des GvL/T-Effekts am Zielort erhoffen. Infusionen von frisch isolierten unstimulierten NK-Zellen zeigten im Gegensatz dazu keine vergleichbaren Effekte. Neben der gesteigerten zytotoxischen Aktivität von IL-2 stimulierten NK-Zellen spricht demnach auch die vermeintliche Extravasation für eine klinische Präferenz von IL-2 stimulierten NK-Zellen im Vergleich zu unstimulierten NK-Zell-Infusionen. Ob dies auch in einer tatsächlichen Steigerung der Effektivität der Immuntherapie resultiert – und damit die Prognose der Patienten verbessert wird – werden jedoch erst zukünftige Studien mit größeren Patientenkohorten abschließend zeigen können.

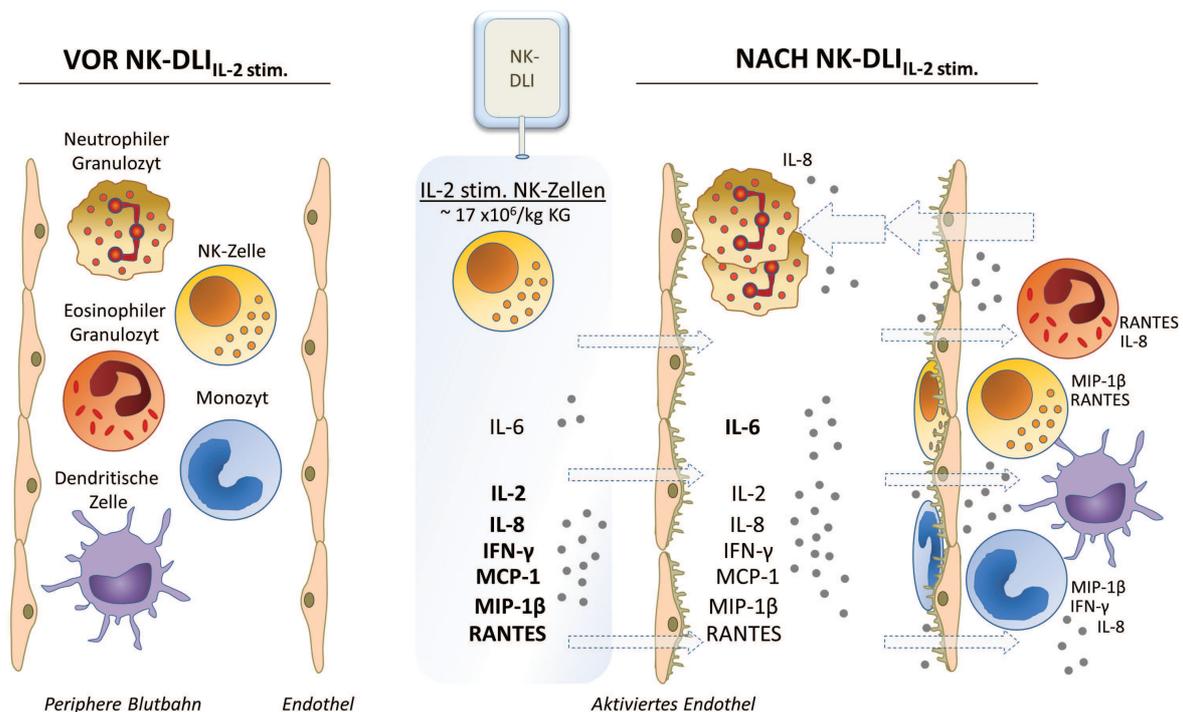


Abbildung 5.1: Model der Zytokin/Chemokin-induzierten Leukozyten-Migration nach NK-DLI_{IL-2 stim.} Die Koinfusion IL-2 aktivierter NK-Zellen und hoher Mengen während der *ex vivo* NK-Zell-Expansion sekretierter Zytokine und Chemokine führt vermutlich zu einer Aktivierung der Endothelzellen. Dies induziert das Anheften und/oder die Extravasation der Leukozyten entlang eines chemotaktischen Gradienten aus der peripheren Blutzirkulation. Die starke Einwanderung der neutrophilen Granulozyten ist vermutlich durch das erhöhte Vorkommen von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen wie z. B. IL-8 bedingt (Eigene Abbildung in Anlehnung an Middleton *et al.*, Blood 2002) [169].

5.2. Einfluss immunsuppressiver Therapie auf die NK-Zell-Funktionalität

Die Kontrolle von Abstoßungsreaktionen ist eine Grundvoraussetzung jeder erfolgreichen Transplantation. Dabei hat die immunsuppressive Therapie im Rahmen der allogenen hämatopoetischen SZT im Wesentlichen zwei Schwerpunkte. Zum einen soll eine Abstoßung der transfundierten Spenderstammzellen durch Empfängerzellen verhindert werden. Zum anderen dient die Immunsuppression nach allogener SZT der Vermeidung von immunologischen Spender-Empfänger-Reaktionen, die vorwiegend durch Spender-T-Zellen aus dem Transplantat hervorgerufen werden und zu schwerwiegenden immunologischen Reaktionen wie einer GvHD führen können [50]. Im Lauf dieser klinischen Phase I/II NK-Zell-Studie erfolgte ein Wechsel von CD34-selektionierten zu CD3/CD19-depletierten Stammzellpräparaten. Bei der CD3/CD19-depletierten SZT werden den Patienten jedoch deutlich höhere Mengen an residualen T-Zellen verabreicht. Um einer aufgrund der haploidenten HLA-Kompatibilität erhöhten Gefahr der Entstehung einer GvHD vorzubeugen, wurde das immunsuppressive Medikament MMF appliziert (▷ Abb. 5.2). Trotz kontinuierlicher Dosisreduktion war die Immunsuppression dennoch meist während der ersten klinischen NK-Zell-Applikation an Tag +40 und teilweise auch während der zweiten an Tag +100 präsent. Um eine Beeinträchtigung der Effektivität der NK-Zell-Therapie zu evaluieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von MMF auf die Funktionalität von NK-Zellen untersucht.

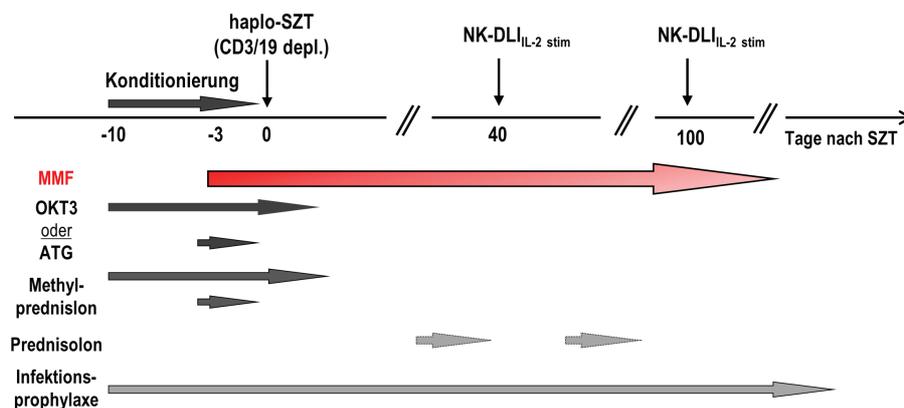


Abbildung 5.2: Immunsuppressive Therapie während der Phase I/II NK-Zell-Studie. Zur Vermeidung einer Transplantatabstoßung wurde im Rahmen der Konditionierung der monoklonale AK OKT3 von Tag -10 bis +3 oder Antithymozytenglobuline (ATG) von Tag -4 bis -1 verwendet. Zeitgleich dazu wurden hochdosierte Corticosteroide (Methylprednisolon, Tag -9 bis +3, bzw. -4 bis -1) appliziert. Zur GvHD-Prophylaxe bzw. -Therapie wurde das Immunsuppressivum MMF (Cellcept®) ab Tag -3 in einer Tagesdosis von 30 mg/kg KG (max. 2 g/Tag) appliziert und individuell im Lauf der Zeit reduziert. Im Fall einer auftretenden GvHD wurde die MMF-Dosis ggf. erhöht und das Glukocortikoid Prednisolon temporär verabreicht. Zur Infektionsprophylaxe wurden antivirale, antimykotische und antibakterielle Medikamente bis zu Tag +200 appliziert (Eigene Abbildung).

5.2.1. Dosisabhängige, reversible Proliferationshemmung

Mycophenolsäure (MPA) – der aktive Metabolit des immunsuppressiven Medikaments MMF – wirkt als Inhibitor der Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase (IMPDH), welche eines der zentralen Enzyme des *de novo* Purinbiosynthesewegs darstellt [59]. Da Lymphozyten im Gegensatz zu den meisten anderen Zellarten vollständig von der Neugenerierung der Nukleinsäuren über diesen *de novo Pathway* abhängig sind, hat MPA einen deutlich ausgeprägteren zytostatischen Effekt auf Lymphozyten als auf anderen Zellen [56]. Innerhalb der letzten 20 Jahre haben vor allem Studien von Allison und Eugui *et al.* den Effekt von MMF bzw. MPA auf humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMNZ) untersucht. Dabei wurde jedoch primär die Auswirkung auf T- und B-Lymphozyten behandelt, während Daten zum Einfluss auf die dritte Lymphozytenpopulation der NK-Zellen bisher kaum verfügbar sind.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte anhand von *in vitro* Studien auch eine ausgeprägte Hemmung der NK-Zell-Proliferation gezeigt werden. Dies war aufgrund der antimetabolischen Wirkungsweise von MPA auf Lymphozyten im Allgemeinen zu erwarten gewesen. Die niedrigste Dosis mit der effektivsten Hemmung entsprach der therapeutisch relevanten Konzentration von 10 μM . Dies korreliert mit Ergebnissen von Eugui *et al.*, die *in vitro* eine antiproliferative Wirkung von 1 bis 10 μM MPA auf humane PBMNZ nachwiesen [58]. Interessanterweise konnte die in vorliegender Arbeit beschriebene antiproliferative Wirkung auf NK-Zellen durch Entfernung von MPA aus dem Zellkulturmedium nach erfolgter 3-tägiger Inkubation aufgehoben werden. Dies führte zu einer schnellen und fast vollständigen Erholung der NK-Zell-Proliferation. Auch Allison und Eugui *et al.* beschrieben eine Reversion des zytostatischen Effekts von MPA. So konnte die T-Zell-Proliferation nach MPA-induzierter Hemmung durch die Zugabe von Guanodinukleotiden wiederhergestellt werden [58]. Auch die Inkubation von humanen PBMNZ mit Patientenplasma unter MMF-Therapie resultierte in einer Hemmung der *ex vivo* Proliferation, was nach Entfernung des Plasmas reversibel war [57]. Auch in vorliegender Arbeit wurde gezeigt, dass die *in vitro* MPA-Behandlung von T-Zellen in einer Hemmung der Proliferation resultiert, was ebenfalls nach Entfernung des Immunsuppressivums vollständig reversibel war. Um die Effektivität der Immuntherapie nicht zu gefährden, würde eine Reversibilität der MPA-induzierten NK-Zell-Hemmung klinisch die Möglichkeit bieten, einige Tage vor einer NK-Zell-Therapie die MMF-Behandlung des Patienten zu unterbrechen. Diese Option wäre bei anderen immunsuppressiven Medikamenten häufig aufgrund einer Depotbildung so zeitnah nicht möglich. Da Hemmung und Reversibilität von NK- und T-Zellen jedoch vergleichbar war, wäre die erwünschte Proliferationskontrolle potentiell alloreaktiver T-Zellen nicht mehr gegeben, was dementsprechend das Risiko einer GvHD-Entstehung erhöhen würde.

5.2.2. Einschränkungen der Effektorfunktion

Die Effektorfunktion von NK-Zellen wird durch vielerlei miteinander verknüpfter Mechanismen reguliert. Diese umfassen die Aktivierung der Zellen durch NK-Zell-Liganden und Zytokin/Chemokin-Stimuli, die Expression inhibierender sowie aktivierender Rezeptoren, die Anwesenheit von Zell-Zell-Kontakt-vermittelnden Oberflächenmolekülen sowie die entsprechende Signalweiterleitung durch intrazelluläre Signalkaskaden. Eine verminderte Aktivität nach MPA-Behandlung ist somit ein Resultat einer Intervention des Immunsuppressivums auf dem Weg zur Ausübung der NK-Zell-Effektorfunktion. Die Beteiligung unzähliger einzelner Faktoren verdeutlicht, dass eine Hemmung der NK-Zell-Funktionalität durch MPA auf vielen verschiedenen Ebenen erfolgen kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht möglichst viele verschiedene Ebenen dieser Aktivierungskaskade zu beleuchten. Da der Schwerpunkt dieser Untersuchungen eine mögliche Einschränkung der Effektivität der hier beschriebenen NK-Zell-Immuntherapie beinhaltet, lag der Fokus auf einer potentiellen Funktionseinschränkung von IL-2 stimulierten NK-Zellen.

Hemmung der zytotoxischen Aktivität und Expression aktivierender Rezeptoren

Wie im Rahmen dieser NK-Zell-Studie gezeigt, führt die Stimulierung von NK-Zellen mit IL-2 zu einer signifikanten Steigerung der Zytotoxizität im Vergleich zu unstimulierten NK-Zellen. Dies korreliert direkt mit einer Erhöhung der NCR-Rezeptordichte [115]. Folglich wurde eine potentielle Einschränkung der hohen zytotoxischen Aktivität stimulierter Spender-NK-Zellen durch das während der NK-Zell-Therapie verabreichte Immunsuppressivum MMF analysiert. Die 24-stündige Behandlung mit 10 μM MPA von neun Tage IL-2 stimulierten Spender-NK-Zellen führte zu einer signifikanten Reduktion der zytotoxischen Aktivität. Trotz statistischer Signifikanz betrug diese jedoch im Mittel nur 7% und resultierte daher nur in einer geringen Funktionseinschränkung der Zellen. Dies war nicht mit einer veränderten NCR oder NKG2D Expression assoziiert, da die Dichte dieser aktivierenden Rezeptoren von der kurzzeitigen MPA-Behandlung unbeeinflusst blieben. Daher scheinen NCR- bzw. NKG2D-unabhängige Mechanismen involviert zu sein. Im Unterschied dazu beschrieben Ohata *et al.* nach einwöchiger MPA-Inkubation mit 31,25 μM und 312,5 μM MPA eine um etwa 50% reduzierte auf nur noch 15 bzw. 10% verbleibende Zytotoxizität gegen K-562 und Daudi Zielzellen im 1:1 Ratio. Dies war von einer Reduktion der NCRs und des NKG2D Rezeptors begleitet [172]. Die Diskrepanz zu hier beschriebenen Daten erklärt sich durch die sowohl deutlich längere Inkubationszeit als auch durch eine bis zu 30-mal höhere MPA-Konzentration. Zudem wurden frisch isolierte NK-Zellen von Beginn der NK-Zell-Kultivierung mit dem Immunsuppressivum koinkubiert, während in hier vorgestellten Ergebnissen neun Tage IL-2 aktivierte NK-

5.2. Einfluss immunsuppressiver Therapie auf die NK-Zell-Funktionalität

Zellen behandelt wurden.

Des Weiteren wurde sowohl von dieser als auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben, dass unter IL-2 Stimulierung der Anteil der KIR negativen NK-Zellpopulation zunimmt [115, 116, 173]. Durch die gleichzeitig erhöhte NCR Expression scheint sich der Schwerpunkt der zytotoxischen Aktivität auf die aktivierenden Rezeptoren zu verlagern. Eine Wiedergewinnung der Expression inhibierender KIRs auf IL-2 aktivierten KIR negativen Zellen durch eine MPA-Behandlung scheint nicht plausibel. Eissens *et al.* untersuchten folglich den Effekt von MPA auf frisch isolierte NK-Zellen während des Expansionsprozesses. Sie bestätigten den Verlust der KIR Expression während der Zytokinstimulation, was durch eine Koinkubation mit MPA verhindert wurde, sodass MPA-behandelte NK-Zellen den gleichen KIR-Phänotyp wie unstimulierte NK-Zellen zeigten [174].

Im Folgenden wurde versucht *in vitro* den Kontakt von stimulierten Spender-NK-Zellen mit dem entsprechenden peripheren Blutplasma des Patienten zu stimulieren. Im Gegensatz zu der alleinigen MPA-Inkubation hatte die 24-stündige Inkubation der Spender-NK-Zellen mit dem entsprechenden Patientenplasma, welches unmittelbar vor der NK-Zell-Applikation entnommen wurde, eine deutlich stärkere Reduktion der Zytotoxizität zur Folge. Dies korrelierte zudem mit einer partiellen Reduktion der Rezeptordichte, die im Fall der Expression des NKG2D Rezeptors in beiden NK-Zell-Subpopulationen signifikant reduziert wurde. Dabei ist jedoch zu bemerken, dass nur zwei der vier Patienten zum Zeitpunkt der Immuntherapie und damit der Plasmaentnahme unter MMF-Behandlung waren. Konzentrationsbestimmungen ergaben einen mittleren MPA-Plasmaspiegel von $1,19 \mu\text{M}$ unter MMF-Therapie, während Patienten ohne immunsuppressive Medikation einen MPA-Plasmalevel von im Mittel $0,35 \mu\text{M}$ aufzeigten. Die zytotoxische Aktivität der Spender-NK-Zellen scheint daher neben dem therapeutisch relevanten MPA-Plasmalevel noch durch andere Faktoren im Patientenplasma beeinträchtigt zu werden. Es ist bekannt, dass hohe Plasmaspiegel des löslichen MICA (*soluble MHC class I chain-related antigen A*, sMICA) Proteins zu einer Reduktion der NKG2D Oberflächenexpression und zu einer Minderung der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen führen. MICA ist einer der Liganden des NKG2D Rezeptors, der auf Tumorzellen sowie stressinduzierten oder virusinfizierten Zellen häufig überexprimiert ist [72]. Im Rahmen von *Tumor escape* Mechanismen regulieren viele Tumorzellen die Oberflächenexpression von NKG2D Liganden herunter oder es kommt zu einem sog. *shedding*, also einem Ablösen der Liganden von der Zelloberfläche [150, 175, 176]. So konnte in dem an einem Neuroblastom Stadium IV erkrankten Patienten (Tab. 3.2, Nr. 17) in dem zur NK-Zell-Inkubation verwendeten Plasma ein hoher sMICA Spiegel von $133,65 \text{ pg/ml}$ gemessen werden. Dies korreliert mit Raffaghello *et al.* und Kloess *et al.* die ebenfalls deutlich erhöhte sMICA Plasmalevel in Neuroblastom-Patienten beschrieben [150, 177]. Dennoch repräsentiert MICA neben

5. Diskussion

MICB und den ULBP-Molekülen nur einen der zahlreichen NKG2D Liganden die im Rahmen von *Tumor escape* Mechanismen die NK-Zell-Funktion beeinträchtigen können. So wird neben einem beschriebenen *shedding* von MICB [178] auch eine von Tumorzellen freigesetzte lösliche Form des NKp30 Liganden BAT3 vermutet [179].

Des Weiteren hatte die Inkubation mit Patientenplasma, welches während einer einmaligen Steroidapplikation (1×2 mg/kg KG Prednisolon) entnommen wurde, die drastischste Hemmung der Spender-NK-Zell-Zytotoxizität zur Folge. Die zytotoxische Aktivität von neun Tage IL-2 stimulierten NK-Zellen gegen K-562 Zellen wurde nur durch eine 24-stündige Steroidplasma-Inkubation um die Hälfte von 66 % auf nur noch verbleibende 34 % reduziert. Dies ist in Korrelation zu Chiossone *et al.*, die von Einschränkungen der NK-Zell-Zytotoxizität, der NCR Rezeptorexpression, sowie von intrazellulären Signalmolekülen wie STAT-1, -3, -5 und ERK1/2 nach *in vitro* Steroidbehandlung unter IL-2 und IL-15 Stimulation berichteten [180]. Auch Vitale *et al.* beschrieben eine Funktionseinschränkung von *ex vivo* Steroid-behandelten NK-Zellen. Zudem demonstrierten sie eine Hemmung der NK-Zell-Funktionalität pädiatrischer Patienten, die im Rahmen einer GvHD-Therapie nach allogener SZT mit Steroiden behandelt wurden [181].

Zusammenfassend scheinen neben therapeutisch relevanten MPA-Plasmaspiegeln weitere immunsuppressiv-wirkende Plasmakomponenten eine Einschränkung der zytotoxischen Funktionalität der Spender-NK-Zellen während der Immuntherapie zu verursachen. Zudem wird die durch eine 24-stündige MPA-Behandlung verursachte Hemmung der NK-Zell-Zytotoxizität vermutlich nicht durch eine Reduktion der NCR oder NKG2D Rezeptorexpression reguliert.

5.2.3. Einfluss von MPA auf das Rezeptorrepertoire und die NK-Zell-Mobilität

Die Aktivierung zytotoxischer Mechanismen wird durch ein Zusammenspiel von verschiedenen Oberflächenmolekülen reguliert, von denen NCRs und der NKG2D Rezeptor zwar eine wichtige, aber nicht exklusive Rolle spielen. Dazu zählen neben diversen Korezeptoren auch Zelladhäsionsmoleküle, die sowohl einen Zell-Zell-Kontakt zwischen Effektor- und Zielzelle gewährleisten als auch an der intrazellulären Weiterleitung aktivierender Signale beteiligt sind [79, 82]. Während eines Langzeit-Mikroskopie Zeitrafferfilms konnte in vorliegender Arbeit eine deutliche Einschränkung der zytotoxischen Aktivität und im Speziellen der Mobilität von MPA-behandelten Spender-NK-Zellen in Richtung eines Neuroblastom Tumorsphäroids beobachtet werden. Dies war zudem von einer abgerundeten unpolaren Morphologie der NK-Zellen begleitet. Im Zuge dessen wurde die Expression diverser in Zelladhäsion und Migration involvierter Oberflächenmoleküle unter der MPA-

5.2. Einfluss immunsuppressiver Therapie auf die NK-Zell-Funktionalität

Behandlung analysiert.

Die Zelladhäsionsmoleküle LFA-1, MAC-1 und ICAM-1 haben neben der Funktion in der Leukozyten-Adhäsion und -Migration auch eine wichtige Rolle in der Initiations- und Effektorphase von Immunzellen. Die Interaktion von Antigen-präsentierenden Zellen und Lymphozyten, aber auch der Kontakt von Effektorlymphozyten und Zielzellen, erfordert eine komplementäre Bindung von Adhäsionsmolekülen [51, 85, 87, 88]. In vorliegender Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Stimulation der NK-Zellen mit IL-2 in einer verstärkten Expression der untersuchten Zelladhäsionsmoleküle LFA-1, ICAM-1 und DNAM-1 resultiert. Auch das L-Selektin CD62L, welches während des *Homings* naiver Lymphozyten in lymphatisches Gewebe und bei den Vorgängen des „Anhaftens und Rollens“ während der Leukozyten-Migration eine zentrale Rolle spielt [155], wurde im Lauf der IL-2 Stimulation kurzzeitig in seiner Expression erhöht, was sich jedoch bis zum neunten Tag der Expansion wieder reduzierte. Ebenso wurden die in Leukozyten-Aktivierung und Chemotaxis involvierten Chemokin-Rezeptoren CCR5 und CXCR3 [156, 157] in ihrer zellulären Expression durch IL-2 erhöht. Interessanterweise führte eine MPA-Exposition mit der klinisch relevanten MPA-Konzentration von 10 μM während des Expansionsprozesses hingegen zu einer deutlichen Inhibition der IL-2 induzierten Rezeptorexpression in den NK-Zellen.

