

**EINFLUSS VON GAMMAKETTENZYTOKINEN
AUF DIE NK-ZELLINTERAKTION MIT RHABDOMYOSARKOMZELLEN**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von

Juliane Sabine Wagner

aus Osterburg

Frankfurt 2017

(D30)

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

Dekan: Prof. Dr. Sven Klimpel

1. Gutachterin: Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz

2. Gutachterin: Prof. Dr. Evelyn Ullrich

Datum der Disputation: 15. März. 2018

ERKLÄRUNG

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

Frankfurt am Main, den

(Unterschrift)

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Titel

„Einfluss von Gammakettenzytokinen auf die NK-Zellinteraktion mit Rhabdomyosarkomzellen“

selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass alle Entlehnungen aus anderen Schriften mit Angabe der betreffenden Schrift gekennzeichnet sind.

Ich versichere, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben

Frankfurt am Main, den

(Unterschrift)

Für Eva Lappat

ZUSAMMENFASSUNG

Im Kindes- und Jugendalter gehört das Rhabdomyosarkom zu den häufigsten Weichteilsarkomen. Bisher beläuft sich das Therapieverfahren auf chirurgische Entfernung, gefolgt von Chemotherapie, bzw. bei nicht-operablen Fällen auf Radiotherapie und Chemotherapie, jedoch haben sich die Überlebenschancen für Patienten mit einer Erkrankung in metastasiertem oder rezidiviertem Stadium trotz intensiver Forschung über mehrere Jahrzehnte hinweg kaum gebessert und bleiben bei unter 30%. Neue therapeutische Strategien versuchen das Immunsystem des Patienten zu modulieren und dieses gezielter oder aggressiver gegen Tumorzellen zu machen. Nebst direkter Injektion von Zytokinen oder Antikörpern bietet die adoptive Immunzelltherapie einen vielversprechenden Ansatz. In der vorliegenden Arbeit lag der Fokus auf Natürlichen Killer- (NK) Zellen, da diese ein hohes zytotoxisches Potential gegenüber Tumorzellen aufweisen. Eine der größten Herausforderungen der NK-Zellforschung ist die Bereitstellung ausreichender Mengen an NK-Zellen mit optimaler antitumorale Funktion für den klinischen Einsatz. Viele aktuell erprobte NK-Zellexpansionsstrategien basieren auf der Verwendung von Hilfs- oder *Feeder*-Zellen (Versorgerzellen), die jedoch vor der Applikation in Patienten aus dem finalen Produkt entfernt werden müssen. In der vorliegenden Arbeit sollten *Feeder*-zellfreie NK-Zellexpansionsprotokolle unter Verwendung von Gammakettenzytokinen getestet werden.

Interleukin (IL-) 15 erwies sich dabei vor allem für die Vermehrung der NK-Zellen als besonders förderlich. Im Vergleich dazu fielen die Expansionsraten mit IL-2 oder IL-21 geringer aus. Interessanterweise wurde der expansionsfördernde Effekt von IL-15 durch dauerhafte Anwesenheit von IL-21 im Kulturmedium gehemmt. Ein kurzer, dreitägiger IL-21-Boost am Ende der Expansionsphase wirkte sich wiederum positiv auf die NK-Zellexpansionsraten aus. Zudem zeigte sich durch IL-21 ein vermehrtes Auftreten von NK-Zellen des reiferen CD16^{pos}CD56^{dim} Phänotyps, der die zytotoxische Funktion vermittelt. Bei Degranulationsuntersuchungen wurden eine IL-21-induzierte Exozytoseaktivität und die vermehrte Ausschüttung von Perforin und Granzym B, welche Apoptose in den Zielzellen auslösen, beobachtet. Vor allem der dreitägige Boost mit IL-21 bewirkte eine gesteigerte Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen, insbesondere gegenüber Rhabdomyosarkomzellen.

Auf dieser Grundlage bot es sich an für die NK-Zellexpansion ein Zwei-Phasen-Protokoll anzuwenden, bestehend aus einer initialen Proliferationsphase mit IL-15 und einem anschließendem IL-21-Boost, durch den die antitumorale Funktionalität der NK-Zellen gesteigert wurde. Dieses IL-15+21_{boost}-Protokoll wurde mit anderen Kombinationen aus den

ZUSAMMENFASSUNG

Gammakettenzytokinen IL-2, IL-15 und IL-21 verglichen und stellte sich hinsichtlich der NK-Zellexpansionsraten, der Degranulationskapazität und der damit verbundenen Zytotoxizität als den anderen Protokollen überlegen heraus.

Zytokinexpandierte NK-Zellen zeigten eine höhere Rezeptorexpression an ihren Oberflächen als unstimulierte Zellen. Die Expansion mit dem IL-15+21_{boost}-Protokoll bewirkte die höchste Dichte des Todesrezeptors TRAIL, jedoch auch der inhibitorischen KIR2D-Rezeptorfamilie. Für andere Oberflächenmarker ergab sich jeweils eine mittlere Expressionsdichte verglichen mit dem IL-15- bzw. dem IL-15+21-Expansionsprotokoll. Die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie Interferon- γ (IFN- γ) und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) wurde zudem verstärkt durch IL-21 angeregt, aber ebenso die Sekretion des immunsupprimierenden IL-10.

Weiter wurden die zytoinexpandierten NK-Zellen zur Überprüfung ihrer *in vivo* Funktionalität anhand eines präklinischen Xenograftmodells unter Verwendung von NOD SCID IL-2-R γ ^{-/-} (NSG) Mäusen und der Technologie der *in-vivo*-Biolumineszenzbildgebung getestet. Dabei konnte beobachtet werden, dass die NK-Zellen das Wachstum luciferaseexprimierender humaner Rhabdomyosarkome verlangsamten. Die Wirksamkeit der IL-15+21_{boost}-expandierten NK-Zellen zeigte sich vor allem in einem kombinierten Ansatz, bei dem die Tumore zunächst mit ionisierender Strahlung behandelt wurden und residuale Rhabdomyosarkomzellen anschließend durch den adoptiven Transfer von humanen NK-Zellen in ihrem Wachstum gehemmt waren, solange die NK-Zelltherapie andauerte. Somit stellte sich die Kombination aus Bestrahlung und NK-Zelltransfer als wirksamer im Einsatz gegen Rhabdomyosarkome heraus als die alleinige Behandlung der Tumore durch Radiotherapie.

Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit ein NK-Zellexpansionsprotokoll entwickelt werden, dass durch den ausschließlichen Einsatz von Gammakettenzytokinen zu einem funktionalen NK-Zellprodukt führte, welches auch *in vivo* lytische Aktivität gegenüber Rhabdomyosarkomzellen aufwies.

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	I
INHALTSVERZEICHNIS	III
1 EINLEITUNG	1
1.1 Rhabdomyosarkom	1
1.2 Adoptive Immunzelltherapie	5
1.3 Natürliche Killerzellen.....	8
1.3.1 Adoptive NK-Zelltherapie	13
1.3.2 NK-Zellexpansion mittels Gammakettenzytokinen.....	14
1.4 Kombination von Radiotherapie und Immunzelltherapie.....	17
1.5 Zielstellung	19
2 MATERIAL	20
2.1 Biologisches Material	20
2.1.1 Tiere	20
2.1.2 Zellen und Zelllinien.....	20
2.1.3 Plasmide.....	21
2.1.4 Antikörper	22
2.2 Medien und Puffer	23
2.3 Kits und Reagenzien	24
2.4 Verbrauchsmaterial.....	26
2.5 Geräte.....	27
2.6 Programme.....	28
3 METHODEN	29
3.1 Zelllinienkultur	29
3.1.1 Revitalisierung der Zelllinien	29
3.1.2 Subkultivierung der Zelllinien	29
3.1.3 Kryokonservierung von Zellen	30
3.2 Anreicherung und Kultivierung Natürlicher Killerzellen.....	30
3.3 Proliferationsanalyse.....	31
3.4 Phänotypisierung	32
3.4.1 Phänotypisierung der NK-Zellen	32
3.4.2 Phänotypisierung der Tumorzellen	33
3.5 Zytotoxizitätstests	34

INHALTSVERZEICHNIS

3.6	Aktivitätsanalyse.....	35
3.6.1	Degranulation und IFN- γ -Produktion	35
3.6.2	Immunoblotnachweis von Perforin und Granzym B	36
3.7	Zytokinsekretionsmessung	38
3.8	Lentivirale Transduktion	39
3.8.1	Plasmidamplifikation	39
3.8.2	Plasmidpräparation	40
3.8.3	Transfektion und Virusproduktion.....	40
3.8.4	Tansduktion der Zielzellen	41
3.9	<i>In vivo</i> Biolumineszenzmessungen.....	41
3.10	Lokalisierte Radiotherapie in Mäusen	43
4	ERGEBNISSE	44
4.1	NK-Zellaufreinigung	44
4.2	NK-Zellexpansion.....	45
4.2.1	NK Zellproliferation	46
4.2.2	Spenderabhängige Unterschiede in Expansionsraten	47
4.2.3	Durchschnittliche Expansionsraten bei Langzeitkulturen	48
4.3	Qualität des NK-Zellprodukts.....	50
4.3.1	Reinheit	50
4.3.2	Vitalität	51
4.3.3	Rückgewinnungsrate und Vitalität nach Kryokonservierung	52
4.4	Charakterisierung des NK-Zellprodukts.....	54
4.4.1	CD56-Expression.....	54
4.4.2	Reifestadium	56
4.4.3	Phänotypisierung.....	57
4.4.3.1	Aktivierungsrezeptoren	58
4.4.3.2	Inhibierende Rezeptoren.....	62
4.4.3.3	Migrations- und Adhäsionsrezeptoren	64
4.5	Oberflächentypisierung der Zielzellen.....	65
4.6	Funktionalität des NK-Zellprodukts	66
4.6.1	<i>In vitro</i> Zytotoxizität ausgewählt expandierter NK-Zellen.....	66
4.6.2	Zytotoxizität nach Kryokonservierung	68
4.6.3	Zytotoxizitätssteigerung durch NK-Zellpassagierung	69
4.6.4	Antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität	70
4.6.5	NK-Zellaktivität und Degranulation	72

INHALTSVERZEICHNIS

4.6.6	Ausschüttung von Zytokinen	74
4.7	<i>In vivo</i> Anwendung des NK-Zellprodukts	76
4.7.1	Transduktion der RMS Zelllinien	76
4.7.2	Tumorkontrolle durch adoptive NK-Zelltherapie	78
4.7.3	Kombinationsstrategie – Radiotherapie und adoptiver NK Zelltransfer	81
4.7.3.1	Auswirkung von RT auf RMS.....	81
4.7.3.2	Tumorkontrolle durch adoptive NK-Zelltherapie nach Bestrahlung.....	84
5	DISKUSSION	87
5.1	NK-Zellexpansion und phänotypische Charakterisierung	87
5.2	Bewertung der NK-Zellfunktionalität.....	91
5.3	Kombinationsstrategie – Radiotherapie und NK-Zelltherapie	96
5.4	Klinische Anwendung von zytokinexpandierten NK-Zellprodukten	98
6	LITERATURVERZEICHNIS	101
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	127
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	131
9	TABELLENVERZEICHNIS	134
10	ANHANG	135
10.1	Publikationsliste.....	135
10.2	Ausgewählte öffentliche Präsentationen.....	136

1 EINLEITUNG

1.1 RHABDOMYOSARKOM

Mit einem Viertel aller Sterbefälle gehören Krebsleiden in Deutschland zu den häufigsten Todesursachen nach Herz-/ Kreislaufkrankungen [1]. Der Begriff Krebs ist eine Sammelbezeichnung für maligne Gewebeneubildungen und bösartige Tumore. Bei Kindern treten Krebserkrankungen wesentlich seltener auf als bei Erwachsenen, dennoch zählen sie auch hier zu den zweithäufigsten Todesursachen. In Deutschland gibt es jährlich etwa 1800 Neuerkrankungen bei Kindern und Jugendlichen unter 15 Jahren [2,3]. Nach der Diagnose betragen die durchschnittlichen Überlebensraten nach drei Jahren 82% und nach fünf Jahren 79%. Die häufigsten malignen Erkrankungen des Kindesalters sind Leukämien, Tumore des Zentralnervensystems (ZNS) und Lymphome [3].

Weichteilsarkome gehören zur Gruppe der soliden Tumore und machen circa 6% aller pädiatrischen Krebserkrankungen aus. Das häufigste Weichteilsarkom ist das Rhabdomyosarkom (RMS), eine Weichteilgeschwulstbildung der quergestreiften Muskulatur. Am häufigsten sind Kinder in einem Alter unter vier Jahren betroffen [3]. Prinzipiell können Rhabdomyosarkome in fast allen Organen entstehen, treten aber vorrangig im Kopf- und Halsbereich, in Harn- und Geschlechtsorganen sowie an den Extremitäten auf. Die Lokalisation ist auch abhängig vom jeweiligen RMS-Subtyp, wobei man bei Kindern und Jugendlichen hauptsächlich zwischen dem embryonalen und dem alveolären Typ unterscheidet (Abb. 1-1). 2013 gab die Weltgesundheitsorganisation (WHO) eine neue Klassifikation bekannt, nach der weiter zwischen embryonalem und sklerosierendem (auch spindelzelligem) RMS differenziert wird [4].

Das embryonale Rhabdomyosarkom (ERMS) tritt häufiger in der Altersgruppe ab Geburt bis zwölf Jahre auf und besteht aus spindelförmigen Zellen, die in einer aufgelockerten, mesenchymalen Gewebeansammlung auftreten. Dahingegen betrifft das alveoläre Rhabdomyosarkom (ARMS) ältere Kinder und Jugendliche im Alter von zehn bis 20 Jahren und ist deshalb auch als juveniles Rhabdomyosarkom bekannt. Histologisch lässt es sich anhand von mit Hohlräumen durchzogenen Nestern runder Zellen mit gelegentlich auftretenden multinukleären Riesenzellen erkennen. Das ARMS gilt, aufgrund von schnellerem Wachstum, häufiger Gewebeeinfiltration und Metastasierung als der deutlich aggressiverer Subtyp [2].

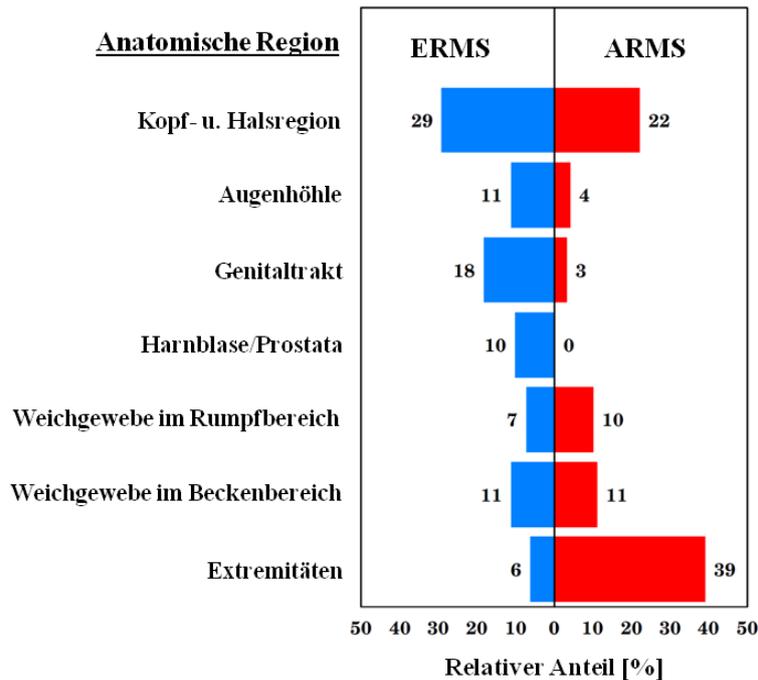


Abb. 1-1 Prozentuale Verteilung von embryonalen und alveolären Rhabdomyosarkomen über verschiedene anatomische Bereiche. Berücksichtigt wurden Patienten im Alter unter 20 Jahren, aller Rassen und beider Geschlechter (SEER, 1975-95). Abbildung übernommen und angepasst von Ries et al. [5]

Zusätzlich zu der gängigen histologischen Zuordnung des Subtyps helfen neuere Erkenntnisse zum biologischen Hintergrund des RMS bei der Erstellung von Risikoprofilen, Prognosen und darauf abgestimmten Behandlungsstrategien. Darunter fällt der Nachweis der onkogenen, durch Translokation entstandenen Fusionsprodukte der Gene PAX3 beziehungsweise PAX7 mit FOXO-1. Das Genprodukt P3F tritt in 60% aller ARMS auf, das Genprodukt P7F in 20% [6]. Beide sind in die Umgehung des altersinduzierten Zelltods involviert [7]. Dabei ist das Vorkommen von P3F mit einer niedrigeren Chance auf ein ereignisfreies Überleben assoziiert als der Nachweis von P7F. Die beste Prognose haben Patienten mit fusionsnegativem RMS und tatsächlich scheint dieser Aspekt ausschlaggebender zu sein als die herkömmliche histologische Kategorisierung [8–10]. Alternativ können weitere immunhistochemische Marker, wie zum Beispiel Myogenin, AP2B, NOS-1 oder HMGA-2 herangezogen werden um den Fusionsstatus zu überprüfen [11]. Ebenso führen Mutationen in der RAS/NF1- oder der p53-Kaskade zur Zuordnung zu einer höheren Risikogruppe, bieten aber neue Angriffspunkte für innovative Behandlungsstrategien [12].

Die Risikostratifikation erfolgt derzeit hauptsächlich abhängig vom Alter der Patienten bei Diagnosestellung, der Tumorgröße und -lokalisierung, Ausmaß des Übergriffs auf das umliegende Gewebe und Lymphknotenbefall [2,13]. Die Risikogruppenzuordnung bestimmt

EINLEITUNG

die Dauer und Reihenfolge der Behandlungsstrategie, die meist aus einem multimodalen Ansatz, zusammengesetzt aus Chemotherapie und lokaltherapeutischen Methoden wie operativer Entfernung des Tumors und Strahlentherapie, besteht [2]. Durch diese Art der Kombinationstherapie werden heute Heilungschancen von über 60% erreicht, im Vergleich zu 25-30% in den 1960er Jahren, als hauptsächlich Lokaltherapie eingesetzt wurde [14]. Abhängig von der Risikostratifikation wird die Behandlungsstrategie möglichst genau auf die Bedürfnisse der Patienten abgestimmt. Dabei ist das Ziel, die Heilungschancen für Hochrisikopatienten und Patienten mit mittlerem Risiko zu verbessern und gleichzeitig bei Kindern mit niedrigem Risiko die therapieinduzierten akuten Nebenwirkungen und vor allem Spätfolgen zu minimieren [15].

Die Lokaltherapie stellt auch aktuell noch ein wichtiges Element des gesamten Behandlungskonzepts dar. Die operative Entfernung des Primärtumors ist eine Methode, aber nicht immer möglich, wenn zum Beispiel die Lage oder Größe des Tumorgewebes die Entnahme mehrerer Organe erfordert oder unzumutbare kosmetische Konsequenzen hat [16,17]. Eine andere Möglichkeit bietet die häufiger angewandte Strahlen- oder Radiotherapie (RT). Der antitumorale Effekt ionisierender Strahlung basiert auf der Herbeiführung von Einzel- und Doppelstrangbrüchen in der Desoxyribonukleinsäure (DNS) und die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies innerhalb der Tumorzellen [18]. Da auch die Strahlentherapie oft mit Nebenwirkungen und vor allem schwer kalkulierbaren Spätfolgen einhergeht, wird versucht diese auf ein Minimum zu reduzieren oder die lokale Begrenzung der Bestrahlung zu optimieren und umliegendes Gewebe zu schonen. Mehrere Studien aus dem Jahr 2011 zeigten, dass das Weglassen der RT häufiger zu einem Rezidiv führen kann [19–21], jedoch war es möglich im Ansatz der verzögerten primären Resektion die Strahlendosis in ausgewählten Patienten zu verringern ohne, dass es zu einer Minimierung der Lokalkontrolle kam [17]. Außerdem hat die sogenannte intensitätsmodulierte RT (IMRT) im Vergleich zur herkömmlichen 3D-konformen RT eine verbesserte Dosisabdeckung im Zielgewebe ohne negative Einflüsse auf die Lokalkontrolle und das ausfallfreie Überleben (*failure-free survival*, FFS) [22]. Vor Kurzem wurden erste vielversprechende Ergebnisse mit protonenbasierter Strahlentherapie erzielt. Aufgrund der limitierten Gewebepenetration massehaltiger Teilchen wird so eine lokale Begrenzung gewährt und benachbartes Gewebe abgeschirmt. 16 von 57 Patienten erlitten mittelschwere, akute oder späte Nebenwirkungen, die aber nicht höher als Grad III waren [23]. Langfristige Ergebnisse dieser Studie sind allerdings noch abzuwarten.

EINLEITUNG

Etwa ein Drittel aller betroffenen Kinder weisen zum Zeitpunkt der Diagnose bereits radiologisch detektierbare Metastasen auf und auch bei Patienten, bei denen keine Metastasen gefunden werden konnten, wird davon ausgegangen, dass sich bereits Mikrometastasen in benachbarten Lymphknoten oder entfernteren Organen festgesetzt haben [24]. Um auch diesen beizukommen, wird heute von Anfang an die sowohl lokal als auch systemisch wirksame Chemotherapie eingesetzt [25]. Die Standardchemotherapie umfasst eine Kombination verschiedener Zytostatika, die in mehreren Zyklen verabreicht werden, im Wechsel mit Therapiepausen zur Erholung der Patienten. Bei niedriger Risikoordnung werden Vincristin und Actinomycin-D (VA) über etwa 22 Wochen verabreicht, bei mittlerem Risiko wird das Spektrum auf Cyclophosphamid (VAC) oder Ifosfamid (IVA) und die Therapiedauer auf 25 Wochen ausgeweitet. Für Patienten der mittleren Risikogruppe wurde kürzlich von der *Children Oncology Group* eine alternierende Therapie mit VAC und der Kombination aus Vincristin, Topotecan und Cyclophosphamid (VTC) vorgeschlagen, zeigte aber keine Verbesserung des FFS in den folgenden vier Jahren [26]. Auch weitere Studien mit anderen Zytostatikakombinationen brachten keine zusätzlichen Verbesserungen [27], sondern waren stattdessen mit stärkeren Nebenwirkungen, wie höherem Infektionsrisiko, Myelosuppression (Knochenmarksdepression) oder Mukositis (Schleimhautentzündung) verbunden [28].

Obwohl sich die Situation für RMS Patienten insgesamt in den letzten Jahrzehnten stark verbessert hat, bleiben die Prognosen für Kinder, deren Tumore bereits stark gestreut haben, oder, die nach der Behandlung ein Rezidiv erleiden, weiter unterdurchschnittlich (siehe Abb. 1-2) [29,30]. Resistenzen von Tumoren gegenüber herkömmlichen Strategien, insbesondere nach wiederholter Behandlung, demonstrieren die Notwendigkeit der Entwicklung neuartiger Therapeutika und Behandlungskonzepte. Hauptaugenmerk der Forschung liegt derzeit auf der Nutzung und Verbesserung der Möglichkeiten, die das Immunsystem des Patienten selbst bietet und so dem Körper hilft sich selbst zu helfen.

Multizentrische Studien in Deutschland zeigten eine ereignisfreie Fünf-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von gerade einmal 2% für Kinder älter als zehn Jahre, bei Diagnose mit Metastasen in Knochen oder Knochenmark, und keine Überlebenden beim Auftreten von Rezidiven [31,32]. Solchen Patienten bleibt die Chance an der Teilnahme klinischer Studien zum Einsatz haploidenter oder allogener Stammzelltransplantationen, Applikation zytokininduzierter Killerzellen (CIKs) oder die Weiterentwicklung

immunzellbasierter Behandlungsmethoden, wie beispielsweise des adoptiven Transfers natürlicher Killerzellen (NK-Zellen).

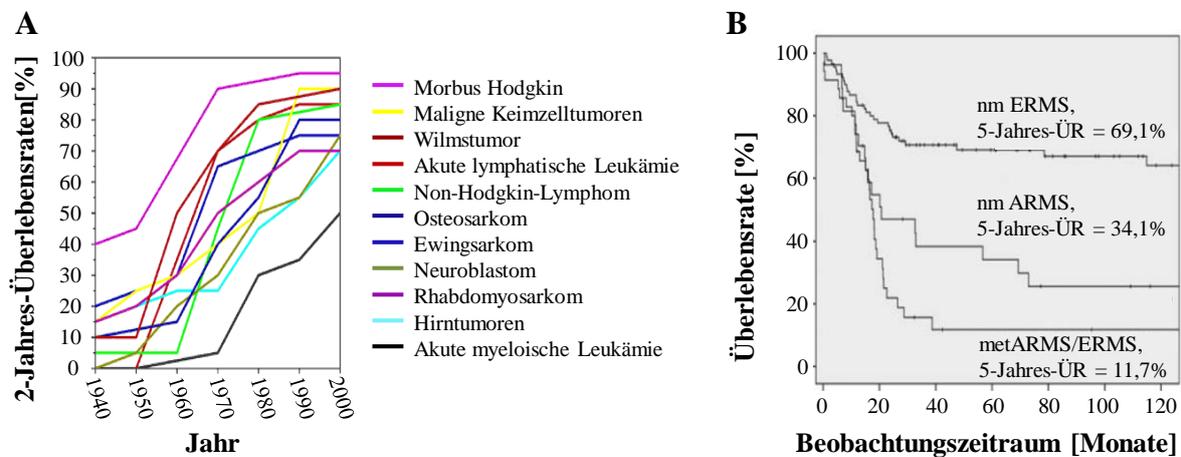


Abb. 1-2 Überlebensraten bei verschiedenen malignen Erkrankungen **A** Zunahme des Behandlungserfolgs für ausgewählte maligne Erkrankungen bei Kindern und Jugendlichen in den Jahren zwischen 1940 und 2000; Abbildung übernommen und angepasst vom Informationsportal zu Krebs- und Bluterkrankungen bei Kindern und Jugendlichen [33] **B** Überlebensraten nach Diagnose eines Rhabdomyosarkoms, aufgeschlüsselt nach nicht-metastasiertem embryonalem Rhabdomyosarkom (nm ERMS, n=90 Patienten, nach fünf Jahren n=40 Patienten), nicht-metastasiertem alveolärem Rhabdomyosarkom (nm ARMS, n=27 Patienten, nach fünf Jahren n=8 Patienten) und metastasierten alveolären und embryonalen Rhabdomyosarkomerkrankungen (metARMS/ERMS, n=35 Patienten, nach fünf Jahren n=2 Patienten); 5-Jahres-ÜR: Fünf-Jahres-Überlebensrate; Abbildung übernommen und angepasst von van Gaal et al. [34]

1.2 ADOPTIVE IMMUNZELLTHERAPIE

Die Geschichte der Immuntherapie begann 1866 mit der Entdeckung Wilhelm Buschs, dass sich bei Sarkompatienten, die eine postoperative Wundrose entwickelt hatten, der Tumor spontan zurückbildete [35]. 1891 stellte William B. Coley den Zusammenhang zwischen Tumorregression (auch entfernter Metastasen) und einer bakteriellen Infektion her [36]. Seine Annahme, dieser Zusammenhang beruhe auf dem von Bakterien produzierten Coley Toxin, konnte nicht nachhaltig bewiesen werden und so wurde die Erlaubnis, das Toxin in den USA als Behandlungssubstanz zu verwenden, 1963 von der FDA (*Food and Drug Administration*, Zulassungsbehörde der USA) zurückgezogen [37]. Heute ist bekannt, dass nicht Toxine oder Bakterien, sondern die Stimulation des Immunsystems für die Tumorkontrolle verantwortlich ist.

Mutationen geschehen regelmäßig und führen zu abnormen Zellen, bleiben aber meist unbemerkt, da der Körper diese normalerweise durch eine Reihe eigener Kontroll- und

EINLEITUNG

Abwehrmechanismen in Schach hält. Bei Krebspatienten sind diese Mechanismen fehlreguliert oder sogar vollständig außer Kraft gesetzt. Aktuelle experimentelle Ansätze der Immuntherapie versuchen diese zu verbessern bzw. wieder herzustellen [38,39]. So dienen Tumorvakzine oder antikörperbasierte Therapien dazu, die Erkennung von Tumorzellen durch Immunzellen zu erleichtern, während Adjuvantien wiederum, Coleys Theorie folgend, immunstimulierende Funktion besitzen [40–45].

Eines der Hauptkonzepte ist die adoptive Immunzelltherapie, bei der zytotoxisch wirksame Immunzellen, hauptsächlich T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen (NK-Zellen), aus Spendern gewonnen, *ex vivo* expandiert und/oder stimuliert [46–50] teilweise auch genetisch modifiziert [51,52] und schließlich den Malignompatienten transferiert werden [53]. Dabei können Spender und Empfänger ein und dieselbe Person (autologe Immunzelltherapie) oder verschiedene Personen sein (allogene Immunzelltherapie).

Der Transfer autologer Zellen spielt vor allem bei der Transplantation hämatologischer Stammzellen eine Rolle. Diese diente ursprünglich der Rückgewinnung des hämatologischen (blutbildenden) Systems eines Patienten nach Hochdosischemotherapie oder Ganzkörperbestrahlung. Die bei besonders schwer behandelbaren malignen Erkrankungen angewandten Hochdosisverfahren wirken sich nicht nur auf das Tumorgewebe aus, sondern zerstören auch zellteilungsintensive Gewebe wie zum Beispiel das Knochenmark. Da das Knochenmark Ursprungsort der Blutzellen, und damit auch des Immunsystems, ist, führt eine dauerhafte Schädigung, - unbehandelt -, zum Tod des Patienten. Die Spende eigener Stammzellen und Rückführung dieser nach der Hochdosisbehandlung kann somit Leben retten. Mit der Stammzelltransplantation werden auch Vorläufer von Immunzellen übertragen, die nach Rekonstruktion des Immunsystems wieder alle überlebenswichtigen Funktionen übernehmen können. Da es sich um körpereigene Zellen handelt, wird die autologe Stammzelltransplantation meist gut vertragen. Dennoch gibt es limitierende Faktoren, wie zum Beispiel ein erhöhtes Infektionsrisiko während der Immundepression, das heißt in der Zeit bis das Immunsystem wieder vollständig etabliert und rekonstruiert ist. Ein weiteres Risiko birgt, dass das körpereigene Immunsystem bereits einmal in der Kontrolle der Tumorentstehung versagt hat und es im Falle eines Rezidivs sehr wahrscheinlich ist, dass es wieder dazu kommt [54]. Bei Patienten mit fortgeschrittenen Rhabdomyosarkomerkrankungen hatte die Anwendung der Hochdosischemotherapie gefolgt von einer autologen Stammzelltransplantation keine Verbesserung der Überlebensraten zur Folge [32,55–57].

Ist das patienteneigene Immunsystem nicht funktionstüchtig oder sind Zellen des Immunsystems selbst betroffen und fehlerhaft, zum Beispiel im Falle einer Leukämie, werden alternativ Stammzellen fremder Spender (allogene Stammzellen) oder eines zu 50% genetisch verwandten Spenders (haploidente Stammzellen) transplantiert. Da so bei Transplantation der Stammzellen das gesamte, potente Immunsystem des gesunden Spenders mit übertragen wird, hat dieses effizientere Wirkung gegenüber residualen oder neu entstehenden Tumorzellen als das patienteneigene [58,59]. Der essenzielle, immunbasierte Effekt, der in einem solchen Fall greift, nennt sich Transplantat-*versus*-Tumor- oder Transplantat-*versus*-Leukämie-Effekt (GvT/L, *graft-versus-tumor/leukemia*). Der GvT/L-Effekt ist hauptsächlich abhängig von T-Lymphozyten und NK-Zellen, die sich vom Spendersystem ableiten, und kann durch zusätzliche Spenderlymphozyteninfusionen (DLI, *donor lymphocyte infusion*) weiter verstärkt werden [60,61].

Damit der Körper des Patienten sich vollständig auf das neue Immunsystem einstellen kann, muss das patienteneigene System ganzheitlich eliminiert werden, zum Beispiel mittels myeloablativer Chemo- oder Radiotherapie. Hat sich im Anschluss das Spendersystem komplett etabliert, besteht ein sogenannter vollständiger Chimärismus. Durch DLIs ist es möglich einen vollständigen Chimärismus schneller herbeizuführen, bzw. kann dieser auch mit einer geringeren Dosis oder ganz ohne myeloablative Chemo- oder Radiotherapie erreicht werden. Erst bei vollständigem Spenderchimerismus wird auch der gewünschte GvT/L-Effekt bewirkt [62].

Wenn Spender und Empfänger nicht zu 100% kompatibel sind, geht der positive GvT/L-Effekt leider oft mit der Komplikation der Transplantat-*versus*-Empfänger-Erkrankung (GvHD, *graft-versus-host-disease*) einher. Hauptmediatoren der GvHD sind Spender-T-Zellen, - werden sie aus dem Transplantat entfernt, so verringert sich das Risiko einer GvHD [63]. Die T-Zellaktivierung ist abhängig von der Erkennung des humanen Leukozytenantigens (HLA) auf der Oberfläche körpereigener Zellen. Im gesunden Zustand präsentieren Zellen mittels HLA-Moleküle nur körpereigene Selbstantigene und sind so vor zytotoxischen T-Lymphozyten geschützt. Weichen die Zellen jedoch von ihrem normalen Erscheinungsbild ab, durch virale Infektion oder maligne Veränderungen, so präsentieren sie mit den HLA-Molekülen dem Immunsystem unbekannte oder fremde Antigene. Diese werden von zytotoxischen T-Zellen als Gefahr wahrgenommen und direkt eliminiert. Im Rahmen der allogenen Transplantation befinden sich zytotoxische Spenderlymphozyten in fremdem Milieu, werden aktiviert und greifen das Empfängergewebe an. So besteht ein enger

Zusammenhang zwischen GvL/T und GvHD [64–68]. Der adoptive Transfer von Spender-T-Lymphozyten ist damit limitiert. Risiko und Nutzen müssen individuell und sehr genau abgewogen und ein möglichst passender Spender für jeden Patienten gefunden werden.

Der GvL/T-Effekt ist nicht zwingend abhängig von der Entstehung einer GvHD [69]. Die Depletion von CD8^{pos} zytotoxischen T-Lymphozyten, bei reduziertem Aufkommen von GvHD, aber unverändertem GvL-Effekt, demonstriert, dass letzterer nach allogener Stammzelltransplantation und DLI nicht alleinig von transferierten T-Zellen abhängt [63,70]. NK-Zellen können ebenfalls GvL/T-Effekte entfalten, nutzen aber andere Aktivierungsmechanismen [71]. Unreife aktivierte antigenpräsentierende Zellen des Empfängers, die die Aktivierung von Spender-T-Zellen verantworten, werden durch Spender-NK-Zellen eliminiert, die somit eine GvHD vermeiden und den Patienten schützen [72–74].

1.3 NATÜRLICHE KILLERZELLEN

T-Zellen und NK-Zellen entwickeln sich aus einem gemeinsamen lymphoiden Vorläufer im Knochenmark und sind eng miteinander verwandt [75]. Im Gegensatz zu T-Zellen erfolgt jedoch die Differenzierung der NK-Zellen nicht im Thymus, sondern während der Zirkulation im peripheren Blut. Außerdem gehören sie zum angeborenen Immunsystem und bilden die erste Abwehr gegen virusinfizierte oder durch maligne Veränderungen auffällig gewordene Zellen [76]. Im Verlauf einer Erstinfektion erreichen NK-Zellen demnach innerhalb der ersten ein bis drei Tage ihre volle Aktivität, während die T-Zellantwort als Teil der adaptiven Immunität erst nach sieben bis neun Tagen in vollem Umfang erfolgt.

Morphologisch werden NK-Zellen als große granuläre Lymphozyten erkannt, die weiter über den Oberflächenmarker CD56 (Neurales Zelladhäsionsmolekül 1, NCAM1) bei gleichzeitiger Abwesenheit von CD3 (Korezeptor des T-Zellrezeptors) identifiziert werden. Zudem lassen sich NK-Zellen in Subtypen einteilen, von denen die einen viel CD56 aber kein CD16 (Fcγ-Rezeptor III) exprimieren (CD56^{bright}CD16^{neg}) und sich durch Zytokinsekretion und damit immunregulatorische Funktion auszeichnen, während die anderen CD56 in geringerer Dichte, dafür aber zusätzlich CD16 auf ihrer Oberfläche tragen (CD56^{dim}CD16^{pos}), den reiferen Phänotyp darstellen und vorwiegend zytotoxische Funktion ausüben (Abb. 1-3) [77,78]. Die Gesamtpopulation aller NK-Zellen besteht hauptsächlich aus CD56^{dim}CD16^{pos} Zellen, CD56^{bright}CD16^{neg} Zellen kommen dagegen nur zu 10% vor [77,79].

CD56 kommt auch auf neuronalen Zellen vor und ist dort für die Zell-Zell-Interaktion zur Stimulation des Neuritenwachstums verantwortlich [80]. Die Beteiligung an Zellkontakten

wird für CD56 auf NK-Zellen ebenfalls diskutiert. Obwohl es im Falle der meisten Tumore nicht direkt am zytolytischen Prozess beteiligt ist, gibt es Hinweise auf die homophile Adhäsion von NK-Zellen an CD56^{POS} Tumorzellen [81]. Zudem scheint CD56 an der Erkennung von Pathogenen beteiligt zu sein [82]. Das CD16 Molekül, auch Fc γ III-Rezeptor genannt, kann an die Fc-Domäne von Antikörpern des Immunglobulinisotyps G binden, sobald diese ihr spezifisches Antigen, beispielsweise auf der Tumoroberfläche, gebunden haben. Diese Bindung aktiviert die NK-Zelle und lässt diese ihre zytotoxische Funktion ausüben (siehe Abb. 1-4). Dieser Mechanismus wird als antikörpervermittelte zelluläre Zytotoxizität, kurz ADCC (*antibody dependent cellular cytotoxicity*), bezeichnet und stellt eine Verzahnung der Mechanismen aus angeborener und erworbener Immunität dar [83].

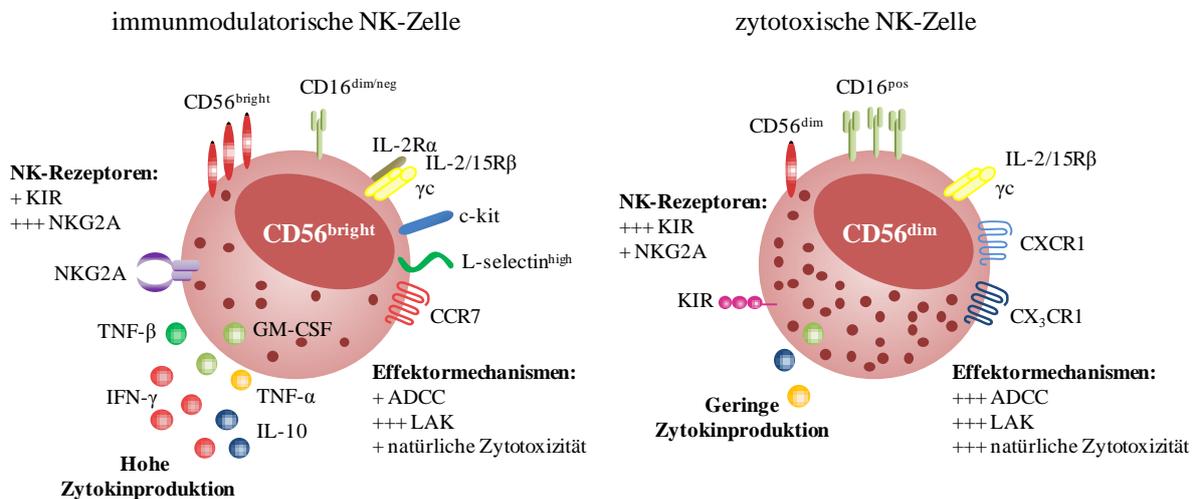


Abb. 1-3 Schematische Darstellung der NK-Subpopulationen. Immunregulatorische NK-Zellen zeichnen sich durch eine hohe Expression von CD56, sowie eine geringe bis ausbleibende Expression von CD16 (FcR γ III) aus und haben immunregulatorische Wirkung durch hohe Zytokin- und Chemokinsekretion. Sie weisen eine geringe Expression zytotoxischer Rezeptoren und wenige zytotoxische Granula auf und gelten damit als gering zytotoxisch. Durch die Expression des hochaffinen IL-2-Rezeptors IL-2R α β γ können sie in Anwesenheit von IL-2 stark proliferieren und aufgrund der Expression von CD62L und CCR7 zielgerichtet ins Knochenmark bzw. in lymphoides Gewebe migrieren. Die zytotoxischen NK-Zellen exprimieren CD56 nur in geringer Dichte, dafür aber viele zytotoxische Rezeptoren und ADCC vermittelndes CD16. Weiter weisen sie eine hohe Dichte zytotoxischer Granula auf und vermitteln über die NCRs natürliche Zytotoxizität, produzieren aber vergleichsweise wenig Zytokine. Beide Subpopulationen können durch Lymphokine aktiviert werden und zytotoxische Wirkung entfalten (LAK, *lymphokine activated killer activity*). Abbildung erstellt nach Cooper *et al.* [77]

Weiter zeichnen sich NK-Zellen durch eine Gruppe keimbahncodierter Oberflächenmoleküle aus, den sogenannten killerimmunglobulinähnlichen Rezeptoren (KIR, *killer immunoglobulin-like receptors*). Anhand dieser ist es der NK-Zelle möglich, krankhafte Zellen zu erkennen, durch Rezeptor-Ligand-Interaktion von KIRs mit entsprechenden MHC-I Molekülen. Die

KIR-Gene, die zur Immunglobulin-Superfamilie gehören, sind auf dem Chromosom 19 lokalisiert und werden unabhängig von den HLA-Genen exprimiert. Es sind 17 humane KIR-Gene bekannt, die jedoch nicht alle gleichzeitig exprimiert werden und in unterschiedlicher Kombination auf Zellen verschiedener Individuen vorkommen können [84,85]. Ebenso werden nicht alle KIR-Gene auf allen Zellen eines Individuums exprimiert und bilden auf diese Weise weitere NK-Subpopulationen [86,87]. Eine solche Plastizität der KIR-Populationen gewährt eine hohe Diversität in der Erkennung entsprechender HLA-Moleküle. Die meisten KIRs haben eine inhibitorische Wirkung, vermittelt anhand langer zytoplasmatischer Enden, bestehend aus inhibitorischen Aminosäuremotiven, sogenannten ITIMs (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs*) [88,89]. Binden diese Rezeptoren an passende HLA-Liganden, so wird eine aktivitätsinhibierende Signalkaskade in den NK-Zellen ausgelöst. Dieser Mechanismus ist wichtig, um NK-Zellzytotoxizität gegen gesunde körpereigene Zellen zu vermeiden (Selbsttoleranz) [90]. Es gibt aber auch KIRs mit kurzem zytoplasmatischem Ende, denen das inhibitorische Motiv fehlt. Diese liegen assoziiert mit dem Adaptermolekül DAP12 (*DNAX activation protein of 12 kDa*), das aktivierende Aminosäuremotive, ITAMs (*immunoreceptor tyrosine-based activating motifs*), trägt, vor und lösen nach Bindung entsprechender Liganden eine NK-zellaktivierende Kaskade aus [91].

Auf ähnliche Weise funktionieren C-Typ-Lektin ähnliche Rezeptoren. Während NKG2A (engl.: *natural killer group 2A*) zytoplasmatische ITIMs besitzt und nach Ligandenbindung inhibitorisch wirkt, lösen NKG2C und NKG2E nach Ligandenbindung vermittelt über DAP12 die aktivierende Signalkaskade aus. NKG2D nimmt eine Sonderstellung ein und funktioniert gänzlich MHC-unabhängig [92]. Es bildet ein Heteromer mit dem ITAMs tragenden DAP10 und bindet die Liganden ULBP1-6 (UL-16 bindendes Protein) oder MIC-A/B (*MHC class I polypeptide-related sequence A/B*), eine Gruppe Glycoproteine, die häufig von Tumorzellen oder Zellen, die genotoxischem Stress unterliegen, exprimiert wird [93,94]. Auf ausdifferenzierten, gesunden Zellen kommen diese Liganden in der Regel nicht vor. Die Bindung von NKG2D bewirkt eine Aktivierung der NK-Zellen, erhöht deren Zytotoxizität und regt die Zytokinsekretion an [95].

Ebenfalls MHC-unabhängig und aktivierend wirken die natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren, NCRs (*natural cytotoxicity receptors*), auf NK-Zellen. Bisher sind NKp30, NKp44 und NKp46, sowie neuerdings auch NKp80, auf NK-Zellen bekannt, die entsprechenden Liganden konnten wiederum nur teilweise identifiziert werden. So interagiert beispielsweise NKp80 mit AICL (*activation-induced C-type lectin*), einem Marker auf myeloiden Zellen, und erlaubt

damit die gegenseitige Aktivierung von NK-Zellen und anderen Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Monozyten, Makrophagen und Granulozyten, zur Initiierung der Immunantwort gegen Infektionen [96]. Im Mai 2017 wurde außerdem von der Gruppe um Vivier *et al.* publiziert, dass NKp46 an den löslichen Komplementfaktor P binden kann [97], was vor allem bei der Kontrolle von Meningokokkeninfektionen eine Rolle spielt. Für NKp46 ist außerdem vor allem die Bindung an virales Hämagglutinin und an virale Hämagglutinin-Neuraminidase beschrieben [98,99]. Bekannt ist ebenfalls, dass membrangebundenes Heparansulfat auf Zielzellen mit NCRs interagiert und als akzessorisches Molekül unterstützend wirkt, die Entdeckung konkreter tumorassoziierter Liganden steht jedoch größtenteils noch aus. Auch NKp44, welches nur auf aktivierten NK-Zellen vorhanden ist, bindet Hämagglutinin und an Hämagglutinin-Neuraminidase, aber ebenso an tumorale Zielstrukturen [100]. NKp30 spielt in der Tumorabwehr eine Rolle und ist zum Einen im Zusammenspiel mit anderen NCRs an der Erkennung und Lyse von Tumorzellen beteiligt, zum Anderen vermittelt es den Kontakt zu Dendritischen Zellen (DC) [101–104]. Auf Tumorzellen konnte B7H6 als stimulierender Ligand von NKp30 identifiziert werden [105].