Allison *et al.* beobachteten bereits im Jahr 1993, dass die MPA-Behandlung von T-Zellen oder Endothelzellen in Konzentrationen von 1 bis 10 μM zu einer deutlich reduzierten Adhäsion der Lymphozyten führte, wobei die stärkste Inhibition nach Behandlung beider Zelltypen zu verzeichnen war [59]. Blaheta *et al.* beschrieben zudem eine deutlich verminderte Expression des vaskulären Zelladhäsionsmoleküls VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*), sowie der E- und P-Selektine in Lymphozyten und Endothelzellen, was in einer gehemmten Adhäsion und Penetration von T-Zellen resultierte [182]. Dies steht im Zusammenhang damit, dass MPA durch die Hemmung des zentralen *de novo* Purinbiosynthese Enzyms IMPDH in Lymphozyten zu einer Depletion von GTP-Nukleotiden führt [57]. Die Glykosylierung von Proteinen und Lipiden erfolgt durch Nukleotid-Zwischenstufen. Dabei werden Fukose und Mannose durch Guanodin-Diphosphate (GDP) transferiert. Die MPA-bedingte Depletion der Guanodin-Nukleotide führt damit in Lymphozyten zu einer signifikanten Hemmung der Glykosylierung von Glykoproteinen, zu denen auch zahlreiche Adhäsionsmoleküle gehören [60]. Dieser Vorgang scheint auch die Ursache der hier in NK-Zellen demonstrierten Hemmung von Adhäsionsmolekülen durch das Immunsuppressivum MPA zu sein.

Neben der erhöhten Expression von Zelladhäsionsmolekülen führte die IL-2 Stimulation auch zu einer verstärkten Expression von CD25, der α -Untereinheit des IL-2 Rezeptors, welche Auskunft über den Aktivierungszustand der NK-Zelle gibt und im Komplex mit

5. Diskussion

der β - und γ -Untereinheit als Zytokinrezeptor (IL-2R $\alpha\beta\gamma$) eine hohe IL-2 Affinität aufweist [90]. Werden die NK-Zellen jedoch während der IL-2 Stimulation zusätzlich mit dem Immunsuppressivum MPA behandelt, scheint die IL-2-vermittelte Aktivierung der NK-Zellen unterdrückt zu werden. Dies äußerte sich unter anderem in einer massiv gehemmten Hochregulierung der α -Untereinheit des hochaffinen IL-2 Rezeptors. Zudem wurde die unter der IL-2 Stimulation beschriebene verstärkte Expression des CD56 Antigens zur Ausbildung des primär CD56^{bright} NK-Zell-Phänotyps durch MPA inhibiert. Des Weiteren unterdrückte MPA die durch IL-2 induzierte erhöhte Expression des inhibierenden NKG2A Rezeptors nach 6-tägiger Stimulation vollständig. Auch Eissens *et al.* beschrieben eine MPA-bedingte Hemmung des Zytokin-aktivierten NK-Zell-Phänotyps. Die Koinkubation mit MPA während der Zytokinstimulierung hatte keine Aktivierung und erhöhte Rezeptorexpression zur Folge und die MPA-behandelten NK-Zellen zeigten den selben immunologischen Rezeptorphänotyp wie unstimulierte NK-Zellen (vorwiegend CD56^{dim}NKG2A⁻KIR⁺NCR^{+/-}) [174]. Diese Ergebnisse sind in Korrelation mit Barten *et al.*, die auch in T-Zellen eine MPA-induzierte Hemmung des aktivierten Phänotyps anhand einer reduzierten CD25, CD11a und CD54 Expression demonstrieren [183]. Quemeneur *et al.* beschrieben hingegen keinen Einfluss von 10 μ M MPA auf die Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 in Phytohämagglutinin (PHA) stimulierten Lymphozyten [184].

Interessanterweise hatte sowohl eine 24-stündige MPA-Behandlung von bereits neun Tage IL-2 aktivierten NK-Zellen als auch eine 4-tägige MPA-Inkubation von bereits sechs Tage stimulierten Zellen keinen Einfluss auf die Expression der beschriebenen Oberflächenmoleküle. Es scheint, dass bereits am sechsten Tag der IL-2 Stimulation der Aktivierungsprozess soweit in Gang ist, sodass eine rückwirkende spätere MPA-Behandlung keinen inhibitorischen Effekt mehr ausübt. Damit übereinstimmend konnte bei einigen Rezeptoren auch ein Expressionsmaximum am sechsten Tag der Stimulation verzeichnet werden, während die Expression häufig bis zum Ende des Expansionszeitraums an Tag 9 wieder abnahm. Dies korrelierte mit den zeitlichen Aktivierungsprofilen aller untersuchten zentralen Signalmoleküle, was im folgenden Kapitel weiterführend diskutiert wird (\triangleright Kapitel 5.2.4). Der ausbleibende Einfluss von MPA auf die Konstitution diverser Oberflächenrezeptoren bereits stimulierter NK-Zellen steht jedoch im Gegensatz zu der während des Langzeit-Mikroskopie Zeitrafferfilms beobachteten, massiv eingeschränkten Mobilität und veränderten Morphologie nach nur 24-stündiger MPA-Exposition von neun Tage IL-2 vorstimulierten Spender-NK-Zellen. Demnach scheinen vermutlich andere in die NK-Zell-Mobilität und -Polarität involvierte Mechanismen durch MPA beeinflusst zu werden. In diesem Zusammenhang sollte in zukünftigen Untersuchungen die Expression weiterer Integrine sowie Chemokin-Rezeptoren evaluiert werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die *ex vivo* Stimulation von NK-Zellen mit dem Zytokin IL-2 in einer Ausbildung eines aktivierten NK-Zell-Phänotyps resultiert, was durch eine erhöhte Expression diverser in Zelladhäsion, Migration und Zytotoxizität involvierter Oberflächenmoleküle gekennzeichnet war. Diese Zytokin-induzierte Aktivierung wurde bei gleichzeitiger MPA-Behandlung hingegen teilweise bis vollständig inhibiert. Im Gegensatz dazu hatte die MPA-Behandlung von IL-2 vorstimulierten NK-Zellen keinerlei Einfluss auf den bereits ausgebildeten aktivierten NK-Zell-Phänotyp.

5.2.4. Beeinflussung intrazellulärer Signalkaskaden und der Zytokin/Chemokin-Sekretion

Die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden erfolgt unter dem komplexen Zusammenspiel von aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren nach Ligandenkontakt sowie unter der Einwirkung von Zytokinen. NK-Zellen können durch verschiedene Zytokin-Stimuli aktiviert werden unter denen IL-2, -12, -15, -18, -21 und Typ-I Interferone wie IFN- α und - β zu den Wichtigsten zählen [106, 185]. In vorliegender Arbeit wurde das Zytokin IL-2 zur Stimulation der NK-Zellen verwendet. Der IL-2 Rezeptor (IL-2R) setzt sich aus einer α - (CD25), β - (CD122) und einer γ -Untereinheit (CD132) zusammen, wobei der aus allen Dreien bestehende IL-2R $\alpha\beta\gamma$ Komplex die höchste IL-2 Affinität besitzt. Während die α -Untereinheit die hochaffine Zytokinbindung vermittelt, erfolgt die intrazelluläre Signaltransduktion durch die zytoplasmatischen Domänen der β - und γ -Untereinheiten [96, 186]. IL-2 hat überlappende Funktionen mit den Zytokinen IL-4, -7, -9, -15 und -21, da die jeweiligen Zytokinrezeptoren ebenfalls über eine γ -Untereinheit verfügen. IL-2 und IL-15 teilen zudem auch die dementsprechend bezeichnete IL2/15R β Untereinheit, was in der stärksten Analogie der biologischen Aktivitäten beider Zytokine resultiert [90].

Die zellulären Prozesse werden durch ein komplexes Netzwerk von Zytokinen reguliert, wobei viele davon auch redundante Funktionen haben. Da ein einziges Zytokin viele verschiedene Signalmoleküle stimulieren kann und auch umgekehrt ein Signalmolekül durch diverse Zytokine aktiviert wird, kann einem einzelnen Zytokin oder Signalmolekül nicht eine exklusive Funktion zugeordnet werden. Wie bereits im Kapitel 1.5.1 der Einleitung beschrieben und in Abbildung 1.11 schematisch dargestellt, erfolgt die Transduktion aktivierender Signale über den Jak/STAT-Signalweg, den MAPK/ERK-Signalweg und durch die Aktivierung der PI3K/AKT-Signalkaskade. Diese Signalwege können sowohl durch eine Ligandenbindung aktivierender NK-Zell-Rezeptoren aktiviert werden – auch im Zusammenspiel mit Zelladhäsionsmolekülen wie den Integrinen – aber auch durch die Zytokinbindung eines Zytokinrezeptors. Dies resultiert zudem in der Aktivierung des Zytokin-induzierten Jak/STAT-Signalwegs. Da in vorliegender Arbeit die Aktivierung dieser Si-

5. Diskussion

gnalwege unter alleinigem IL-2 Stimulus – ohne bestehenden Zielzellkontakt – untersucht wurde, lag der Fokus der Untersuchungen auf die durch das Zytokin IL-2 vermittelte Induktion der intrazellulären Signalkaskaden.

IL-2 ist einer der prominentesten Aktivatoren von NK-Zellen. Es fördert sowohl in T- als auch in NK-Zellen das Zellüberleben und die Proliferation, während die Förderung der Zytotoxizität nur auf NK-Zellen beschränkt ist. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass die Zytokinbindung des IL-2 Rezeptors die Phosphorylierung und Aktivierung von STAT-3 und STAT-5 in T- und NK-Zellen induziert [187, 188] aber STAT-4 ausschließlich in NK-Zellen [92, 189] und NK-ähnlichen T-Zellen aktiviert wird [190]. Wang *et al.* postulierten folglich, dass die STAT-4 Aktivierung mit der spezifisch in NK-Zellen durch IL-2 induzierten zytotoxischen Aktivität assoziiert ist [92]. Auch eine Expressionssteigerung des IL-12 Rezeptors, der eine wichtige Rolle bei der STAT-4 Signaltransduktion spielt, wurde durch IL-2 in NK-Zellen gezeigt [189]. Braunschweig *et al.* beschrieben jedoch auch den direkten Zusammenhang der STAT-3 Expression mit der zytotoxischen Aktivität von NK92 Zellen unter IL-2 Stimulation. So führte die Blockierung von STAT-3 mit *small interfering RNAs* (siRNA) zu einer signifikanten Reduktion der NK-Zell-Zytotoxizität gegen K-562 Zellen und einer reduzierten IL-10 Sekretion [96]. Da die Signalmoleküle STAT-1, -3 und -5 in verschiedenen Zelltypen durch eine Vielzahl von Zytokinen aktiviert werden können, wird diesen Molekülen eine Regulation von zentralen, zellübergreifenden Funktionen wie Wachstum und Überleben zugesprochen. Andere Signalmoleküle wie z. B. STAT-4 scheinen nur in bestimmten Zellen durch vereinzelte Zytokin-Stimuli aktiviert zu werden [191].

In vorliegender Arbeit wurde anhand einer Phosphorylierungs-Kinetik die Aktivierung einiger zentraler Signalmoleküle in NK-Zellen unter IL-2 Stimulation verfolgt. Die *ex vivo* IL-2 Stimulation der NK-Zellen führte zu einer Phosphorylierung von STAT-3, STAT-4 und STAT-5 sowie von ERK1/2 und der Proteinkinase AKT. Dies verdeutlicht eine Aktivierung aller drei diskutierten Signalkaskaden. Die Aktivierung der Signalmoleküle erfolgte innerhalb der ersten 24 h der IL-2 Stimulierung, zeigte jedoch ihren Höhepunkt erst nach 6-tägiger Kultivierung. Wie im Rahmen der hier beschriebenen NK-Zell-Studie von Huenecke *et al.* und in vorliegender Arbeit (> Kapitel 4.1.4 und 4.2.5) demonstriert, sekretieren NK-Zellen im Lauf der IL-2 *ex vivo* Expansion eine Vielzahl von Zytokinen und Chemokinen [115].

Neben IL-2 vermögen auch andere Zytokine NK-Zellen zu aktivieren. So beschrieben z. B. Kalina *et al.*, dass durch die Stimulation der NK-Zelllinie NK92 mit IL-18 STAT-3 und ERK1/2 aber nicht STAT-5 aktiviert werden. Dies war von einer erhöhten zytotoxischen Aktivität gegen K-562 Zellen und einer vermehrten IFN- γ Produktion begleitet, was durch spezifische MAPK/ERK Inhibitoren blockiert werden konnte und so die Vermittlung der

5.2. Einfluss immunsuppressiver Therapie auf die NK-Zell-Funktionalität

zytotoxischen Aktivität über diesen Signalweg verdeutlicht. Während die Proliferation der NK92 Zellen durch IL-18 nicht beeinflusst wurde, hatte die spezifische Inhibition des Jak/STAT-Signalwegs während der IL-2 Stimulation eine vollständige Inhibition der NK-Zell-Proliferation zur Folge [192]. Dies wurde ebenfalls von Yao *et al.* gezeigt [193]. Auch IL-21 verursachte in primären NK-Zellen eine STAT-1 und STAT-3 Aktivierung was von einer verstärkten zytotoxischen Aktivität gegen K-562 Zellen begleitet war [194].

Da im Lauf des IL-2 stimulierten NK-Zell-Expansionsprozesses auch diverse andere Zytokine und Chemokine produziert wurden, kann nicht unterschieden werden, ob die Aktivierung der Signalkaskaden durch IL-2 selbst oder durch andere von NK-Zellen sekretierten Zytokine erfolgte. Die wichtigsten NK-Zell-aktivierenden Zytokine wie IL-12, -15, -18, -21, IFN- α und - β werden jedoch nicht oder nur gering von NK-Zellen selbst, sondern hauptsächlich von Antigen-präsentierenden Zellen sekretiert [10, 106, 195], wodurch demnach eine primär durch IL-2 induzierte Aktivierung der Signalkaskaden vermutet werden kann. Interessanterweise korreliert zudem das Aktivierungsprofil der Signalmoleküle mit dem ebenfalls am sechsten Tag der IL-2 Stimulation beschriebenen Höhepunkt der *ex vivo* Zytokin- und Chemokin-Sekretion während des Expansionsprozesses. Diese enge zeitliche Korrelation verdeutlicht, dass die Regulation der Zytokin-Produktion und -Sekretion durch die Aktivierung der hier untersuchten Signalmoleküle erfolgte.

Nachdem die Aktivierung der untersuchten Signalkaskaden in NK-Zellen durch die IL-2 Stimulation demonstriert werden konnte, wurde im Weiteren untersucht, ob die durch das Immunsuppressivum MPA beobachtete Hemmung der NK-Zell-Funktionalität – insbesondere der Proliferation, Zytotoxizität und Zytokin-Sekretion – durch eine Beeinträchtigung der intrazellulären Signalwege induziert wurde. In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Behandlung von primären NK-Zellen mit therapeutisch relevanten MPA-Konzentrationen zu einer massiven Beeinträchtigung der drei zentralen intrazellulären Signalkaskaden führte. Während die im Zuge der IL-2 Stimulierung beschriebene Phosphorylierung durch die Koinkubation mit 10 μ M MPA die Aktivierung der Proteinkinase AKT sowie STAT-3 und STAT-5 deutlich in ihrer Aktivierung hemmte, führte die MPA-Behandlung sogar zu einer vollständigen Blockierung der ERK1/2 und STAT-4 Aktivierung.

Sowohl STAT-3 also auch die Proteinkinase AKT regulieren die Proliferation, das Wachstum und vor allem das Überleben der NK-Zellen [93, 188]. Wie in vorliegender Arbeit demonstriert, wurde die Proliferation der NK-Zellen trotz andauernder IL-2 Stimulation nach MPA-Exposition vollständig inhibiert. Zudem starb ein Großteil der NK-Zellen innerhalb der ersten drei bis sechs Tage ab, was von einer massiven Reduktion der Zahl vitaler Zellen gekennzeichnet war. Dies steht vermutlich im Zusammenhang mit der MPA-induzierten Inhibition der AKT Kinase, die neben der Regulierung von Proliferation und

5. Diskussion

Wachstum einen der wichtigsten Mediatoren des Zellüberlebens darstellt.

Der MAPK/ERK-Signalweg sowie die Aktivierung von STAT-4 sind in NK-Zellen nicht an der Regulierung von Proliferation, sondern an der potenten Induktion zytotoxischer Effektormechanismen beteiligt [92, 94]. Dies korreliert mit Eissens und Ohata *et al.*, die durch eine 6-tägige MPA-Inkubation eine signifikante Reduktion der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen gegen K-562 und Daudi Zellen beschrieben [172, 174]. Demnach werden neben Proliferations- auch Zytotoxizitäts-vermittelnde Signalkaskaden durch MPA inhibiert.

Auch andere Immunsuppressiva scheinen mit intrazellulären Signalkaskaden in NK-Zellen zu intervenieren. So beschrieben Chiossone *et al.* eine durch das Corticosteroid Methylprednisolon induzierte Hemmung der durch IL-2 vermittelten Phosphorylierung der Signalmoleküle STAT-1, STAT-3 und STAT-5 sowie eine Hemmung der ERK1/2 Phosphorylierung, der Perforin-Ausschüttung und der NK-Zell-Zytotoxizität [180].

Des Weiteren konnte im Rahmen dieser Arbeit durch das Immunsuppressivum MPA eine deutliche Inhibition der IL-2 induzierten Zytokin- und Chemokin-Sekretion der NK-Zellen im Lauf des *ex vivo* Expansionsprozesses demonstriert werden. Die Zytokin-Sekretion wurde fast vollständig durch die MPA-Behandlung blockiert, was zudem von einer deutlich reduzierten Zellzahl begleitet war. Dies ist in Korrelation zu Nagy *et al.*, die in humanen Lymphozyten nach 48-stündiger MPA-Inkubation eine reduzierte Produktion von IL-2, -3, -4, -5, -6, -10, IFN γ und TNF- α beschrieben [196]. Auffallend war zudem, dass in der MPA-behandelten NK-Zell-Kultur über die gesamte Dauer der Kultivierung die hohen Mengen an zugefügtem IL-2 nicht reduziert wurden, während unbehandelte NK-Zellen das IL-2 zu verbrauchen bzw. es zu „verstoffwechseln“ schienen. Auch dies lässt auf eine durch MPA verursachte Hemmung der IL-2 induzierten Signaltransduktion schließen.

Den Startpunkt dieser durch IL-2 vermittelten Signaltransduktion stellt der IL-2 Rezeptor dar. Während die α -Kette (CD25) die hochaffine Zytokinbindung vermittelt, erfolgt die intrazelluläre Signaltransduktion durch die β - und γ -Untereinheit des IL-2 Rezeptors. Zwar kann auch die β -Untereinheit IL-2 binden, jedoch mit einer deutlich geringeren Affinität [90, 96, 186]. Wie im vorangegangenen Kapitel 5.2.3 beschrieben, wurde CD25 unter IL-2 Stimulation bis zum sechsten Expansionstag deutlich verstärkt exprimiert. Durch die MPA-Behandlung wurde dies jedoch gehemmt, wodurch die Ausbildung des hochaffinen IL-2 $\alpha\beta\gamma$ -Rezeptors unterbunden wurde (\triangleright Abb. 5.3 A). Somit scheint die IL-2 induzierte Aktivierung der nachgeschalteten Signalkaskaden derart gestört, dass diese trotz hoher Mengen IL-2 in der Kultur nicht oder nur in reduzierter Form erfolgen kann. Da die untersuchten Signalmoleküle nicht ausschließlich durch IL-2 aktiviert werden können, könnte auch eine weitere Ursache der inhibierten NK-Zell-Funktionalität in der durch MPA-reduzierten Zytokin-Sekretion liegen. Damit wäre die Zytokin-vermittelte Signal-

5.2. Einfluss immunsuppressiver Therapie auf die NK-Zell-Funktionalität

transduktion anderer Zytokinrezeptoren ebenfalls gehemmt (\triangleright Abb. 5.3 B). Naheliegender wäre auch eine Hemmung der α -Untereinheit anderer Zytokinrezeptoren oder auch der β - (CD122) oder γ - (CD132) Untereinheiten des IL-2 Rezeptors (\triangleright Abb. 5.3 C), da diese auch von anderen Zytokinrezeptoren wie IL-4, -7, -9 und -21 (γ -Untereinheit) und IL-15 (β - und γ -Untereinheit) exprimiert werden. Zukünftige Untersuchungen sollten daher auch die Expression der β - und γ -Untereinheit des IL-2 Rezeptors nach MPA-Inkubation beleuchten, um zu erfahren, ob neben der durch IL-2 induzierten Signalkaskade auch die Signalweiterleitung anderer Zytokine durch MPA beeinflusst wird.

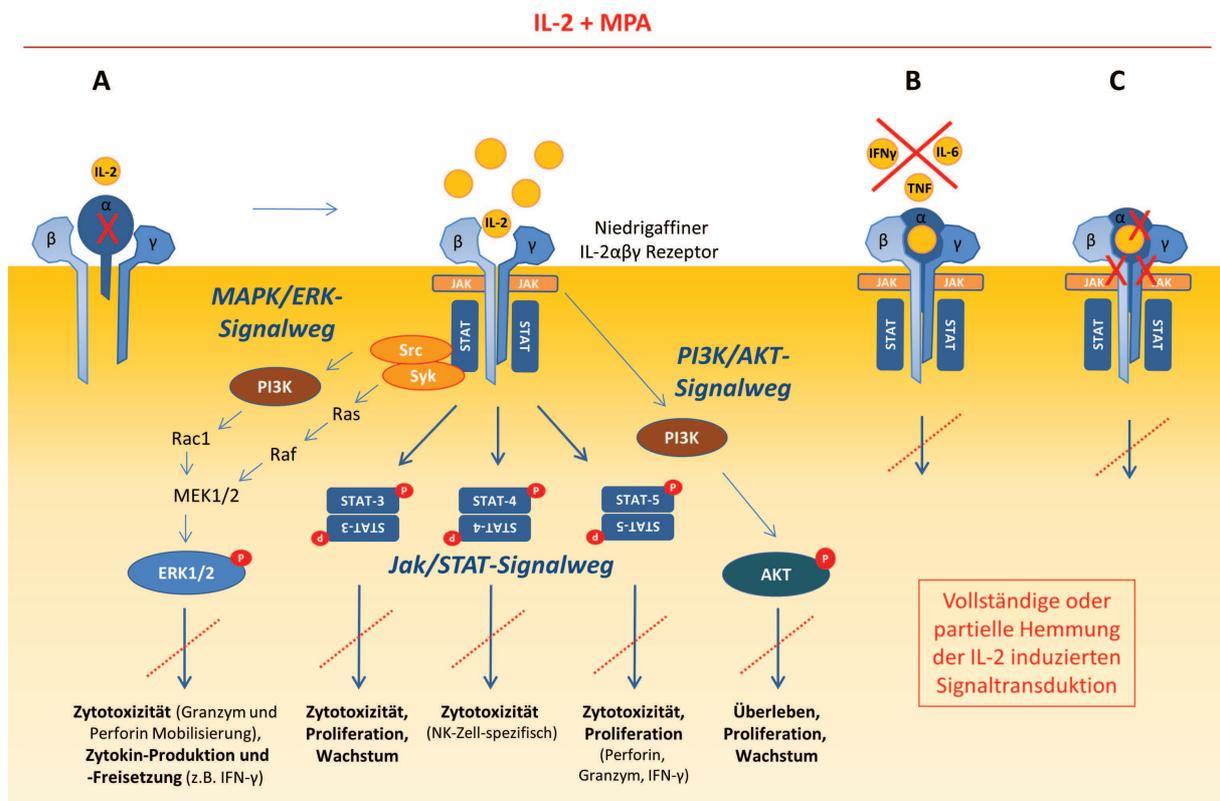


Abbildung 5.3: Hypothese der durch MPA gehemmten Aktivierung von Signalkaskaden.