Zusätzlich zu den regulatorischen Rezeptoren, können NK-Zellen auch die Todesrezeptoren Fas-Ligand (Fas-L) und TRAIL exprimieren, die entsprechenden Gegenstücke, Fas und TRAIL-Rezeptor werden von gestressten Zellen oder Zellen in entzündetem Gewebe exprimiert. Die Bindung von Fas-L und TRAIL an ihre Rezeptoren löst in der Zielzelle eine Signalkaskade über Kaspasen aus, die direkt in der Apoptose, dem programmierten Zelltod, der Zielzelle resultiert [106,107].

Ein weiterer Wirkmechanismus der NK-Zellen gleicht dem von zytotoxischen CD8^{pos} T-Zellen und verläuft über die Ausschüttung von apoptoseinduzierenden Enzymen. Durch Aktivierung der NK-Zelle erfolgt die Exozytose intrazellulärer Granula in Richtung der Zielzelle und die zytolytischen Enzyme, vor allem Perforine und Granzyme, werden in die immunologische Synapse, der Kontaktstelle zwischen Ziel- und NK-Zelle, sekretiert. Dabei integrieren Perforinmoleküle in die Membran der Zielzellen und bilden dort durch Oligomerisierung Poren aus, durch die wiederum Serinproteasen wie Granzyme in die Zielzelle gelangen und dort über Kaspasen vermittelt Apoptose auslösen [108,109].

Anders als bei T-Zellen erfordert die Aktivierung von NK-Zellen keine vorhergehende Sensibilisierung und erfolgt unabhängig von einer Antigen-Rezeptor-Bindung. Stattdessen wird ihre Funktion durch die Balance der Signale von aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren reguliert [110]. Dabei gibt es verschiedene Szenarien, die zu Aktivierung der NK-

Zelle und Ausführung ihrer Funktion führen können, diese sind in Abb. 1-4 dargestellt. Bereits in den 1980er Jahren wurde beobachtet, dass Tumorzellen durch syngene, das heißt genetisch identische, NK-Zellen angegriffen werden, wenn sie keine MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche tragen [111]. In diesem Fall fehlen die inhibitorischen Signale durch ausbleibende MHC-Bindung und aktivierende Signale führen zu umgehender Aktivierung zytotoxischer NK-Zellfunktion. Diese Situation wird *Missing-Self* genannt, da sich krankhafte, veränderte Zellen nicht mehr als körpereigen identifizieren können, sondern als fremd und gefährlich erkannt werden. Bei gesunden Zellen wirken die Signale inhibitorischer KIRs bei Erkennung körpereigener MHC-Moleküle Signalen aktivierender Rezeptoren entgegen, blockieren so die Aktivierung der NK-Zelle und schützen das gesunde Gewebe.

Jedoch kann es auch in Anwesenheit von MHC-Molekülen auf der Zielzelloberfläche zum Angriff durch NK-Zellen kommen, wenn genügend aktivierende Rezeptoren an ihre Liganden binden und so die aktivierenden Signale gegenüber den inhibitorischen Signalen überwiegen.

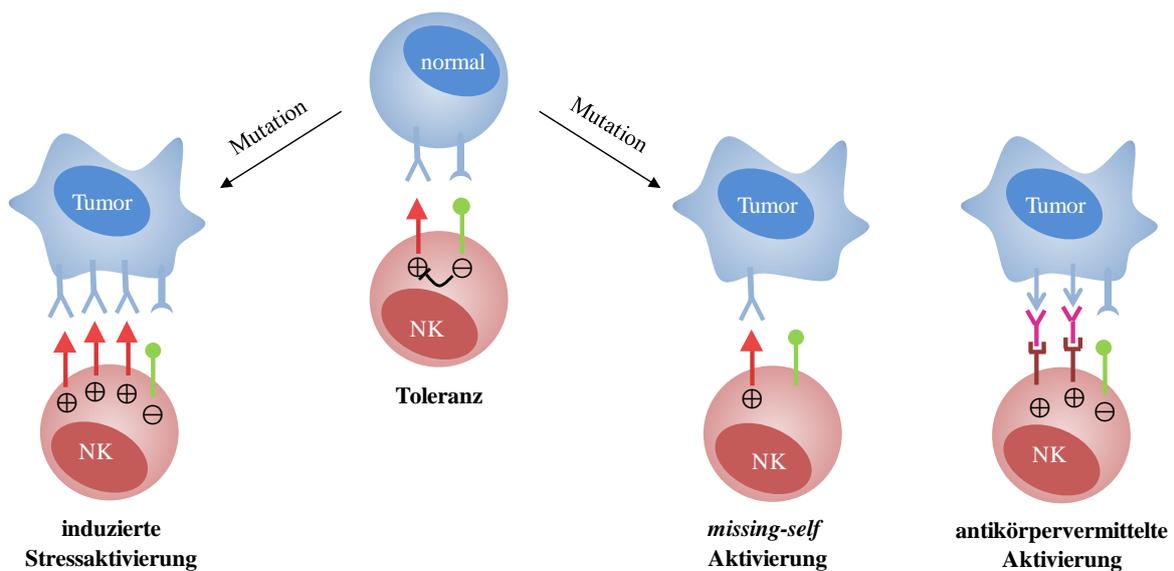


Abb. 1-4 Szenarien der NK-Zellaktivierung Steht die NK-Zelle normalem, gesundem Gewebe gegenüber, so wird sie durch die gleichzeitige Ligation aktivierender und inhibitorischer Rezeptoren gehemmt und bleibt tolerant. Durch Mutationen können jedoch Tumorzellen entstehen, die induzierte Stressliganden überexprimieren. Diese werden von aktivierenden Rezeptoren auf der NK-Zelle erkannt und führen zu überwiegend aktivierenden Signalen innerhalb der NK-Zelle. Alternativ können bei der Entstehung maligner Zellen die Selbstantigene verloren gehen, die Hemmung der NK-Zelle durch Ligation inhibitorischer Rezeptoren unterbleibt somit und die Signale durch aktivierende Rezeptoren dominieren und es kommt zur *missing-self* Aktivierung. Zusätzlich zur direkten Tumorerkennung durch NK-Zellrezeptoren können spezifische Antikörper an Tumorantigene binden und anschließend über ihren Fc-Teil von CD16^{pos} NK-Zellen erkannt werden. Die vom FcγRIII (CD16) weitergeleiteten Signale führen ebenfalls zu Aktivierung der NK-Zelle.

1.3.1 Adoptive NK-Zelltherapie

Die Wahl der MHC-KIR-Kompatibilität kann Einfluss auf den klinischen Effekt adoptiv transferierter NK-Zellen haben. So wurden zunächst Ansätze mit autologen, also patienteneigenen, NK-Zellen mit Unterstützung des Zytokins Interleukin (IL-) 2 verfolgt. Diese haben den Vorteil, dass das Risiko einer GvHD minimal ist, daher keine immunsupprimierende Vorbehandlung notwendig ist und damit auch das Risiko einer transplantatinduzierten Infektion gering gehalten wird. Die Patienten vertrugen, abgesehen von IL-2-induzierten Nebenwirkungen, die NK-Zellen gut, auch in höheren Dosen, jedoch konnten keine Verbesserungen durch die NK-Zellgabe festgestellt werden [112]. Durch intensive Vorbehandlung mit Immunsuppressiva und zusätzliche IL-2-Administration konnte zwar die Detektion von NK-Zellen im Patientenblut verlängert werden, aber nichts davon führte zu einer tatsächlichen klinischen Verbesserung oder resultierte in einer nachweisbaren Antitumorwirkung [113]. Trotz vielversprechender Daten aus *in vitro* Versuchen und teilweise präklinischen Studien, konnte auch die Kombination mit Antikörpern zur Blockierung inhibitorischer KIR-Signale oder zur Steigerung der ADCC sowie mit Proteosom- oder Histondeacetylaseinhibitoren zu keiner klinischen Verbesserung des autologen NK-Zelltransfers führen [114–116]. Stattdessen machten sich Forscher die „nicht-selbst“-Erkennung durch NK-Zellen zunutze und gingen dazu über, den adoptiven Transfer auch in allogenen Ansätzen zu testen.

Vor allem bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) zeigte sich ein Erfolg durch Transplantation von Stammzellen alloreaktiver Spender im Vergleich zu Zellen nicht-alloreaktiver Spender [53,117]. Weitere Studien mit anderen Tumorentitäten zeigten wiederum keine anti-tumoralen Effekte, konnten aber zur Bestätigung der Sicherheit allogener NK-Zellprodukte beitragen. Wichtigstes Sicherheitskriterium ist dabei, die Anzahl koinfundierter T- und B-Zellen durch vorausgehende CD3- bzw. CD19-Depletion gering zu halten, um die Risiken einer GvHD oder einer Epstein-Barr-Virus induzierten lymphoproliferativen Störung gering zu halten [118]. Andererseits ist es möglich nach allogener Stammzelltransplantation im HLA-passenden Ansatz NK-Zell-angereicherte Lymphozytenprodukte mit einer etwas höheren Anzahl an T-Zellen zu verabreichen als im haploidenten Ansatz (halbpassend, von einem verwandten Spender) [119]. Die aggressive Depletion von lymphoiden und myeloiden Zellen resultierte auch zwei Wochen nach Applikation in detektierbare NK-Zellniveaus im peripheren Blut. Vermutlich führte die verminderte Konkurrenz um IL-15 zu höheren Serumspiegeln, die die Proliferation von NK-

und CD8^{pos} T-Zellen *in vivo* unterstützten [120]. Je länger die NK-Zellen nachweisbar blieben, desto größer war der Therapieerfolg und sogar Hochrisiko-AML Patienten wiesen eine komplette Remission auf [121]. Die NK-Zellen wurden in solchen Behandlungen gut vertragen und zeigten auch bei ähnlichen Einsätzen gegen Leukämien, Non-Hodgkin-Lymphomen, sowie Brust-, Eierstock- und Lungenkarzinomen Wirkung [122–124].

Auch, wenn diese Ansätze die Sicherheit und Wirksamkeit von NK-Zellen zeigen, bleiben doch Limitationen wie die geringe Anzahl verfügbarer Zellen und die Überwindung der Suppressionsmechanismen von Tumoren bisher bestehen.

Um den klinischen Nutzen von NK-Zellen zu optimieren gibt es zahlreiche Strategien, die die Balance zwischen aktivierenden und inhibitorischen Rezeptoren beeinflussen oder die Interaktion mit anderen Immunzellen [125]. Die NK-Zellstimulation und –expansion mit Zytokinen, vor allem mit Gammakettenzytokinen, kann viele dieser optimierenden Faktoren bewirken und somit die Funktionalität von NK-Zellen regulieren [126,127].

1.3.2 NK-Zellexpansion mittels Gammakettenzytokinen

Die Quellen allogener NK-Zellen sind vielfältig und reichen von Zelllinien, wie NK-92, die vor Applikation bestrahlt werden müssen um ungehemmtes Wachstum im Patienten zu vermeiden, über Stammzellen, Nabelschnurblutstammzellen und induzierte Stammzellen, die zu NK-Zellen differenziert werden müssen, zu mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs), welche bisher die Hauptquelle darstellen und auf die auch in der vorliegenden Arbeit zurückgegriffen wurden [128]. Da diese nur in begrenztem Maße verfügbar sind, müssen Methoden gefunden werden sie effizient zu vermehren und ihre Funktionalität zu steigern. In diesem Zusammenhang bietet die *ex vivo* Expansion von NK-Zellen vor Injektion in den Patienten eine großartige Möglichkeit die Zahl applizierbarer Zellen zu erhöhen, sie zu aktivieren und ihre anti-tumoralen Eigenschaften zu modifizieren.

In vielen Ansätzen werden während der Kultivierung Hilfszellen, wie z. B. akzessorische mononukleäre Zellen des peripheren Blutes oder genetisch veränderte Feederzellen, zugegeben um die Anzahl der NK-Zellen zu steigern. In diesen Fällen müssen jedoch weitreichende regulatorische Aspekte mit berücksichtigt werden, da die Präsenz solcher Hilfszellen im finalen, injizierten Produkt wiederum zu Nebenwirkungen wie der GvHD oder einer ungehinderten Vermehrung genmodifizierter Zellen zur Folge haben kann [129]. Regulatorisch unbedenklicher und in ersten klinischen Ansätzen in Deutschland bereits

erprobt ist die NK-Zellexpansion durch Applikation einzelner Zytokine zur Zellkultur [130]. Durch die Zugabe von Zytokinen können NK-Zellen zur Proliferation angeregt und ihre zytotoxische Funktion aktiviert werden. Die Verwendung von Zytokinen der IL-2-Familie bzw. sogenannter Gammakettenzytokine, darunter vor allem IL-2, IL-15 und IL-21, wurden zu einem der wichtigsten und intensivst erforschten Gebiete in der adoptiven Immunzelltherapie. Abb. 1-5 fasst die Quellen dieser drei Zytokine zusammen und zeigt den schematischen Aufbau der entsprechenden Rezeptoren, sowie die Auswirkungen durch ihre Ligation.

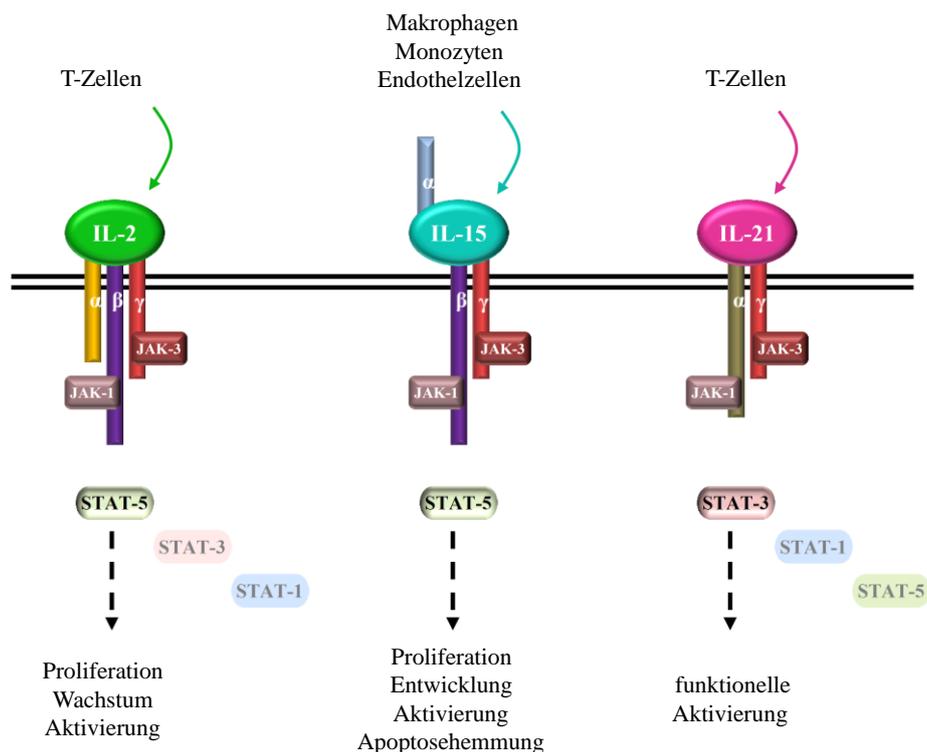


Abb. 1-5: Schematischer Aufbau der Gammakettenrezeptoren zur Bindung der Zytokine IL-2, IL-15 und IL-21 und ihre Wirkung. Allen Rezeptoren ist die γ -Kette gemeinsam. Der IL-2- und IL-15-Rezeptor teilen sich außerdem die β -Kette, ihre Signalkaskaden sind daher ähnlich und beide verlaufen hauptsächlich über STAT-5. Beiden wird eine ähnliche Wirkung zugeschrieben, die Zellwachstum und -aktivierung beinhalten, IL-15 fördert zudem das Überleben von Immunzellen. Der IL-21-Rezeptor ist ein Heterodimer aus der gemeinsamen Gammakette und der IL-21R α -Kette. Dieser Rezeptor signalisiert vorrangig über STAT-3 und unterscheidet sich daher stärker von den anderen beiden. Die Aktivierung über IL-21 ist kontrovers diskutiert, deutet aber auf eine gesteigerte Funktionalität hin. Eigene Abbildung in Anlehnung an Sim *et al.* [126]

Erste Versuche der Gruppe um Rosenberg dienten der Generierung von lymphokinaktivierten Killerzellen (LAK-Zellen). Diese mit IL-2 stimulierte heterogene Zellpopulation war fähig autologe Tumorzellen anzugreifen, wobei der anti-tumorale Effekt vorrangig den enthaltenen NK-Zellen zugeschrieben wurde [131,132]. In der klinischen Anwendung überstieg die

Antitumorantwort dieses IL-2-aktivierten Zellprodukts allerdings nicht die der Monotherapie mit IL-2 [133].

IL-2, zunächst auch bekannt als T-Zellwachstumsfaktor (*T cell growth factor*), ist seit über 40 Jahren das meist studierte Zytokin, welches der Familie auch ihren Namen gab. Es wird vor allem durch antigenaktivierte CD4^{POS} und CD8^{POS} T-Zellen produziert und spielt eine zentrale Rolle in der Proliferation von T- und NK-Zellen. Auf diesen bindet es an einen Rezeptor, der sich aus drei Untereinheiten, der IL-2R α -Kette, der IL-2R β -Kette und der IL-2R γ -Kette, zusammensetzt. Die IL-2R α -Untereinheit wird nicht nur von NK-Zellen exprimiert, sondern auch von diversen anderen Immunzellen. Vor allem regulatorische T-Zellen (T_{reg}-Zellen) haben ein hohes Expressionsniveau von IL-2R α und IL-2R β und können somit IL-2 höchst effizient aufnehmen. Darin findet sich auch eine mögliche Begründung für die Limitation der IL-2-Monotherapie und der Anwendung von IL-2 auf eine gemischte Population peripherer Blutlymphozyten.

In den 1990er Jahren wurde postuliert, dass das Überleben von NK-Zellen von einem weiteren Zytokin, das ebenfalls an die IL-2R β - und IL-2R γ -Einheit bindet, abhängt und jenes als IL-15 identifiziert [134–136]. Das 14 bis 15 kDa große Zytokin ist strukturell eng verwandt mit IL-2 und hat dementsprechend ähnliche Effekte auf Immunzellen [134,135,137,138]. Dennoch gibt es bedeutende Unterschiede zwischen den beiden Zytokinen. Anders als IL-2 hat IL-15 keine bekannten Effekte auf T_{reg}-Zellen, spielt keine Rolle im aktivierungsinduzierten Zelltod von T-Zellen und induziert somit auch keine Immuntoleranz, fördert aber dafür das Langzeitüberleben und ist an der Ausbildung von Gedächtniszellen beteiligt [139–143]. Im Gegensatz zu IL-2 wird IL-15 nicht von T-Zellen, sondern von dendritischen Zellen, Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen sowie Nierenepithelzellen produziert [144–148]. Die dritte, IL-15 bindende Rezeptoreinheit IL-15R α , kann von NK-Zellen selbst *cis*-präsentiert oder von diversen anderen Zellen des Immunsystems, wie B-, T-, NKT- und dendritischen Zellen oder Monozyten und Makrophagen, *trans*-präsentiert werden. Außerdem wird sie von nicht immunologischen Geweben wie Herz-, Leber-, Lungen-, Milz-, Skelettmuskulatur- und Endothelzellen exprimiert [149–151]. All diese Eigenschaften von IL-15 können darauf schließen lassen, dass es vor allem während der Reaktionsphase des angeborenen Immunsystems produziert und in der frühen Phase der NK-Zellexpansion benötigt wird.

In seiner Ähnlichkeit zu IL-2 propagiert IL-15 die Proliferation und die Entwicklung von T- und NK-Zellen, fördert ihr Überleben und erhöht ihre zytotoxische Wirkung [136,152]. Auch

IL-15 reguliert die NCRs, sowie den frühen Aktivitätsmarker CD69 auf NK-Zellen hoch und steigert ihre Zytotoxizität gegen primäre Blasten akuter lymphatischer Leukämie. Ebenso konnte gegen das solide RMS eine verstärkte lytische Wirkung IL-15-stimulierter NK-Zellen festgestellt und auf eine erhöhte Expression von NCRs, NKG2D und DNAM-1 zurückgeführt werden [153]. Zudem wurde die klinische Sicherheit angereicherter und IL-15-expandierter NK-Zellen 2010 in einer Phase I Studie an Lungenkrebspatienten in fortgeschrittenem Stadium demonstriert [123].

Auch IL-21 gehört zur IL-2-Zytokinfamilie und wird durch einen heterodimeren Rezeptor aus der allgemeinen IL-2R γ -Kette und der spezifischen IL-21R α -Kette, die auch auf NK-Zellen vorkommt, gebunden [127]. Das Zytokin wird von aktivierten CD4^{pos} T-Zellen gebildet, tritt dementsprechend physiologisch in der späten Phase, mit der adaptiven Immunantwort, auf den Plan [154]. Die Effekte von IL-21 sind kontrovers diskutiert [155]. Einerseits ist bekannt, dass es an der Entwicklung von NK-Zellen aus Vorläuferzellen des Knochenmarks und auch an der funktionellen Reifung der Zellen beteiligt ist [156], dabei kann es neben der Proliferation auch die Sekretion und die zytotoxische Wirkung, sowie die antikörperabhängige Zytotoxizität (ADCC) in Verbindung mit Cituximab auf Pankreaskarzinomzellen steigern [157–159]. Auf der anderen Seite gibt es Berichte, dass es in Mäusen die Zellexpansion dämpft und in humanen NK-Zellen Apoptose auslöst und somit zu einer Verkürzung ihrer Lebenszeit *in vitro* führt [154,160]. Vor diesem Hintergrund haben der Zeitpunkt und die Zeitspanne, in der die NK-Zellen dem IL-21 ausgesetzt sind, kritischen Einfluss auf die *ex vivo* Expansion. So zeigten der kontinuierliche oder zeitlich limitierte Einsatz von IL-21 in Kokulturen von NK-Zellen mit Feederzellen drastische Unterschiede in Bezug auf Expansionsrate, Phänotyp und Funktionalität [161]. Die optimale Kombination mit weiteren γ -Kettenzytokinen sowie die effiziente Terminierung der Zugabe von IL-21, um vorrangig seine positiven Effekte nutzbar zu machen und negative Einflüsse zu vermeiden, steht für aufgereinigte NK-Zellprodukte noch aus und soll in der vorliegenden Arbeit behandelt werden.

1.4 KOMBINATION VON RADIOTHERAPIE UND IMMUNZELLTHERAPIE

Um den prinzipiellen Einsatz optimal expandierter NK-Zellen gegen das schwer behandelbare Rhabdomyosarkom zu testen, wurde ein Xenograftmodell von humanen Rhabdomyosarkomzellen in NOD/SCID IL-2R γ ^{-/-} (NSG) Mäusen etabliert. Der NSG-Mausstamm wurde von Leonard Shultz im *Jackson Laboratory* entwickelt und bildet keine

eigenen T- oder B-Zellen und auch keine NK-Zellen aus [162]. Zudem ist auch das angeborene Immunsystem der Tiere mit multiplen Funktionsausfällen verbunden, so dass sie einen guten Modellorganismus zur Testung humaner Immunzellen darstellen [163]. In Anlehnung an das klinische Behandlungsprotokoll, wurden die Tiere nach Tumoretablierung einer lokalen Radiotherapie mit ionisierender Strahlung unterzogen, bevor der Einsatz der *ex vivo* expandierten NK-Zellen gegen die verbleibenden, strahlungsresistenten Tumorzellen erfolgte.

Im Milieu des Tumors finden sich oft immunsuppressive Zytokine, wie beispielsweise IL-10 und TGF- β , die vom Tumor selbst gebildet werden und ihn durch Inhibierung zytotoxischer Immunzellen schützen [164,165]. Die Bestrahlung des Tumorgewebes kann die Bildung von Neoantigenen und immunstimulierender Zytokine wie IFN- γ anregen und so die Immunzellinfiltration des malignen Gewebes erleichtern. Wie sich zeigte, regulieren bestrahlte Tumorzellen NKG2D-Liganden auf ihrer Oberfläche hoch, wodurch die NK-Zellaktivität in solchen Geweben gesteigert wird [166,167]. Ames *et al.* demonstrierte außerdem vor Kurzem einen NK-zellvermittelten zytotoxischen Effekt gegen durch Strahlung hervorgerufene Stammzellen diverser Tumorzelllinien sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Auch auf diesen Zellen waren im Vergleich zu ihren nicht bestrahlten Versionen NKG2D-Liganden hochreguliert [168]. Sogar ungerichtete Ganzkörperbestrahlung steigerte die Infiltration und Akkumulation von NK-Zellen im malignen Gewebe, wo diese proliferierten und mindestens drei Monate lang im Gewebe persistierten und somit zu einem verzögerten Wachstum etablierter Tumore führten [169].

Nebst aller positiver Effekte ionisierender Strahlung, die zur Tumorkontrolle beitragen, kann allerdings auch die Sekretion von TGF- β in der Tumorköhle ansteigen, damit den Epithel-Mesenchym-Übergang (*epithelial-mesenchymal-transition*, EMT) induzieren und so zu Tumorinvasion und Metastasierung führen. Dieser Umstand ist auch von klinischer Bedeutung, da Radiotherapie zwar die lokale Tumorkontrolle fördert, aber Rezidive, die am Bestrahlungsort entstehen, häufig mit einem hohen Metastasierungsrisiko einhergehen [170–172]. Durch die intravenöse Injektion *ex vivo* expandierter NK-Zellen unmittelbar nach Beendigung der Strahlentherapie, kann gegebenenfalls dieser Aspekt zusätzlich adressiert werden.

1.5 ZIELSTELLUNG

NK-Zellen stellen ein vielversprechendes Werkzeug in der Bekämpfung maligner Erkrankungen dar. Die natürliche Zytotoxizität gegen bösartig veränderte Zellen und die gleichzeitige Unterdrückung der gefürchteten Abstoßungsreaktion, GvHD, nach allogenen Immunzelltransfer, macht die adoptive NK-Zelltherapie zu einer vielversprechenden Therapieoption. Um die Zellen in ausreichender Menge unter Erhaltung oder möglichst Steigerung ihrer funktionellen Wirkung zu generieren, gibt es zahlreiche Methoden. Viele dieser Strategien setzen auf den Einsatz von sogenannten Feederzellen in Kokultur mit den NK-Zellen, haben aber den Nachteil, dass sie, bevor das NK-Zellprodukt verwendet werden kann, aus der Zellsuspension wieder entfernt werden müssen. Dennoch konnten bei Verwendung solcher Feederzellen unter Zugabe von Gammakettenzytokinen große Mengen an NK-Zellen hergestellt werden. Dabei wird die Wirkung von IL-21 kontrovers diskutiert, scheint aber bei gezielter Terminierung die Ausbeute und die NK-Zellaktivität zu steigern.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Gammakettenzytokine IL-2, IL-15 und IL-21, einzeln oder in Kombination zur Expansion reiner NK-Zellen zu nutzen und dabei auf die Verwendung von Feederzellen zu verzichten. Aus den getesteten Expansionsprotokollen sollte das effektivste identifiziert und weiter analysiert werden. Hauptaugenmerk lag dabei auf dem Expansionspotential der NK-Zellen und ihrer zytotoxischen Aktivität gegen Tumorzellen, vor allem für den Einsatz gegen das Rhabdomyosarkom. Begleitend wurden die expandierten Zellen phänotypisch charakterisiert und die Auswirkungen spezifischer Expansionsprotokolle auf die NK-Zellen untersucht. Im Zuge dessen sollte der Mechanismus, durch den die gesteigerte lytische Funktion nach Administration von IL-21 vermittelt wurde, weiter aufgeklärt werden.

In weiteren Versuchen sollten die NK-Zellen mit einem Zwei-Phasen-Protokoll, bestehend aus einer initialen IL-15-Proliferationsphase mit einem abschließenden dreitägigen IL-21-Boost, expandiert und die Funktion des so generierten Zellprodukts schließlich im lebenden System getestet werden. Dazu musste ein Xenograftmodell mit humanen Rhabdomyosarkomzellen in Mäusen für Analysen mittels Biolumineszenzbildgebung etabliert werden. Um einem klinischen Behandlungsprotokoll möglichst nahe zu kommen, sollten die NK-Zellen zudem in Kombination mit ionisierender Strahlung gegen die Tumore eingesetzt und ihre zusätzliche wachstumshemmende Wirkung gezeigt werden.

2 MATERIAL

2.1 BIOLOGISCHES MATERIAL

2.1.1 Tiere

Im Rahmen der *in vivo* Studien wurden NOD/Scid/IL2R $\gamma^{-/-}$ Mäuse (NSG Mäuse) mit dem Genotyp NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ verwendet. Die Tiere wurden entweder von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen oder stammten aus der Zucht des Georg-Speyer-Hauses (Frankfurt am Main, Deutschland) oder aus eigener Zucht bei mfd Diagnostics GmbH (Wendelsheim, Deutschland). Während der Versuche wurden die Mäuse in den entsprechenden Räumlichkeiten des Georg-Speyer-Hauses gehalten.

2.1.2 Zellen und Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden die in Tab. 2-1 zusammengefassten humanen Zellen und Zelllinien sowie Bakterien verwendet.

Tab. 2-1 Auflistung der verwendeten Zellen und Zelllinien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Primäre Natürliche Killerzellen, human	Angereichert aus Leukozytenpräparaten gesunder Spender, DRK-Blutspendedienst, Frankfurt/M, Deutschland
HEK293T (humane derivative embryonale Nierenzelllinie)	ATCC, American Type Culture Collection in Partnerschaft mit LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland
K562 (humane erythromyeloblastoide Leukämiezelllinie)	ATCC, American Type Culture Collection in Partnerschaft mit LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland
RD (humane embryonale Rhabdomyosarkomzelllinie)	ATCC, American Type Culture Collection in Partnerschaft mit LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland

MATERIAL

Bezeichnung	Bezugsquelle
RH30 (humane alveoläre Rhabdomyosarkomzelllinie)	ATCC, American Type Culture Collection in Partnerschaft mit LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland
<i>Escherichia coli</i> TOP10	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland

2.1.3 Plasmide

Die für die vorliegende Arbeit genutzten Plasmide sind in Tab. 2-2 zusammengefasst.

Tab. 2-2 Auflistung aller verwendeter Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung	Bezugsquelle
pSL2GW	Abgeleitet von pSEW, wobei GFP durch Luciferase-GFP, getrennt durch eine T2A Schnittstelle, ersetzt wurde [173]	Arbeitsgruppe Buchholz, Paul- Ehrlich-Institut, Langen (Hess.), Deutschland
pMDLg/pRRE	HIV-1 GAG/POL; kodiert für Hauptstrukturproteine und Retrovirus- spezifische Enzyme unter Kontrolle eines CMV-Promotors und des β -Globin poly A-Signals, ohne rev-Gen	Arbeitsgruppe Beilhack, Experimentelle Stammzelltransplantation, Universitätsklinikum Würzburg
pRSV-Rev	zweites und drittes Exon von HIV-1 rev miteinander verbunden unter Kontrolle des RSV U3 Promotors	Arbeitsgruppe Beilhack, Experimentelle Stammzelltransplantation, Universitätsklinikum Würzburg
pMD2.G	VSV-G inseriert in Exon 3 des humanen β -Globingens unter Kontrolle eines CMV-Promotors und des β -Globin poly A-Signals	Arbeitsgruppe Beilhack, Experimentelle Stammzelltransplantation, Universitätsklinikum Würzburg

2.1.4 Antikörper

Für die hier beschriebenen Untersuchungen wurden die in Tab. 2-3 zusammengefassten Antikörper verwendet.

Tab. 2-3 Auflistung aller angewandter Antikörper. Die Spezifitäten der Antikörper richteten sich, wenn nicht anders vermerkt, gegen humane Antigene.

Ms: Maus; Gt: Ziege; Rbt: Kaninchen; rh: rekombinant human

Spezifität	Fluorochrom	Klon	Isotyp	Hersteller
CD3	APC	UCHT1	Ms IgG1, κ	Biolegend
CD3	BV421	UCHT1	Ms IgG1, κ	BD Biosciences
CD14	BV421	M ϕ P9	Ms IgG2b, κ	BD Biosciences
CD16	PE-Cy7	3G8	Ms IgG1, κ	Biolegend
CD16	PE	3G8	Ms IgG1, κ	Biolegend
CD19	PerCP	HIB19	Ms IgG1, κ	Biolegend
CD19	BV421	HIB19	Ms IgG1, κ	BD Biosciences
CD25	PE	2A3	Ms IgG1	BD Biosciences
CD45	PE	HI30	Ms IgG1	Invitrogen
CD45	BV510	HI30	Ms IgG1, κ	BD Biosciences
CD56	FITC	HCD56	Ms IgG1, κ	Biolegend
CD56	APC-A700	N901	Ms IgG1	BeckmanCoulter
CD62L	APC	DREG-56	Ms IgG1, κ	BD Biosciences
CD69	BV605	FN50	Ms IgG1, κ	BD Biosciences
CD94	PerCP-Vio700	REA113	rh IgG1	Miltenyi
CD95 (Fas)	FITC	DX2	Ms IgG1, κ	Biolegend
CD107a	APC-H7	H4A3	Ms IgG1, κ	BD Biosciences
CD158e/k	PE	5.133	Ms IgG1	Miltenyi
CD159a (NKG2A)	APC	Z199	Ms IgG2b	Beckman Coulter
CD314 (NKG2D)	APC	1D11	Ms IgG1, κ	BD Biosciences
CD335 (NKp46)	APC	9,00E+02	Ms IgG1	Miltenyi
CD336 (NKp44)	PE	p44-8.1	Ms IgG1, κ	BD Biosciences
CD337 (NKp30)	FITC-Alexa488	210845	Ms IgG2a	R&D Systems
CD197 (CCR7)	FITC	150505	Ms IgG2a	R&D Systems
CD184 (CXCR4)	PE-Cy7	12G5	Ms IgG2a, κ	BD Biosciences
CD226 (DNAM-1)	FITC	DX11	Ms IgG1	BD Biosciences

MATERIAL

Spezifität	Fluorochrom	Klon	Isotyp	Hersteller
CD262 (TRAIL-R)	PE	DJR2-4	Ms IgG1, κ	Biolegend
CX ₃ CR1	PerCP eFluor	2A9-1	Rat IgG2b, κ	eBioscience
Granzym B		2C5	Ms IgG1	Santa Cruz
IgG (Maus)	APC		Gt IgG	Jackson
IgG (Kaninchen)	HRP	poly	Gt IgG	Sigma-Aldrich
IgG1			Ms IgG1	R&D
IgG2a			Ms IgG2a	R&D
KIR2D	FITC	NKVFS1	Ms IgG1	Miltenyi
MICA		AMO1	Ms IgG1	Steinle, IMM [174]
MICB		BMO2	Ms IgG2a	Steinle, IMM [174]
Perforin			Ms IgG2a	LifeSpan BioSciences
IgG (Maus)	HRP	poly	Rbt IgG	Sigma-Aldrich
ULBP1		AUMO3	Ms IgG1	Steinle, IMM [80,175]
ULBP2		BUMO1	Ms IgG1	Steinle, IMM [175]
ULBP3		CUMO3	Ms IgG1	Steinle, IMM [80,174,175]
ULBP4		3B6	Ms IgG1	Steinle, IMM [80]
γ -Tubulin		DQ-19	Rbt IgG1	Sigma-Aldrich

2.2 MEDIEN UND PUFFER

Im Folgenden sind alle verwendeten Medien und Puffer aufgelistet (Tab. 2-4).

Tab. 2-4 Auflistung der verwendeten Medien und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
DMEM10 ⁺⁺	DMEM + 10% FKS + 1% L-Glutamin + 1% Penicillin/ Streptomycin
EasySep Puffer	DPBS (Ca ²⁺ - and Mg ²⁺ -frei) + 2% FKS + 1 mM EDTA
FACS Puffer	Cell Wash + 0,5% BSA + 0,01% NaN ₃

MATERIAL

Bezeichnung	Zusammensetzung
Luria-Bertani (LB-) Medium	5 g NaCl + 5 g Hefeextrakt + 10 g Trypton gelöst in 1 L <i>A. dest.</i>
HBS	281 mM NaCl + 100 mM HEPES + 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,12
R10++	RPMI 1640 mit GlutaMAX + 10% FKS + 1% Penicillin/ Streptomycin
xVivo++	X-VIVO 10 + 5% HP + 1% Penicillin/Streptomycin

2.3 KITS UND REAGENZIEN

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kamen die im Folgenden gelisteten Kits und Reagenzien zum Einsatz (Tab. 2-5).

Tab. 2-5 Auflistung der verwendeten Kits und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Biolegend, San Diego, USA
Accutase	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Agarose	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Agar-Pulver	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ampicillin	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
<i>Aqua destillata (A. dest.)</i>	B. Braun, Melsungen, Deutschland
BD FACS Clean Solution	BD Biosciences, San Jose, USA
BD FACS Shutdown Solution	BD Biosciences, San Jose, USA
BD FACSTFlow Rinse Solution	BD Biosciences, San Jose, USA
BD FACSTFlow Sheath Solution	BD Biosciences, San Jose, USA
BD Horizon™ Brilliant Stain Buffer	BD Biosciences, San Jose, USA
Biocoll (Dichte 1,077 g/l)	Merck Millipore Ltd., Tullagreen, Irland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Buffy Coats	DRK-Blutspendedienst, Frankfurt/M, Deutschland
CaCl ₂	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

MATERIAL

Bezeichnung	Hersteller
CellTrace CFSE Proliferation Kit	Molecular Probes, Eugene, USA
Cell Wash	BD Biosciences, San Jose, USA
Chloroquin	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Desomed Rapid AF	Dr. Trippen GmbH, Freiburg, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DMEM	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
DPBS (Ca ²⁺ - and Mg ²⁺ -frei)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
EasySep Human NK Cell Enrichment Kit mit Magnet „The Big Easy“	Stemcell Technologies, Vancouver, USA
FKS (fötales Kälberserum)	Invitrogen, Paisley, UK
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt, Deutschland
HEPES	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Humanes Plasma (HP)	DRK-Blutspendedienst, Frankfurt /M, Deutschland
IL-2 (Proleukin S)	Novartis Pharma, Nürnberg, Deutschland
IL-15	Peptotech, Rocky Hill, USA
IL-21	Peptotech, Rocky Hill, USA
Kanamycin	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
L-Glutamin	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
NaCl	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Pancoll human (Dichte 1,077 g/l)	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Paisley, UK
Polybren	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Protein-Molekulargewichtsmarker	Peqlab, Erlangen, Deutschland
RPMI 1640 + GlutaMAX	Invitrogen, Paisley, UK
Trypanblau (0,4%)	Invitrogen, Paisley, UK
TrypLE™ Select ohne Phenolrot	Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-EDTA (0,25%) mit Phenolrot	Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypton	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
UltraPure 0,5 M EDTA, pH 8,0	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland

MATERIAL

Bezeichnung	Hersteller
X-VIVO 10 (ohne Phenolrot)	Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz
Zombie Violet Kit	Biolegend, San Diego, USA

2.4 VERBRAUCHSMATERIAL

Die in Tab. 2-6 beschriebenen Verbrauchsmaterialien kamen in dieser Arbeit zum Einsatz.

Tab. 2-6 Auflistung verwendeter Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
6-Loch-Platten	Corning, Inc. Acton, USA
48-Loch-Platten	Thermo scientific, Waltham, USA
96er-Lochplatten, Rundboden	Corning Inc., Acton, USA
96er-Lochplatten, Flachboden	Corning Inc., Acton, USA
Zellkulturflaschen (50 ml, 25 cm ²)	Greiner Bio-One, Nürtingen, Deutschland
Zellkulturflaschen (250 ml, 75 cm ²)	Greiner Bio-One, Nürtingen, Deutschland
Combitips advanced®	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kryogefäße	Greiner Bio-One, Nürtingen, Deutschland
Drei-Wege-Hähne	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Reaktionsgefäße mit Sicherheitsverschluss (0,5/1,5/2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FACS Röhrchen (5 ml)	Becton Dickinson, Pont de Claix, Frankreich
15-mL-Gefäße	Greiner Bio-One, Nürtingen, Deutschland
50-mL-Gefäße	Greiner Bio-One, Nürtingen, Deutschland
Heidelberger Verlängerung (Luer Lock)	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Incidin-Tücher	Ecolab Healthcare, Monheim/Rhein, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Hycor Biomedical, Garden Grove, USA
Pipetten (0,1-1000 µL)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen (10-1000 µL)	Starlab, Ahrensburg, Deutschland
Pipettierhilfen	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland

MATERIAL

Bezeichnung	Hersteller
Petrischalen (94mm)	Greiner Bio-One, Nürtingen, Deutschland
Polystyrol Rundbodenröhrchen (15 mL)	Becton Dickinson, Pont de Claix, Frankreich
Serologische Pipetten (5-50 mL)	Costar, New York, USA
Spritzen (Luer Lock, 50 mL)	Becton Dickinson, Pont de Claix, Frankreich
Sterilfilter Milltex (0,45 µm)	Merck Millipore Ltd., Tullagreen, Irland
TSCD Wafers	Terumo Corp., Tokyo, Japan

2.5 GERÄTE

Geräte, die im Rahmen dieser Arbeit zu Einsatz kamen, sind in Tab. 2-7 gelistet.

Tab. 2-7 Auflistung verwendeter Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Biolumineszenzgerät IVIS Lumina II	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Durchflusszytometer FACSCantoII	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Durchflusszytometer FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACSCanto™ 10c	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACSCanto™ II	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Fluoreszenzaktivierter Zellsortierer FACSAria™II	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Inkubatoren BBD 6220	Heraeus, Hanau, Deutschland
HeraCell 150i	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
Small Animal Radiation Reserch Platform - SARRP	xStrahl LTD, Camberley, UK
Sterilwerkbänke CleanAir CA/RE4	CleanAir, Haan, Deutschland
HERAsafe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Ultrazentrifuge L8-80M Rotor SW 32 Ti/ swinging bucket	Beckamnn Coulter, Krefeld, Deutschland

MATERIAL

Bezeichnung	Hersteller
Zentrifugen	
Avanti™ J-25	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Biofuge pico	Heraeus, Hanau, Deutschland
Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Mikro 22R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
MiniSpin	Heraeus, Hanau, Deutschland
Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Multifuge 40R	Heraeus, Hanau, Deutschland
neoLab 3-1810	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Rotina 46 R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Rotina 420R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Z 160M	Hermle, Gosheim, Deutschland

2.6 PROGRAMME

In der vorliegenden Arbeit wurden in Tab. 2-8 aufgelistete Programme verwendet.

Tab. 2-8 Auflistung der verwendeten Computerprogramme

Bezeichnung	Hersteller
Living Image	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
BD FACSDiva™	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FlowJo®	FlowJo, LLC, Ashland, USA
Microsoft® Office	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Muri Plan	xStrahl LTD, Camberley, UK
MuriSlice	xStrahl LTD, Camberley, UK
GraphPadPrism	GraphPad Software, La Jolla, USA

3 METHODEN

3.1 ZELLINIENKULTUR

3.1.1 Revitalisierung der Zelllinien

Die Stammkulturen der Zelllinien wurden in 1-mL-Aliquots in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Revitalisierung der Zellen wurde ein solches Aliquot unter ständiger Bewegung und Beobachtung im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und zügig in 5 bis 10 mL vorgewärmten R10++Medium transferiert. Um das im Kryomedium enthaltene DMSO zu entfernen, wurde die Zellsuspension 5 bis 10 min mit 300 xg bei Raumtemperatur zentrifugiert und das Pellet in 10 mL frischen Mediums erneut aufgenommen. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂-Sättigung kultiviert und die folgenden Tage genau beobachtet und bei etwa 80% Konfluenz passagiert.

3.1.2 Subkultivierung der Zelllinien

Die Zellen wurden stets bei 37°C und 5% CO₂-Sättigung kultiviert und alle 3 bis 4 Tage bei etwa 80%iger Konfluenz passagiert. Im Falle von Suspensionszelllinien wurden diese gut resuspendiert und bei einem Farbumschlag des Mediums zu orange neun Zehntel der Kultur aus der Kulturflasche entfernt und mit frischem Medium ersetzt.

Von adhärennten Zellen wurde vorsichtig das Medium entfernt und der Zellrasen mit einigen Millilitern Phosphat-gepufferter Salzlösung (engl.: *Phosphate Buffered Saline*, kurz: PBS) gespült. Anschließend wurden 1 bis 2 mL Trypsin-EDTA-Lösung oder AccutaseTM-Lösung auf der Zellschicht verteilt und für wenige Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die vollständige Ablösung der Zellen von der Substratfläche wurde mittels Mikroskop kontrolliert und gegebenenfalls durch knappe Erschütterung der Kulturschale gefördert werden. Sobald alle Zellen in Suspension waren, wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 3 bis 8 mL Medium gestoppt und eventuell noch vorhandene Zelleverbände durch wiederholtes Pipettieren aufgelöst. Die Zellsuspension wurde dann mit 300 bis 400 xg bei Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert und das Pellet in 1 mL frischen Mediums resuspendiert. Von diesem Milliliter wurde ein Zehntel entnommen und in eine Kulturschale mit 10 bis 15 mL frischem Medium überführt.