A) Durch die inhibierte Expression der α -Untereinheit (CD25) wird die Ausbildung des hochaffinen IL-2 $\alpha\beta\gamma$ -Rezeptors durch MPA unterdrückt. Somit wird die durch IL-2 vermittelte Signaltransduktion derart gestört, dass trotz hoher Mengen IL-2 die Signalmoleküle partiell (AKT, STAT-3, STAT-5) oder auch vollständig (ERK1/2, STAT-4) in ihrer Aktivierung gehemmt werden. **B)** Als alternatives Modell wäre auch eine Hemmung der durch andere Zytokine vermittelte Signaltransduktion anderer Rezeptoren aufgrund der durch MPA-inhibierten Zytokin-Sekretion möglich. **C)** Ergänzend könnte die Expression der α -Untereinheit anderer Zytokinrezeptoren oder der von sowohl dem IL-2R als auch von Rezeptoren für IL-4, -7, -9 und -21 exprimierten γ -Untereinheit, bzw. den IL-15R betreffend β - und γ -Untereinheit, gehemmt werden. Auch diese Faktoren könnten zu der gestörten Signaltransduktion beitragen (Eigene Abbildung).

5. Diskussion

Interessanterweise hatte jedoch weder eine 24-stündige noch eine 4-tägige MPA-Exposition von bereits IL-2 vorstimulierten NK-Zellen einen negativen Einfluss auf die *ex vivo* Zytokin-Sekretion. Demnach scheinen die in die Zytokin-Produktion involvierten Signalkaskaden (z. B. STAT-5, MAPK/ERK) bis zum sechsten Tag bereits soweit aktiviert, dass eine rückwirkende Behandlung mit MPA keine inhibitorische Wirkung mehr ausübt. Dies korreliert mit den zeitlichen Aktivierungsprofilen der Signalmoleküle, die am sechsten Tag der IL-2 Stimulation die höchste Phosphorylierungsintensität aufzeigten.

Des Weiteren entsprach auch das CD25 Expressionsprofil dabei dem identischen zeitlichen Aktivierungsprofil der untersuchten Signalmoleküle. Sowohl die CD25 Expression als auch die Aktivierung der Signalmoleküle hatte ihren Höhepunkt am sechsten Tag der IL-2 Stimulation. Dies lässt einen direkten Zusammenhang vermuten. Man weiß, dass IL-2 den STAT-5 Signalweg in NK-Zellen aktiviert und eines der STAT-5 Zielgene ist wiederum CD25, die α -Kette des IL-2 Rezeptors [91]. Dies könnte somit Ursache des identischen zeitlichen Aktivierungsmusters der CD25 Expression und der STAT-5 Aktivierung sein. Sowie die MPA-Behandlung bereits aktivierter NK-Zellen keinen Effekt auf die Zytokin-Sekretion hatte, so wurde auch die CD25 Expression auf bereits vorstimulierten NK-Zellen durch eine MPA-Behandlung für 24 h oder 4 Tage nicht reduziert. Auch Quémenéur *et al.* haben in sieben Tage durch Phytohämagglutinin (PHA) und IL-2 voraktivierten Lymphozyten keine Inhibition der CD25 Expression durch MPA beobachten können [184].

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass die durch das Zytokin IL-2 induzierte intrazelluläre Signaltransduktion durch das Immunsuppressivum MPA massiv beeinflusst wird. Dies äußerte sich in einer partiell bis vollständig inhibierten Phosphorylierung zentraler Signalmoleküle wie STAT-3, -4 und -5 (Jak/STAT-Signalweg), der MAP-Kinase ERK1/2 (MAPK/ERK-Signalweg) und der Proteinkinase AKT (PI3K/AKT-Signalweg). Dadurch wurden die durch IL-2 geförderten Zellprozesse wie das Überleben, die Proliferation und die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen drastisch gehemmt. Dies steht vermutlich im Zusammenhang mit einer reduzierten Expression der IL-2R α Untereinheit (CD25), wodurch die Ausbildung des hochaffinen IL-2 $\alpha\beta\gamma$ -Rezeptors auf der Zelloberfläche verhindert wurde. Demzufolge scheint die eingeschränkte NK-Zell-Effektorfunktion Ursache einer durch MPA gestörten IL-2 Signaltransduktion zu sein.

5.3. Schlussfolgerung für die klinische Anwendung

5.3.1. Klinische Studien mit haploidenten NK-Zellen als Immuntherapie

Bei der haploidenten SZT mit CD3/CD19-depletierten Stammzelltransplantaten werden dem Patienten hohe Mengen an potentiell alloreaktiven NK-Zellen verabreicht [26, 47]. Diese sollen bereits während der Aplasiaphase unmittelbar nach SZT eine Immunkompetenz und einen GvL/T-Effekt gegen residuale Tumorzellen vermitteln. Untersuchungen von Miller *et al.* berichten jedoch von einem sich auf die NK-Zell-Funktionalität negativ auswirkenden Effekt des zur Stammzellmobilisierung verwendeten Wachstumsfaktors G-CSF (Neupogen®). Somit scheint die Immunkompetenz im Hinblick auf die Proliferation und die Zytotoxizität von NK-Zellen aus G-CSF stimulierten Leukapherisaten eingeschränkt zu sein [137]. Zudem dominiert bei den in den ersten Monaten nach hämatopoetischer SZT rekonstituierten NK-Zellen primär ein CD56^{bright}CD16^{dim/-} NK-Zell-Phänotyp im peripheren Blut der Patienten über dessen Reifungsgrad und zytotoxische Kompetenz zum Teil widersprüchliche Ergebnisse publiziert wurden. Dulphy *et al.* beschreiben den nach HLA-identer hämatopoetischer SZT vorherrschenden CD56^{bright}CD16^{dim/-} Phänotyp mit erhöhter NKp46, NKG2D aber auch CD94/NKG2A Expression, was jedoch nicht von einer veränderten Funktionalität der beiden Subpopulationen begleitet war [197]. Cooley *et al.* und Nguyen *et al.* berichten hingegen von der Dominanz eines unreifen CD56^{bright}KIR^{neg} NK-Zell-Phänotyps mit verstärkter CD94/NKG2A Expression und von einer stark eingeschränkten zytotoxischen Funktionalität dieser früh nach haploidenter SZT immunrekonstituierten NK-Zellen [198, 199]. Somit könnte ein frühzeitiger Einsatz von Immuntherapien mit hochfunktionalen NK-Zellen diese Einschränkungen in der Immunkompetenz und Funktionalität der NK-Zellen in der frühen Phase nach hämatopoetischer SZT überbrücken und eine Förderung des GvL/T-Effekts im Patienten bewirken.

In ersten klinischen Phase I/II Studien wurden sowohl unstimulierte als auch durch Zytokine aktivierte allogene NK-Zellen zur Behandlung von Hochrisikopatienten mit diversen malignen Erkrankungen verwendet. Dabei ist die Zytokin-Aktivierung entweder während einer *ex vivo* Kultivierung der NK-Zellen oder durch Zytokin-Applikation während eines *in vivo* Expansionsprozesses im Patienten erfolgt. Die folgende Tabelle zeigt Beispiele für die klinische Anwendung von haploidenten CD3⁻CD56⁺ NK-Zellen in Kombination mit und unabhängig von einer hämatopoetischer SZT (▷ Tab. 5.1).

Tabelle 5.1: Protokolle verschiedener NK-Zell-Studien.

Applikation nach hämatopoetischer SZT				
Autor	Protokoll	Patienten	Dosis* [/KG]	Erkrankung
Uharek <i>et al.</i> 2003 [130, 200]	haploidente NK, IL-2 stim. für 1–2 d	6	$7,6 \times 10^6$	ALL, AML, CML, MH
Koehl <i>et al.</i> 2004 [129]	haploidente NK, IL-2 stim. für 14 d und 2–3 \times IL-2 s.c. für 4–6 wk (bis zu 3 DLIs)	3, 6 DLIs	$10,7 \times 10^6$	ALL, AML
Passweg <i>et al.</i> 2004 [201]	haploidente NK, mehrere unstim. Gaben	5, 9 DLIs	$9,3 \times 10^6$	AML, CML
Koehl <i>et al.</i> 2006 [130, 202]	haploidente NK, mehrere unstim. Gaben	7, 12 DLIs	$12,6 \times 10^6$	ALL, AML, NB, MH, RMS
Applikation ohne SZT, aber nach voll-/teilmyeloablativer Konditionierung				
Miller <i>et al.</i> 2005 [132]	haploidente NK, IL-2 stim. ü. N. und 6 \times IL-2 s.c. für 14 d	43	$8,5 \times 10^6$	AML, NZK, M, MH
Rubnitz <i>et al.</i> 2010 [131]	haploidente NK, unstim., 6 \times IL-2 s.c.	10	$29,0 \times 10^6$	AML
Bachanova <i>et al.</i> 2010 [203]	haploidente NK, IL-2 stim. 8–16 h und 6 \times IL-2 s.c. für 14 d	6	$21,0 \times 10^6$	NHL
Geller <i>et al.</i> 2011 [204]	haploidente NK, IL-2 stim. ü. N. und 6 \times IL-2 s.c. für 14 d	20	$21,6 \times 10^6$	OK, MK
Curti <i>et al.</i> 2011 [205]	haploidente NK, unstim., 6 \times IL-2 s.c. für 14 d	13	$2,7 \times 10^6$	AML

ALL: Akute lymphatische Leukämie, AML: Akute myeloische Leukämie, CML: Chronische myeloische Leukämie, d: Tage, DLI: *donor lymphocyte infusion* (Spender-Lymphozyten-Infusion), KG: kg/Körpergewicht, M: metastasierendes Melanom, MH: Morbus Hodgkin, MK: Mammakarzinom, NB: Neuroblastom, NHL: Non-Hodgkin-Lymphom, NK: NK-Zellen, NZK: Nierenzellkarzinom, OK: Ovarialkarzinom, RMS: Rhabdomyosarkom, s.c.: subkutane Injektion, stim.: stimuliert, SZT: Stammzelltransplantation, unstim.: unstimuliert, ü. N.: über Nacht, wk: Woche, *Dosis entspricht dem Median.

Bisher konnte sowohl die Machbarkeit der Aufreinigung nach GMP-Bedingungen als auch die Sicherheit der Infusion von unstimulierten und *ex vivo* Zytokin-stimulierten Spender-NK-Zellen nach haploidenter SZT demonstriert werden. Hierbei zeigten Passweg *et al.* und Koehl *et al.*, dass NK-Zell-Produkte zur klinischen Applikation mittels einer CD3-Depletion und darauffolgender CD56-Selektion eine Reinheit von 95 % mit einer kontaminierenden T-Zell-Menge von unter 0,1 % erreichten [130, 206]. Koehl *et al.* demonstrierten zudem die Machbarkeit der *ex vivo* IL-2 Stimulation unter GMP-Bedingungen, was mit einer 5-fachen NK-Zell-Expansion und einer signifikant gesteigerten zytotoxischen Aktivität einherging [115, 134]. Zudem wurden weder nach unstimulierten noch nach IL-2 stimulierten NK-Zell-Infusionen schwerwiegende Nebenwirkungen oder die Entstehung einer schweren akuten oder chronischen GvHD beobachtet. Die klinische Applikation haploidenter NK-Zellen erfolgte in anderen Therapieprotokollen auch unabhängig von einer hämatopoetischen SZT. Dabei wurden, wie von Miller *et al.*, Bachanova *et al.* und Geller *et al.* beschrieben, sowohl über Nacht IL-2 stimulierte NK-Zellen als auch, wie von Rubnitz *et al.* und Curti *et al.* publiziert, frisch isolierte unstimulierte NK-Zellen den

Patienten verabreicht. Im Rahmen dieser Studien wurde auch eine sichere *in vivo* NK-Zell-Expansion durch subkutane IL-2 Injektionen demonstriert [131, 132, 203–205].

Aufgrund des im Vergleich zu T-Zell-DLIs erhöhten Aufwands der NK-Zell-Aufreinigung und -Expansion, sind NK-Zell-Therapien dennoch bisher nur in relativ kleinen Patientenkohorten durchgeführt worden. Daher kann neben einer sicheren Applikation und trotz vereinzelter vielversprechender Erfolge noch keine endgültige Prognose über die Effektivität der NK-Zell-basierten Immuntherapien in Bezug zu Remissionsstatus und Überleben getroffen werden.

5.3.2. Bewertung der Sicherheit der NK-Zell-Applikation

Im Unterschied zu T-Zellen scheinen NK-Zellen gesundes Empfängergewebe nicht zu schädigen und lösen daher keine oder nur eine milde GvHD aus. So konnten Ruggeri *et al.* im Mausmodell zeigen, dass hohe Mengen alloreaktiver NK-Zellen einen GvL/T-Effekt ausüben ohne eine GvHD zu induzieren. Zudem wurde den alloreaktiven NK-Zellen im Zusammenhang mit der Eliminierung von Empfänger-dendritischen Zellen eine protektive Rolle zur Prävention einer GvHD zugesprochen [117]. Dabei richten sich NK-Zellen gegen unreife aktivierte dendritische Zellen, die im Lauf der Initialisierung einer GvHD eine zentrale Rolle bei der Aktivierung von Spender-T-Zellen durch Präsentation von Empfängerantigenen beinhalten [127, 128]. Huenecke *et al.* zeigten bereits im Rahmen der in Frankfurt a. M. laufenden NK-Zell-Studie, dass selbst die Infusionen hoher NK-Zell-Dosen von bis zu $60 \times 10^6/\text{kg KG}$ nicht zu der Entstehung einer GvHD führten, solange die kontaminierende T-Zell-Menge < 50.000 T-Zellen/kg KG betrug [115]. Die im Lauf dieser Dissertation weitergeführten Untersuchungen bestätigten diese Ergebnisse, obgleich in 75 % der Patienten ein KIR-Liganden *Mismatch* in Richtung eines förderlichen GvL/T-Effekts und somit auch einer GvHD Entstehung vorlag. Trotz hoher NK-Zell-Dosen entwickelten nur zwei der 16 Patienten eine GvHD $>$ Grad II, was in einem Fall auf eine kontaminierende T-Zell-Menge von $> 50.000/\text{kg KG}$ in einem unstimulierten NK-Zell-Produkt zurückzuführen war und in dem anderen Fall mit der höchsten verabreichten T-Zell-Dosis im Stammzellpräparat assoziiert war (\triangleright Tab. 4.1 und 4.2). Patienten mit IL-2 stimulierten NK-Zell-Applikationen zeigten nach NK-Zell-Infusion entweder keine oder nur eine milde Form der GvHD, die sich in leichten Hautrötungen (unspezifisches makuläres Exanthem) äußerte. Dies war interessanterweise unabhängig von der mit der NK-DLI_{IL-2 stim} verabreichten T-Zell-Dosis die einmalig sogar $98,3 \times 10^3$ T-Zellen/kg KG betrug. Dies könnte mit einem beschriebenen Funktionsverlust von *ex vivo* expandierten T-Zellen im Zusammenhang stehen [207, 208].

5. Diskussion

Dass trotz bestehendem KIR-Liganden *Mismatch* die Infusion hoher Dosen alloreaktiver NK-Zellen nicht zu einer Auslösung einer GvHD führt, unterstützt die These, dass ein alleiniges Fehlen des inhibierenden KIR-Liganden für die NK-Zell-Aktivierung nicht ausreichend ist. Es wird zudem ein aktivierendes Signal zur Induktion der zytotoxischen Aktivität benötigt. Die meisten Liganden aktivierender NK-Zell-Rezeptoren befinden sich auf stressinduzierten, virusinfizierten, transformierten oder hämatopoetischen Zellen [79, 86]. So wurde von einer Resistenz von ALL-Blasten gegen alloreaktive NK-Zellen berichtet, wenn diese eine verminderte Expression des auf hämatopoetischen Zellen vorkommenden Zelladhäsionsmoleküls LFA-1 auf ihrer Zelloberfläche zeigten [45]. Die fehlende Expression von aktivierenden NK-Zell-Liganden auf nicht-hämatopoetischem, gesundem Gewebe vermag daher eine der Ursachen sein, warum potentiell alloreaktive NK-Zellen selbst im haploidenten Stammzellsetting gesundes Empfängergewebe nicht schädigen und daher schwerwiegende GvH-Erkrankungen ausbleiben [125].

Des Weiteren wurde speziell der Einfluss von IL-2 stimulierten NK-Zell-Präparaten evaluiert. Die *ex vivo* IL-2 Stimulation war von einer signifikanten Steigerung der NK-Zell-Funktionalität begleitet, was mit einer gesteigerten Zytokin- und Chemokin-Produktion und einer erhöhten zytotoxischen Aktivität einherging. Um einen Zellverlust zu vermeiden, wurden die IL-2 expandierten NK-Zell-Produkte vor Applikation nicht gewaschen. Demnach wurden dem Patienten die gesamten im Lauf der *ex vivo* NK-Zell-Expansion sekretierten Zytokine und Chemokine koappliziert. Trotz einer erhofften Steigerung des GvL/T-Effektes dürfen potentielle Risikofaktoren einer Zelltherapie mit stimulierten NK-Zellen nicht außer Acht gelassen werden. Die Koinfusion hoher Mengen *ex vivo* sekretierter Zytokine und Chemokine könnte mit einem Risiko von schwerwiegenden immunologischen Reaktionen des Patienten, wie z. B. die Auslösung eines sog. „Zytokinsturms“, begleitet sein. Die Behandlung von neun Patienten mit insgesamt 15 NK-DLI_{IL-2 stim} Applikationen waren im Rahmen dieser Studie jedoch nur partiell von transientem Fieber und von keinen schweren Nebenwirkungen begleitet. In zwei Patienten kam es in Folge der NK-DLI zu Erbrechen und Blutdruckschwankungen, woraufhin in einer einmaligen Dosis Steroide appliziert wurden. Dies führte unmittelbar zu einer Verbesserung des Allgemeinzustandes. Zusammenfassend wurde die Immuntherapie mit haploidenten unstimulierten sowie mit *ex vivo* IL-2 aktivierten Spender-NK-Zellen ohne schwerwiegende Konsequenzen im Patienten gut toleriert.

5.3.3. Einschränkungen in der NK-Zell-Funktionalität

Um eine effiziente Immuntherapie zu gewährleisten, müssen potentielle Funktionseinschränkungen charakterisiert und bewertet werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnten signifikante Beeinträchtigungen der Funktionalität von NK-Zellen demonstriert werden. Dabei stand das zur GvHD-Prophylaxe eingesetzte immunsuppressive Medikament MMF im Fokus dieser Untersuchungen. In Übereinstimmung mit anderen Gruppen [172, 174] wurde eine Hemmung der NK-Zell-Proliferation, Zytokin-Sekretion, der zytotoxischen Aktivität und des Zytokin-aktivierten NK-Zell-Phänotyps beobachtet. Im Rahmen dieser Arbeit konnte zudem erstmalig gezeigt werden, dass auch die durch Zytokine induzierte intrazelluläre Signaltransduktion durch das Immunsuppressivum MPA massiv beeinflusst wird. Dies äußerte sich durch eine partiell bis vollständig inhibierte Phosphorylierung zentraler Signalmoleküle wie STAT-3, -4 und -5 (Jak/STAT-Signalweg), der MAP-Kinase ERK1/2 (MAPK/ERK-Signalweg) und der Proteinkinase AKT (PI3K/AKT-Signalweg). Dies steht vermutlich im Zusammenhang mit einer reduzierten Expression der IL-2R α -Untereinheit (CD25), wodurch die Ausbildung des hochaffinen IL-2 $\alpha\beta\gamma$ -Rezeptors auf der Zelloberfläche verhindert wurde. Demzufolge scheint die eingeschränkte NK-Zell-Effektorfunktion Ursache einer durch MPA gestörten IL-2 Signaltransduktion zu sein.

MPA verursachte zudem eine Hemmung der durch den IL-2 Stimulus hervorgerufenen Expressionssteigerung diverser Oberflächenmoleküle. Dabei wurden auch Integrine (LFA-1), Selektine (CD62L) und das interzelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1, die eine zentrale Rolle bei den Vorgängen des „Anhaftens und Rollens“ im Lauf der Leukozyten-Migration beinhalten, durch MPA in ihrer Expression gehemmt. Auch die im Rahmen der Leukozyten-Aktivierung und Chemotaxis-relevanten Chemokin-Rezeptoren CCR5 und CXCR3 wurden in ihrer Expression inhibiert. Interessanterweise wurde jedoch eine bereits erhöhte Oberflächenexpression auf stimulierten und damit aktivierten NK-Zellen durch eine 1- bis 4-tägige MPA-Behandlung nicht beeinflusst. Somit wäre die während des klinischen *in vivo* Monitorings beobachtete Extravasation stimulierter NK-Zellen vermutlich nicht beeinträchtigt. Demgegenüber stehen jedoch Untersuchungen von Blaheta *et al.*, die nach *in vitro* MPA-Inkubation nicht nur auf T-Zellen sondern auch auf Endothelzellen eine Reduktion diverser Zelladhäsionsmoleküle beschrieben, wodurch die Migration von T-Zellen massiv beeinträchtigt wurde [182]. Da für eine effiziente Leukozyten-Migration auch eine adäquate Expression von Zelladhäsionsmolekülen auf Seiten des Endothels erforderlich ist, könnte demnach bei andauernder Immunsuppression während der NK-Zell-Therapie die Extravasation der stimulierten NK-Zellen aus der NK-DLI dennoch beeinflusst werden.

Ogleich in vorliegender Arbeit auch unstimulierte NK-Zellen auf eine Beeinflussung durch das Immunsuppressivum MMF untersucht wurden, lag der Fokus auf einer möglichen

5. Diskussion

Einschränkung der Funktionalität von IL-2 aktivierten NK-Zellen im Rahmen der NK-Zell-Immuntherapie. Ohahta *et al.* und Eissens *et al.* untersuchten hingegen ausschließlich Effekte auf frisch isolierte NK-Zellen, die während des Expansionsprozesses mit MPA behandelt wurden [172, 174]. Dieser experimentelle Aufbau legt den Fokus auf eine potentielle Hemmung der Funktion der nach hämatopoetischer SZT rekonstituierten NK-Zell-Population. Die gehemmte Ausbildung eines aktivierten NK-Zell-Phänotyps lässt auch *in vivo* eine unter Immunsuppression deutlich eingeschränkte NK-Zell-vermittelte Immunkompetenz der Patienten erwarten. Dafür sprechen Daten von Weigel *et al.*, die *in vivo* den Einfluss einer MMF-Therapie nach Herztransplantation auf Lymphozyten untersuchten und eine reduzierte Expression der Aktivierungsmarker CD25 und HLA-DR auf NK-Zellen beschreiben [209]. Demnach wäre die Effektorfunktion von im Lauf einer Infektion durch Zytokine aktivierten NK-Zellen auch *in vivo* durch die Inhibition des aktivierten zytotoxischen NK-Zell-Phänotyps während einer MMF-Therapie massiv beeinträchtigt. Dies lässt nicht nur eine Einschränkung der im Rahmen der NK-Zell-Therapie applizierten, sondern auch der endogen rekonstituierenden NK-Zellen vermuten. Zwar gibt es bisher keine Anzeichen einer verspäteten Immunrestitution durch das zur GvHD-Prophylaxe verwendete Immunsuppressivum MMF in Patienten nach allogener hämatopoetischer SZT [210–212], jedoch scheint die zytotoxische Funktionalität der früh nach SZT immunrekonstituierten NK-Zellen bereits beeinträchtigt zu sein [198, 199]. Eine prolongierte immunsuppressive Therapie nach SZT könnte nach vorliegenden Ergebnissen vermutlich zu weiteren Funktionseinschränkungen führen.

Des Weiteren hat die Inkubation von hochzytotoxischen NK-Zellen mit Patientenplasma sowohl die NKG2D Rezeptordichte als auch die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen signifikant beeinträchtigt. Neben einer therapeutisch relevanten MPA-Plasmakonzentration konnte in einem Neuroblastom-Patienten zudem auch ein erhöhter sMICA-Plasmaspiegel detektiert werden. Es ist bekannt, dass hohe Plasmaspiegel des sMICA Oberflächenproteins zu einer Reduktion der NKG2D Expression und zu einer signifikanten Hemmung der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen führen können. Dies steht im Zusammenhang mit *Tumor escape* Mechanismen wobei unter anderem auch Neuroblastomzellen durch ein sog. *shedding* von NKG2D Liganden von ihrer Oberfläche einer NK-Zell-vermittelten Erkennung und Lyse entkommen [150, 175, 176]. Die zytotoxische Funktionalität der Spender-NK-Zellen scheint demnach neben der immunsuppressiven Therapie noch durch weitere Faktoren im Patientenplasma beeinträchtigt zu werden.

Zusammenfassend scheinen mehrere Faktoren die Immunkompetenz der frühen NK-Zellen nach SZT zu beeinflussen. Ein Ziel adaptiver Immuntherapien ist es, Einschränkungen in der Immunkompetenz und Funktionalität der NK-Zellen in der frühen Phase nach hämatopoetischer SZT zu überbrücken. In diesem Zusammenhang scheinen IL-2 stimulierte

NK-Zellen durch die erhöhte Zytokin/Chemokin-Sekretion, die gesteigerte Zytotoxizität und die geringere Sensitivität gegenüber der MPA-Exposition einen Vorteil gegenüber unstimulierten NK-Zell-Applikationen zu haben.

5.3.4. Bewertung der Effektivität der Immuntherapie

Es wird angenommen, dass Immuntherapien mit allogenen NK-Zellen den GvL/T-Effekt nach haploidenter SZT fördern können. Rubnitz *et al.* beschrieben kürzlich ein 100%iges Überleben von zehn pädiatrischen Patienten mit AML nach haploidenter NK-Zell-Therapie [131]. Obwohl die Patienten einer günstigen und/oder intermediären Risikogruppe zugeordnet waren und in erster kompletter Remission behandelt wurden, erscheinen die Ergebnisse vielversprechend. In vorliegender Arbeit kann aufgrund der kleinen und sehr heterogenen Patientengruppen nur schwer eine unmittelbare Einschätzung der Effektivität der hier vorgestellten Immuntherapie abgegeben werden – weder im Allgemeinen noch in Bezug zu Unterschieden in der Applikation von unstimulierten oder IL-2 stimulierten NK-Zell-Infusionen. Zudem wurden nur Hochrisikopatienten in dieser Studie behandelt, die zu 63 % zum Zeitpunkt der haploidenten SZT nicht in Remission waren. HLA- und KIR-Typisierungen der Spender und Empfänger ergaben in zwölf von 16 Patienten (75 %) einen KIR-Liganden *Mismatch* und somit eine prognostische Alloreaktivität in Richtung des GvL/T-Effekts. Es konnte jedoch kein Einfluss auf den Therapieerfolg hinsichtlich einer GvHD-Entstehung, Rezidivrate oder des Remissionsstatus festgestellt werden. Hoffnungsvoll erscheint jedoch, dass zwei der vier Hochrisiko Neuroblastom Stadium IV Patienten trotz schlechter Überlebensprognose sich bereits über zwei Jahre nach haploidenter SZT und zusätzlicher Immuntherapie mit IL-2 stimulierten NK-Zellen in kompletter Remission befinden. Ebenso weisen die vorliegenden Ergebnisse auf eine deutlich verbesserte Funktionalität der durch IL-2 stimulierten NK-Zellen hin, die sowohl durch eine gesteigerte zytotoxische Aktivität als auch durch eine hohe *ex vivo* Sekretion von Zytokinen und Chemokinen gekennzeichnet war. Die Koapplikation dieses Zytokin/Chemokin-Gemischs scheint die Extravasation der hochzytotoxischen NK-Zellen von der peripheren Blutzirkulation ins Gewebe zu fördern, was eine Ausübung des GvL/T-Effekts *in vivo* erhoffen lässt. Ob dies in einer tatsächlichen Steigerung der Effektivität der Immuntherapie resultiert, und damit die Prognose der Patienten verbessert, werden erst zukünftige Studien mit größeren Patientenkohorten abschließend zeigen können.

6. Ausblick

In den hier vorgestellten begleitenden Untersuchungen zu einer klinischen Phase I/II NK-Zell-Studie konnte ein Verlassen der IL-2 stimulierten Spender-NK-Zellen aus der peripheren Blutbahn der Patienten gezeigt werden. Während in dieser und anderen Arbeiten *ex vivo* gegen Leukämie- und Tumorzellen ein deutlich gesteigerter zytotoxischer Effekt der stimulierten NK-Zellen gegenüber unstimulierten NK-Zellen demonstriert wurde, steht der *in vivo* Beweis hinsichtlich eines verbesserten GvL/T-Effekts noch aus. Nur multizentrische Studien mit vergleichbaren Studienprotokollen und größeren, möglichst homogenen Patientengruppen können einen positiven klinischen Nutzen abschließend klären. Des Weiteren konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Einschränkung der *ex vivo* Funktionalität von NK-Zellen durch das Immunsuppressivum MMF gezeigt werden. Dabei waren IL-2 stimulierte im Vergleich zu unstimulierten NK-Zellen deutlich weniger sensitiv gegenüber der MMF-Exposition. Die geringere MMF-Sensibilität sowie eine gesteigerte Zytotoxizität IL-2 stimulierter NK-Zellen als auch die mutmaßliche Extravasation stimulierter NK-Zellen wähen Vorteile der klinischen Applikation von NK-DLI_{IL-2 stim.}. Die notwendige Verbesserung der Effektivität dieser NK-Zell-Immuntherapie könnte in zukünftigen Studien durch folgende Konzepte erzielt werden:

1. Vermeidung immunsuppressiver Therapie zum Zeitpunkt der NK-DLI

- a) Absetzen immunsuppressiver Medikamente: Um eine hohe NK-Zell-Funktionalität zu gewährleisten, sollte die NK-DLI nach dem Absetzen der immunsuppressiven Therapie erfolgen oder wenn möglich auf die Immunsuppression ganz verzichtet werden. Neben MMF haben auch andere Immunsuppressiva wie CsA, Sirolimus und Tacrolimus einen hemmenden Effekt auf NK-Zellen gezeigt [172–174], womit die Umstellung auf ein anderes Medikament keine Verbesserung darstellen würde. Um eine immunsuppressive Therapie nach haploidenter SZT zu vermeiden, muss die Menge an alloreaktiven Spender-T-Zellen im Transplantat reduziert werden. Dies kann durch eine CD34-Selektion der Stammzellen erfolgen oder möglicherweise durch neue Depletionsverfahren wie die TCR $\alpha\beta$ -Depletion [213]. Die im Rahmen dieser NK-Zell-Studie genutzte Methode der CD3/CD19-Depletion führte zu einer hohen Anzahl residualer Spender-T-Zellen, was eine immunsuppressive Therapie nötig machte.

2. Überwindung der eingeschränkten NK-Zell-Funktionalität durch Optimierung von Frequenz und Dosis der NK-DLI

- a) Überwindung von *Tumor escape* Mechanismen: NK-Zellen werden durch erhöhte Plasmaspiegel des löslichen Oberflächenproteins sMICA in ihrer zytotoxischen Aktivität signifikant gehemmt. Dabei bindet das von Tumorzellen sekretierte sMICA den NKG2D Rezeptor der NK-Zellen und verhindert so eine effiziente Tumorerkennung [175, 176]. Wie erste *in vitro* Ergebnisse im Rahmen dieser NK-Zell-Studie gezeigt haben, konnte durch kurze aufeinanderfolgende Gaben von NK-Zellen dieser *Tumor escape* Mechanismus teilweise überwunden werden. Die erste NK-Zell-Infusion würde dabei lösliches MICA „abfangen“, sodass die in der zweiten Infusion enthaltenen hochzytotoxischen NK-Zellen nicht mehr in ihrer zytotoxischen Aktivität gehemmt wären und potentiell einen GvL/T-Effekt am Zielort ausüben könnten [150]. Dafür werden jedoch hohe Dosen an NK-Zellen benötigt. Auch eine kombinierte NK-Zell-Therapie mit MICA-spezifischen Antikörpern wäre denkbar.
- b) Optimierung des Expansionsprozesses: Höhere Dosen IL-2 stimulierter NK-Zellen könnten eine *Tumor escape*- und MMF-induzierte Funktionseinschränkung der NK-Zellen kompensieren. Im Rahmen dieser NK-Zell-Studie wurde im Median nur eine etwa 5-fache Expansionsrate der NK-Zellen erreicht. Bei einer Zieldosis von 1×10^7 /kg KG NK-Zellen erlaubt diese Expansionsrate nur zwei bis drei NK-DLI Applikationen. Um mehrfache NK-DLI Applikationen mit einer höheren Zieldosis von etwa 1×10^8 /kg KG NK-Zellen zu erzielen, sind neue Expansionsprotokolle erforderlich. Dabei könnte die Kokultivierung von NK-Zellen mit dendritischen Zellen oder mit zytokinproduzierenden autologen sog. *Feeder* Zellen eine deutliche Steigerung der NK-Zell-Ausbeute bewirken.

3. Funktionssteigerung der NK-Zellen

- a) Zytokin-Kombinationen: Die *ex vivo* IL-2 Stimulation stellt eine sichere und hocheffiziente Aktivierung der NK-Zellen dar. Eine stärkere Aktivierung könnte gegenteilig sogar in einer Überstimulierung und frühen Apoptose resultieren. Dennoch sollten zukünftige Untersuchungen klären, ob durch eine Kombination von IL-2 mit anderen Zytokinen wie z. B. IL-15 oder IL-12 kürzere Expansionszeiträume mit einer verbesserten Expansionsrate bei gleichbleibender hoher Funktionalität erzielt werden können.
- b) Kombinierte Antikörper- und NK-Zell-Therapie: Bei einer kombinierten NK-Zell-Therapie mit bereits klinisch erprobten tumorspezifischen Antikörpern könnte die Fc-Rezeptor-vermittelte Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) verstärkt werden. Dies wurde bereits in ersten klinischen Studien mit haploidenten NK-Zellen

6. Ausblick

und dem CD20 Antikörper Rituximab bei der Behandlung von B-Zell-Lymphomen angewandt [203]. Bispezifische Antikörper, die sowohl die Tumorzelle als auch eine NK-Zell-spezifische Oberflächenstruktur erkennen, könnten die räumliche Nähe von Effektor- und Zielzelle zudem verbessern [214].

- c) Verbesserung der Tumorzellerkennung: Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDACis) können die Expression aktivierender NK-Zell-Rezeptorliganden auf Tumorzellen verstärken und so *Tumor escape* Mechanismen entgegenwirken [215–217]. Eine Kombinationstherapie mit NK-Zellen könnte somit die NK-Zell-Funktionalität *in vivo* verbessern.

7. Zusammenfassung

Zelluläre Immuntherapien mit hochaufgereinigten allogenen NK-Zellen sind eine mögliche Therapieoption um den GvL/T-Effekt nach haploidenter SZT bei pädiatrischen Hochrisikopatienten mit malignen Erkrankungen zu verstärken. Im Rahmen der in Frankfurt a. M. laufenden klinischen Phase I/II NK-Zell-Studie wurden 16 pädiatrische Patienten sowohl mit unstimulierten (NK-DLI_{unstim}, 9 Patienten) als auch mit zehn Tage *ex vivo* IL-2 (1000 U/ml) stimulierten Spender-NK-Zellen (NK-DLI_{IL-2 stim}, 9 Patienten) an den Tagen (+3), +40 und +100 nach haploidenter SZT behandelt. Bisher gibt es kaum Daten über den Verbleib der transfundierten Zellen und den Einfluss der NK-DLI Immuntherapie auf sowohl zelluläre als auch humorale Komponenten des Immunsystems der Patienten. Da die Patienten zudem nach haploidenter SZT zur GvHD-Prophylaxe das immunsuppressive Medikament Mycophenolat-Mofetil (MMF) erhalten, sind Untersuchungen zum Einfluss von MMF auf die Funktionalität der Spender-NK-Zellen von großem Interesse.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe eines studienbegleitenden, nichtinvasiven *in vivo* Immunmonitorings erstmalig ein unterschiedlicher Einfluss von NK-DLI_{unstim} im Vergleich zu NK-DLI_{IL-2 stim} auf zelluläre Bestandteile und auf die Zytokin/Chemokin-Spiegel des peripheren Blutes der Patienten vor und 10 min, 1 h, 4 h und 24 h nach der Zelltherapie beschrieben. Mittels durchflusszytometrischen *single platform* Analysen konnten sowohl Spender-NK-Zellen als auch patienteneigene NK-Zellen phänotypisch und funktionell charakterisiert und unterschieden werden. So wurden neben einer gesteigerten zytotoxischen Aktivität IL-2 stimulierter NK-Zellen auch Unterschiede hinsichtlich der Expression des Oberflächenmoleküls CD56, des Aktivierungsmarkers CD69, des Natürlichen Zytotoxizitäts-Rezeptors (NCR) NKp44 und des Lymphknoten *Homing* Moleküls CD62L beobachtet. Des Weiteren führte die Applikation von NK-DLI_{IL-2 stim} zu einer signifikanten Zellmigration in der peripheren Blutzirkulation der Patienten. Während sich die Zahl der neutrophilen Granulozyten innerhalb von 4 h im peripheren Blut vervierfachte wurde unmittelbar 10 min nach NK-DLI_{IL-2 stim} ein massiver Zellverlust von eosinophilen Granulozyten, Monozyten, dendritischen Zellen und vor allem der NK-Zellen beobachtet. Eine ausgeprägtere Reduktion der immunregulatorischen CD56^{bright}CD16^{dim/-} NK-Zellen hatte zudem eine Verschiebung in der prozentualen Verteilung der NK-Zell-Subpopulationen zur Folge. In den folgenden 24 h normalisierten sich alle Zellzahlen wieder zu den Werten vor NK-DLI. Anhand der beschriebenen phänotypischen Unterscheidungsmerkmale konnte gezeigt werden, dass dabei nur patienteneigene NK-Zellen in die periphere Blutbahn zurückkehrten. Die Zellmigration war zudem *in vivo* von einem signifikanten Anstieg der

7. Zusammenfassung

proinflammatorisch- und chemotaktisch-wirkenden Zytokine/Chemokine IL-2, IL-6, IL-8, IFN- γ , MCP-1 und MIP-1 β im peripheren Blut der Patienten 10 min nach NK-DLI_{IL-2 stim} Applikation begleitet. Die Applikationen von NK-DLI_{unstim} zeigten im Gegensatz dazu keine vergleichbaren Effekte.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war herauszufinden, ob eine Therapie mit dem Immunsuppressivum MMF nach haploidenter SZT die Funktionalität dieser hochaktivierten Spender-NK-Zellen beeinträchtigt und somit die Effektivität der Immuntherapie gefährdet. Es konnten Einschränkungen in der *ex vivo* Funktionalität der NK-Zellen durch therapeutisch relevante Konzentrationen (1 bis 10 μ M) des aktiven Metaboliten Mycophenolsäure (MPA) gezeigt werden. Die MPA-Inkubation führte zu einer dosisabhängigen aber reversiblen Inhibition der IL-2 bedingten *ex vivo* NK-Zell-Proliferation. Auch die während des *ex vivo* Expansionsprozesses induzierte Zytokin/Chemokin-Sekretion wurde signifikant gehemmt. Eine 24-stündige MPA-Inkubation der IL-2 stimulierten NK-Zellen führte zudem zu einer eingeschränkten Mobilität der NK-Zellen. Dies korrelierte mit einer signifikant reduzierten zytotoxischen Aktivität gegen K-562 Tumorzellen, was jedoch nicht mit einer Oberflächenreduktion der NCRs und des NKG2D Rezeptors assoziiert war. Auch die durch die IL-2 Stimulation verursachte Hochregulierung der in Aktivierung und Migration involvierten Oberflächenmoleküle CD25, LFA-1, ICAM-1, CCR5, CXCR7, DNAM-1 und CD62L wurde durch MPA inhibiert. Im Gegensatz dazu hatte eine 24-stündige oder 4-tägige MPA-Behandlung bereits vorstimulierter NK-Zellen keinen Einfluss. Zudem konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass die IL-2 induzierte intrazelluläre Signaltransduktion durch MPA beeinflusst wird. Dies äußerte sich in einer partiell bis vollständig inhibierten Phosphorylierung zentraler Signalmoleküle wie STAT-3, -4 und -5, der MAP-Kinase ERK1/2 und der Proteinkinase AKT. Dadurch wurden die durch IL-2 geförderten Zellprozesse wie das Überleben, die Proliferation und die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen drastisch gehemmt. Dies steht vermutlich im Zusammenhang mit einer reduzierten Expression der IL-2R α Untereinheit (CD25), wodurch die Ausbildung des hochaffinen IL-2 $\alpha\beta\gamma$ -Rezeptors auf der Zelloberfläche verhindert wurde. Demzufolge scheint die eingeschränkte NK-Zell-Effektorfunktion Ursache einer durch MPA gestörten IL-2 Signaltransduktion zu sein.

Zusammenfassend scheinen NK-DLI_{IL-2 stim} durch die gesteigerte Zytotoxizität, die geringere Sensitivität gegenüber der MPA-Exposition sowie durch die mutmaßliche Extravasation der stimulierten NK-Zellen aus der peripheren Blutbahn einen Vorteil gegenüber NK-DLI_{unstim} zu haben. Ob dies auch in einer Steigerung der Effektivität der Immuntherapie resultiert und damit die Prognose der Patienten verbessert werden kann, werden jedoch erst zukünftige Studien mit größeren Patientenkohorten abschließend zeigen können.

8. Literaturverzeichnis

- [1] Deutsches Kinderkrebsregister, Johannes Gutenberg-Universität Mainz (www.Kinderkrebsregister.de). Jahresbericht 2010.
- [2] Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) (www.Kinderkrebsinfo.de). Informationsportal zu Krebs- und Bluterkrankungen bei Kindern und Jugendlichen.
- [3] Beckmann, I. A. (www.krebshilfe.de). Die blauen Ratgeber: Krebs im Kindesalter. Deutsche Krebshilfe e.V. 2010.
- [4] Michl, M. (2005) *Hämatologie*. Elsevier Urban & Fischer.
- [5] Hiddemann, W. and Bartram, C. R. (2010) *Die Onkologie, Teil 1: Allgemeiner Teil, 2. aktualisierte Auflage*. Springer Medizin Verlag.
- [6] ALL-REZ BFM 2002, Protokoll zur Behandlung von Kindern mit Rezidiv einer akuten lymphoblastischen Leukämie (Fassung vom 25.06.2003). Multizentrische Therapieoptimierungsstudie der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH).
- [7] AML-BFM 2004, Protokoll zur Behandlung der akuten myeloischen Leukämien bei Kindern und Jugendlichen (Fassung von 08/2005). Multizentrische Therapieoptimierungsstudie der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH).
- [8] Akute lymphoblastische (ALL) und akute myeloische (AML) Leukämie im Kindesalter, Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft und der Gesellschaft für Pädiatrischen Onkologie und Hämatologie (GPOH) (Fassung von 05/2008). AWMF online (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften).
- [9] Gadner, H., Gaedicke, G., Niemeyer, C., and Ritter, J. (2006) *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*. Springer Medizin Verlag.
- [10] Pezzutto, A., Ulrichs, T., and Burmester, G.-R. (2006) *Taschenatlas der Immunologie, Grundlagen - Labor - Klinik, 2. Aufl., vollst. überarbeitete Auflage (Unter Mitarbeit von A. Aicher)*. Thieme Verlag.
- [11] Possinger, K. and Regierer, A. (2007) *Facharzt Hämatologie Onkologie*. Elsevier Urban & Fischer.
- [12] Gutjahr, P. (2004) *Krebs bei Kindern und Jugendlichen: Klinik und Praxis der pädiatrischen Onkologie*. Deutscher Ärzte-Verlag.
- [13] Bader, P., Niethammer, D., Willasch, A., Kreyenberg, H., and Klingebiel, T. (2005) How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplant*, **35**, 107–119.
- [14] Holländer, G. A. (2006) *Immunologie - Grundlagen für Klinik und Praxis*. Elsevier Urban & Fischer.
- [15] Neumann, J. (2008) *Immunbiologie - Eine Einführung*. Springer Medizin Verlag.

8. Literaturverzeichnis

- [16] Klingebiel, T., Handgretinger, R., Lang, P., Bader, P., and Niethammer, D. (2004) Haploidentical transplantation for acute lymphoblastic leukemia in childhood. *Blood Rev*, **18**, 181–192.
- [17] ALL SZT-BFM 2003, Allogene Stammzelltransplantation bei Kindern und Jugendlichen mit Akuter Lymphoblastischer Leukämie (Version Oktober 2003). Multizentrische Therapiestudie, Therapieprotokoll Pilotphase.
- [18] Klingebiel, T. and Bochennek, K. (2004) Die allogene Blutstammzelltransplantation. *Pädiat Prax*, **65**, 201–215.
- [19] Bader, P., Soerensen, J., Jarisch, A., Ponstingl, E., Krenn, T., Faber, J., Dürken, M., Reinhardt, H., Willasch, A., Esser, R., Böning, H., Koehl, U., and Klingebiel, T. (2011) Rapid immune recovery and low TRM in haploidentical stem cell transplantation in children and adolescence using CD3/CD19-depleted stem cells. *Best Pract Res Clin Haematol*, **24**, 331–337.
- [20] Klingebiel, T., Cornish, J., Labopin, M., Locatelli, F., Darbyshire, P., Handgretinger, R., Balduzzi, A., Owoc-Lempach, J., Fagioli, F., Or, R., Peters, C., Aversa, F., Polge, E., Dini, G., Rocha, V., Diseases, P., of the European Group for Blood, A. L. W. P., and (EBMT), M. T. (2010) Results and factors influencing outcome after fully haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in children with very high-risk acute lymphoblastic leukemia: impact of center size: an analysis on behalf of the Acute Leukemia and Pediatric Disease Working Parties of the European Blood and Marrow Transplant group. *Blood*, **115**, 3437–3446.
- [21] Handgretinger, R., Klingebiel, T., Lang, P., Schumm, M., Neu, S., Geiselhart, A., Bader, P., Schlegel, P. G., Greil, J., Stachel, D., Herzog, R. J., and Niethammer, D. (2001) Megadose transplantation of purified peripheral blood CD34⁺ progenitor cells from HLA-mismatched parental donors in children. *Bone Marrow Transplant*, **27**, 777–783.
- [22] Aversa, F., Velardi, A., Tabilio, A., Reisner, Y., and Martelli, M. F. (2001) Haploidentical stem cell transplantation in leukemia. *Blood Rev*, **15**, 111–119.
- [23] Lang, P., Greil, J., Bader, P., Handgretinger, R., Klingebiel, T., Schumm, M., Schlegel, P.-G., Feuchtinger, T., Pfeiffer, M., Scheel-Walter, H., Führer, M., Martin, D., and Niethammer, D. (2004) Long-term outcome after haploidentical stem cell transplantation in children. *Blood Cells Mol Dis*, **33**, 281–287.
- [24] Klingebiel, T., Lang, P., Schumm, M., Koehl, U., Bader, P., Schwabe, D., Schlegel, P. G., Eyrich, M., Greil, J., Beck, J. F., Niethammer, D., and Handgretinger, R. (2005) Experiences with haploidentical stem cell transplantation in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pathol Biol (Paris)*, **53**, 159–161.
- [25] Bader, P., Willach, A., Jarisch, A., Soerensen, J., Esser, R., Böning, H., and Klingebiel, T. (2010) Transplantation CD3/CD19-depletierter Stammzellen. *Monatsschr Kinderheilkd*, Springer-Verlag. DOI 10.1007/s00112-009-2137-0.
- [26] Lang, P., Schumm, M., Greil, J., Bader, P., Klingebiel, T., Müller, I., Feuchtinger, T., Pfeiffer, M., Schlegel, P.-G., Niethammer, D., and Handgretinger, R. (2005) A comparison between three graft manipulation methods for haploidentical stem cell transplantation in pediatric patients: preliminary results of a pilot study. *Klin Padiatr*, **217**, 334–338.