3.1.3 Kryokonservierung von Zellen

Für die Langzeitlagerung von Zellen und Zelllinien wurden diese zu 5×10^6 Zellen pro Gefäß im entsprechenden Medium aliquotiert und der Anteil an FKS (fötales Kälberserum) auf etwa 30% erhöht. Um beim Einfrieren die Bildung von Eiskristallen zu minimieren wurden der Zellsuspension 10% DMSO beigefügt und das Gemisch über Nacht mithilfe eines Isopropanol gefüllten Tiefkühlcontainers mit 1°C pro Minute auf -80°C heruntergekühlt. Die 1 bis 2 mL fassenden Kryogefäße wurden dann in Stickstofftanks überführt und dort bei circa -160°C dauerhaft oder bis zum Gebrauch gelagert.

3.2 ANREICHERUNG UND KULTIVIERUNG NATÜRLICHER KILLERZELLEN

Die Natürlichen Killerzellen wurden aus Buffy-Coats gesunder Spender gewonnen. Die Buffy-Coats fallen bei der Herstellung von Frischplasma-Produkten und Erythrozyten- bzw. Thrombozytenkonzentraten aus mit einem Gerinnungshemmer versetztem Vollblut als Nebenprodukt an.

Die Blutproduktbeutel wurden mittels eines Schlauchschweißgeräts mit einer Heidelberger Verlängerung steril zusammengefügt. Über diese Verlängerungsleitung wurde der Blutbeutel mit einem Drei-Wege-Hahn und darüber mit einer leeren und einer PBS-gefüllten Spritze verbunden. Über die leere Spritze wurde der Buffy-Coat aus dem Blutbeutel steril entnommen und auf 50-mL-Gefäße verteilt. Anschließend wurde der Beutel mit dem PBS in zwei aufeinanderfolgenden Schritten gespült und in gleichen Volumina mit den Buffy-Coat-Aliquots vereinigt.

Zur Isolation der Mononukleären Zellen aus dem Peripheren Blut (engl.: *Peripheral Blood Mononuclear Cells*, kurz: PBMCs) wurden die Buffy-Coat-Lösungen mit etwa dem halben Volumen einer Polysucrose-Lösung (Biocoll) unterschichtet und durch Zentrifugation mit $800\times g$ für 20 min bei Raumtemperatur in einem Dichtegradienten aufgetrennt. Die PBMCs sammeln sich in einem weißen Ring an der Grenzschicht zwischen Erythrozyten und Blutplasma. Sie enthalten hauptsächlich Leukozyten und Blutplättchen. Der PBMC-Ring wurde vorsichtig abgenommen und dreimal mit PBS gewaschen. Dazu wurde das Zellpellet aufgeschlämmt und das Gefäß komplett mit PBS aufgefüllt und anschließend 7 min mit $400\times g$ bei Raumtemperatur zentrifugiert. Zum Schluss wurde das Pellet noch einmal in definiertem

METHODEN

Volumen aufgenommen, durch ein Zellsieb mit 100 µm Porengröße größere Zellverbände entfernt und die Zellkonzentration und Gesamtzahl mittels Hämazytometer (COULTER® Ac·T diff™ Analyzer, Beckmann Coulter) ermittelt.

Die PBMCs wurden erneut pelletiert und in einer Konzentration von 1×10^8 Zellen/mL in EasySep Puffer aufgenommen. Die NK-Zellanreicherung wurde durch Negativselektion mit dem EasySep™ Human NK Cell Enrichment Kit der Firma Stemcell erreicht. Zunächst wurden 50 µL/mL Zellsuspension des Enrichment Cocktails, der Dextran-gebundene bispezifische tetramere Antikörperkomplexe enthält, die gegen CD3, CD4, CD14, CD19, CD20, CD36, CD66b, CD123, HLA-DR und Glycophorin A gerichtet sind, zugefügt und für 10 min inkubiert. Anschließend wurden 100 µL/mL Zellsuspension der Dextran-Eisen-Partikel hinzugegeben und weitere 5 min inkubiert. Die Zelllösung wurde abhängig der Zellmenge mit EasySep Puffer auf 5 mL ($< 1 \times 10^8$ PBMCs), 10 mL (1 bis 5×10^8 PBMCs) oder 20 mL ($> 5 \times 10^8$ PBMCs) aufgefüllt und für 2 min 30 sec in den „The Big Easy“ EasySep™-Magneten positioniert. In dieser Zeit wurden alle über die Antikörperkomplexe an Dextran-Eisen-Partikel gebundene unerwünschten Blutzellen im magnetischen Feld an den Rand des Reaktionsgefäßes gezogen und die ungebundenen Zellen konnten in der Lösung vorsichtig in ein frisches 15-mL-Gefäß dekantiert werden. Die Zellkonzentration dieser Lösung wurde erneut mit dem Coulter Act diff Zellzähler ermittelt, die Zellen pelletiert und wiederum zu 2×10^6 Zellen/mL in xVivo++ Medium aufgenommen.

Für die Kultivierung wurden der Zellkultur Interleukin-(IL-)2 zu 100 U/mL oder 1000 U/mL, IL-15 zu 15 ng/mL, IL-21 zu 25 ng/mL oder eine entsprechende Kombination diese Zytokine beigefügt und die Zellen bei 37°C und 5% CO₂-Sättigung kultiviert. Alle 3 bis 4 Tage wurde die Hälfte des Mediums entnommen und durch frisches Medium und der entsprechenden Menge an Zytokinen ersetzt. Die Kultivierung erfolgte abhängig vom Kulturvolumen in 96er-, 48er-, 24er- oder 12er-Lochplatten oder in 25 cm²/50 mL-Suspensionszellkulturflaschen mit Filterdeckel.

3.3 PROLIFERATIONSANALYSE

Proliferationsanalysen erfolgten in 96er-Lochplatten mit U-förmigem Boden in einzelnen 100 µL Volumina, in doppelten Ansätzen. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 2×10^6 /mL unter Zugabe von IL-2 zu 100 U/mL (IL-2¹⁰⁰) oder 1000 U/mL (IL-2¹⁰⁰⁰), IL-15 zu 15 ng/mL (IL-15), IL-21 zu 25 ng/mL (IL-21) oder in entsprechenden Kombinationen IL-

$2^{100}+15$, $IL-2^{100}+15+21$ oder $IL-15+21$ kultiviert. In einem weiteren Ansatz wurden die Zellen mit $IL-15$ kultiviert und jeweils drei Tage vor Ernte und Analyse zusätzlich mit einem $IL-21$ -Boost stimuliert.

Die Auswirkungen der verschiedenen Expansionsansätze wurden an den Tagen 0, 3, 6, 10, 14, 21, 28, 35 und 42 anhand der Zellzahlen, der Vitalität der Zellen und der Kontamination durch andere hämatopoietische Zellen verfolgt. Für die Bestimmung der Zellzahl wurden die einzelnen Kulturansätze resuspendiert und mit Hilfe des Hämazytometers die Anzahl der weißen Blutzellen (*white blood cell count*) ermittelt. Diese Daten wurden in Duplikaten erhoben und die jeweiligen Mittelwerte errechnet. Anschließend wurden die Doppelansätze zusammengeführt und mit Antikörpern gegen folgende Oberflächenantigene markiert: $CD45$ (Leukozytenmarker), $CD19$ (B-Zellmarker), $CD3$ (Marker für T-Zellen und NK ähnliche T-Zellen), $CD56$ (Marker für NK ähnliche T-Zellen, NK-Zellen und NK-Zellsubpopulationen) und $CD16$ (NK-Zellsubpopulationsmarker). Nach einer Inkubationszeit von 10-15 min im Dunkeln bei $4^{\circ}C$, wurden die Zellen mit PBS oder FACS-Puffer gewaschen (Zentrifugation: 5 min, $300 \times g$, Raumtemperatur) und in $350 \mu L$ einer 1:6000 Verdünnung von 4',6-Diamidin-2-phenylindol, kurz DAPI, (1 mg/mL Lagerlösung) resuspendiert. DAPI wurde zur Unterscheidung lebender und toter Zellen verwendet, da es die Membranen toter Zellen schnell, lebender Zellen aber nur sehr langsam durchdringen kann. Im Zellinneren interagiert es mit adenin-/thymineichen Desoxyribonukleinsäureabschnitten und emittiert nach entsprechender Anregung Licht mit einer Wellenlänge von 460 nm. Die so vorbereiteten Zellen wurden dann am Durchflusszytometer (FACSCantoTM 10c, BD Biosciences) gemessen. Die aufgenommenen Daten wurden anschließend mit den Programmen FlowJo[®] und ggf. Excel[®] und GraphPad Prism[®] ausgewertet.

3.4 PHÄNOTYPISIERUNG

3.4.1 Phänotypisierung der NK-Zellen

Um die NK-Zellen nach Expansion näher zu charakterisieren, wurden diese auf verschiedene Oberflächenmarker getestet, die Aussagen über ihren Aktivierungsstatus und ihr Migrationsverhalten erlauben sollten. Immer unter Berücksichtigung der Identifikation von NK-Zellen, als $CD45^{pos}$, $CD56^{pos}$ Zellen unter Ausschluss $CD3^{pos}$, $CD19^{pos}$, $CD14^{pos}$ und toter Zellen und nach Möglichkeit der Unterscheidung von NK-Zellsubpopulationen mithilfe von

CD16 wurden Antikörper gegen die aktivierende Rezeptoren NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46 und DNAM-1, sowie den frühen Aktivierungsmarker CD69 und den späten CD25. Daneben wurden Antikörper gegen die inhibitorisch wirkenden Rezeptor NKG2A und die Rezeptorfamilien KIR2D und KIR3D (CD158 e/k) eingesetzt. Das Migrationsverhalten der Zellen wurde über den Knochenmarkszielmarker CD62L und die Chemokinrezeptoren CCR7, CX3CR1 und CXCR4 sowie die Adhäsionsmoleküle LFA-1 (CD11a) und 4-1BB (CD137) ermittelt.

Nach Ernte der expandierten NK-Zellen wurden diese mit FACS-Puffer gewaschen und die Pellets in 100 µL BD Horizon™ Brilliant Stain Buffer resuspendiert. Durch Zugabe von IgG und Zombie Violet™ konnten unspezifischer Antikörperbindungen blockiert und tote Zellen erkannt werden. Die Zellen wurden so für 15 min dunkel bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend erneut mit FACS-Puffer gewaschen. Wieder in je 100 µL BD Horizon™ Brilliant Stain Buffer gelöst wurden die entsprechenden Antikörper gegen aktivierende und inhibierende Rezeptoren sowie Migrations- und Adhäsionsmoleküle zugegeben und für 20 min dunkel bei 4°C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen in 400 µL FACS-Lösung resuspendiert und am Durchflusszytometer FACSCanto™ 10c gemessen. Die Daten wurden mit FlowJo®, Excel® und GraphPad Prism® ausgewertet.

3.4.2 Phänotypisierung der Tumorzellen

Damit die Reaktionsfähigkeit der NK-Zellen gegen die Zielzellen näher beurteilt werden konnte, wurden die Tumorzellen auf die Expression von NKG2D-Liganden untersucht. Dafür wurden die Zellen zu 100 µL in die Vertiefungen von 96er-Lochplatten pipettiert, mit FACS-Puffer gewaschen und für 20 min bei 4°C mit den Primärantikörpern gegen MIC-A (#AMO1), MIC-B (#BMO2), ULBP-1 (#AUMO3), ULBP-2 (#BUMO1), ULBP-3 (#CUMO3) und ULBP-4 (#α-ULBP43B6) markiert, anschließend dreimal intensiv gewaschen und schließlich noch einmal mit dem Sekundärantikörper GAM-APC für weitere 20 min bei 4°C im Dunkeln gefärbt [80,174,175]. Nach einem weiteren intensiven Waschverfahren wurden die Zellen in 150 µL FACS-Puffer gelöst und am Durchflusszytometer gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm FlowJo®.

3.5 ZYTOTOXIZITÄTSTESTS

Zur Bestimmung der Zytotoxizität der NK-Zellen gegen RMS-Zellen wurden verschiedene Testverfahren ausprobiert, da die photometrisch auswertbaren europium- oder kristallviolett-basierten Analysen nicht zu verlässlichen Ergebnissen führten, wurde ein Versuchsaufbau mit anschließender durchflusszytometrischer Auswertung gewählt.

Die Zytotoxizitätstests wurden in 96er-Rundbodenlochplatten in 200 μ L Volumen angesetzt. Dazu wurden die Zielzellen wie in Absatz 3.1.2 beschrieben geerntet und schließlich in 1 bis 5 mL PBS5 resuspendiert. Die Zellkonzentration wurde mittels Hämazytometer (COULTER® Ac-T diff™ Analyzer, Beckmann Coulter) ermittelt und durch Zugabe der entsprechenden Menge PBS5 auf etwa 2 bis 4 x 10⁶ Zellen/ mL eingestellt. Zur Färbung wurde eine 5 mM CFSE-Lösung in 1000-facher Verdünnung eingesetzt und 5 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension dreimal mit je 10 mL PBS5 gewaschen (Zentrifugation: 5 min, 300 x g, Raumtemperatur), das Zellpellet in definiertem Volumen xVivo++ aufgenommen und erneut die Zellzahl ermittelt. Die Zellkonzentration wurde auf 2,5 x 10⁵/mL eingestellt und in 100 μ L Aliquots in die Vertiefungen der 96er-Lochplatte verteilt.

Die 6 Tage lang mit Zytokinen stimulierten Effektorzellen wurden geerntet und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und ihre Anzahl mithilfe des Hämazytometers bestimmt. Für ein Effektor-zu-Zielzell-Verhältnis von 10:1 wurde zunächst eine Effektorzellsuspension mit der Konzentration 2,5 x 10⁶/mL in xVivo++ angesetzt. Diese wurde für weitere Effektor-zu-Zielzell-Verhältnisse, nämlich 5:1 und 1:1, 2-fach bzw. 10-fach verdünnt und ebenfalls in 100 μ L-Aliquots zu den Zielzellen hinzugefügt. Zur Kontrolle der Spontanlyse, das heißt der natürlichen Sterberate, wurden zu einigen Zielzellen 100 μ L xVivo++ ohne Effektorzellen zugegeben.

Die Koinkubation erfolgte über 2 h (wenn K562-Zellen als Zielzellen eingesetzt wurden) oder über 5 h (wenn RD-Zellen als Zielzellen eingesetzt wurden) bei 37°C und 5% CO₂-Sättigung.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen pelletiert (3 min, 500 x g, rt) und der Überstand dekantiert. Kurz vor der durchflusszytometrischen Messung wurden 50 μ L TrypLE Select Lösung in die Vertiefungen gegeben und die Zellen in einer 1- bis 2-minütigen Reaktionszeit vom Plattenboden abgelöst (- wobei bei Zytotoxizitätsanalysen mit Suspensionszellen dieser Schritt wegfiel). Die Zellsuspension wurde in 350 μ L DAPI-Lösung aufgenommen, in ein Rundbodenröhrchen gegeben und dem Durchflusszytometer zugeführt.

Im FSC-SSC-Plot wurde das Fenster auf fast alle Ereignisse gelegt, nur die Zelltrümmer und kleinere Fragmente wurden ausgeschlossen und nicht mehr im folgenden FSC-A-FSC-H-Plot angezeigt. Aus diesem wurden die vereinzelt vorliegenden Zellen von Dubletten und Zellhaufen isoliert. Das dritte Fenster wurde auf die CFSE gefärbten (im FITC-Kanal sichtbaren) Zielzellen gelegt. In diesem Fenster wurden 4000 Ereignisse aufgezeichnet und der DAPI-positive Anteil im V450-Kanal ermittelt. In **Abb. 3-1** sind exemplarisch die Regionen in den Plots, mithilfe derer die Zielzellen identifiziert und die Sterberate ermittelt wurden, dargestellt.

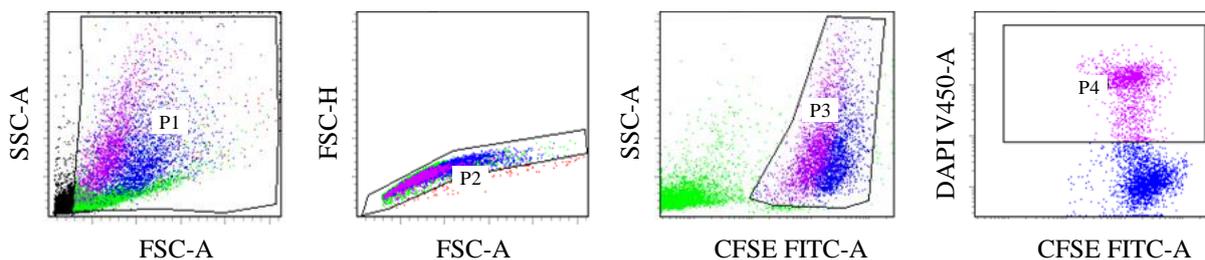


Abb. 3-1: Identifikationsstrategie (Gating) beim Zytotoxizitätstest mittels Durchflusszytometrie. P1 umfasst alle Zellen. Nur Zelltrümmer und kleinere Fragmente werden ausgegrenzt und nicht mehr im Folgeplot angezeigt. P2 schließt Dubletten und Zellverbände aus und P3 isoliert die CFSE-gefärbten Zielzellen für den letzten Plot, in dem mittels P4 im V450-Kanal DAPI-positive, nekrotische Zellen von lebenden abgegrenzt werden können.

Für die Messungen am FACSCanto™ 10c wurde die dazugehörige BD FACSDiva™ Software verwendet, für die Auswertung wurde auf die Software FlowJo® zurückgegriffen.

3.6 AKTIVITÄTSANALYSE

3.6.1 Degranulation und IFN- γ -Produktion

Zur Bestimmung des Aktivierungsgrades der NK-Zellen wird typischerweise die Degranulierungskapazität der Zellen ermittelt. Zu diesem Zweck wird das in Exosomen exprimierte Membranprotein CD107a, auch bekannt als LAMP-1 (*lysosom associated membrane protein-1*), angefärbt und durchflusszytometrisch detektiert. Parallel dazu kann außerdem der Nachweis der intrazellulären IFN- γ -Produktion zur Aktivitätsanalyse erfolgen.

Die NK-Zellen wurden sechs Tage nach Beginn der Kultivierung unter Anwendung der entsprechenden Expansionsprotokolle geerntet, gewaschen und in einer Konzentration von

2×10^5 Zellen in 100 μL X-Vivo⁺⁺ in die Vertiefungen einer 96er-Rundbodenlochplatte ausgesät. Zu den NK-Zellen wurden zusätzlich 2×10^5 Tumorzellen gegeben, einige der Vertiefungen wurden ausschließlich mit weiteren 100 μL X-Vivo⁺⁺ Medium aufgefüllt, um später die Spontandegranulation der NK-Zellen ermitteln zu können. Nach einer einstündigen Initiationsphase bei 37°C und 5% CO₂-Sättigung wurden 2 μL eines APC-H7-konjugierten, gegen CD107a gerichteten Antikörpers zu jedem Ansatz zugegeben. Nach einer weiteren Stunde im Brutschrank wurden nach Verdünnungsschritten insgesamt 0,13 μL BD GolgiStopTM in jede Vertiefung gegeben. BD Golgi StopTM enthält Monensin, welches die Prozessierung von IFN- γ zur Sekretion zu verhindert und es stattdessen innerhalb des Golgikomplexes akkumulieren lässt. So ist es später leichter detektierbar.

Im Anschluss an eine weitere Inkubationszeit im Brutschrank von einer Stunde wurden die Zellen schließlich mit PBS gewaschen, in BD HorizonTM Brilliant Stain Buffer resuspendiert, mit IgG unspezifische Antikörperbindstellen blockiert und Zombie VioletTM zur leben/tod-Unterscheidung eingesetzt. Die Zellen wurden nach einer Inkubation über 20 min im Dunkeln mit FACS-Puffer gewaschen und erneut in BD HorizonTM Brilliant Stain Buffer resuspendiert. Zur Identifizierung der NK-Zellen wurden diese für 20 min dunkel bei 4°C an der Zelloberfläche mit Antikörpern gegen CD45, CD56 und CD16 gefärbt. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen zur Perforation der Membranen in saponinhaltigem Puffer aufgenommen und gleichzeitig durch Zugabe des anti-IFN- γ -Antikörpers für 30 min bei 4°C im Dunkeln intrazellulär gefärbt. Da die Permeabilisierung der Membran mit Saponin ein reversibler Prozess ist, wurde zum anschließenden Waschen ein saponinhaltiger Wasch/Perm-Puffer verwendet, bevor die Zellen schließlich am Durchflusszytometer gemessen wurden.

3.6.2 Immunoblotnachweis von Perforin und Granzym B

Ob bei der Degranulation auch vermehrt der granulaabhängige Wirkmechanismus der NK-Zellen aktiviert ist, wurde über den Nachweis der apoptoseinduzierenden Enzyme Perforin und Granzym B in den Zellen und in ihrem Kulturüberstand getestet.

Zu diesem Zweck wurden am Tag 6 der NK-Zellexpansion etwas vom Kulturüberstand abgenommen, die Zellen abzentrifugiert und der Überstand bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Außerdem wurden jeweils etwa 5×10^6 NK-Zellen geerntet, gewaschen, pelletiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

METHODEN

Zur weiteren Verarbeitung wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, jeweils in 30-40 µL RIPA-Puffer aufgenommen und für 20 min auf Eis lysiert. Um die Proteinisolaton zu unterstützen, wurden die Proben anschließend in drei Runden à 15 s mit 30 s Unterbrechung im eisgekühlten Ultraschallbad behandelt. Durch Zentrifugation mit 14.000 U/min (24.100 x g) für 10 min bei 4°C wurden Zelltrümmer sedimentiert und der proteinhaltige Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch mittels Bradford-Reagenz (BioRad) ermittelt. Dazu wurden 2 µL der Probe in einer Küvette mit 1 mL einer 1:5 verdünnten Bradford-Lösung versetzt, für 5 min inkubiert und anschließend am Photometer gemessen. Der Proteingehalt errechnete sich aus einer zuvor aufgenommenen Standardkurve einer Verdünnungsreihe. 25 µg jeder Probe wurden mit 7 µL 5x-LÄMLI-Puffer versetzt und mit *A. dest.* auf ein Endvolumen von 35 µL aufgefüllt. Parallel dazu wurden 40 µL der Kulturüberstände mit 8 µL 5x-LÄMLI-Puffer versetzt. Alle LÄMLI-haltigen Proben wurden für 5 min bei 95°C denaturiert.

Für die Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylelektrophorese, kurz SDS-PAGE, zur Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe, wurde ein Trenngel mit 10% Acrylamid mit einem Sammelgel aus 5% Acrylamid vorbereitet, die genaue Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 4.xxx wiedergegeben.