- [27] Pfeiffer, M. M., Feuchtinger, T., Teltschik, H.-M., Schumm, M., Müller, I., Handgretinger, R., and Lang, P. (2010) Reconstitution of natural killer cell receptors influences natural killer activity and relapse rate after haploidentical transplantation of T- and B-cell depleted grafts in children. *Haematologica*, **95**, 1381–1388.
- [28] Lang, P., Pfeiffer, M., Müller, I., Schumm, M., Ebinger, M., Koscielniak, E., Feuchtinger, T., Föll, J., Martin, D., and Handgretinger, R. (2006) Haploidentical stem cell transplantation in patients with pediatric solid tumors: preliminary results of a pilot study and analysis of graft versus tumor effects. *Klin Padiatr*, **218**, 321–326.
- [29] Lang, P. and Handgretinger, R. (2008) Haploidentical SCT in children: an update and future perspectives. *Bone Marrow Transplant*, **42 Suppl 2**, S54–S59.
- [30] Chen, X., Hale, G. A., Barfield, R., Benaim, E., Leung, W. H., Knowles, J., Horwitz, E. M., Woodard, P., Kasow, K., Yusuf, U., Behm, F. G., Hayden, R. T., Shurtleff, S. A., Turner, V., Srivastava, D. K., and Handgretinger, R. (2006) Rapid immune reconstitution after a reduced-intensity conditioning regimen and a CD3-depleted haploidentical stem cell graft for paediatric refractory haematological malignancies. *Br J Haematol*, **135**, 524–532.
- [31] Haas, R. and Knönenwett, R. (2005) *Fragen und Antworten zur hämatopoetischen Stammzelle*. Deutscher Ärzte-Verlag.
- [32] Müller-Eckhardt, C. and Kiefel, V. (2004) *Transfusionsmedizin*. Springer-Verlag.
- [33] Miltenyi Biotec. Herstellungsprotokoll, Handbuch CliniMACS CD3/CD19 Reagent Kombination.
- [34] Schumm, M., Lang, P., Taylor, G., Kuçi, S., Klingebiel, T., Bühring, H. J., Geiselhart, A., Niethammer, D., and Handgretinger, R. (1999) Isolation of highly purified autologous and allogeneic peripheral CD34⁺ cells using the CliniMACS device. *J Hematother*, **8**, 209–218.
- [35] Bethge, W. A., Faul, C., Bornhäuser, M., Stuhler, G., Beelen, D. W., Lang, P., Stelljes, M., Vogel, W., Hägele, M., Handgretinger, R., and Kanz, L. (2008) Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults using CD3/CD19 depletion and reduced intensity conditioning: an update. *Blood Cells Mol Dis*, **40**, 13–19.
- [36] Gordon, P. R., Leimig, T., Mueller, I., Babarin-Dorner, A., Holladay, M. A., Houston, J., Kerst, G., Geiger, T., and Handgretinger, R. (2002) A large-scale method for T cell depletion: towards graft engineering of mobilized peripheral blood stem cells. *Bone Marrow Transplant*, **30**, 69–74.
- [37] Ball, L. M., Egeler, R. M., and Party, E. B. M. T. P. W. (2008) Acute GvHD: pathogenesis and classification. *Bone Marrow Transplant*, **41 Suppl 2**, S58–S64.
- [38] Paczesny, S., Hanauer, D., Sun, Y., and Reddy, P. (2010) New perspectives on the biology of acute GVHD. *Bone Marrow Transplant*, **45**, 1–11.
- [39] Ferrara, J. L. M., Levine, J. E., Reddy, P., and Holler, E. (2009) Graft-versus-host disease. *Lancet*, **373**, 1550–1561.
- [40] Bolaños-Meade, J. and Vogelsang, G. B. (2004) Acute graft-versus-host disease. *Clin Adv Hematol Oncol*, **2**, 672–682.

8. Literaturverzeichnis

- [41] Jenq, R. R. and van den Brink, M. R. M. (2010) Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: individualized stem cell and immune therapy of cancer. *Nat Rev Cancer*, **10**, 213–221.
- [42] Shlomchik, W. D. (2007) Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol*, **7**, 340–352.
- [43] Nash, R. A. and Storb, R. (1996) Graft-versus-host effect after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: GVHD and GVL. *Curr Opin Immunol*, **8**, 674–680.
- [44] Nordlander, A., Mattsson, J., Ringdén, O., Leblanc, K., Gustafsson, B., Ljungman, P., Svenberg, P., Svénilson, J., and Remberger, M. (2004) Graft-versus-host disease is associated with a lower relapse incidence after hematopoietic stem cell transplantation in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*, **10**, 195–203.
- [45] Ruggeri, L., Capanni, M., Casucci, M., Volpi, I., Tosti, A., Perruccio, K., Urbani, E., Negrin, R. S., Martelli, M. F., and Velardi, A. (1999) Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, **94**, 333–339.
- [46] Ruggeri, L., Aversa, F., Martelli, M. F., and Velardi, A. (2006) Allogeneic hematopoietic transplantation and natural killer cell recognition of missing self. *Immunol Rev*, **214**, 202–218.
- [47] Bethge, W. A., Haegle, M., Faul, C., Lang, P., Schumm, M., Bornhauser, M., Handgretinger, R., and Kanz, L. (2006) Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults with reduced-intensity conditioning and CD3/CD19 depletion: fast engraftment and low toxicity. *Exp Hematol*, **34**, 1746–1752.
- [48] Krüger, W., Rüssmann, B., Kröger, N., Salomon, C., Ekopf, N., Elsner, H. A., Kaulfers, P. M., Mack, D., Fuchs, N., Dürken, M., Kabisch, H., Erttmann, R., and Zander, A. R. (1999) Early infections in patients undergoing bone marrow or blood stem cell transplantation—a 7 year single centre investigation of 409 cases. *Bone Marrow Transplant*, **23**, 589–597.
- [49] Lehrnbecher, T., Frank, C., Engels, K., Kriener, S., Groll, A. H., and Schwabe, D. (2010) Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital. *J Infect*, **61**, 259–265.
- [50] Ganschow, R. (2003) *Immunsuppression in der pädiatrischen Transplantationsmedizin*. Uni-Med Verlag AG.
- [51] Rupperecht, H., Burchardi, C., Mistry-Burchardi, N., Fischereeder, M., and Weidner, S. (2005) *Immunsuppression*. Elsevier Urban & Fischer.
- [52] Allison, A. C. and Eugui, E. M. (2005) Mechanisms of action of mycophenolate mofetil in preventing acute and chronic allograft rejection. *Transplantation*, **80**, S181–S190.
- [53] Baudard, M., Vincent, A., Moreau, P., Kergueris, M. F., Harousseau, J. L., and Milpied, N. (2002) Mycophenolate mofetil for the treatment of acute and chronic GVHD is effective and well tolerated but induces a high risk of infectious complications: a series of 21 BM or PBSC transplant patients. *Bone Marrow Transplant*, **30**, 287–295.

- [54] Bhatia, M., Militano, O., Jin, Z., Figurski, M., Shaw, L., Moore, V., Morris, E., Tallamy, B., van de Ven, C., Ayello, J., Baxter-Lowe, L., Satwani, P., George, D., Bradley, M. B., Garvin, J., and Cairo, M. S. (2010) An age-dependent pharmacokinetic study of intravenous and oral mycophenolate mofetil in combination with tacrolimus for GVHD prophylaxis in pediatric allogeneic stem cell transplantation recipients. *Biol Blood Marrow Transplant*, **16**, 333–343.
- [55] Nowak, I. and Shaw, L. M. (1995) Mycophenolic acid binding to human serum albumin: characterization and relation to pharmacodynamics. *Clin Chem*, **41**, 1011–1017.
- [56] Allison, A. C. and Eugui, E. M. (2000) Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology*, **47**, 85–118.
- [57] Allison, A. C. and Eugui, E. M. (1993) Immunosuppressive and other effects of mycophenolic acid and an ester prodrug, mycophenolate mofetil. *Immunol Rev*, **136**, 5–28.
- [58] Eugui, E. M., Almquist, S. J., Muller, C. D., and Allison, A. C. (1991) Lymphocyte-selective cytostatic and immunosuppressive effects of mycophenolic acid in vitro: role of deoxyguanosine nucleotide depletion. *Scand J Immunol*, **33**, 161–173.
- [59] Allison, A. C., Kowalski, W. J., Muller, C. D., and Eugui, E. M. (1993) Mechanisms of action of mycophenolic acid. *Ann N Y Acad Sci*, **696**, 63–87.
- [60] Allison, A. C., Kowalski, W. J., Muller, C. J., Waters, R. V., and Eugui, E. M. (1993) Mycophenolic acid and brequinar, inhibitors of purine and pyrimidine synthesis, block the glycosylation of adhesion molecules. *Transplant Proc*, **25**, 67–70.
- [61] Cohn, R. G., Mirkovich, A., Dunlap, B., Burton, P., Chiu, S. H., Eugui, E., and Caulfield, J. P. (1999) Mycophenolic acid increases apoptosis, lysosomes and lipid droplets in human lymphoid and monocytic cell lines. *Transplantation*, **68**, 411–418.
- [62] Senda, M., DeLustro, B., Eugui, E., and Natsumeda, Y. (1995) Mycophenolic acid, an inhibitor of IMP dehydrogenase that is also an immunosuppressive agent, suppresses the cytokine-induced nitric oxide production in mouse and rat vascular endothelial cells. *Transplantation*, **60**, 1143–1148.
- [63] Altmeyer, P. and Bacharach-Buhles, M. (2002) *Springer Enzyklopädie. Dermatologie, Allergologie, Umweltmedizin*. Springer-Verlag.
- [64] Dranoff, G. (2004) Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, **4**, 11–22.
- [65] Ferlazzo, G. and Münz, C. (2004) Nk cell compartments and their activation by dendritic cells. *J Immunol*, **172**, 1333–1339.
- [66] Yokoyama, W. M., Kim, S., and French, A. R. (2004) The dynamic life of natural killer cells. *Annu Rev Immunol*, **22**, 405–429.
- [67] Freud, A. G. and Caligiuri, M. A. (2006) Human natural killer cell development. *Immunol Rev*, **214**, 56–72.
- [68] Santo, J. P. D. and Vosshenrich, C. A. J. (2006) Bone marrow versus thymic pathways of natural killer cell development. *Immunol Rev*, **214**, 35–46.

8. Literaturverzeichnis

- [69] Lanier, L. L. (2005) NK cell recognition. *Annu Rev Immunol*, **23**, 225–274.
- [70] Cooper, M. A., Fehniger, T. A., and Caligiuri, M. A. (2001) The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*, **22**, 633–640.
- [71] Farag, S. S., Fehniger, T. A., Ruggeri, L., Velardi, A., and Caligiuri, M. A. (2002) Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood*, **100**, 1935–1947.
- [72] Cerwenka, A. and Lanier, L. L. (2001) Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat Rev Immunol*, **1**, 41–49.
- [73] Pegram, H. J., Haynes, N. M., Smyth, M. J., Kershaw, M. H., and Darcy, P. K. (2010) Characterizing the anti-tumor function of adoptively transferred NK cells in vivo. *Cancer Immunol Immunother*, **59**, 1235–1246.
- [74] Bryceson, Y. T., March, M. E., Ljunggren, H.-G., and Long, E. O. (2006) Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood*, **107**, 159–166.
- [75] Sivori, S., Parolini, S., Marcenaro, E., Castriconi, R., Pende, D., Millo, R., and Moretta, A. (2000) Involvement of natural cytotoxicity receptors in human natural killer cell-mediated lysis of neuroblastoma and glioblastoma cell lines. *J Neuroimmunol*, **107**, 220–225.
- [76] Pende, D., Spaggiari, G. M., Marcenaro, S., Martini, S., Rivera, P., Capobianco, A., Falco, M., Lanino, E., Pierri, I., Zambello, R., Bacigalupo, A., Mingari, M. C., Moretta, A., and Moretta, L. (2005) Analysis of the receptor-ligand interactions in the natural killer-mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias: evidence for the involvement of the Poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112). *Blood*, **105**, 2066–2073.
- [77] Simhadri, V. R., Reiners, K. S., Hansen, H. P., Topolar, D., Simhadri, V. L., Nohroudi, K., Kufer, T. A., Engert, A., and von Strandmann, E. P. (2008) Dendritic cells release HLA-B-associated transcript-3 positive exosomes to regulate natural killer function. *PLoS One*, **3**, e3377.
- [78] Walzer, T., Dalod, M., Robbins, S. H., Zitvogel, L., and Vivier, E. (2005) Natural-killer cells and dendritic cells: l’union fait la force. *Blood*, **106**, 2252–2258.
- [79] Biassoni, R. (2009) Human natural killer receptors, co-receptors, and their ligands. *Curr Protoc Immunol*, **Chapter 14**, Unit 14.10.
- [80] Tomasello, E., Bléry, M., Vély, F., and Vivier, E. (2000) Signaling pathways engaged by NK cell receptors: double concerto for activating receptors, inhibitory receptors and NK cells. *Semin Immunol*, **12**, 139–147.
- [81] Smyth, M. J., Hayakawa, Y., Takeda, K., and Yagita, H. (2002) New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer*, **2**, 850–861.
- [82] Bryceson, Y. T., March, M. E., Ljunggren, H.-G., and Long, E. O. (2006) Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev*, **214**, 73–91.

- [83] Jiang, K., Zhong, B., Gilvary, D. L., Corliss, B. C., Hong-Geller, E., Wei, S., and Djeu, J. Y. (2000) Pivotal role of phosphoinositide-3 kinase in regulation of cytotoxicity in natural killer cells. *Nat Immunol*, **1**, 419–425.
- [84] Vivier, E., Nunès, J. A., and Vély, F. (2004) Natural killer cell signaling pathways. *Science*, **306**, 1517–1519.
- [85] Davis, D. M. and Dustin, M. L. (2004) What is the importance of the immunological synapse? *Trends Immunol*, **25**, 323–327.
- [86] Bottino, C., Castriconi, R., Moretta, L., and Moretta, A. (2005) Cellular ligands of activating NK receptors. *Trends Immunol*, **26**, 221–226.
- [87] Barber, D. F., Faure, M., and Long, E. O. (2004) LFA-1 contributes an early signal for NK cell cytotoxicity. *J Immunol*, **173**, 3653–3659.
- [88] Shibuya, K., Lanier, L. L., Phillips, J. H., Ochs, H. D., Shimizu, K., Nakayama, E., Nakachi, H., and Shibuya, A. (1999) Physical and functional association of LFA-1 with DNAM-1 adhesion molecule. *Immunity*, **11**, 615–623.
- [89] Shirakawa, J., Wang, Y., Tahara-Hanaoka, S., ichiro Honda, S., Shibuya, K., and Shibuya, A. (2006) LFA-1-dependent lipid raft recruitment of DNAM-1 (CD226) in CD4+ T cell. *Int Immunol*, **18**, 951–957.
- [90] Waldmann, T. A. (2006) The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat Rev Immunol*, **6**, 595–601.
- [91] Lin, J. X. and Leonard, W. J. (2000) The role of Stat5a and Stat5b in signaling by IL-2 family cytokines. *Oncogene*, **19**, 2566–2576.
- [92] Wang, K. S., Ritz, J., and Frank, D. A. (1999) IL-2 induces STAT4 activation in primary NK cells and NK cell lines, but not in T cells. *J Immunol*, **162**, 299–304.
- [93] Jiang, K., Zhong, B., Ritchey, C., Gilvary, D. L., Hong-Geller, E., Wei, S., and Djeu, J. Y. (2003) Regulation of Akt-dependent cell survival by Syk and Rac. *Blood*, **101**, 236–244.
- [94] Wei, S., Gamero, A. M., Liu, J. H., Daulton, A. A., Valkov, N. I., Trapani, J. A., Larner, A. C., Weber, M. J., and Djeu, J. Y. (1998) Control of lytic function by mitogen-activated protein kinase/extracellular regulatory kinase 2 (ERK2) in a human natural killer cell line: identification of perforin and granzyme B mobilization by functional ERK2. *J Exp Med*, **187**, 1753–1765.
- [95] Fung, M. M., Rohwer, F., and McGuire, K. L. (2003) IL-2 activation of a PI3K-dependent STAT3 serine phosphorylation pathway in primary human T cells. *Cell Signal*, **15**, 625–636.
- [96] Braunschweig, A., Poehlmann, T. G., Busch, S., Schleussner, E., and Markert, U. R. (2011) Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS3) balance controls cytotoxicity and IL-10 expression in decidual-like natural killer cell line NK-92. *Am J Reprod Immunol*, **66**, 329–335.
- [97] Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Cantoni, C., Mingari, M. C., Biassoni, R., and Moretta, L. (2001) Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol*, **19**, 197–223.

8. Literaturverzeichnis

- [98] Sutherland, C. L., Chalupny, N. J., Schooley, K., VandenBos, T., Kubin, M., and Cosman, D. (2002) UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells. *J Immunol*, **168**, 671–679.
- [99] van den Brink, M. R. M. and Burakoff, S. J. (2002) Cytolytic pathways in haematopoietic stem-cell transplantation. *Nat Rev Immunol*, **2**, 273–281.
- [100] Choy, J. C. (2010) Granzymes and perforin in solid organ transplant rejection. *Cell Death Differ*, **17**, 567–576.
- [101] Trapani, J. A. and Smyth, M. J. (2002) Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol*, **2**, 735–747.
- [102] Biron, C. A., Nguyen, K. B., Pien, G. C., Cousens, L. P., and Salazar-Mather, T. P. (1999) Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol*, **17**, 189–220.
- [103] Weiner, L. M., Surana, R., and Wang, S. (2010) Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, **10**, 317–327.
- [104] Kärre, K., Ljunggren, H. G., Piontek, G., and Kiessling, R. (1986) Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature*, **319**, 675–678.
- [105] Ljunggren, H. G. and Kärre, K. (1990) In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*, **11**, 237–244.
- [106] Ljunggren, H.-G. and Malmberg, K.-J. (2007) Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat Rev Immunol*, **7**, 329–339.
- [107] Raulet, D. H. and Vance, R. E. (2006) Self-tolerance of natural killer cells. *Nat Rev Immunol*, **6**, 520–531.
- [108] Raulet, D. H., Held, W., Correa, I., Dorfman, J. R., Wu, M. F., and Corral, L. (1997) Specificity, tolerance and developmental regulation of natural killer cells defined by expression of class I-specific Ly49 receptors. *Immunol Rev*, **155**, 41–52.
- [109] Valiante, N. M., Uhrberg, M., Shilling, H. G., Lienert-Weidenbach, K., Arnett, K. L., D'Andrea, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L., and Parham, P. (1997) Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity*, **7**, 739–751.
- [110] Liao, N. S., Bix, M., Zijlstra, M., Jaenisch, R., and Raulet, D. (1991) MHC class I deficiency: susceptibility to natural killer (NK) cells and impaired NK activity. *Science*, **253**, 199–202.
- [111] Höglund, P., Ohlén, C., Carbone, E., Franksson, L., Ljunggren, H. G., Latour, A., Koller, B., and Kärre, K. (1991) Recognition of beta 2-microglobulin-negative (beta 2m-) T-cell blasts by natural killer cells from normal but not from beta 2m- mice: nonresponsiveness controlled by beta 2m- bone marrow in chimeric mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 10332–10336.

- [112] Yokoyama, W. M. and Kim, S. (2006) Licensing of natural killer cells by self-major histocompatibility complex class i. *Immunol Rev*, **214**, 143–154.
- [113] Kim, S., Poursine-Laurent, J., Truscott, S. M., Lybarger, L., Song, Y.-J., Yang, L., French, A. R., Sunwoo, J. B., Lemieux, S., Hansen, T. H., and Yokoyama, W. M. (2005) Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class i molecules. *Nature*, **436**, 709–713.
- [114] Gasser, S. and Raulet, D. H. (2006) Activation and self-tolerance of natural killer cells. *Immunol Rev*, **214**, 130–142.
- [115] Huenecke, S., Zimmermann, S. Y., Kloess, S., Esser, R., Brinkmann, A., Tramsen, L., Koenig, M., Erben, S., Seidl, C., Tonn, T., Eggert, A., Schramm, A., Bader, P., Klingebiel, T., Lehrnbecher, T., Passweg, J. R., Soerensen, J., Schwabe, D., and Koehl, U. (2010) IL-2-driven regulation of NK cell receptors with regard to the distribution of CD16⁺ and CD16⁻ subpopulations and in vivo influence after haploidentical NK cell infusion. *J Immunother*, **33**, 200–210.
- [116] Romagnani, C., Juelke, K., Falco, M., Morandi, B., D’Agostino, A., Costa, R., Ratto, G., Forte, G., Carrega, P., Lui, G., Conte, R., Strowig, T., Moretta, A., Münz, C., Thiel, A., Moretta, L., and Ferlazzo, G. (2007) CD56^{bright}CD16⁻ killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56^{dim} NK cells upon activation. *J Immunol*, **178**, 4947–4955.
- [117] Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W. D., Tosti, A., Posati, S., Rogaia, D., Frassoni, F., Aversa, F., Martelli, M. F., and Velardi, A. (2002) Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*, **295**, 2097–2100.
- [118] Igarashi, T., Wynberg, J., Srinivasan, R., Becknell, B., McCoy, J. P., Takahashi, Y., Suffredini, D. A., Linehan, W. M., Caligiuri, M. A., and Childs, R. W. (2004) Enhanced cytotoxicity of allogeneic NK cells with killer immunoglobulin-like receptor ligand incompatibility against melanoma and renal cell carcinoma cells. *Blood*, **104**, 170–177.
- [119] Leung, W., Iyengar, R., Turner, V., Lang, P., Bader, P., Conn, P., Niethammer, D., and Handgretinger, R. (2004) Determinants of antileukemia effects of allogeneic NK cells. *J Immunol*, **172**, 644–650.
- [120] Mengarelli, A., Zarcone, D., Caruso, R., Tenca, C., Rana, I., Pinto, R. M., Grossi, C. E., and Rossi, G. D. (2001) Adhesion molecule expression, clinical features and therapy outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*, **40**, 625–630.
- [121] Davies, S. M., Ruggieri, L., DeFor, T., Wagner, J. E., Weisdorf, D. J., Miller, J. S., Velardi, A., and Blazar, B. R. (2002) Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatched unrelated donor hematopoietic transplants. Killer immunoglobulin-like receptor. *Blood*, **100**, 3825–3827.
- [122] Bornhäuser, M., Schwerdtfeger, R., Martin, H., Frank, K.-H., Theuser, C., and Ehninger, G. (2004) Role of KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation using unrelated donors. *Blood*, **103**, 2860–1; author reply 2862.