Tab. 3-1 Zusammensetzung der Gele, die für die SDS-PAGE verwendet wurden.
A. dest.: destilliertes Wasser; APS: Ammoniumperoxodisulfat; SDS: Natriumdodecylsulfat;
 TEMED: Tetramethylethylendiamin

	Sammelgel 5%	Trenngel 10%
1 M Tris-Puffer	500 µL (pH 6,8)	2 mL (pH 8,8)
30% Acrylamid/ 8% Bisacrylamid	670 µL	2,66 mL
<i>A. dest.</i>	2,7 mL	3,32 mL
10% SDS	40 µL	80 µL
10% APS	40 µL	50 µL
TEMED	4 µL	20 µL

Die Proteine wurden für 20 min bei 100 V ins Sammelgel einlaufen gelassen und anschließend für 2 h bei einer angelegten Spannung von 120 V aufgetrennt.

Für die Übertragung der Proteine auf eine Polyvinylfluoridmembran wurde das Westernblotverfahren angewandt. Dazu wurde die Membran durch zweiminütige Inkubation

METHODEN

in Ethanol aktiviert und mit *A. dest.* gewaschen. Anschließend wurden auf der Anodenplattform der Blotkammer zwei in Anodenpuffer I getränkte Whatman-Papiere, gefolgt von zwei in Anodenpuffer II getränkte Whatman-Papiere, gefolgt von der Polyvinylfluoridmembran, gefolgt vom Trenngel, gefolgt von zwei in Kathodenpuffer getränkten Whatman-Papieren, gestapelt und die Kammer mit dem Kathodendeckel geschlossen. Der Übertrag der Proteine erfolgte für 2 h bei 50 mA pro Gel.

Die Membranen wurden für eine Stunde mit einer 5%igen Magermilchlösung für unspezifische Antikörperbindungen blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem spezifischen Primärantikörper über Nacht. Die eingesetzten Primärantikörper richteten sich gegen das 70 kDa große Perforin, das 32 kDa große Granzym B oder gegen das 48 kDa große γ -Tubulin, das als standardmäßig exprimierte Ladekontrolle diente. Nach mehrmaligem, intensivem Waschen wurde der mit Meerrettichperoxidase konjugierte Sekundärantikörper auf die Membran gegeben und für 45-60 min inkubiert. Nach weiteren Waschschrritten wurde das PierceTM ECL-Chemilumineszenzsystem zur Detektion der Protein-Antikörper-Komplexe verwendet, die Membranen im Dunkeln für einige Minuten inkubiert und die Signale schließlich mithilfe von Röntgenfilmen sichtbar gemacht.

3.7 ZYTOKINSEKRETIONSMESSUNG

Um lösliche Faktoren zu bestimmen, die beim adoptiven NK-Zelltransfer den Therapieverlauf beeinflussen können, wurden aufgereinigte CD56^{pos} CD3^{neg} NK-Zellen über sechs Tage nach den Expansionsprotokollen IL-15, IL15+21 und IL-15+21_{boost} kultiviert. 200 μ L des Überstands wurden abgenommen, zentrifugiert um verbleibende Zellen abzutrennen und 100 μ L in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Für die Messung wurde das BDTM *Cytometric Bead Array* (CBA) Kit, bestehend aus den CBA *Human Flex Sets* und den CBA *Human Soluble Protein Master Buffer Kit* (BD Biosciences) verwendet. Der Vorteil des CBA-Kits im Vergleich zu anderen Verfahren liegt darin, dass eine geringe Menge Probe, 50 μ L, gleichzeitig auf mehrere verschiedene Zytokine getestet werden kann. Das Prinzip basiert auf dem Einsatz von Mikropartikeln, die zum einen spezifische Fluoreszenzintensitäten im roten und im nahen Infrarotkanal aufweisen und an die, zum anderen, Antikörper mit einer bestimmten Spezifität gekoppelt sind. Somit steht eine Art von Partikeln, mit ihren Fluoreszenzintensitäten für ein spezifisches Zytokin, das gebunden werden soll. Probe und Antikörperpartikel wurden nach Herstellerangaben

zusammen für eine Stunde dunkel, im Kühlschrank inkubiert, bevor die Detektionsantikörper für weitere zwei Stunden hinzugefügt wurden. Die Spezifität der Detektionsantikörper richtete sich ebenso gegen das zu analysierende Zytokin, jedoch waren diese PE-konjugiert. Die Proben mit den gebildeten Sandwich-Komplexen wurden schließlich am FACS Array Durchflusszytometer (BD Biosciences) gemessen. Anhand der Partikelfluoreszenz im nahen Infrarotkanal und im roten Kanal ließ sich das untersuchte Zytokin ermitteln, anhand der Fluoreszenzintensität des Detektionsantikörpers und einer parallel gemessenen Standardreihe konnte die Menge des in der Probe vorhandenen Zytokins mit Hilfe des FCAP ArrayTM Programms bestimmt werden.

3.8 LENTIVIRALE TRANSDUKTION

Für den Gentransfer wird ein Vier-Plasmid –System verwendet, das zur dritten Generation lentiviraler Vektorsysteme gehört, womit die Möglichkeit der Rekombination zu replikationskompetenten Lentiviren weiter reduziert wird. Das Transferplasmid pSL2GW stammte aus dem Labor der AG Buchholz, Paul-Ehrlich-Institut, Langen, und enthielt die Gene für die Luciferase des Leuchtkäfers und das grünfluoreszierende Protein (GFP) der Qualle *Aequorea victoria*, durch eine T2A Schnittstelle gekoppelt. Die Expression wurde mittels Promotorsequenz aus dem Spleen Focus Forming Virus (pSFFV) kontrolliert und anhand einer WPRE-Sequenz (*Woodchuck posttranscriptional regulatory element*) unterstützt. Die Plasmide mit den Genen für Hüllproteine und essentielle Enzyme wurden von der AG Beilhack, Experimentelle Stammzelltransplantation, Universitätsklinikum Würzburg, zur Verfügung gestellt.

3.8.1 Plasmidamplifikation

Zunächst wurden die Plasmide in *Escherichia coli* Zellen amplifiziert. 0,5 µL der Plasmidlösungen wurden in separaten Ansätzen zu je 50 µL Bakteriensuspension mit je 5×10^5 chemikompetenten Zellen gegeben und für 15 min auf Eis inkubiert, damit sich die DNS an die Zellwand anlagern konnte. Durch den anschließenden Hitzeschock bei 42°C wurde die Bildung von Poren in der Bakterienzellwand ausgelöst, die das Eindringen der DNS ins Zellinnere ermöglichte. Im Anschluss an eine Erholungsphase in LB-Medium wurden die Zellen auf ampicillinhaltige LB-Agarplatten (100 µg/mL) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden ampicillinhaltige 5-mL-Startkulturen beimpft und

für mehrere Stunden bei 37°C in einer Geschwindigkeit von 220 rpm inkubiert. Diese Startkulturen wurden schließlich in 250 mL LB-Medium überführt und ebenfalls bei 37°C und 220 rpm über Nacht kultiviert.

3.8.2 Plasmidpräparation

Für die Plasmidisolation wurde das Plasmid DNA Purification Kit von Macherey-Nagel nach Herstellerangaben verwendet. Die Zellen wurden geerntet und bei 6000 x g für 10 min pelletiert. Das Pellet wurde anschließend im mitgelieferten RES-Puffer aufgenommen und mittels Zugabe von LYS-Puffer lysiert. Die NucleoBond®Xtra Säulen wurden zunächst mit EQU-Puffer äquilibriert, mit NEU-Puffer neutralisiert und schließlich mit dem Lysat beladen. Anschließend wurde die Säule einmal mit EQU-Puffer und einmal mit WASH-Puffer gewaschen und die Plasmide dann mit ELU-Puffer in ein frisches Reaktionsgefäß eluiert. Durch Zugabe von Isopropanol wurde die DNS gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und das Pellet bis zur Transparenz getrocknet. Durch vorsichtiges Vortexen für 10 min wurde die DNS in einem definierten Volumen von 200 µL *A. dest* resuspendiert und die Konzentration und damit die Ausbeute am NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) photometrisch bestimmt.

3.8.3 Transfektion und Virusproduktion

Mittels Transfektion der viel Plasmide in die Verpackungszelllinie HEK293T wurden replikationinkompetente virale Vektorpartikel generiert. Dazu wurden 14×10^6 HEK293T Zellen ausplattiert und über Nacht adhärirt. Am Folgetag wurden die Zellen mit 10 mM Chloroquin in DMEM Medium vorbehandelt. Die Plasmide pSL2GW, pMDLg/pRRE, pRSV-Rev und pMD2.G wurden in Gewichtsverhältnissen von 6:3:2:1 in einer Gesamtmenge von 60 µg mit 150 µL 2,5 mM Calciumchloridlösung in einem Volumen von 1350 µL *A. dest.* aufgenommen und unter ständiger Bewegung mit 1500 µL zweifach konzentriertem HBSS Puffer vermischt. Nach einer fünfminütigen Ruhepause wurde die Plasmid-Lösung tropfenweise zu der HEK293T-Zellkultur gegeben und bei 37°C und 5% CO₂-Sättigung für mindestens 4 h inkubiert. Anschließend wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt, an welches die Viruspartikel abgegeben wurden. Am folgenden Tag wurde der virushaltige Überstand abgesammelt und noch einmal frisches Medium auf die Verpackungszellen

gegeben. Dieses wurde ebenfalls nach 24 h abgesammelt und mit dem vorherigen zusammengefügt.

Die vereinigten Überstände wurden auf Ultrazentrifugenröhrchen verteilt und für 2 h bei 70.000 x g zentrifugiert. Das resultierende Viruspellet wurde getrocknet und in reduziertem Volumen 1 x HBSS Puffer resuspendiert. Die schlussendliche Anzahl transduzierender Einheiten wurde durch Virustitration auf HEK293T-Zellen ermittelt.

3.8.4 Transduktion der Zielzellen

Die Zielzellen wurden zu 5×10^5 Zellen in die Vertiefungen von 6-Lochplatten ausgesät und für einen Tag zum Adhären der Zellen an den Plattenboden kultiviert. Am Folgetag wurde der Kulturüberstand abgenommen und durch frisches RPMI1640 Medium unter Zusatz von 8 µg/ml Polybren und Viruspartikeln ersetzt. Die Viruspartikel wurden in verschiedenen Verdünnungen hinzugefügt. Das kationische Polymer Polybren neutralisiert die molekulare Abstoßung zwischen Virushülle und den Sialinsäureresten auf der Oberfläche eukaryotischer Zellen diente der Verbesserung der Transduktionseffizienz.

Nach einem Tag Inkubation bei 37°C und 5% CO₂-Sättigung wurde das Transduktionsmedium durch frisches R10⁺⁺ Medium ersetzt. Nach zwei weiteren Tagen wurden die Zellen durch Trypsinierung geerntet und durchflusszytometrisch auf ihre GFP-Expression hin geprüft und die Zellen, aus dem Ansatz mit der besten Transduktionsrate, weiter vermehrt. Im Folgenden wurden erfolgreich transduzierte Zellen durch Fluoreszenzaktivierte Zellseparation (FACS) von nicht transduzierten Zellen abgetrennt, in der Zellkultur erneut vermehrt und schließlich bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert.

3.9 IN VIVO BIOLUMINESZENZMESSUNGEN

Die Tiere wurden vor Versuchsbeginn und während der Versuchslaufzeit in sterilen Plexiglasboxen mit sterilisiertem Einstreu und Papiertüchern als Spielmaterial gehalten. Die Käfigboxen wurden einzeln mit steril gefilterter Luft belüftet, so dass sogenannte Barrierebedingungen gegeben waren und damit der Kontakt mit Krankheitserregern vermieden wurde. Da es sich bei Mäusen um gesellige Tiere handelt, wurden diese in kleinen Gruppen gehalten.

METHODEN

Wasser, Futter und der Gesundheitszustand der Versuchstiere wurde täglich kontrolliert. Die Käfige wurden wöchentlich vom Tierpflegepersonal gereinigt. Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Hell-/Dunkelzeiten blieben konstant, damit standardisierte Versuchs- und Haltungsbedingungen gewährleistet waren.

Für die Messungen wurden die Käfige in nicht sterilen, aber sauberen Räumlichkeiten geöffnet und die Tiere entnommen. Während der Narkose befanden sich die Mäuse in Gehäusen, die über Anschlüsse für Sauerstoff und dem gasförmigen Narkosemittel Isofluran verfügten, aber zum Einbringen der Versuchstiere geöffnet werden müssen. Die Applikation der unter sterilen Bedingungen generierten Zellen oder des Luziferins erfolgte mit steril verpackten Insulinspritzen.

Die Tumorzellen wurden einmalig subkutan in 100 μ L Injektionsvolumen in die Flanke oder in das Peritoneum (Bauchhöhle) appliziert. Das Tumorengraftment und –wachstum wurde zweimal wöchentlich visuell und mittels Biolumineszenzbildgebung am Caliper IVIS Lumina II Multispectral Imaging Systems überwacht. Dazu werden Die Mäuse in die Narkosekammer überführt und unter kontrollierten Bedingungen sediert. Den narkotisierten Mäusen wurden intraperitoneal oder subkutan 1,5 mg D-Luziferin in 100 μ L Injektionsvolumen appliziert. Dabei wurde die Injektionsstelle ggf. auf der anderen Körperseite der Tumorlokalisierung gewählt. Nach 10 bis 15 min Inkubationszeit und Überführung der Tiere in die Dunkelkammer des Caliper IVIS Lumina II Multispectral Imaging Systems, wurden Aufnahmen mit verschiedenen Belichtungszeiten von 1 s bis 2 min gemacht. Die Mäuse wurden dabei weiter über Maskennarkose mit Isofluran sediert gehalten. Unmittelbar nach der Messung wurden die Tumorumfänge mittels Messschieber ermittelt und die Tiere zurück in ihre Käfige gelegt. Innerhalb weniger Minuten erwachten die Mäuse unter ständiger Beobachtung aus der Narkose.

Die Auswertung der BLI-Aufnahmen erfolgte mittels des LivingImage Programmes. Aufnahmen, die miteinander verglichen werden sollten wurden gemeinsam in einer Datei geöffnet und die Einteilung der Skalen für die Strahlendichte für alle Aufnahmen angeglichen. Jedes Tier wurde mit einer rechteckigen Messregion, ROI (*region of interest*), umschlossen und aus dieser Messregion die durchschnittliche Strahlendichte bestimmt. Für eine optimale Vergleichbarkeit wurde der Messbereich für alle Tiere gleichgroß gehalten. Die weitere Auswertung der Messdaten erfolgte mit den Programmen MS[®] Excel und GraphPad Prism[®].

3.10 LOKALISIERTE RADIOTHERAPIE IN MÄUSEN

Für die Bestrahlung der Mäuse an einer Hochpräzisionsbestrahlungsanlage für Tumore in Kleintieren (*Small Animal Radiation Research Plattform*, SARRP, xStrahl LTD) wurden 2,5 Gy Einzeldosen bis zu einer kumulativen Gesamtdosis von 27,5 oder 30 Gy gegeben. Die CT-gestützte und qualitätsoptimierte Planung der Bestrahlung des Tumors als primäres Zielgewebe erzielte damit eine bisher unerreichte Präzision und zugleich eine Schonung des gesunden Gewebes, einschließlich des Knochenmarks und der Risikoorgane, was sich in einer deutlich reduzierten Gesamtbelastung der Tiere widerspiegelte. Die Tiere wurden ebenfalls durch eine Inhalationsnarkose mit Isofluran sediert und in die Bestrahlungsplattform eingebracht. Anschließend erfolgte die individuelle Bildgebung durch eine integrierte Computertomographie bei 65 kV und 0,5 mA. Die resultierenden Aufnahmen wurden in das MuriPlanTM Programm hinein geladen, anhand dessen die exakte Planung der Strahlengänge erfolgte. Nach individuell angepasster Positionierung der Isozentren, wurde die Bestrahlung mit 175 kV und 15 mA bidirektional in zwei Einzelstrahlen, mit je 50% Intensität ausgeführt, um eine optimale Dosisverteilung im Tumorgewebe zu erreichen. Das Strahlenfeld wurde dabei abhängig von der Tumorgröße mittels Kollimator auf 1 bis 10 mm² eingegrenzt. Während der gesamten Zeit verblieben die Mäuse in Narkose und ihre Vitalfunktionen konnten ständig über eine Kamera im Innenraum des SARRP überwacht werden.

4 ERGEBNISSE

4.1 NK-ZELLAUFREINIGUNG

Für Untersuchungen bezüglich des Proliferationspotentials, der Phänotypisierung und der Zytotoxizität gegenüber verschiedenen Tumorzellen, wurden primäre NK Zellen verwendet. Mittels Dichtegradientenzentrifugation über Biocoll, einem Saccharosepolymer, wurden PBMCs aus Leukozytenpräparaten gewonnen. Die Anreicherung der NK-Zellen aus den PBMCs erfolgte durch Negativselektion, mithilfe des NK Enrichment Kits, wie im Methodenteil beschrieben. Um den Erfolg der NK-Zellanreicherung beurteilen zu können, wurden sowohl die PBMCs vor der Aufreinigung als auch die NK-Zellen nach der Aufreinigung einer Durchflusszytometrie unterzogen (siehe Abb. 4-1), die Frequenz der $CD3^{neg}CD56^{pos}$ NK-Zellen und damit der Aufreinigungsfaktor ermittelt.

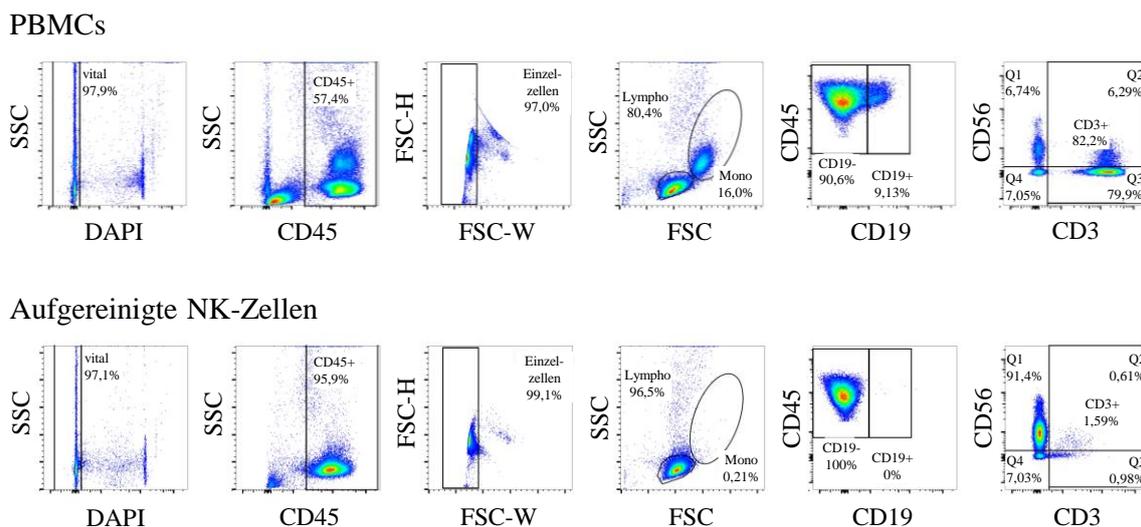


Abb. 4-1: NK-Zell-Definitionsstrategie. Zur Überprüfung der Zusammensetzung der PBMCs und des NK-zellangereicherten Startmaterials wurden die jeweiligen Zellprodukte durchflusszytometrisch analysiert. Zunächst wurde eine Region um die lebenden, DAPI^{neg} Zellen gelegt, anschließend wurden die CD45^{pos} Leukozyten identifiziert und über die Signalintensität und die Signaldauer des Vorwärtsstreulichts die Einzelzellregion bestimmt. Mittels der Seitwärtsstreuung (SSC, Maß für die Granularität einer Zelle) und Vorwärtsstreuung (FSC, Maß für die Größe einer Zelle) wurden die Regionen für Lymphozyten und Monozyten definiert. Weiter wurden die Lymphozyten angezeigt und Regionen um die CD45^{pos} CD19^{pos} B-Zellen und die CD45^{pos} CD19^{neg} Nicht-B-Zellen gelegt. Zuletzt wurden die nicht-B-Zellen auf die Expression von CD56 und CD3 untersucht und so die CD3^{neg}CD56^{pos} NK-Zellregion, CD3^{pos}CD56^{neg} T-Zellregion und die CD3^{pos}CD56^{pos} Region NK-ähnlicher T-Zellen bestimmt. Zusätzlich wurden im letzten Plot eine doppelt negative Region und eine ganzheitliche CD3^{pos} Region definiert.

ERGEBNISSE

Mit dem Aufreinigungsschritt wurde durchschnittlich eine 11-fache Anreicherung (4- bis 18-fach) erzielt und damit eine mittlere Reinheit von 90% (77-98%) erreicht (siehe Abb. 4-2). Der nicht-NK-Zellanteil setzte sich aus durchschnittlich 0,06% (0,008-0,26%) B-Zellen, 1,22% (0,45-1,45%) T-Zellen und 0,31% (0,00-1,10%) NK-ähnliche T-Zellen zusammen. Den größten Anteil von 7,34% (1,62-21,84%) machten Lymphozyten aus, die zwar CD45^{pos} waren, aber sonst keinen der getesteten Marker exprimierten. Die NK-angereicherten Zellprodukte wurden anschließend in Kultur genommen und mittels Zusatz verschiedener Zytokine oder Zytokinkombinationen expandiert.

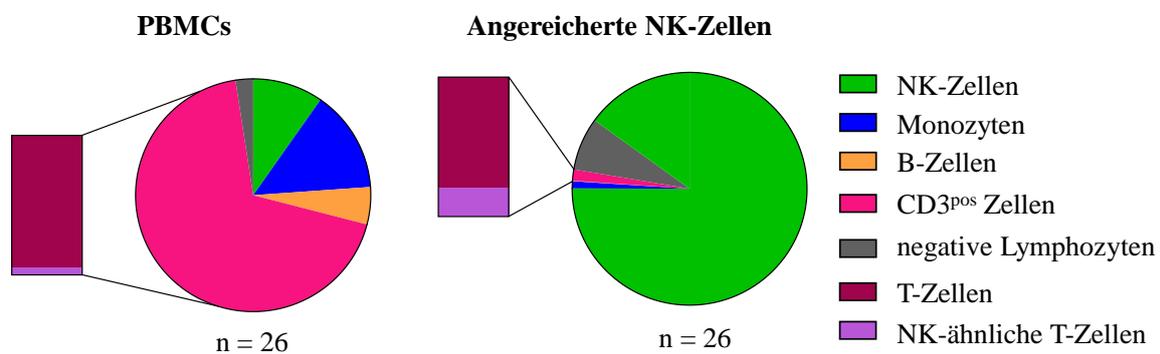


Abb. 4-2: Zusammensetzung des Zellproduktes vor (PBMCs) und nach NK-Zellaufreinigung (Angereicherte NK-Zellen). Die PBMCs wurden durch Dichtegradientenzentrifugation über Biocoll gewonnen und setzten sich zum Großteil aus CD3^{pos} Zellen (hauptsächlich T-Zellen und wenige NK-ähnliche T-Zellen), Monozyten, B-Zellen, NK-Zellen und einigen nicht näher bestimmbar, für die getesteten Oberflächenmarker negative Lymphozyten zusammen. Nach der NK-Zellaufreinigung aus PBMCs mit dem NK Cell Enrichment Kit (Stemcell) bestand das Produkt hauptsächlich aus NK-Zellen.