8. Literaturverzeichnis

- [123] Bishara, A., Santis, D. D., Witt, C. C., Brautbar, C., Christiansen, F. T., Or, R., Nagler, A., and Slavin, S. (2004) The beneficial role of inhibitory KIR genes of HLA class I NK epitopes in haploidentically mismatched stem cell allografts may be masked by residual donor-alloreactive T cells causing GVHD. *Tissue Antigens*, **63**, 204–211.
- [124] Miller, J. S., Cooley, S., Parham, P., Farag, S. S., Verneris, M. R., McQueen, K. L., Guethlein, L. A., Trachtenberg, E. A., Haagenson, M., Horowitz, M. M., Klein, J. P., and Weisdorf, D. J. (2007) Missing KIR ligands are associated with less relapse and increased graft-versus-host disease (GVHD) following unrelated donor allogeneic HCT. *Blood*, **109**, 5058–5061.
- [125] Velardi, A., Ruggeri, L., Mancusi, A., Burchielli, E., Perruccio, K., Aversa, F., Martelli, M. F., and Immunobiology Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) (2008) Clinical impact of natural killer cell reconstitution after allogeneic hematopoietic transplantation. *Semin Immunopathol*, **30**, 489–503.
- [126] Velardi, A., Ruggeri, L., Alessandro, Moretta, and Moretta, L. (2002) NK cells: a lesson from mismatched hematopoietic transplantation. *Trends Immunol*, **23**, 438–444.
- [127] Parham, P. and McQueen, K. L. (2003) Alloreactive killer cells: hindrance and help for haematopoietic transplants. *Nat Rev Immunol*, **3**, 108–122.
- [128] Shlomchik, W. D., Couzens, M. S., Tang, C. B., McNiff, J., Robert, M. E., Liu, J., Shlomchik, M. J., and Emerson, S. G. (1999) Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science*, **285**, 412–415.
- [129] Koehl, U., Sörensen, J., Esser, R., Zimmermann, S., Grüttner, H. P., Tonn, T., Seidl, C., Seifried, E., Klingebiel, T., and Schwabe, D. (2004) IL-2 activated NK cell immunotherapy of three children after haploidentical stem cell transplantation. *Blood Cells Mol Dis*, **33**, 261–266.
- [130] Passweg, J. R., Stern, M., Koehl, U., Uharek, L., and Tichelli, A. (2005) Use of natural killer cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, **35**, 637–643.
- [131] Rubnitz, J. E., Inaba, H., Ribeiro, R. C., Pounds, S., Rooney, B., Bell, T., Pui, C.-H., and Leung, W. (2010) NKAML: a pilot study to determine the safety and feasibility of haploidentical natural killer cell transplantation in childhood acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*, **28**, 955–959.
- [132] Miller, J. S., Soignier, Y., Panoskaltsis-Mortari, A., McNearney, S. A., Yun, G. H., Fautsch, S. K., McKenna, D., Le, C., Defor, T. E., Burns, L. J., Orchard, P. J., Blazar, B. R., Wagner, J. E., Slungaard, A., Weisdorf, D. J., Okazaki, I. J., and McGlave, P. B. (2005) Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood*, **105**, 3051–3057.
- [133] Huenecke, S. (2010) *Immuntherapie mit NK-Zellen nach Stammzelltransplantation: Einfluss von NK-Zellen auf den Graft versus Tumor Effekt und die Immunrestitution nach haploidenter Stammzelltransplantation*. Suedwestdeutscher Verlag fuer Hochschulschriften.
- [134] Koehl, U., Esser, R., Zimmermann, S., Tonn, T., Kotchetkov, R., Bartling, T., Sörensen, J., Grüttner, H.-P., Bader, P., Seifried, E., Martin, H., Lang, P., Passweg, J. R., Klingebiel, T.,

- and Schwabe, D. (2005) Ex vivo expansion of highly purified NK cells for immunotherapy after haploidentical stem cell transplantation in children. *Klin Padiatr*, **217**, 345–350.
- [135] Esser, R., Müller, T., Stefes, D., Kloess, S., Seidel, D., Gillies, S. D., Aperlo-Iffland, C., Huston, J. S., Uherek, C., Schönfeld, K., Tonn, T., Huebener, N., Lode, H. N., Koehl, U., and Wels, W. S. (2012) NK cells engineered to express a GD(2)-specific antigen receptor display built-in ADCC-like activity against tumour cells of neuroectodermal origin. *J Cell Mol Med*, **16**, 569–581.
- [136] STEMCELL Technologies (www.stemcell.com). EasySep Negative Selection Human NK Cell Enrichment Kit, Product Information Sheet.
- [137] Miller, J. S., Prosper, F., and McCullar, V. (1997) Natural killer (NK) cells are functionally abnormal and NK cell progenitors are diminished in granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cell collections. *Blood*, **90**, 3098–3105.
- [138] Brehm, C., Huenecke, S., Quaiser, A., Esser, R., Bremm, M., Kloess, S., Soerensen, J., Kreyenberg, H., Seidl, C., Becker, P. S. A., Mühl, H., Klingebiel, T., Bader, P., Passweg, J. R., Schwabe, D., and Koehl, U. (2011) IL-2 stimulated but not unstimulated NK cells induce selective disappearance of peripheral blood cells: Concomitant results to a phase I/II study. *PLoS One*, **6**, e27351.
- [139] American Type Culture Collection (ATCC) (www.atcc.org).
- [140] Carlsten, M., Björkström, N. K., Norell, H., Bryceson, Y., van Hall, T., Baumann, B. C., Hanson, M., Schedvins, K., Kiessling, R., Ljunggren, H.-G., and Malmberg, K.-J. (2007) DNAX accessory molecule-1 mediated recognition of freshly isolated ovarian carcinoma by resting natural killer cells. *Cancer Res*, **67**, 1317–1325.
- [141] Hanson, M. G. V., Ozenci, V., Carlsten, M. C. V., Glimelius, B. L., Frödin, J.-E. A., Masucci, G., Malmberg, K.-J., and Kiessling, R. V. R. (2007) A short-term dietary supplementation with high doses of vitamin E increases NK cell cytolytic activity in advanced colorectal cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*, **56**, 973–984.
- [142] U. Sack, A. Tarnok, G. Rothe (2006) *Zelluläre Diagnostik Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. Karger.
- [143] Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M., and Myrtek, D. (2009) *Der Experimentator Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag.
- [144] Beckman Coulter (19.-23.03.2001). 10. Mainzer Zytometrie-Tage Beckman Coulter, Johannes Gutenberg Universität Mainz.
- [145] BangsLaboratories, Inc. (www.bangslabs.com). Quantum Simply Cellular Kit.
- [146] Quah, B. J. C., Warren, H. S., and Parish, C. R. (2007) Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nat Protoc*, **2**, 2049–2056.
- [147] Wallace, P. K., Tario, J. D., Fisher, J. L., Wallace, S. S., Ernstoff, M. S., and Muirhead, K. A. (2008) Tracking antigen-driven responses by flow cytometry: monitoring proliferation by dye dilution. *Cytometry A*, **73**, 1019–1034.

8. Literaturverzeichnis

- [148] Zimmermann, S.-Y., Esser, R., Rohrbach, E., Klingebiel, T., and Koehl, U. (2005) A novel four-colour flow cytometric assay to determine natural killer cell or T-cell-mediated cellular cytotoxicity against leukaemic cells in peripheral or bone marrow specimens containing greater than 20% of normal cells. *J Immunol Methods*, **296**, 63–76.
- [149] BD Biosciences (www.bdbiosciences.com). BD Cytometric Bead Array (CBA) Brochure.
- [150] Kloess, S., Huenecke, S., Piechulek, D., Esser, R., Koch, J., Brehm, C., Soerensen, J., Gardlowski, T., Brinkmann, A., Bader, P., Passweg, J., Klingebiel, T., Schwabe, D., and Koehl, U. (2010) IL-2-activated haploidentical NK cells restore NKG2D-mediated NK-cell cytotoxicity in neuroblastoma patients by scavenging of plasma MICA. *Eur J Immunol*, **40**, 3255–3267.
- [151] du Prel, J.-B., Röhrig, B., Hommel, G., and Blettner, M. (2010) Choosing statistical tests: part 12 of a series on evaluation of scientific publications. *Dtsch Arztebl Int*, **107**, 343–348.
- [152] Jöhr, M. (2009) *Kinderanästhesie*. Elsevier Urban & Fischer.
- [153] Koehl, U., Bochennek, K., Zimmermann, S. Y., Lehrnbecher, T., Sörensen, J., Esser, R., Andreas, C., Kramm, C., Grüttner, H. P., Falkenberg, E., Orth, A., Bader, P., Schwabe, D., and Klingebiel, T. (2007) Immune recovery in children undergoing allogeneic stem cell transplantation: absolute CD8⁺ CD3⁺ count reconstitution is associated with survival. *Bone Marrow Transplant*, **39**, 269–278.
- [154] van Hest, R. M., Doorduyn, J. K., de Winter, B. C. M., Cornelissen, J. J., Vulto, A. G., Oellerich, M., Löwenberg, B., Mathot, R. A. A., Armstrong, V. W., and van Gelder, T. (2007) Pharmacokinetics of mycophenolate mofetil in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Ther Drug Monit*, **29**, 353–360.
- [155] Frey, M., Packianathan, N. B., Fehniger, T. A., Ross, M. E., Wang, W. C., Stewart, C. C., Caligiuri, M. A., and Evans, S. S. (1998) Differential expression and function of L-selectin on CD56^{bright} and CD56^{dim} natural killer cell subsets. *J Immunol*, **161**, 400–408.
- [156] Grégoire, C., Chasson, L., Luci, C., Tomasello, E., Geissmann, F., Vivier, E., and Walzer, T. (2007) The trafficking of natural killer cells. *Immunol Rev*, **220**, 169–182.
- [157] Martín-Fontecha, A., Thomsen, L. L., Brett, S., Gerard, C., Lipp, M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2004) Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN- γ for T(H)1 priming. *Nat Immunol*, **5**, 1260–1265.
- [158] Nishimura, R., Baker, J., Beilhack, A., Zeiser, R., Olson, J. A., Segal, E. I., Karimi, M., and Negrin, R. S. (2008) In vivo trafficking and survival of cytokine-induced killer cells resulting in minimal GVHD with retention of antitumor activity. *Blood*, **112**, 2563–2574.
- [159] Olson, J. A., Zeiser, R., Beilhack, A., Goldman, J. J., and Negrin, R. S. (2009) Tissue-specific homing and expansion of donor NK cells in allogeneic bone marrow transplantation. *J Immunol*, **183**, 3219–3228.
- [160] Meller, B., Frohn, C., Brand, J.-M., Lauer, I., Schelper, L. F., von Hof, K., Kirchner, H., Richter, E., and Baehre, M. (2004) Monitoring of a new approach of immunotherapy with allogenic ¹¹¹In-labelled NK cells in patients with renal cell carcinoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, **31**, 403–407.

- [161] Brand, J.-M., Meller, B., Hof, K. V., Luhm, J., Bähre, M., Kirchner, H., and Frohn, C. (2004) Kinetics and organ distribution of allogeneic natural killer lymphocytes transfused into patients suffering from renal cell carcinoma. *Stem Cells Dev*, **13**, 307–314.
- [162] Nowak, B., Weber, C., Schober, A., Zeiffer, U., Liehn, E. A., von Hundelshausen, P., Reinartz, P., Schaefer, W. M., and Buell, U. (2007) Indium-111 oxine labelling affects the cellular integrity of haematopoietic progenitor cells. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, **34**, 715–721.
- [163] Lotze, M. T., Matory, Y. L., Ettinghausen, S. E., Rayner, A. A., Sharrow, S. O., Seipp, C. A., Custer, M. C., and Rosenberg, S. A. (1985) In vivo administration of purified human interleukin 2. II. Half life, immunologic effects, and expansion of peripheral lymphoid cells in vivo with recombinant IL 2. *J Immunol*, **135**, 2865–2875.
- [164] Salvo, G., Samoggia, P., Masciulli, R., Boccoli, G., Allavena, P., Mariani, G., Bullo, A., Montesoro, E., Bulgarini, D., and Carlini, P. (1992) Interleukin-2 bolus therapy induces immediate and selective disappearance from peripheral blood of all lymphocyte subpopulations displaying natural killer activity: role of cell adhesion to endothelium. *Eur J Cancer*, **28A**, 818–825.
- [165] Aronson, F. R., Libby, P., Brandon, E. P., Janicka, M. W., and Mier, J. W. (1988) IL-2 rapidly induces natural killer cell adhesion to human endothelial cells. A potential mechanism for endothelial injury. *J Immunol*, **141**, 158–163.
- [166] Cassatella, M. A. (1995) The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today*, **16**, 21–26.
- [167] Cassatella, M. A., Gasperini, S., Calzetti, F., Bertagnin, A., Luster, A. D., and McDonald, P. P. (1997) Regulated production of the interferon- γ -inducible protein-10 (IP-10) chemokine by human neutrophils. *Eur J Immunol*, **27**, 111–115.
- [168] Gardner, L., Patterson, A. M., Ashton, B. A., Stone, M. A., and Middleton, J. (2004) The human Duffy antigen binds selected inflammatory but not homeostatic chemokines. *Biochem Biophys Res Commun*, **321**, 306–312.
- [169] Middleton, J., Patterson, A. M., Gardner, L., Schmutz, C., and Ashton, B. A. (2002) Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood*, **100**, 3853–3860.
- [170] Horne, K. and Woolley, I. J. (2009) Shedding light on DARC: the role of the Duffy antigen/receptor for chemokines in inflammation, infection and malignancy. *Inflamm Res*, **58**, 431–435.
- [171] Heinrich, P. C., Castell, J. V., and Andus, T. (1990) Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J*, **265**, 621–636.
- [172] Ohata, K., Espinoza, J. L., Lu, X., Kondo, Y., and Nakao, S. (2011) Mycophenolic acid inhibits natural killer cell proliferation and cytotoxic function: a possible disadvantage of including mycophenolate mofetil in the graft-versus-host disease prophylaxis regimen. *Biol Blood Marrow Transplant*, **17**, 205–213.

8. Literaturverzeichnis

- [173] Wang, H., Grzywacz, B., Sukovich, D., McCullar, V., Cao, Q., Lee, A. B., Blazar, B. R., Cornfield, D. N., Miller, J. S., and Verneris, M. R. (2007) The unexpected effect of cyclosporin A on CD56⁺CD16⁻ and CD56⁺CD16⁺ natural killer cell subpopulations. *Blood*, **110**, 1530–1539.
- [174] Eissens, D. N., Meer, A. V. D., Cranenbroek, B. V., Preijers, F. W. M. B., and Joosten, I. (2010) Rapamycin and MPA, but not CsA, impair human NK cell cytotoxicity due to differential effects on NK cell phenotype. *Am J Transplant*, **10**, 1981–1990.
- [175] Salih, H. R., Rammensee, H.-G., and Steinle, A. (2002) Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J Immunol*, **169**, 4098–4102.
- [176] Zwirner, N. W., Fuertes, M. B., Girart, M. V., Domaica, C. I., and Rossi, L. E. (2007) Cytokine-driven regulation of NK cell functions in tumor immunity: role of the MICA-NKG2D system. *Cytokine Growth Factor Rev*, **18**, 159–170.
- [177] Raffaghello, L., Prigione, I., Airoidi, I., Camoriano, M., Levreri, I., Gambini, C., Pende, D., Steinle, A., Ferrone, S., and Pistoia, V. (2004) Downregulation and/or release of NKG2D ligands as immune evasion strategy of human neuroblastoma. *Neoplasia*, **6**, 558–568.
- [178] Salih, H. R., Goehlsdorf, D., and Steinle, A. (2006) Release of MICB molecules by tumor cells: mechanism and soluble MICB in sera of cancer patients. *Hum Immunol*, **67**, 188–195.
- [179] von Strandmann, E. P., Simhadri, V. R., von Tresckow, B., Sasse, S., Reiners, K. S., Hansen, H. P., Rothe, A., Böll, B., Simhadri, V. L., Borchmann, P., McKinnon, P. J., Hallek, M., and Engert, A. (2007) Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the NKp30 receptor on natural killer cells. *Immunity*, **27**, 965–974.
- [180] Chiossone, L., Vitale, C., Cottalasso, F., Moretti, S., Azzarone, B., Moretta, L., and Mingari, M. C. (2007) Molecular analysis of the methylprednisolone-mediated inhibition of NK-cell function: evidence for different susceptibility of IL-2- versus IL-15-activated NK cells. *Blood*, **109**, 3767–3775.
- [181] Vitale, C., Chiossone, L., Cantoni, C., Morreale, G., Cottalasso, F., Moretti, S., Pistorio, A., Haupt, R., Lanino, E., Dini, G., Moretta, L., and Mingari, M. C. (2004) The corticosteroid-induced inhibitory effect on NK cell function reflects down-regulation and/or dysfunction of triggering receptors involved in natural cytotoxicity. *Eur J Immunol*, **34**, 3028–3038.
- [182] Blaheta, R. A., Leckel, K., Wittig, B., Zenker, D., Oppermann, E., Harder, S., Scholz, M., Weber, S., Encke, A., and Markus, B. H. (1999) Mycophenolate mofetil impairs transendothelial migration of allogeneic CD4 and CD8 T-cells. *Transplant Proc*, **31**, 1250–1252.
- [183] Barten, M. J., van Gelder, T., Gummert, J. F., Shorthouse, R., and Morris, R. E. (2002) Novel assays of multiple lymphocyte functions in whole blood measure: new mechanisms of action of mycophenolate mofetil in vivo. *Transpl Immunol*, **10**, 1–14.
- [184] Quéméneur, L., Flacher, M., Gerland, L.-M., Ffrench, M., Revillard, J.-P., and Bonnefoy-Berard, N. (2002) Mycophenolic acid inhibits IL-2-dependent T cell proliferation, but not IL-2-dependent survival and sensitization to apoptosis. *J Immunol*, **169**, 2747–2755.

- [185] Farag, S. S. and Caligiuri, M. A. (2006) Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev*, **20**, 123–137.
- [186] Thèze, J., Alzari, P. M., and Bertoglio, J. (1996) Interleukin 2 and its receptors: recent advances and new immunological functions. *Immunol Today*, **17**, 481–486.
- [187] Frank, D. A., Robertson, M. J., Bonni, A., Ritz, J., and Greenberg, M. E. (1995) Interleukin 2 signaling involves the phosphorylation of Stat proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 7779–7783.
- [188] Yu, C. R., Lin, J. X., Fink, D. W., Akira, S., Bloom, E. T., and Yamauchi, A. (1996) Differential utilization of Janus kinase-signal transducer activator of transcription signaling pathways in the stimulation of human natural killer cells by IL-2, IL-12, and IFN- α . *J Immunol*, **157**, 126–137.
- [189] Wang, K. S., Frank, D. A., and Ritz, J. (2000) Interleukin-2 enhances the response of natural killer cells to interleukin-12 through up-regulation of the interleukin-12 receptor and STAT4. *Blood*, **95**, 3183–3190.
- [190] Bessoles, S., Fouret, F., Dudal, S., Besra, G. S., Sanchez, F., and Lafont, V. (2008) IL-2 triggers specific signaling pathways in human NKT cells leading to the production of pro- and anti-inflammatory cytokines. *J Leukoc Biol*, **84**, 224–233.
- [191] Lafont, V., Loisel, S., Liautard, J., Dudal, S., Sablé-Teychené, M., Liautard, J.-P., and Favero, J. (2003) Specific signaling pathways triggered by IL-2 in human V gamma 9V delta 2 T cells: an amalgamation of NK and alpha beta T cell signaling. *J Immunol*, **171**, 5225–5232.
- [192] Kalina, U., Kauschat, D., Koyama, N., Nuernberger, H., Ballas, K., Koschmieder, S., Bug, G., Hofmann, W. K., Hoelzer, D., and Ottmann, O. G. (2000) IL-18 activates STAT3 in the natural killer cell line 92, augments cytotoxic activity, and mediates IFN-gamma production by the stress kinase p38 and by the extracellular regulated kinases p44erk-1 and p42erk-21. *J Immunol*, **165**, 1307–1313.
- [193] Yao, A. Y., Tang, H. Y., Wang, Y., Feng, M. F., and Zhou, R. L. (2004) Inhibition of the activating signals in NK92 cells by recombinant GST-sHLA-G1a chain. *Cell Res*, **14**, 155–160.
- [194] Wendt, K., Wilk, E., Buyny, S., Schmidt, R. E., and Jacobs, R. (2007) Interleukin-21 differentially affects human natural killer cell subsets. *Immunology*, **122**, 486–495.
- [195] Caligiuri, M. A. (2008) Human natural killer cells. *Blood*, **112**, 461–469.
- [196] Nagy, S. E., Andersson, J. P., and Andersson, U. G. (1993) Effect of mycophenolate mofetil (RS-61443) on cytokine production: inhibition of superantigen-induced cytokines. *Immunopharmacology*, **26**, 11–20.
- [197] Dulphy, N., Haas, P., Busson, M., Belhadj, S., de Latour, R. P., Robin, M., Carmagnat, M., Loiseau, P., Tamouza, R., Scieux, C., Rabian, C., Santo, J. P. D., Charron, D., Janin, A., Socié, G., and Toubert, A. (2008) An unusual CD56^{bright} CD16^{low} NK cell subset dominates the early posttransplant period following HLA-matched hematopoietic stem cell transplantation. *J Immunol*, **181**, 2227–2237.

8. Literaturverzeichnis

- [198] Cooley, S., McCullar, V., Wangen, R., Bergemann, T. L., Spellman, S., Weisdorf, D. J., and Miller, J. S. (2005) KIR reconstitution is altered by T cells in the graft and correlates with clinical outcomes after unrelated donor transplantation. *Blood*, **106**, 4370–4376.
- [199] Nguyen, S., Dhedin, N., Vernant, J.-P., Kuentz, M., Jijakli, A. A., Rouas-Freiss, N., Carosella, E. D., Boudifa, A., Debré, P., and Vieillard, V. (2005) NK-cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantations: immaturity of NK cells and inhibitory effect of NKG2A override GvL effect. *Blood*, **105**, 4135–4142.
- [200] Uharek, L., Hilbers, U., Hartung, G., Lange, T., Kliem, C., Hegenbart, U., Pönisch, W., Zeis, M., Huppert, V., Glass, B., Uhrberg, M., Schmitz, N., and Niederwieser, D. (2003) Cellular immunotherapy with alloreactive NK cells: Promising results of a phase I/II study investigating the use of ex-vivo activated donor CD3⁻CD56⁺ NK cells after transplantation of highly purified HLA-haplotype mismatched stem cell grafts in patients. *Onkologie 2003, Abstracts, 26 (Sonderheft 5):1–235, V374*.
- [201] Passweg, J. R., Tichelli, A., Meyer-Monard, S., Heim, D., Stern, M., Kühne, T., Favre, G., and Gratwohl, A. (2004) Purified donor NK-lymphocyte infusion to consolidate engraftment after haploidentical stem cell transplantation. *Leukemia*, **18**, 1835–1838.
- [202] Koehl, U., Sörensen, J., Esser, R., Becker, M., Huenecke, S., Munkelt, D., Tonn, T., Seifried, E., Klingebiel, T., Bader, P., Passweg, J., and Schwabe, D. (2006) Immunotherapy with highly purified CD56⁺ CD3⁻ natural killer cells for paediatric patients after haploidentical stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation 2006; 37 (S1):s35, Abstracts EBMT*.
- [203] Bachanova, V., Burns, L. J., McKenna, D. H., Curtsinger, J., Panoskaltis-Mortari, A., Lindgren, B. R., Cooley, S., Weisdorf, D., and Miller, J. S. (2010) Allogeneic natural killer cells for refractory lymphoma. *Cancer Immunol Immunother*, **59**, 1739–1744.
- [204] Geller, M. A., Cooley, S., Judson, P. L., Ghebre, R., Carson, L. F., Argenta, P. A., Jonson, A. L., Panoskaltis-Mortari, A., Curtsinger, J., McKenna, D., Dusenbery, K., Bliss, R., Downs, L. S., and Miller, J. S. (2011) A phase II study of allogeneic natural killer cell therapy to treat patients with recurrent ovarian and breast cancer. *Cytotherapy*, **13**, 98–107.
- [205] Curti, A., Ruggeri, L., D’Addio, A., Bontadini, A., Dan, E., Motta, M. R., TrabANELLI, S., Giudice, V., Urbani, E., Martinelli, G., Paolini, S., Fruet, F., Isidori, A., Parisi, S., Bandini, G., Baccarani, M., Velardi, A., and Lemoli, R. M. (2011) Successful transfer of alloreactive haploidentical KIR ligand-mismatched natural killer cells after infusion in elderly high risk acute myeloid leukemia patients. *Blood*, **118**, 3273–3279.
- [206] Passweg, J. R., Koehl, U., Uharek, L., Meyer-Monard, S., and Tichelli, A. (2006) Natural-killer-cell-based treatment in haematopoietic stem-cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol*, **19**, 811–824.
- [207] Hollatz, G., Grez, M., Mastaglio, S., Quaritsch, R., Huenecke, S., Ciceri, F., Bonini, C., Esser, R., Klingebiel, T., Kreuter, J., and Koehl, U. (2008) T cells for suicide gene therapy: activation, functionality and clinical relevance. *J Immunol Methods*, **331**, 69–81.
- [208] Sauce, D., Tonnelier, N., Duperrier, A., Petracca, B., de Carvalho Bittencourt, M., Saadi, M., Saas, P., Ferrand, C., Herve, P., Tiberghien, P., and Robinet, E. (2002) Influence of ex

- vivo expansion and retrovirus-mediated gene transfer on primary T lymphocyte phenotype and functions. *J Hematother Stem Cell Res*, **11**, 929–940.
- [209] Weigel, G., Griesmacher, A., Karimi, A., Zuckermann, A. O., Grimm, M., and Mueller, M. M. (2002) Effect of mycophenolate mofetil therapy on lymphocyte activation in heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant*, **21**, 1074–1079.
- [210] Bornhäuser, M., Schuler, U., Pörksen, G., Naumann, R., Geissler, G., Thiede, C., Schwerdtfeger, R., Ehninger, G., and Thiede, H. M. (1999) Mycophenolate mofetil and cyclosporine as graft-versus-host disease prophylaxis after allogeneic blood stem cell transplantation. *Transplantation*, **67**, 499–504.
- [211] Haentzschel, I., Freiberg-Richter, J., Platzbecker, U., Kiani, A., Schetelig, J., Illmer, T., Ehninger, G., Schleyer, E., and Bornhäuser, M. (2008) Targeting mycophenolate mofetil for graft-versus-host disease prophylaxis after allogeneic blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, **42**, 113–120.
- [212] Nash, R. A., Johnston, L., Parker, P., McCune, J. S., Storer, B., Slattery, J. T., Furlong, T., Anasetti, C., Appelbaum, F. R., Lloid, M. E., Deeg, H. J., Kiem, H.-P., Martin, P. J., Schubert, M. M., Witherspoon, R. P., Forman, S. J., Blume, K. G., and Storb, R. (2005) A phase I/II study of mycophenolate mofetil in combination with cyclosporine for prophylaxis of acute graft-versus-host disease after myeloablative conditioning and allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, **11**, 495–505.
- [213] Chaleff, S., Otto, M., Barfield, R. C., Leimig, T., Iyengar, R., Martin, J., Holiday, M., Houston, J., Geiger, T., Huppert, V., and Handgretinger, R. (2007) A large-scale method for the selective depletion of alphabeta T lymphocytes from PBSC for allogeneic transplantation. *Cytotherapy*, **9**, 746–754.
- [214] von Strandmann, E. P., Hansen, H. P., Reiners, K. S., Schnell, R., Borchmann, P., Merkert, S., Simhadri, V. R., Draube, A., Reiser, M., Purr, I., Hallek, M., and Engert, A. (2006) A novel bispecific protein (ULBP2-BB4) targeting the NKG2D receptor on natural killer (NK) cells and CD138 activates NK cells and has potent antitumor activity against human multiple myeloma in vitro and in vivo. *Blood*, **107**, 1955–1962.
- [215] Zhang, C., Wang, Y., Zhou, Z., Zhang, J., and Tian, Z. (2009) Sodium butyrate upregulates expression of NKG2D ligand MICA/B in HeLa and HepG2 cell lines and increases their susceptibility to NK lysis. *Cancer Immunol Immunother*, **58**, 1275–1285.
- [216] Skov, S., Pedersen, M. T., Andresen, L., Straten, P. T., Woetmann, A., and Odum, N. (2005) Cancer cells become susceptible to natural killer cell killing after exposure to histone deacetylase inhibitors due to glycogen synthase kinase-3-dependent expression of MHC class I-related chain A and B. *Cancer Res*, **65**, 11136–11145.
- [217] Huang, B., Sikorski, R., Sampath, P., and Thorne, S. H. (2011) Modulation of NKG2D-ligand cell surface expression enhances immune cell therapy of cancer. *J Immunother*, **34**, 289–296.

9. Abbildungsverzeichnis

1.1. Häufigkeitsverteilung maligner Erkrankungen bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland	1
1.2. Hämatopoese	3
1.3. Pathophysiologie der akuten <i>Graft-versus-Host-Disease</i> (GvHD)	9
1.4. Immunologische Spender-Empfänger-Reaktion in Bezug auf HLA <i>Matching</i>	11
1.5. Die richtige Balance der Immunsuppression	13
1.6. Chemische Struktur von Mycophenolat-Mofetil und Mycophenolsäure	15
1.7. Purinbiosynthesewege	16
1.8. Angeborene und erlernte Immunität	18
1.9. NK-Zell-Subpopulationen	20
1.10. Aktivierende und inhibierende NK-Zell-Rezeptoren	22
1.11. Schematische Darstellung der drei zentralen Signalkaskaden der NK-Zell-Aktivierung	23
1.12. Zytolytische Signalwege der NK-Zelle und ADCC	26
1.13. Die Balance inhibierender und aktivierender Signale	27
1.14. Mögliche Effekte von alloreaktiven NK-Zellen nach allogener SZT	30
1.15. Studienprotokoll der klinischen Phase I/II NK-Zell-Studie	31
3.1. Schematische Darstellung des EasySep [®] Funktionsprinzips	42
3.2. Schematisches Beispiel für den Aufbau und die Messmethodik eines Durchflusszytometers	46
3.3. Emissionsspektren verschiedener Fluorochrome	47
3.4. Darstellung durchflusszytometrischer Daten	48
3.5. Verlauf der Blutabnahmen des Begleitmonitorings zur NK-Zell-Studie	49
3.6. Charakterisierung der NK-Zell-Subpopulationen	50
3.7. Messprinzip der quantitativen Bestimmung der Rezeptordichte auf NK-Zellen	52
3.8. Funktionsprinzip der CFSE-Färbung	54
3.9. Proliferationsanalyse CFSE-markierter Zellen	56
3.10. Durchflusszytometrische Bestimmung der NK-Zell-Zytotoxizität	58
3.11. Funktionsprinzip des BD Cytometric Bead Array (CBA)	59
4.1. Zytotoxizität unstimulierter und IL-2 stimulierter NK-Zellen	63
4.2. Immunrekonstitution der NK- und T-Zellen nach haploidenter SZT	65
4.3. Monitoring der NK-Zellen nach frischer NK-DLI	66
4.4. Monitoring der NK-Zellen nach frischer und kryokonservierter NK-DLI _{IL-2 stim}	67

4.5. NK-Zell-Reduktion im Vergleich zu Volumen und Dosis der NK-DLI	68
4.6. Unterschiedliche NK-Zell-Phänotypen im peripherem Blut und der NK-DLI	70
4.7. Monitoring der Monozyten nach NK-DLI	71
4.8. Monitoring der dendritischen Zellen nach NK-DLI	72
4.9. Monitoring der Granulozyten nach NK-DLI	72
4.10. Monitoring der <i>ex vivo</i> und <i>in vivo</i> Zytokin- und Chemokin-Konzentration vor und nach NK-DLI	74
4.11. Dosisabhängige NK-Zell-Proliferation unter MPA-Behandlung	77
4.12. Proliferations-Hemmung und Reversibilität nach MPA-Behandlung	78
4.13. Vergleichbare Proliferations-Hemmung durch MPA und Reversibilität von NK- und T-Zellen	79
4.14. Einfluss des Immunsuppressivums MPA auf die NK-Zell-Zytotoxizität	80
4.15. Einfluss von Patientenplasma auf die NK-Zell-Zytotoxizität	81
4.16. Einfluss einer Steroidapplikation auf die NK-Zell-Zytotoxizität	82
4.17. Morphologie und Mobilität von NK-Zellen \pm MPA in Kokultur mit Neuro- blastom Tumorsphäroiden	83
4.18. Rezeptordichte der Natürlichen Zytotoxizitäts-Rezeptoren und NKG2D	84
4.19. Expression verschiedener Oberflächenrezeptoren unter IL-2 Stimulation \pm MPA	87
4.20. <i>Ex vivo</i> Zytokin/Chemokin-Sekretion IL-2 stimulierter NK-Zellen \pm MPA	89
4.21. Hemmung der Aktivierung intrazellulärer Signalmoleküle	91
5.1. Model der Zytokin/Chemokin-induzierten Leukozyten-Migration nach NK- DLI _{IL-2 stim}	97
5.2. Immunsuppressive Therapie während der Phase I/II NK-Zell-Studie	98
5.3. Hypothese der durch MPA gehemmten Aktivierung von Signalkaskaden	109

10. Tabellenverzeichnis

1.1. Spenderhierarchie nach HLA-Merkmalen	5
1.2. Einteilung der akuten GvHD nach Schweregrad	8
3.1. Patientendaten NK-Zell-Studien-Begleitmonitoring	35
3.2. Patientendaten Einfluss MMF auf NK-Zellen	35
3.3. Geräte und Software	36
3.4. Chemikalien, Medien, Puffer und Kits	37
3.5. Verbrauchsmaterialien	38
3.6. Zellkulturen	38
3.7. Antikörper Durchflusszytometrie	39
3.8. Antikörper Cytometric Bead Array (CBA)	40
3.9. Fluoreszenzfarbstoffe	47
3.10. Pipettierschema Rezeptordichte-Bestimmung	53
4.1. Stammzell-Applikationen	62
4.2. NK-Zell-Applikationen	64
4.3. Effekte von NK-DLI _{IL-2 stim} , NK-DLI _{unstim} und NK-DLI _{IL-2 stim + wash} auf die Zusammensetzung des peripheren Blutes der Patienten	75
4.4. MPA-Konzentration im Patientenplasma	81
5.1. Protokolle verschiedener NK-Zell-Studien	112
A.1. CD-Nomenklatur	150
B.1. Zytokine und Chemokine	152

11. Abkürzungsverzeichnis

<i>7 – AAD</i>	<u>7</u> - <u>A</u> mino- <u>A</u> ctinomycin <u>D</u>
$\times g$	x-fache-Erdbeschleunigung
<i>ABC</i>	<u>A</u> ntibody <u>B</u> inding <u>C</u> apacity (Antikörper-Bindungs-Kapazität)
<i>abs.</i>	absolut
<i>ACD</i>	<u>A</u> cidum <u>C</u> itricum Purum Natrium Citricum <u>D</u> extrose
<i>ADCC</i>	<u>A</u> ntibody- <u>D</u> ependent <u>C</u> ell <u>C</u> ytotoxicity (Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität)
<i>AK</i>	<u>A</u> ntikörper
<i>akt.</i>	aktiviert
<i>ALG</i>	<u>A</u> nti- <u>L</u> ymphozytenglobulin
<i>ALL</i>	<u>A</u> kute <u>L</u> ymphatische <u>L</u> eukämie
<i>AML</i>	<u>A</u> kute <u>M</u> yeloische <u>L</u> eukämie
<i>APZ</i>	<u>A</u> ntigen- <u>p</u> äsentierende <u>Z</u> ellen
<i>AR</i>	<u>A</u> utologe <u>R</u> ekonstitution
<i>ATCC</i>	<u>A</u> merican <u>T</u> ype <u>C</u> ulture <u>C</u> ollection
<i>ATG</i>	<u>A</u> nti- <u>T</u> hymozytenglobulin
<i>AUC</i>	<u>A</u> rea <u>U</u> nder the <u>C</u> urve
<i>Ca</i>	<u>C</u> alcium
<i>CC</i>	<u>C</u> omplete <u>C</u> himerism (Kompletter Donor Chimärismus)
<i>CD</i>	<u>C</u> luster of <u>D</u> ifferentiation
<i>CFSE</i>	<u>C</u> arboxyfluoreszein- <u>S</u> uccinimidyl- <u>E</u> ster
<i>CMV</i>	<u>C</u> ytomegalievirus
<i>CR</i>	<u>C</u> omplete <u>R</u> emission (Komplette Remission)
<i>CsA</i>	<u>C</u> iclosporin <u>A</u>

11. Abkürzungsverzeichnis

<i>d</i>	Tage
<i>DC</i>	<u>D</u> endritic <u>C</u> ell (Dendritische Zelle)
<i>DLI</i>	<u>D</u> onor <u>L</u> ymphocyte <u>I</u> nfusion (Spender-Lymphozyten-Infusion)
<i>DMSO</i>	<u>D</u> imethylsulfoxid
<i>DNAM – 1</i>	<u>D</u> NAX <u>A</u> ccessory <u>M</u> olecule- <u>1</u>
<i>EBV</i>	<u>E</u> pstein- <u>B</u> arr- <u>V</u> irus
<i>EDTA</i>	<u>E</u> thylen- <u>D</u> iamin- <u>T</u> etra- <u>A</u> acetat
<i>ERK1/2</i>	<u>E</u> xtracellular signal- <u>R</u> egulated <u>K</u> inase <u>1/2</u>
<i>FACS</i>	<u>F</u> luorescence <u>A</u> ctivated <u>C</u> ell <u>S</u> orter
<i>FasL</i>	<u>F</u> as <u>L</u> igand
<i>FCS</i>	<u>F</u> etal <u>C</u> alf <u>S</u> erum (Fetales Kälberserum)
<i>FITC</i>	<u>F</u> luorescein- <u>I</u> sothiocyant
<i>FL</i>	<u>F</u> luoreszenz
<i>FSC</i>	<u>F</u> orwardscatter (Vorwärts-Streulicht)
<i>G – CSF</i>	<u>G</u> ranulocyte- <u>C</u> olony <u>S</u> timulating <u>F</u> actor
<i>GDP</i>	<u>G</u> uanosin <u>D</u> iphosphat
<i>GM – CSF</i>	<u>G</u> ranulocyte/ <u>M</u> acrophage- <u>C</u> olony <u>S</u> timulating <u>F</u> actor
<i>GMP</i>	<u>G</u> uanosin <u>M</u> onophosphat
<i>GMP</i>	<u>G</u> ood <u>M</u> anufacturing <u>P</u> ractice (Gute Herstellungspraxis)
<i>GTP</i>	<u>G</u> uanosin <u>T</u> riphosphat
<i>GvHD</i>	<u>G</u> raft- <u>v</u> erus- <u>H</u> ost- <u>D</u> isease (Transplantat-gegen-Empfänger Erkrankung)
<i>GvL/T</i>	<u>G</u> raft- <u>v</u> erus- <u>L</u> eukemia/ <u>T</u> umor (Transplantat gegen Leukämie/Tumor Effekt)
<i>g (m–, μ–, n–)</i> ...	Gramm (milli-, mikro-, nano-)
<i>h</i>	Stunden
<i>HLA</i>	<u>H</u> uman <u>L</u> eukocyte <u>A</u> ntigen (Humanes Leukozyten Antigen)
<i>HP</i>	<u>H</u> umanes <u>P</u> lasma

<i>HSA</i>	<u>H</u> umanes <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin
<i>HSV</i>	<u>H</u> erpes- <u>S</u> implex- <u>V</u> irus
<i>HvG</i>	<u>H</u> ost- <u>v</u> ersus- <u>G</u> raft (Empfänger-gegen-Spender Reaktion)
<i>ICAM – 1</i>	<u>I</u> nter <u>c</u> ellular <u>A</u> dhesion <u>M</u> olecule- <u>1</u> (Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1)
<i>IFN</i>	<u>I</u> nter <u>f</u> er <u>o</u> n
<i>IL</i>	<u>I</u> nter <u>l</u> eukin
<i>IMPDH</i>	<u>I</u> nosin- <u>M</u> onophoshat- <u>D</u> ehydrogenase
<i>ITAM</i>	<u>I</u> mmunoreceptor <u>T</u> yrosine-based <u>A</u> ctivating <u>M</u> otif
<i>ITIM</i>	<u>I</u> mmunoreceptor <u>T</u> yrosine-based <u>I</u> nhibition <u>M</u> otif
<i>KG</i>	<u>K</u> örpergewicht
<i>KIR</i>	<u>K</u> iller-cell <u>I</u> mmunoglobulin-like <u>R</u> eceptor
<i>KM</i>	<u>K</u> nochen <u>m</u> ark
<i>KOF</i>	<u>K</u> örper <u>O</u> ber <u>f</u> läche
<i>LFA – 1</i>	<u>L</u> ymphocyte <u>F</u> unction- <u>a</u> ssoiated <u>A</u> ntigen- <u>1</u> (Lymphozyten-Funktions-Antigen 1)
<i>l (m–, μ–, n–)</i> ...	Liter (milli-, mikro-, nano-)
<i>MAC – 1</i>	<u>M</u> acrophage Adhesion Ligand- <u>1</u> (Makrophagen-Rezeptor-1)
<i>MAPK</i>	<u>M</u> itogen- <u>A</u> ctivated <u>P</u> rotein <u>K</u> inase
<i>MC</i>	<u>M</u> ixed <u>C</u> himerism (Gemischter Donor Chimärismus)
<i>MCP – 1</i>	<u>M</u> onocyte <u>C</u> hemoattractant <u>P</u> rotein- <u>1</u>
<i>mDC</i>	<u>m</u> yeloid <u>D</u> endritic <u>C</u> ell (myeloide dendritische Zelle)
<i>MFD</i>	<u>M</u> atched <u>F</u> amily <u>D</u> onor (HLA-identer Familienspender)
<i>MFI</i>	<u>M</u> ean <u>F</u> luorescence <u>I</u> ntensity (Mittlere Fluoreszenzintensität)
<i>Mg</i>	<u>M</u> agnesium
<i>MH</i>	<u>M</u> orbus <u>H</u> odgkin
<i>MHC</i>	<u>M</u> ajor <u>H</u> istocompatibility <u>C</u> omplex (Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex)
<i>MICA/B</i>	<u>M</u> HC class <u>I</u> <u>C</u> hain-related antigen <u>A/B</u>

11. Abkürzungsverzeichnis

<i>min</i>	Minuten
<i>MIP – 1</i>	<u>M</u> acrophage <u>I</u> nflammatory <u>P</u> rotein-1
<i>MMF</i>	<u>M</u> ycophenolat- <u>M</u> ofetil
<i>MMFD</i>	<u>M</u> ismatched <u>F</u> amily <u>D</u> onor (nicht-identer Familienspender)
<i>MMUD</i>	<u>M</u> ismatched <u>U</u> nrelated <u>D</u> onor (nicht-identer Fremdspender)
<i>MNZ</i>	<u>M</u> ononukleäre <u>Z</u> ellen
<i>MPA</i>	<u>M</u> ycophenolic <u>A</u> cid (Mycophenolsäure)
<i>MPAG</i>	<u>M</u> ycophenolat- <u>G</u> lucuronid
<i>MRD</i>	<u>M</u> inimal <u>R</u> esidual <u>D</u> isease (Minimale Resterkrankung)
<i>MSD</i>	<u>M</u> atched <u>S</u> ibling <u>D</u> onor (HLA-identer Geschwisterspender)
<i>MUD</i>	<u>M</u> atched <u>U</u> nrelated <u>D</u> onor (HLA-identer Fremdspender)
<i>M</i> (<i>m–, μ–, n–</i>) .	Molar (milli-, mikro-, nano-)
<i>n</i>	Anzahl
<i>n.s.</i>	nicht spezifiziert
<i>NB</i>	<u>N</u> euroblastom
<i>NCR</i>	<u>N</u> atural <u>C</u> ytotoxicity <u>R</u> eceptor (Natürliche Zytotoxizitäts-Rezeptoren)
<i>NHL</i>	<u>N</u> on- <u>H</u> odgkin- <u>L</u> ymphom
<i>NK – DLI</i>	<u>NK</u> cell <u>D</u> onor <u>L</u> ymphocyte <u>I</u> nfusion (Spender-NK-Zell-Infusion)
<i>NK – DLI_{IL-2 stim}</i>	IL-2 stimulierte Spender-NK-Zell-Infusion
<i>NK – DLI_{unstim}</i> .	unstimulierte Spender-NK-Zell-Infusion
<i>NK – Zellen</i>	<u>N</u> atürliche <u>K</u> illerzellen
<i>PB</i>	<u>P</u> eripheres <u>B</u> lut
<i>PBMNZ</i>	<u>P</u> eriphere <u>B</u> lut <u>M</u> ononukleäre <u>Z</u> ellen
<i>PBS</i>	<u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
<i>PBSC</i>	<u>P</u> eripheral <u>B</u> lood <u>S</u> tem <u>C</u> ells (Periphere Blutstammzellen)
<i>PC5</i>	<u>P</u> E- <u>C</u> yanin 5

<i>PC7</i>	<u>PE</u> - <u>C</u> yanin <u>7</u>
<i>pDC</i>	<u>p</u> lasmazytoid <u>D</u> endritic <u>C</u> ell (plasmazytoide dendritische Zelle)
<i>PE</i>	<u>P</u> hycoerythrin
<i>PI</i>	<u>P</u> ropidiumjodid
<i>PI3K</i>	<u>P</u> hosphoinositol- <u>3</u> - <u>K</u> inase
<i>RANTES</i>	<u>R</u> egulated on <u>A</u> ctivation, <u>N</u> ormal <u>T</u> cell <u>E</u> xpressed and <u>S</u> ecreted
<i>RMS</i>	<u>R</u> habdomyosarkom
<i>RT</i>	<u>R</u> aum <u>T</u> emperatur
<i>sec</i>	Sekunden
<i>SEM</i>	<u>S</u> tandard <u>E</u> rror of the <u>M</u> ean (Standard Fehler des Mittelwerts)
<i>sMICA</i>	<u>s</u> oluble <u>M</u> HC class <u>I</u> <u>C</u> hain-related antigen <u>A</u> (lösliches MICA)
<i>spp.</i>	lat. <i>species pluralis</i> = mehrere Arten einer Gattung
<i>SSC</i>	<u>S</u> idescatter (Seitwärts-Streulicht)
<i>STAT</i>	<u>S</u> ignal <u>T</u> ransducers and <u>A</u> ctivators of <u>T</u> ranscription
<i>stim.</i>	stimuliert
<i>SZT</i>	<u>S</u> tammzell <u>t</u> ransplantation
<i>TNF</i>	<u>T</u> umornekrosefaktor
<i>TRAIL</i>	<u>T</u> NF- <u>R</u> elated <u>A</u> poptosis- <u>I</u> nducing <u>L</u> igand
<i>TRM</i>	<u>T</u> ransplant- <u>r</u> elated <u>m</u> ortality (Transplantationsbedingte Mortalität)
<i>U</i>	<u>U</u> nits (Einheiten)
<i>ULBP</i>	<u>U</u> nique- <u>L</u> ong-16 <u>B</u> inding <u>P</u> rotein
<i>VZV</i>	<u>V</u> arizella- <u>Z</u> oster- <u>V</u> irus
<i>wk</i>	Wochen

Anhang

A. CD-Nomenklatur

Tabelle A.1: CD-Nomenklatur. Zelluläre Expression und Funktion besprochener und/oder analysierter Oberflächenantigene, klassifiziert nach der CD-Nomenklatur [10, 14].