4.2 NK-ZELLEXPANSION

Der limitierende Faktor der adoptiven NK-Zelltherapie ist die begrenzte Zahl verfügbarer Spender-NK-Zellen. Im Zuge dessen war ein Hauptaspekt dieser Arbeit die NK-Zellproliferation durch Zusatz von Zytokinen zu steigern und die Zellen *ex vivo* optimal zu expandieren. Dabei sollte auf die Verwendung von Feeder-Zellen verzichtet werden und das Ausgangsmaterial möglichst reine NK-Zellen enthalten. Neben der Steigerung der Zahl, durfte die Vitalität der Zellen während der Expansionsphase nicht zu sehr abnehmen und die NK-Zellfunktionalität erhalten bleiben.

4.2.1 NK Zellproliferation

Zur Überprüfung der Proliferation wurden die NK-Zellen mit Carboxyfluoreszin-Succinimidyl-Ester (CFSE) gefärbt. Die Zellmembranen sind permeabel für diesen Farbstoff, der im Zellinneren kovalent an Amine bindet und somit in der Zelle gehalten wird. Gebundenes CFSE hat kaum Auswirkungen auf die Proliferationskapazität oder die Biologie der Zellen. Während der Kultivierung, wird der Farbstoff mit jeder Zellteilung gleichmäßig an die Tochterzellen verteilt. Damit verringert sich die Intensität der Färbung mit jeder Generation um 50% und das Proliferationsverhalten der verschiedenen Expansionsansätze kann verfolgt werden.

Die gefärbten Zellen wurden in 96er-Lochplatten mit Rundböden unter Zusatz der entsprechenden Zytokine kultiviert, einen Tag später und an den Tagen drei bis sechs wurden die Inhalte einzelnen Vertiefungen geerntet und durchflusszytometrisch die CFSE-Farbtintensität der Zellen und somit die Anzahl der erfolgten Teilungen bestimmt (siehe Abb. 4-3).

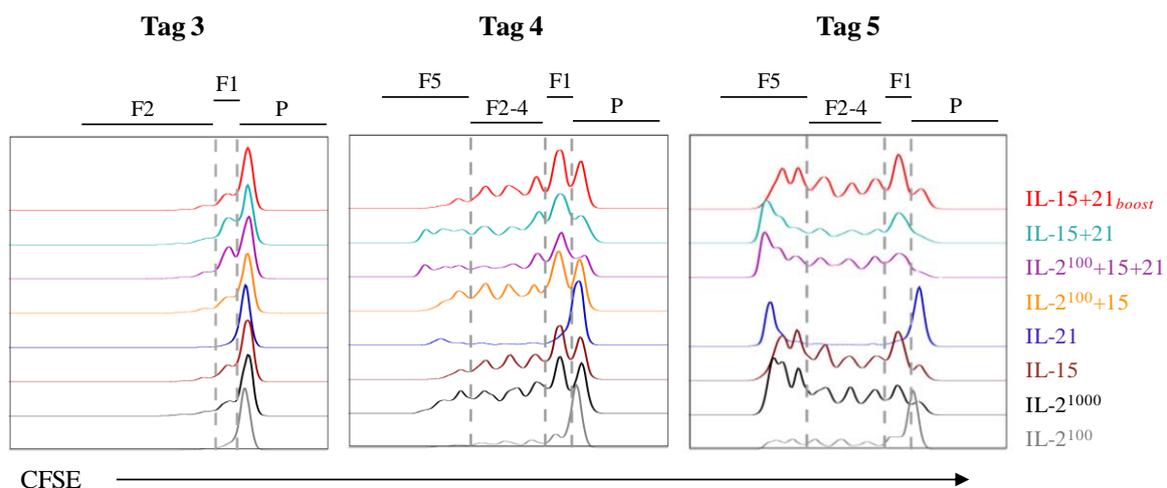


Abb. 4-3: Proliferationsverhalten verschiedenartig stimulierter NK-Zellen.

Aus Lymphozytenpräparaten isolierte NK-Zellen wurden mit CFSE gefärbt und unter Zusatz verschiedener Zytokine, bzw. Zytokinkombinationen kultiviert. Mit jeder Zellteilung verdünnt sich der Farbstoff um 50%, das heißt nicht proliferierende Zellen sind intensiver gefärbt. Je stärker sich die Zellen teilen, desto stärker verschiebt sich die Population in den Bereich schwacher Signale. Jedes Maximum der Kurven stellt eine Generation dar. (P: Parentalgeneration, F1: erste Tochtergeneration (nach einer Zellteilung), F2-F5: zweite bis fünfte Tochtergenerationen (nach mindestens zwei bis fünf Zellteilungen))

Die Proliferationsdaten zeigten eindeutig, dass IL-2 in physiologischer Konzentration von 100 U/mL IL-2 (Protokoll IL-2¹⁰⁰) keine ausreichende Zahl isolierter NK-Zellen zur Teilung

anregte. Unter Verwendung von IL-2¹⁰⁰ fand in den ersten drei Tagen bei nur 12% der Zellen eine Teilung statt und nach fünf Tagen bestand die Gesamtpopulationen im IL-2¹⁰⁰-Ansatz noch zu über 40% aus ungeteilten Zellen. Die Verwendung von IL-2¹⁰⁰⁰ (1000 U/mL IL-2) führte bei 34% der Zellen zu einer mindestens einmaligen Teilung in den ersten drei Tagen. Die alleinige Verwendung von IL-21 regte in den ersten drei Tagen bei nur 7% der Zellen die Proliferation an. So bestand im IL-21-Ansatz die Gesamtpopulationen nach fünf Tagen noch zu über 45% aus ungeteilten Zellen. Die Einwirkung von IL-15 und die Kombination aus IL-15 und IL-21 induzierten wiederum eine starke Proliferation von bis zu 42%, insbesondere, wenn IL-21 in Kombination mit IL-15 dauerhaft im Kulturmedium vorhanden war (Protokolle IL-15+21 und IL-2¹⁰⁰+15+21). Am dritten Tag der NK-Zellkultivierung hatten sich in den IL-15- und IL-21-haltigen Expansionskulturen bereits über 40% der Zellen geteilt und mindestens 30% der IL-15-haltigen Kulturen. Am Tag 4 des Proliferationsansatzes deutete sich in diesen Kulturen eine siebte Zellteilung an, welche an Tag 5 eindeutig ausgeprägt war. Alle anderen Expansionsansätze (IL-2¹⁰⁰, IL-2¹⁰⁰⁰, IL-15, IL-21, IL-2¹⁰⁰+15 und IL-15+21_{boost}) wiesen nur bis zu sechs Tochterpopulationen auf.

4.2.2 Spenderabhängige Unterschiede in Expansionsraten

Ziel einer verstärkten Proliferation ist eine hohe Expansionsrate. Zur Ermittlung ebendieser wurden die NK-Zellen jeweils eines Spenders gleichmäßig aufgeteilt und unter Zusatz der verschiedenen Zytokine bzw. Zytokinkombinationen in 96er-Lochplatten kultiviert. Alle drei bis vier Tage wurde aus jedem Ansatz der Inhalt einer Vertiefung geerntet, die Zellen mit dem Hämozytometer gezählt und durchflusszytometrisch die Reinheit und die Vitalität der NK-Zellen bestimmt. Insgesamt wurden die Zellen vier bis fünf Wochen lang kultiviert.

Die NK-Zellexpansionsraten und der Verlauf der Expansionskurven über die Kultivierungszeit waren von Spender zu Spender sehr heterogen, wie in Abb. 4-4 an drei exemplarischen Spendern gezeigt. Bei manchen Spendern wurde in den ersten Tagen ein Anstieg der NK-Zellexpansionsrate verzeichnet, der in einem Maximum gipfelte und anschließend wieder abfiel. Bei anderen Spendern wurden unterschiedlich starke Anstiege der Expansionsraten beobachtet, die sich im Verlauf der Kultivierung nicht weiter änderten oder sogar weiterhin leicht anstiegen.

ERGEBNISSE

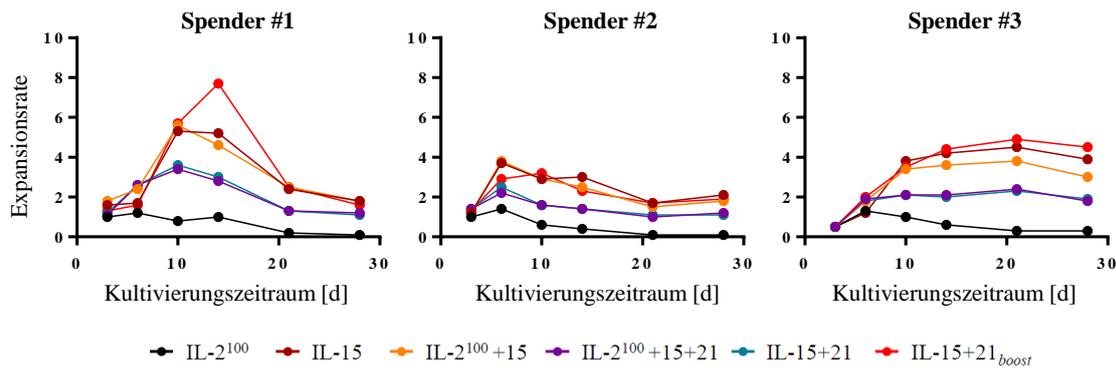


Abb. 4-4: Exemplarische Expansionskurven dreier Spender. Die Verläufe der Expansionskurven sind von Spender zu Spender unterschiedlich, dies betrifft die Expansionsmaxima, die Zeitpunkte zu denen Expansionsmaxima erreicht wurden, und die Stabilität der Expansionsraten über den Kultivierungszeitraum. Spenderweise sind jedoch protokollabhängige Unterschiede, bzw. ähnliche Verläufe durch ähnliche Expansionsprotokolle, ersichtlich. Die Zellzahlen wurden in Duplikaten ermittelt, Mittelwerte errechnet und die hier wiedergegebenen Expansionsraten auf die Anfangszellzahlen normalisiert

Unabhängig von diesen Spenderunterschieden fällt auf, dass Expansionen aus ähnlichen Kulturansätzen z. B. mit den Protokollen IL-15, IL-2¹⁰⁰+15 und IL-15+21_{boost}, die alle IL-15 in der Expansionsphase bereitstellten, aber keine dauerhafte IL-21-Exposition beinhalteten, zueinander einen ähnlichen Verlauf aufweisen. Ebenso resultierten die Protokolle IL-15+21 und IL-2¹⁰⁰+15+21, die beide IL-15 und durchgängig IL-21 während der Expansionsphase vorhielten, nahezu parallele Verläufe der Expansionskurven. Insgesamt expandierten NK-Zellen bei permanenter Anwesenheit von IL-21 nur halb so stark wie Zellen, die während der Expansionsphase nicht mit IL-21 in Kontakt kamen. Mit IL-2¹⁰⁰ wiederum expandierten die Zellen nahezu gar nicht. In direkten Vergleichen der Protokolle IL-15 mit IL-15+21 und IL-15+21_{boost} bzw. IL-15 mit IL-2¹⁰⁰+15 konnte gezeigt werden, dass der Einfluss von einem kurzzeitigen IL-21-Boost bzw. von niedrig konzentriertem IL-2 mit 100 U/mL gering war und in einem ähnlichen Verlauf der Expansionskurven resultierte während der Einfluss von permanent vorhandenem IL-21 erheblich stärker war und die Expansionsraten um die Hälfte reduzierte.

4.2.3 Durchschnittliche Expansionsraten bei Langzeitkulturen

Die Expansionsrate spiegelt den Faktor wieder, um den sich die Zellen am gemessenen Zeitpunkt vervielfältigt haben im Vergleich zur Anfangszellmenge am Tag der Aussaat. Unter Berücksichtigung aller zusammengefassten Daten von bis zu zehn verschiedenen Spendern

ERGEBNISSE

zeigte sich, dass IL-2 in der Konzentration von 100 U/mL nicht ausreicht, um die NK-Zellen zu vermehren (siehe Abb. 4-5). Die gleiche Aussage ließ sich für die Verwendung von IL-21 als Einzelstimulanz treffen, welche zu einer Reduktion der NK-Zellzahl führte. Außerdem zeigte sich noch einmal deutlicher, dass eine permanente IL-21-Exposition den proliferativen Effekt von IL-15 behindert, da mit IL-15 alleine durchschnittlich eine maximal vierfache (2,6- bis 6,8-fache) Expansion erreicht werden konnte, mit zusätzlichem IL-21, dauerhaft in Kultur, aber nur eine dreifache (1,4- bis 4,6-fach). Ein kurzer, dreitägiger Boost mit IL-21, verstärkte wiederum die IL-15-induzierte Expansion und ließ die durchschnittliche Expansionsrate auf das bis zu 4,5-Fache (spenderabhängig 2,2- bis 10,3-fach) ansteigen.

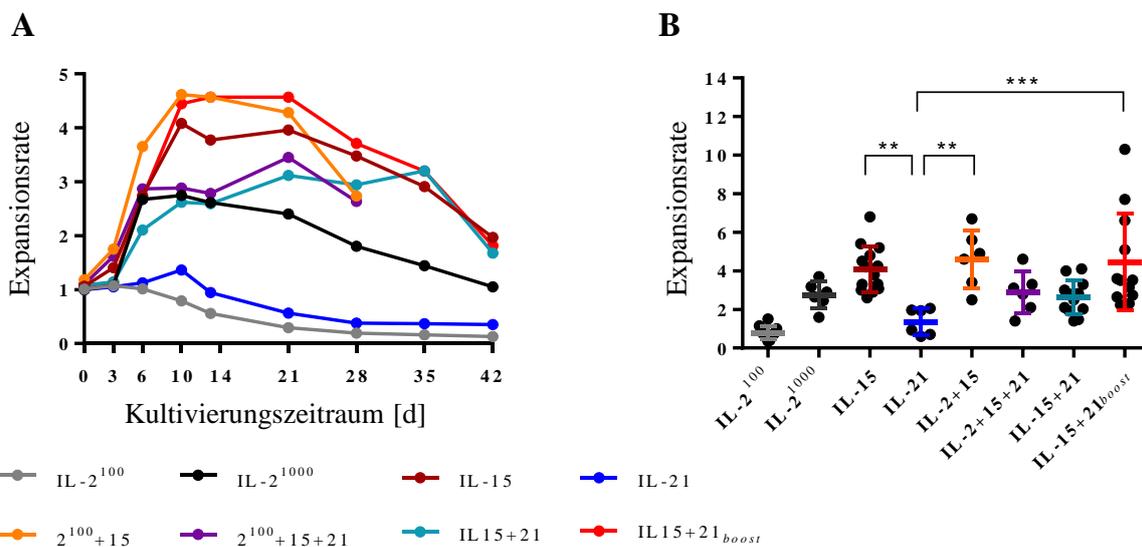


Abb. 4-5: Expansionsverhalten von NK Zellen in ex vivo Kultur unter Einfluss verschiedener Zytokine und Zytokinkombinationen. Aufgereinigte CD56^{pos}CD3^{neg} NK-Zellen wurden über vier bis sechs Wochen unter Einfluss verschiedener Zytokine und Zytokinkombinationen expandiert **A** Gezeigt ist die durchschnittliche Expansionsrate von sechs bis 14 Spendern. Die Expansionsraten wurden in Abhängigkeit der an Tag 0 ausgesäten Zellmenge berechnet und geben den Faktor der Vermehrung am jeweiligen Tag wieder. **B** Die Grafik stellt die spenderabhängige Verteilung der Expansionswerte am zehnten Tag der Kultivierung dar. Die Quer- und Längsbalken geben jeweils die Mittelwerte bzw. die Standardabweichungen wieder. Signifikante Unterschiede werden durch Sterne angezeigt (** p < 0.01, *** p < 0.005, one-way ANOVA). Nicht eingezeichnet sind die Signifikanzen zwischen den durch IL-2100 bzw. IL-21 hervorgerufenen niedrigen Expansionsraten und denen aller anderen Protokolle. Einige der Daten wurden im Rahmen der Masterarbeit von Viktoria Pfannenstiel und des Praktikums von Sarahkehr unter eigener Anleitung erhoben.

Messungen an Tag zehn ergaben signifikant bessere Wachstumsraten aller Kultivierungsbedingungen im Vergleich zur alleinigen Anwendung von IL-2¹⁰⁰. Weiter zeigten diese Daten noch einmal deutlich, dass ein kurzer Boost mit IL-21 mindestens gleich gute, bei einigen Spendern sogar höhere Expansionsraten als IL-15, von bis zu zehnfacher

Vervielfältigung, bewirkte, die ständige Anwesenheit von IL-21 jedoch die Expansionsraten drosselte (siehe Abb. 4-5).

Zellprodukte von NK-Zellexpansionen wurden regelmäßig geerntet, auf ihre Qualität bezüglich NK-Zellreinheit und -vitalität geprüft und sowohl phänotypisch als auch funktionell charakterisiert.

4.3 QUALITÄT DES NK-ZELLPRODUKTS

Ausschlaggebendes Kriterium hinsichtlich der Qualität des NK-Zellprodukts ist zum einen die Reinheit der Zellen, wobei vor allem die Kontamination mit CD3^{POS} Zellen kritisch ist. Zum anderen ist Anteil vitaler und damit voraussichtlich funktionstüchtiger Zellen von Bedeutung und soll hier untersucht werden.

4.3.1 Reinheit

Zur Überprüfung der Reinheit des NK-Zellproduktes vor und während der Expansion, wurden regelmäßig die Inhalte einiger Vertiefungen von 96er-Lochplatten geerntet und durchflusszytometrisch untersucht. Dabei wurden die morphologisch anhand des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichts beurteilt und vitale Lymphozyten weiter auf CD45^{neg}, CD19^{POS} beziehungsweise CD3^{POS} Kontaminationen untersucht. In den Expansionsexperimenten bestanden die Zellprodukte zu Beginn der Kultivierung durchschnittlich zu 86% (69-95%) aus NK-Zellen. Dieser Anteil konnte durch Verwendung von IL-15 mit oder ohne zusätzlichem IL-21-Boost im Kulturmedium weiter erhöht und im Mittel nach 14 Tagen auf 95% (81-99%) angehoben werden (siehe Abb. 4-6), da während der Stimulation der definitionsgemäße NK-Zellmarker CD56 auf den Zelloberflächen hochreguliert wurde und nicht nur Zellen mit moderater Expression zu starker Expression, sondern auch Zellen ohne anfänglich erkennbare Expression zu detektierbarer Expression von CD56 angeregt wurden.

Die präsentierten Daten zeigen außerdem, dass IL-2 als alleiniges Zytokin im Kulturansatz das Wachstum residualer CD3^{POS} Zellen förderte, sowohl in niedriger Konzentration von 100 U/mL als auch in hoher von 1000 U/mL. Besonders ersichtlich wurde dieses Phänomen zu späten Kulturzeitpunkten, nach vier Wochen. Auch die Verwendung von IL-21 resultierte in einer höheren Frequenz von CD3^{POS} Zellen verglichen mit Protokollen, bei denen hauptsächlich IL-15 in der Expansionsphase verwendet wurde.

ERGEBNISSE

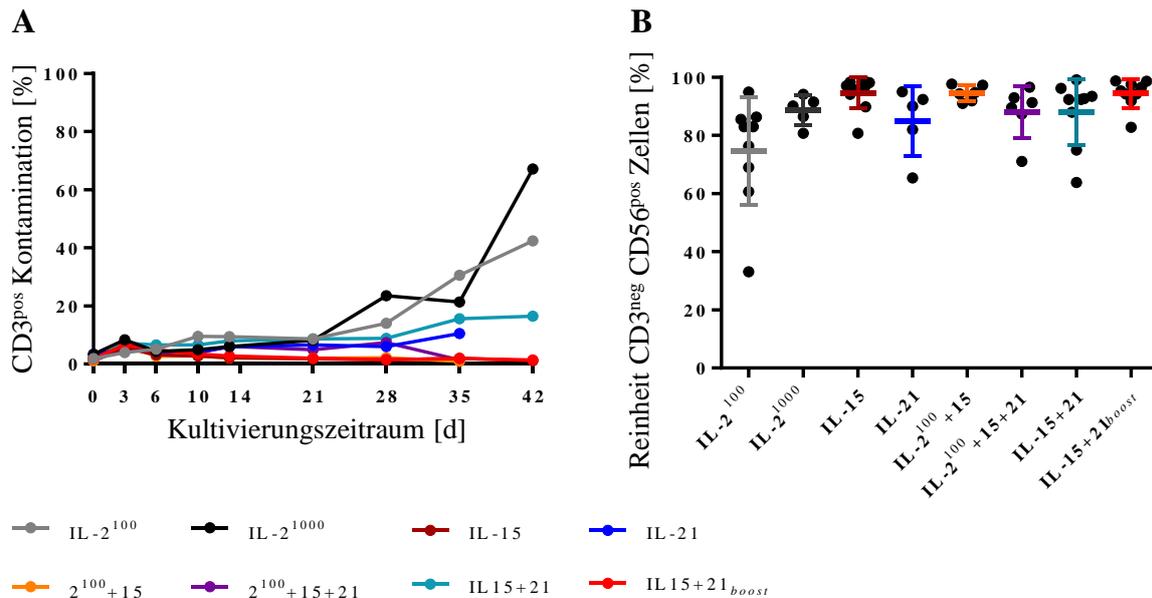


Abb. 4-6: Kontamination durch CD3^{pos} Zellen und Reinheitsgrad von NK-Zellen nach *ex vivo* Expansion unter Einfluss verschiedener Zytokine und Zytokinkombinationen. Aufgereinigte CD56^{pos}CD3^{neg} NK-Zellen wurden über vier bis sechs Wochen unter Einfluss verschiedener Zytokine und Zytokinkombinationen expandiert **A** Durchschnittlicher Anteil an CD3^{pos} Lymphozyten in der NK-Zellkultur von sechs bis 14 Spendern. **B** Anteil der CD56^{pos} CD3^{neg} Lymphozyten an Tag 14 der Kultivierung und die spenderabhängige Verteilung der Werte; die Quer- und Längsbalken geben jeweils die Mittelwerte bzw. die Standardabweichungen wieder. Einige der Daten wurden im Rahmen der Masterarbeit von Viktoria Pfannenstiel und des Praktikums von Sarah Kehr unter eigener Anleitung erhoben.

4.3.2 Vitalität

Die Vitalität der NK Zellen wurde durchflusszytometrisch mittels DAPI Färbung und anschließender Durchflusszytometrie bestimmt. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der bevorzugt in AT-reiche DNS-Abschnitte interkaliert. Er durchdringt intakte Zellmembranen nur sehr langsam und kann daher in stark verdünnter Form gut als Marker für die Zellvitalität eingesetzt werden.