CD-Antigen	alternativer Name	zelluläre Expression	Funktion
CD3	T3	T, Thym	assoziiert mit TCR; Signaltransduktion
CD4	T4	Helfer T, Thym, Mo, Ma	Korezeptor HLA-Klasse-II Moleküle; HIV-Rezeptor; Signaltransduktion
CD8	T8	Zytotoxische T, Thym, Treg, NK	Korezeptor HLA-Klasse-I Moleküle
CD11a	LFA-1, α_L -Integrin	Leuk	Adhäsion; bindet CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2), CD50 (ICAM-3); assoziiert mit CD18
CD11b	MAC-1, α_M -Integrin	NK, Mo, Gra	Adhäsion; bindet CD54 (ICAM-1) und extrazelluläre Matrixproteine; assoziiert mit CD18
CD14	LPS-Rezeptor	Mo, Gra, DC, B	LPS- und LPB-Rezeptor
CD16	Fc γ RIII	NK, Neu, Ma	tief-affiner Fc-Rezeptor; vermittelt Phagozytose und ADCC
CD18	Integrin- β_2	Leuk	Adhäsion; assoziiert mit CD11a/b/c/d
CD19	–	B	Korezeptor B; im Komplex mit CD21 und CD81
CD20	–	B	Aktivierung, Differenzierung, Kostimulation von B
CD25	IL-2R α	akt. T + NK, Treg, B, Mo, reife DC	α -Kette IL-2 Rezeptor
CD33	–	myeloide Vorläufer, Mo, DC	Adhäsion
CD34	Mucin	hämatopoetische Vorläufer, Eos, kapilläres Endo	Adhäsion; Ligand für CD62L (L-Selektin)
CD45	LCA	alle hämatopoetischen Zellen	Tyrosin-Phosphatase
CD54	ICAM-1	hämatopoetische und nicht-hämatopoetische Zellen	interzelluläre Adhäsion; bindet CD11a/CD18-Integrin (LFA-1) und CD11b/CD18-Integrin (MAC-1); Rhinovirus Rezeptor
CD56	NCAM	NK	Adhäsion
CD62L	L-Selektin, LAM-1	NK, B, T, Mo	Adhäsion Leuk; bindet CD34; vermittelt rollende Interaktionen (<i>Leukocyte rolling</i>), <i>Homing</i> Rezeptor

CD69	AIM	früh akt. T + B + NK + Ma	frühes Aktivierungs-Antigen
CD81	TAPA-1	Ly	assoziiert mit CD19 + CD21 zur Formation des B-Zell-Korezeptors
CD85k	–	DC	unbekannt
CD123	–	myeloide Vorläufer	α -Kette des IL-4 und IL-13 Rezeptors
CD159a	NKG2A	NK	inhibierender Rezeptor; verhindert NK-Zell-Zytotoxizität, bindet CD94
CD183	CXCR3	akt. T, Mo, Ma, NK, Eos, B, Endo	Chemokin-Rezeptor IP-9, IP-10, MIG
CD195	CCR5	Mo, Ma, NK, unreife DC	Chemokin-Rezeptor MIP1 $\alpha\beta$, RANTES, MCP-2
CD226	DNAM-1	NK, Throm, Mo, T Subpop	Adhäsion
CD314	NKG2D	NK, T Subpop	aktivierender Rezeptor; NK-Zell-Zytotoxizität
CD335	NKp46	NK	NCR; NK-Zell-Zytotoxizität
CD336	NKp44	NK	NCR; NK-Zell-Zytotoxizität
CD337	NKp30	NK	NCR; NK-Zell-Zytotoxizität

Abkürzungen: ADCC: *antibody-dependent cell cytotoxicity* (Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität), AIM: *Activation induction molecule*, akt.: aktivierte, B: B-Zellen, DC: Dendritische Zellen, DNAM-1: *DNAX accessory molecule-1 receptor*, Endo: Endothel Zellen, Eos: Eosinophile Granulozyten, Gra: Granulozyten, HIV: Humanes Immundefizienz Virus, HLA-I/II: Humanes Leukozyten Antigen Klasse I/II-Molekül, IP-9: *Interferon-inducible protein-9*, IP-10: *Interferon-inducible protein-10*, LAM-1: Leukozyten Adhäsionsmolekül 1, LBP: Lipopolysaccharid-Bindungsprotein, LCA: *Leucocyte common antigen*, Leuk: Leukozyten, LFA-1: *lymphocyte function-associated antigen-1*, LPS: Lipopolysaccharid, Ly: Lymphozyten, Ma: Makrophagen, MAC-1: *Macrophage antigen complex-1*, MCP-2: *Monocyte chemoattractant protein-2*, MIP-1 α/β : *Macrophage inflammatory protein-1 α/β* , MIG: *Monokine induced by Interferon- γ* , Mo: Monozyten, NCR: Natürlicher Zytotoxizitäts Rezeptor, Neu: Neutrophile Granulozyten, NK: NK-Zellen, RANTES: *Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*, Subpop: Subpopulation, T: T-Zellen, TAPA-1: *Target of antiproliferative antibodies*, TCR: T-Zell-Rezeptor, Thym: Thymozyten, Throm: Thrombozyten, Treg.: regulatorische T-Zellen.

B. Zytokine und Chemokine

Tabelle B.1: Zytokine und Chemokine. Produktion, Zielzelle, Rezeptor und Wirkungsweise analysierter Zytokine und Chemokine [10, 14, 156, 157, 167].

Zytokin/ Chemokin	Produzent	Zielzelle	Rezeptor	Wirkung
G-CSF	Ma, Fib, Endo, KM	Gra, Throm, myeloische Vorläufer, Endo,	G-CSF-R	Wachstum, Differenzierung, Aktivierung Gra + myeloische Vorläufer; Proliferaion, Migration Endo
GM-CSF	T, Ma, Fib, Endo	Gra, Mo, EC, Fib, DC	GM-CSF-R	Wachstum hämatopoetischer Vorläufer; Differenzierung, Aktivierung Gra + Mo
IFN- γ	T, NK, DC, Ma	Hämatopoeti- sche Zellen, Epi, Endo, Tumorzellen	IFN γ R	Aktivierung Ma; Stimulierung MHC-I + FcR Expression; Aktivierung Neu + NK; Differenzierung CD8 ⁺ T; Chemotaxis Mo
IL-1 β	Mo, Ma, DC, NK, B, Endo, Fib	T, B, Endo, He	IL-1R	Aktivierung Ly + Ma; Adhäsion; Fieber; Akute-Phase Reaktion
IL-2	T, CD8 ⁺ T	T, NK, B, Mo	IL-2R	Proliferation, Differenzierung T + NK
IL-4	T, KM, Mast,	T, B, Mo, Endo, Fib	IL-4R	Isotyp-Switch in B; Sekretion IgG + IgE
IL-6	akt. T, MNZ, Epi, Endo	B, T, He, KM	IL-6R	Akute-Phase Reaktion; Fieber; CRP-Produktion
IL-7	KM, Thym, Milz	T, B	IL-7R	Proliferation, Differenzierung B + T
IL-8 (CXCL8)	akt. Endo, MNZ,	Leuk, besonders Neu, Ery, Epi, Endo	CXCR1, CXCR2	Aktivierung, Chemotaxis Neu
IL-10	Mo, Ma, DC, akt. T	B, Mo, NK, Thym	IL-10R	Aktivierung, Proliferation B + Thym + Mast
IL-13	akt. T	B, Mo	unbekannt	Proliferation, Differenzierung B; IgE Sekretion
IP-10 (CXCL10)	Ly, Mo, Ma, Endo	Ly, Mo, Neu, Endo	CXCR3	Lymphknoten <i>Homing</i> ; Gewebeinfiltration T
MCP-1 (CCL2)	Leuk, Fib, Endo	NK, T, Mo, Bas, Eos	CCR2, CCR10	Chemotaxis, Stimulierung NK zur Degranulierung

MIP-1 α (CCL3)	stim. Mo + Ma, Gedächtnis T	Gra, T, Häma- topoetische Zellen	CCR1, CCR5	Adhärenz Mo; Migration T; hemmt Hämatopoese
MIP-1 β (CCL4)	akt. T, B, Mo, NK	Mo, Ly, Gra	CCR5	Chemotaxis, Adhäsion Mo + Ly
RANTES (CCL5)	T, NK	T, Mo, Eos, Bas	CCR2, CCR5	Chemotaxis; HIV-Suppressor
TNF- α	akt. Mo + Ma, DC, B, T, Fib	nahezu alle Zellen	TNF-R1+2	proinflammatorisch; Wachstum, Differenzierung vieler Zellen; zytotoxisch für Tumorzellen
TNF- β	akt. T + B	nahezu alle Zellen	TNF-R1+2	Wachstum, Differenzierung vieler Zellen

Abkürzungen: akt.: aktivierte, CRP: C-reaktives Protein B: B-Zellen, Bas: Basophile Granulozyten, DC: Dendritische Zellen, Endo: Endothel Zellen, Eos: Eosinophile Granulozyten, Epi: Epithel Zellen, Ery: Erythrozyten, FcR: Fc-Rezeptor, Fib: Fibroblasten, Gra: Granulozyten, G-CSF: Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor, GM-CSF: Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor, He: Hepatozyten, HIV: Humanes Immundefizienz Virus, IFN: Interferon, IL: Interleukin, IP-10: *Interferon-inducible protein-10*, KM: Knochenmark, Leuk: Leukozyten, Ly: Lymphozyten, Ma: Makrophagen, Mast: Mastzellen, MCP-1: *Monocyte chemoattractant protein-1*, MHC-I: *Major histocompatibility complex* Klasse I-Moleküle, MIP-1 α/β : *Macrophage inflammatory protein-1 α/β* , MNZ: Mononukleäre Zellen, Mo: Monozyten, Neu: Neutrophile Granulozyten, NK: NK-Zellen, RANTES: *Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*, T: T-Zellen, Thym: Thymozyten, TNF: Tumornekrosefaktor, Throm: Thrombozyten.

C. Publikationen und Kongressbeiträge

Eigene Publikationen

Brehm, C., Quaiser, A., Huenecke, S., Esser, R., Kloess, S., Auth, A., Betz, S., Zimmermann, O., Niederberger, E., Soerensen, J., Bader, P., Klingebiel, T., Koehl, U. „NK cell functionality is severely impaired by the immunosuppressive drug mycophenolate mofetil: Consequences for NK cell immunotherapy post haplo-SCT.“

Manuskript erstellt, Einreichung in Vorbereitung

Brehm, C., Huenecke, S., Quaiser, A., Esser, R., Bremm, M., Kloess, S., Soerensen, J., Kreyenberg, H., Seidl, C., Becker, P.S.A., Mühl, H., Klingebiel, T., Bader, P., Passweg, J.R., Schwabe, D., Koehl, U. „IL-2 stimulated but not unstimulated NK cells induce selective disappearance of peripheral blood cells: Concomitant results to a phase I/II study.“

PLoS ONE, November 2011 (6(11):e27351)

Bremm, M., Huenecke, S., Lernbecher, T., Ponstingl, E., Mueller, R., Heinze, A., Bug, G., Quaiser, A., Kapinsky, M., **Brehm, C.**, Bader, P., Schneider, G., Klingebiel, T., Koehl, U. „Advanced flowcytometric analysis of regulatory T cells: CD127 downregulation early post stem cell transplantation and altered Treg/CD3⁺CD4⁺-ratio in severe GvHD or relapse.“

Journal of Immunological Methods, Oktober 2011 (373(1–2):36–44)

Kloess, S., Huenecke, S., Piechulek, D., Esser, R., Koch, J., **Brehm, C.**, Soerensen, J., Gardlowski, T., Brinkmann, A., Bader, P., Passweg, J.R., Klingebiel, T., Schwabe, D., Koehl, U. „IL-2 activated haploidentical NK cells restore NKG2D-mediated NK cell cytotoxicity in neuroblastoma patients by scavenging of plasma MICA.“

European Journal of Immunology, November 2010 (40(11):3255–67)

Kongressbeiträge

Posterpräsentation. **Brehm, C.**, Huenecke, S., Esser, R., Auth, E., Quaiser, A., Betz, S., Soerensen, J., Passweg, J.R., Bader, P., Schwabe, D., Klingebiel, T., Koehl, U. „Influence of the immunosuppressive drug mycophenolate mofetil on NK cell functionality after haploidentical stem cell transplantation.“

Perspectives in Cell-based and Gene-based Medicines, 1st Symposium of the LOEWE Center for Cell and Gene Therapy, 15.–17. März 2012, Frankfurt (Deutschland)

Posterpräsentation. **Brehm, C.**, Huenecke, S., Esser, R., Kloess, S., Quaiser, A., Betz, S., Soerensen, J., Passweg, J.R., Bader, P., Schwabe, D., Klingebiel, T., Koehl, U. „Impact of the immunosuppressive drug mycophenolate mofetil on NK cell functionality.“

3. UCT – Universitäres Centrum für Tumorerkrankungen – Forschungstag, 9. September 2011, Frankfurt (Deutschland)

Posterpräsentation. **Brehm, C.**, Huenecke, S., Esser, R., Kloess, S., Quaiser, A., Betz, S., Soerensen, J., Bader, P., Passweg, J.R., Schwabe, D., Klingebiel, T., Koehl, U. „Pathways underlying the decreased NK cell functionality under the influence of the immunosuppressive drug mycophenolate mofetil.“

Natural Killer Cell Symposium NK2011, 18.–20 April 2011, Mainz (Deutschland)

Posterpräsentation. **Brehm, C.**, Huenecke, S., Esser, R., Brinkmann, A., Betz, S., Soerensen, J., Bader, P., Schwabe, D., Klingebiel, T., Passweg, J.R., Koehl, U. „Influence of the immunosuppressive drug mycophenolate mofetil on NK cell functionality.“

12th Meeting of the Society for Natural Immunity & NK2010, 11.–15. September 2010, Cavtat-Dubrovnik (Kroatien)

Posterpräsentation. **Brehm, C.**, Huenecke, S., Brinkmann, A., Betz, S., Soerensen, J., Esser, R., Kloess, S., Bader, P., Passweg, J.R., Klingebiel, T., Schwabe, D., Koehl, U. „Immunosuppressive drugs and NK cell functionality.“

ScieTalk 2010, 8. Juni 2010, Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), Heidelberg (Deutschland)

Posterpräsentation. Koenig, M., Huenecke, S., Salzmann-Manrique, E., Esser, R., Quaritsch, R., **Brehm, C.**, Martin, H., Bader, P., Klingebiel, T., Schwabe, D., Schneider, G., Lernbecher, T., Orth, A., Koehl, U. „Multivariate analyses of immune reconstitution in children following allogeneic SCT.“

International Society for Cellular Therapy (ISCT), 3.–6. Mai 2009, San Diego (USA)

D. Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde in der Abteilung pädiatrische Hämatologie, Onkologie und Hämostaseologie im Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, Klinik II/III des Klinikums der J. W. Goethe-Universität Frankfurt am Main unter Leitung von Frau PD Dr. Ulrike Köhl angefertigt. An dieser Stelle möchte ich allen Menschen danken, die mich in dieser Zeit unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Thomas Klingebiel für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit in seiner Abteilung unter ausgezeichneten Arbeitsbedingungen anfertigen zu dürfen.

Frau PD Dr. Ulrike Köhl für ihre ausgezeichnete fachliche sowie persönliche Betreuung, die zahlreichen konstruktiven Diskussionen aber auch für ihre herzliche Art und ihre besondere Menschlichkeit, ohne die ich vor allem anfängliche Hürden sicher nicht bewältigt hätte. Zudem danke ich ihr für die Vergabe dieses spannenden Themas, das es mir ermöglicht hat, die naturwissenschaftliche Forschung mit dem klinischen Alltag verbinden zu können.

Frau Prof. Dr. Beatrix Süß für ihr Interesse an diesem Projekt und ihre Bereitschaft diese Arbeit im Fachbereich Biowissenschaften der J. W. Goethe-Universität Frankfurt und im Rahmen des Graduiertenkollegs GRK-1172 zu betreuen.

Meinen weiteren Betreuern des Graduiertenkollegs GRK-1172 Prof. Dr. Winfried Wels, Prof. Dr. Heiko Mühl und PD Dr. Ellen Niederberger für die intensive Unterstützung und die vielen wertvollen Diskussionen über den gesamten Entwicklungsprozess dieser Dissertation. Den Doktoranden des GRK-1172 danke ich für das entspannte und vor allem kollegiale Klima miteinander.

Ein großer Dank geht an das gesamte Team des Labors für Stammzelltransplantation und Immuntherapien für die herzliche Aufnahme in ein außergewöhnliches Team. Ich habe mich in dieser besonderen Arbeitsatmosphäre immer sehr wohl gefühlt.

Andrea Quaiser für ihre unglaubliche Kompetenz in allen experimentellen und durchflusszytometrischen Fragestellungen. Ich danke ihr für die Weitergabe ihres Wissens, den geistigen Austausch bei der Interpretation der Ergebnisse und für den Spaß, den wir dabei hatten. Besonders möchte ich mich auch für ihre direkte Art und ihre Freundschaft bedanken.

Dr. Sabine Hünecke für ihre kompetente Unterstützung und ihren Rückhalt in wirklich allen Höhen und Tiefen dieser Arbeit und der letzten Jahre. Sie war mir ein Vorbild und ich habe viel von ihrer systematischen Herangehensweise und ihrer Fähigkeit zur grafischen Darstellung von Ergebnissen lernen können. Nicht zuletzt möchte ich ihr vor allem für ihre Freundschaft und ihre Herzlichkeit danken.

Dr. Melanie Bremm für die exzellente Einarbeitung in alle klinischen Abläufe, ihre außergewöhnliche Hilfsbereitschaft, das Korrekturlesen und ihrer Hilfe bei der Erstellung dieser Arbeit in Latex sowie für das gute Arbeitsklima.

Dr. Ruth Esser für die Weitergabe ihrer umfassenden Kenntnisse und ihres „Händchens“ bei der Kultivierung von NK-Zellen, die detaillierte Korrektur dieser Arbeit sowie für ihre herzliche und immer hilfsbereite Art.

Dr. Stephan Klöß für die zahlreichen fachlichen Gespräche, seine Forschungsbegeisterung und für die Hilfe bei der Erstellung des Langzeit-Mikroskopie Filmes.

Den technischen Mitarbeitern des Stammzelllabors Sibylle Wehner, Stephanie Erben, Regine Müller, Tanja Gardlowski und Michael Marburger für ihre Hilfestellungen bei allen experimentellen Fragestellungen. Besonders danke ich dabei Sibille Betz und Olga Zimmermann, die durch ihre technische Unterstützung sehr zu der Erstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Den Doktorandinnen Annekathrin Heinze und Eileen Auth für das Rückenfreihalten während der Endphase sowie Claudia Wunram für das Korrekturlesen. Besonders danke ich auch unserer Aushilfe Fabian Sörensen für seine immer ansteckende positive Ausstrahlung und seine stetigen Aufmunterungen und Ablenkungen.

Roswitha Lehne, Silvia Koob und Dr. Brigitte Held für die stets freundliche Hilfe in allen organisatorischen und administrativen Fragestellungen.

Allen Schwestern und Ärzten für die Hilfe bei den Blutabnahmen im Rahmen des NK-Zell-Studien Begleitmonitorings. Besonders möchte ich Dr. Jan Sörensen für die immer freundliche Beantwortung aller klinischen Fragen danken.

Selbstverständlich möchte ich sowohl der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) danken, die mich im Rahmen des Graduiertenkollegs GRK-1172 durch ein Forschungsstipendium finanziell unterstützt hat, als auch der „Hilfe für krebserkrankte Kinder Frankfurt e. V.“ für die weiterführende finanzielle Förderung dieses Projekts.

Ein ganz persönlicher Dank gilt auch meinen Freunden und im Speziellen meinem allerbesten Freund Jens Cappel, der mir viel Verständnis entgegengebracht, mir die nötige Kraft und den Mut gegeben und dabei immer die richtigen Worte gefunden hat. Danke, dass du für mich da warst.

Besonderes möchte ich auch meiner Familie, meiner Schwester und meinen Eltern danken, die mir von Beginn meines Studiums an und in wirklich allen Phasen dieser Arbeit eine riesige Unterstützung waren und ohne deren Rückhalt ich diesen Weg nicht geschafft hätte. Danke...

E. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt habe und mich keiner anderen Hilfsmittel als der angegebenen bedient habe. Alle Entlehnungen aus anderen Schriften sind mit Angabe der betreffenden Schrift als solche gekennzeichnet. Ich versichere, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Zudem erkläre ich hiermit, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung unterzogen habe.

Frankfurt am Main, den 11.04.2012

.....

Claudia Brehm

F. Lebenslauf

Persönliche Daten

Vor- Nachname: Claudia Brehm
Geburtstag: 08.03.1980
Geburtsort: Offenbach am Main
Familienstand: ledig
E-mail: ClaudiaBrehm@gmx.de

Promotion

seit 10/2008 Promotion im Labor für Stammzelltransplantation und Immuntherapien des J. W. Goethe-Universitätsklinikums Frankfurt a. M.

Thema der Promotion: “Immuntherapie mit allogenen Natürlichen Killerzellen bei pädiatrischen Patienten nach Stammzelltransplantation: *In vivo* Monitoring und Einfluss immunsuppressiver Therapie” in der pädiatrischen Hämatologie, Onkologie und Hämostaseologie im Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin des Klinikums der J. W. Goethe-Universität. Betreut durch Frau PD Dr. Ulrike Köhl

- Promotionsbegleitendes Graduiertenkolleg *Biologicals* GRK-1172 gefördert von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG)
 - 10/2008–02/2011 Stipendium des GRK-1172
-

Hochschulausbildung

04/2004–04/2008 Studium der Biologie (Fachbereich Biowissenschaften) an der J. W. Goethe-Universität Frankfurt a. M. mit den Schwerpunkten Zellbiologie, Virologie und Genetik. Abschluss als Diplom Biologin mit der Note „sehr gut“ (1,1)

Thema der Diplomarbeit: “Untersuchungen der Cytomegalievirus Infektion in humanen Neuroblastom-Zelllinien” am Medizinischen Institut für Virologie des Klinikums der J. W. Goethe-Universität. Betreut durch Herrn Prof. Dr. Jindrich Cinatl

10/2001–10/2004 Studium der Fächer Biologie und Englisch für Lehramt an Gymnasien (L3) an der J. W. Goethe-Universität Frankfurt a. M.. Abschluss des Grundstudiums mit der Zwischenprüfungsnote „sehr gut“ (1,0)

Schulbildung

- 08/1998–07/2000 Allgemeine Hochschulreife am Adolf-Reichwein-Gymnasium in Heusenstamm (Hessen, Deutschland)
- 08/1997–07/1998 Amerikanischer High School Abschluss während eines einjährigen Schulaufenthalts an der Allen County High School in Scottsville (Kentucky, USA)
- 08/1990–07/1997 Besuch des Adolf-Reichwein-Gymnasiums in Heusenstamm (Hessen, Deutschland)
- 08/1986–07/1990 Besuch der Matthias-Claudius-Grundschule in Heusenstamm (Hessen, Deutschland)
-

Offenbach am Main, 11. April 2012

G. Langzeit-Mikroskopie Zeitrafferfilme

Diese beigefügte DVD enthält zwei Langzeit-Mikroskopie Zeitrafferfilme als Audio-Video-Format. Der erste Film zeigt die etwa 6-stündige Koinkubation von den als Tumorzell-Sphäroide wachsenden Neuroblastomzellen eines 4-jährigen Neuroblastom Stadium IV Patienten mit neun Tage IL-2 stimulierten Spender-NK-Zellen. Der zweite Film zeigt die Koinkubation der Tumorzellen mit neun Tage IL-2 stimulierten Spender-NK-Zellen nach 24-stündiger Vorbehandlung mit dem immunsuppressiven Medikament MPA in der Konzentration von 10 μM . Die genaue Durchführung der Langzeit-Mikroskopie wurde im Abschnitt „Patienten, Material und Methoden“ Kapitel 3.3.6 aufgeführt. Der Inhalt beider Filme wurde im Abschnitt „Ergebnisse“ in dem Kapitel 4.2.3 beschrieben und im Kapitel 5.2.3 der „Diskussion“ interpretiert.