Bedingt durch den Transfer der Zellen von ihrem natürlichen Milieu in das Kulturmedium, war zunächst ein Vitalitätsverlust zu verzeichnen, im Laufe der Kultivierung nahm der vitale Anteil der NK-Zellen jedoch wieder zu (siehe Abb. 4-7). Ab Tag 14 erholten sich die Zellen, wobei der Anteil vitaler Zellen bei Kultivierung mit IL-15 am höchsten war und jeglicher Zusatz anderer Zytokine diesen verringerte.

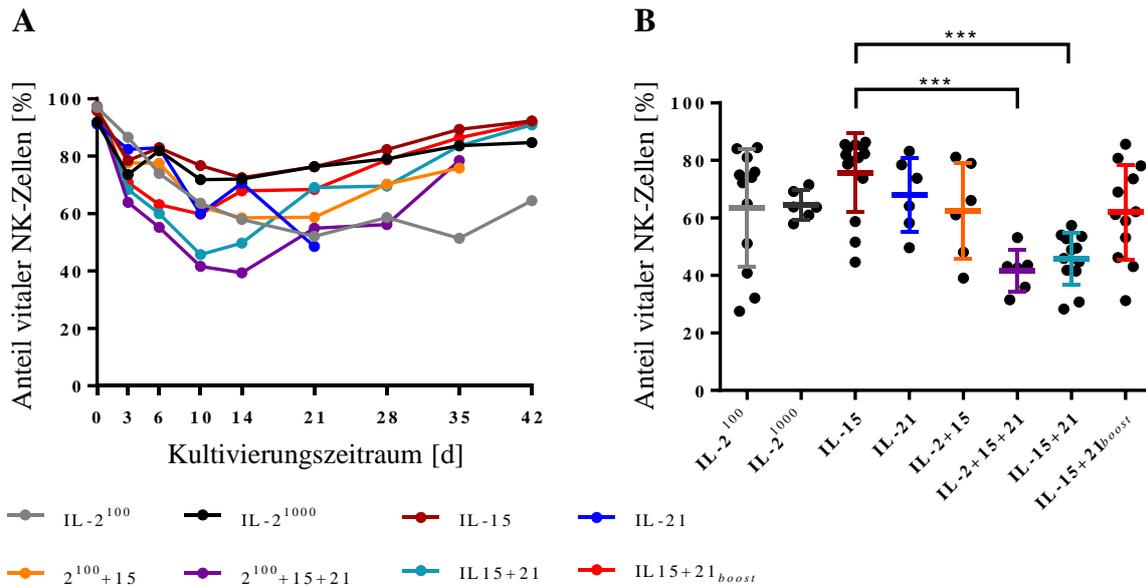


Abb. 4-7: Einfluss verschiedener Expansionsprotokolle auf die Vitalität von CD56^{pos}CD3^{neg} NK-Zellen. **A** Anteil lebender NK-Zellen im Verlauf der Kultivierung im Durchschnitt von sechs bis elf Spendern **B** Verteilung der Werte aller Spender an Tag zehn der Kultivierung; die Quer- und Längsbalken geben jeweils die Mittelwerte bzw. die Standardabweichungen an. Signifikante Unterschiede werden durch Sterne angezeigt (** p < 0.01, *** p < 0.005, one-way ANOVA). Einige der Daten wurden im Rahmen der Masterarbeit von Viktoria Pfannenstiel und des Praktikums von Sarah Kehr unter eigener Anleitung erhoben.

Vor allem bei anhaltender Präsenz von IL-21 war die Vitalität deutlich vermindert und betrug an Tag zehn nur 44% (28-57%). Damit war sie um die Hälfte niedriger als die Vitalität der Zellen unter Stimulation mit IL-15. Der Zusatz von IL-2 in hoher Konzentration von 1000 U/mL resultierte wiederum über den gesamten Kulturzeitraum hinweg in einem ähnlich hohen Anteil vitaler Zellen wie die Verwendung von IL-15.

4.3.3 Rückgewinnungsrate und Vitalität nach Kryokonservierung

Die Kryokonservierung bietet die Möglichkeit eine Zellproduktbank anzulegen und somit das Zellprodukt in größeren Mengen, jederzeit schnell verfügbar zu haben. Um zu überprüfen, ob sich die Kryokonservierung auch für die zytokinstimulierten NK-Zellen eignet, wurden diese nach sechstägiger Kultivierung mit entsprechenden Zytokinen geerntet, gewaschen, in frischem Kryomedium aufgenommen und bei -160°C im Stickstofftank gelagert. Nach Revitalisierung der NK-Zellen gab es zwei Möglichkeiten für den Einsatz solcher Zellen, entweder sie wurden nach einem Waschschrift direkt verwendet oder sie wurden, unter der

ERGEBNISSE

Annahme eine erneute Versorgung mit Zytokinen hätte eine Stabilisierung des Zellproduktes zur Folge, noch einmal für einen Tag unter Zugabe entsprechender Zytokine in Kultur genommen. Für beide Vorgehensweisen wurden sowohl die Rückgewinnungsrate als auch die Vitalität der Zellen bestimmt (siehe Abb. 4-8).

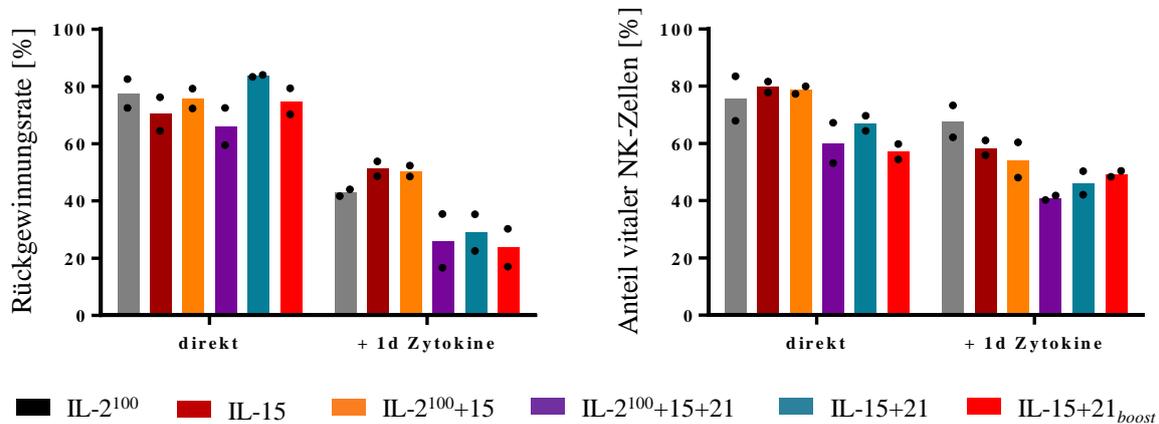


Abb. 4-8: Einfluss des Kryokonservierungs- und Auftauprozesses auf die Ausbeute an vitalen NK-Zellen. Die Zellen wurden über sechs Tage mit den entsprechenden Zytokinen oder Zytokinkombinationen expandiert, anschließend geerntet, gewaschen und kryokonserviert. Nach zwei Wochen Lagerung bei -160°C in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen aufgetaut und entweder direkt die Zellzahl und ihre Vitalität bestimmt (direkt) oder noch einmal für einen Tag mit den entsprechenden Zytokinen in Kultur genommen und erst dann Zellzahl und Vitalität ermittelt (1d Zytokine). Die Rückgewinnungsrate wurde als prozentualer Anteil der kryokonservierten Zellzahlen berechnet. Wiedergegeben sind die Mittelwerte zweier Spender.

In Abhängigkeit von den verschiedenen, vorangegangenen Zytokinstimulationen, konnten direkt nach Revitalisierung 60-84% der Zellen wiedergewonnen werden. Dabei schien sich die Vorbehandlung der NK-Zellen mit der Kombination aus IL-2¹⁰⁰+15+21 nachteilig auszuwirken, die Behandlung mit IL-2 alleine oder mit der Zytokinkombination IL-15+21 wirkte sich am besten auf die Rückgewinnungsrate aus. Zur Stabilisierung des Zellproduktes nach der Kryokonservierung, wurde zudem getestet, welche Zytokine den besten Einfluss auf die Zellvitalität haben. Dafür wurden die revitalisierten Zellen noch einmal für einen Tag in Anwesenheit entsprechender Zytokine kultiviert. Durch diesen Prozess wurde die Rückgewinnungsrate vermindert und sank auf maximal 54% bei Kultivierung mit IL-15 allein, war IL-21 im Medium, sogar auf durchschnittlich 27%. Bei diesem Vorgang bewirkten IL-15 und IL-2¹⁰⁰+15 die höchsten Rückgewinnungsraten verglichen mit anderen Zytokinbehandlungen.

Durchschnittlich 78% (68-83%) der frisch aufgetauten, ohne IL-21 kultivierten NK Zellen waren noch vital. Wurden die Zellen zuvor in Anwesenheit von IL-21 kultiviert, sank die Vitalität nach dem Auftauen auf 61% (53-70%) ab. Im Falle der Kultivierung der Zellen für einen weiteren Tag mit entsprechenden Zytokinen, fiel die Vitalität auf 60% (48-73%) für IL-15-expandede Zellen, bzw. auf 46% (40-50%) für Zellen, die zusätzlich mit IL-21- stimuliert worden waren.

4.4 CHARAKTERISIERUNG DES NK-ZELLPRODUKTS

NK-Zellen werden anhand des Zelladhäsionsmoleküls CD56 bei gleichzeitiger Abwesenheit des T-Zellkorezeptors CD3 definiert. Die NK-Zellsubpopulationen lassen sich an der Expressionsdichte des CD56 und dem Vorhandensein des CD16 unterscheiden. CD16, auch bekannt als Fc γ RIII, wird von reifen, zytotoxischen NK-Zellen exprimiert und kann an die Fc-Domäne von antigengebundenen Antikörpern binden und ist somit essentiell für die antikörpervermittelte Zytotoxizität von NK-Zellen [78,176,177]. Zur Charakterisierung der NK-Zellprodukte wurden die expandierten Zellen mittels der Definitionsmarker CD56 und CD16 hinsichtlich ihrer Subpopulationsverteilung und ihres Reifestadiums beurteilt. Weiter wurden expandierte Zellen bezüglich ihres Rezeptorrepertoires näher untersucht.

4.4.1 CD56-Expression

Im Laufe der NK-Zellexpansion konnte eine Zunahme der Expression des NK-Zellmarkers CD56 beobachtet werden (s. **Abb. 4-9**). Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), anhand derer die relative Markerdichte auf den Zelloberflächen bestimmt werden kann, stieg in den ersten sechs Tagen mit allen Expansionsprotokollen an. Mit IL-21 war die durchschnittliche CD56-Dichte auf allen Zellen um das Dreifache gestiegen, mit allen anderen Expansionsprotokollen war ein siebenfacher Anstieg erfolgt. Die Behandlung mit IL-2¹⁰⁰ bewirkte bei 30% der Zellen eine erhöhte CD56-Expression, dieser Anteil stieg im weiteren Verlauf auf 45%. Bei allen anderen Expansionsprotokollen war nach 14 Tagen bei durchschnittlich 90% der Zellen eine erhöhte CD56-Dichte zu beobachten, an Tag 28 sogar bei 99%. Durch den generellen Anstieg der CD56-Expression entfiel im Weiteren die Unterscheidung zwischen CD56^{dim} und CD56^{high} exprimierenden Zellen.

ERGEBNISSE

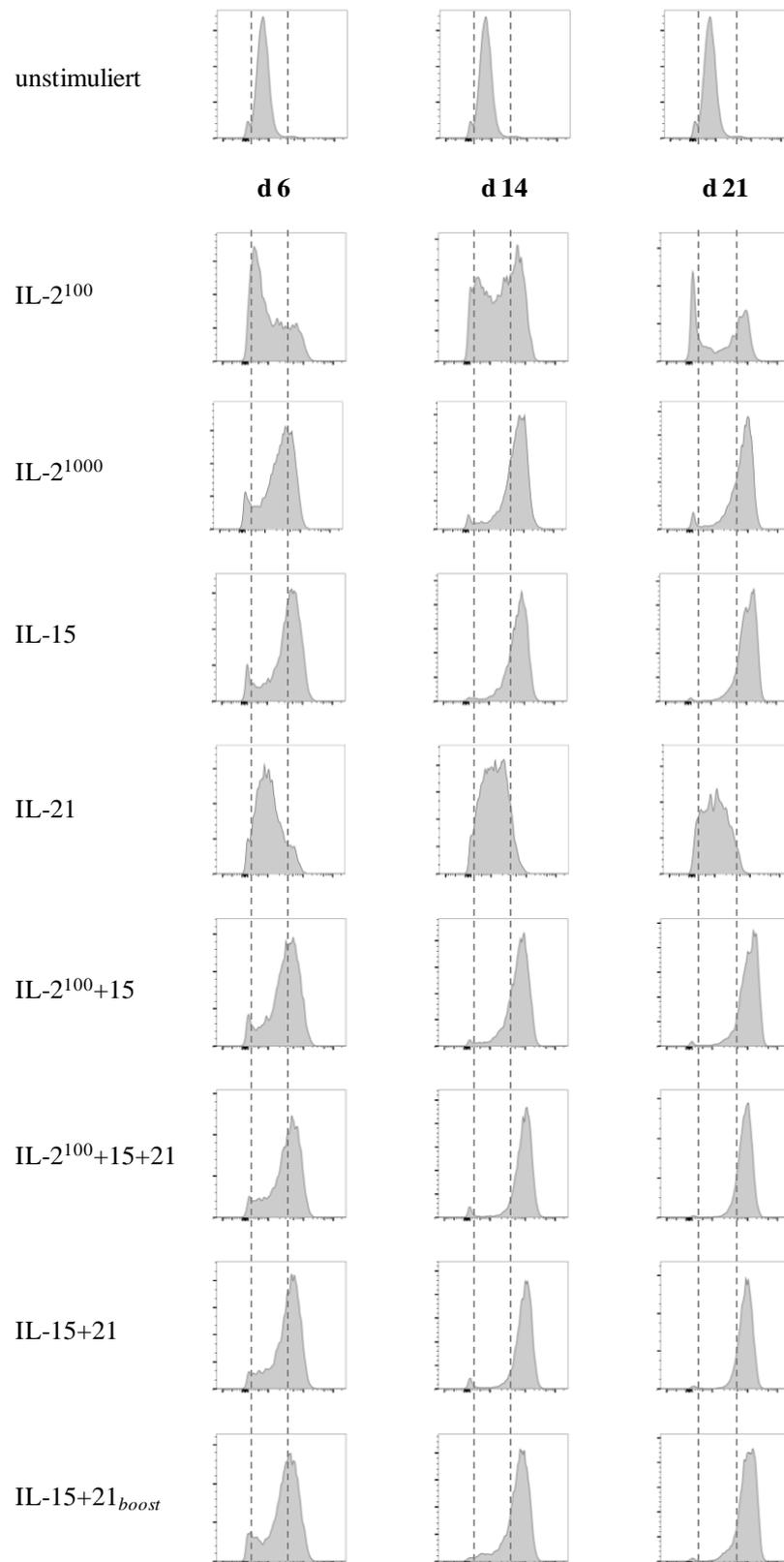


Abb. 4-9: CD56-Expression auf expandierten NK-Zellen. Die CD56-Dichte auf den NK-Zellen wurde vor der Expansion (unstimuliert) und nach sechs, 14 und 28 Tagen Kultivierung mit verschiedenen Zytokinen oder Zytokinkombinationen durchflusszytometrisch bestimmt.

4.4.2 Reifestadium

Da durch die Hochregulation von CD56 die Differenzierung zwischen CD56^{dim} und CD56^{high} zu späten Kultivierungszeiten wegfiel, wurde im Folgenden nur noch zwischen der CD16^{pos} und der CD16^{neg} NK-Subpopulation unterschieden.

Insgesamt ließ sich beobachten, dass IL-21 den Anteil reifer NK-Zellen, der die natürliche Zytotoxizität gegen Tumorzellen vermittelt und entsprechend der Expression des FcγRIII an der antikörpervermittelten Zytotoxizität beteiligt ist, förderte (siehe Abb. 4-10).

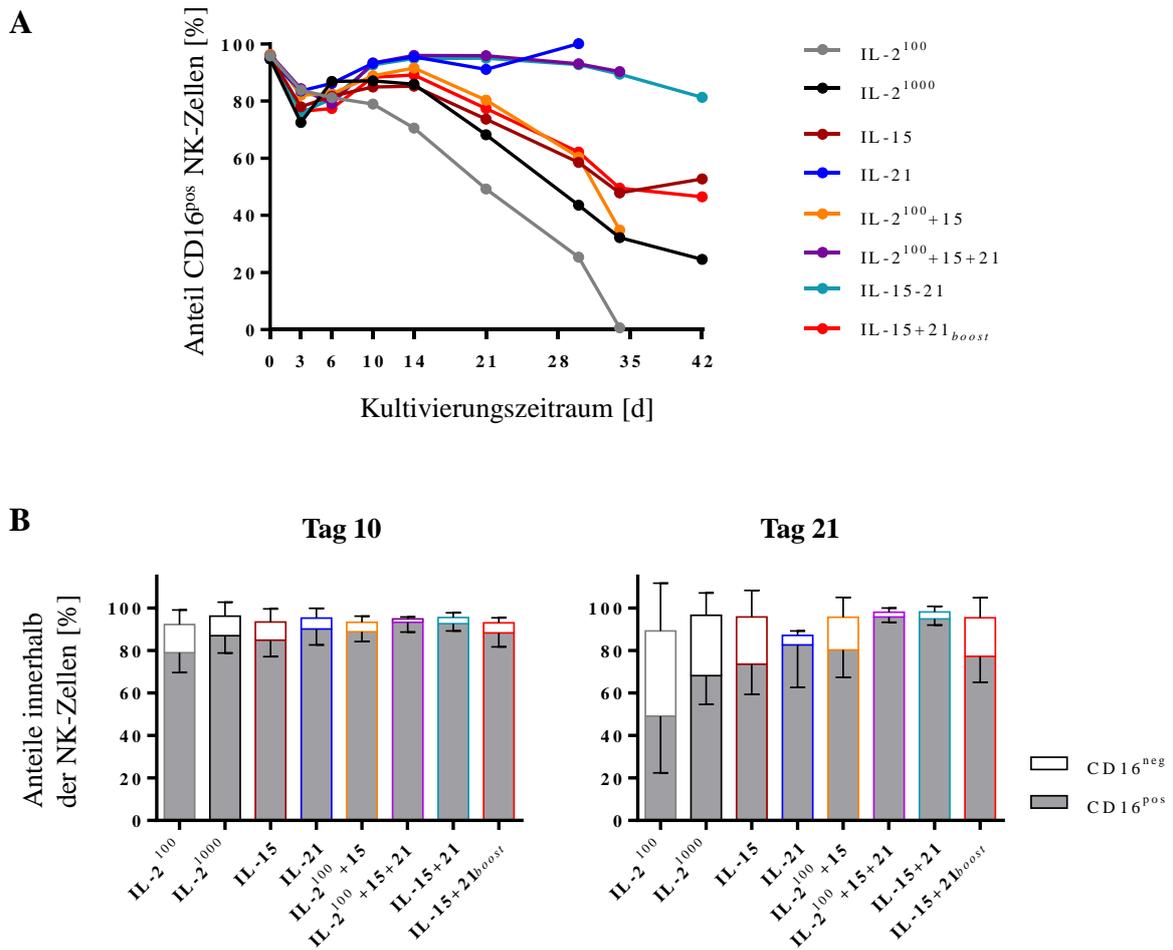


Abb. 4-10: CD16-Expression auf expandierten NK-Zellen. **A** Entwicklung des CD16^{pos} Anteils an NK-Zellen unter Anwendung verschiedener Expansionsprotokolle über vier bis sechs Wochen; dargestellt sind die Mittelwerte von fünf bis elf Spendern. **B** Verteilung von CD16^{pos} bzw. CD16^{neg} NK-Zellen innerhalb der NK-Zellpopulation an den Tagen zehn und 21 nach Expansion mit entsprechenden Zytokinen oder Zytokinkombinationen; die Balken repräsentieren die Mittelwerte von fünf bis elf Spendern, die senkrechten Linien zeigen Standardabweichungen an. Einige der Daten wurden im Rahmen der Masterarbeit von Viktoria Pfannenstiel unter eigener Anleitung erhoben.

In den ersten drei Tagen nach Beginn der *ex vivo* Kultur, erfolgte in allen Fällen ein starker Abfall des Anteils CD16^{pos} Zellen im NK-Zellprodukt von durchschnittlich 96 auf 80% (73-84%). Der Verlust an CD16 glich sich in den folgenden Tagen wieder auf, bis an Tag 14 mit allen Protokollen ein Maximum von 70% (IL-2¹⁰⁰) bis 96% (IL-2¹⁰⁰+15+21) an CD16^{pos} Zellen erreicht wurde. Im Folgenden nahm der Anteil CD16^{pos} NK-Zellen abhängig vom angewandtem Protokoll in unterschiedlichem Ausmaß wieder ab.

Alle Expansionsprotokolle, die IL-21 nutzten, führten ab Tag 14 zu einer konstant hohen Frequenz CD16 exprimierender NK-Zellen von durchschnittlich 91% (95% Tag 14 bis 81% Tag 42). Die CD16-Expression auf den Zelloberflächen war unter Abwesenheit von IL-21 deutlich vermindert und betrug nur 89% (Tag 14) bis 44% (Tag 34). Die ausschließliche Anwendung von IL-2 hatte eine weitere Reduktion des CD16^{pos} Anteils zur Folge und betrug nur noch 32% an Tag 34 bei hoher Konzentration von 1000 U/mL bzw. 79% (Tag 10) bis 1% (Tag 34) bei niedriger Konzentration von 100 U/mL.

4.4.3 Phänotypisierung

Nachdem festgestellt wurde, dass der Phänotyp der NK-Zellen nach Expansion hinsichtlich der Expression von CD56 und CD16 variieren konnte, war es naheliegend auch weitere Oberflächenmarker zu untersuchen. Diese Untersuchungen fokussierten sich auf NK-Zellen, die durch die Expansionsprotokolle IL-15, IL-15+21 und IL-15+21_{boost} generiert wurden, da diese bezüglich der Zellzahlen und Zellreife am vielversprechendsten waren, aber dennoch Unterschiede im Proliferationsverhalten aufwiesen. Außerdem waren sie gut vergleichbar um Schlüsse über die Einflüsse der Zytokine IL-15 und IL-21 auf die NK-Zellen zuzulassen.

Zur weiteren Phänotypisierung wurden Marker untersucht, die Auskunft über den Aktivierungsstand der Zellen geben können, wie z. B. CD69 und CD25, und Rezeptoren, deren Bindung aktivierende Wirkung auf NK-Zellen hat, beispielsweise NKG2D oder natürliche Zytotoxizitätsrezeptoren. Auch inhibitorisch wirkende Rezeptoren oder Rezeptorfamilien, wie die killerimmunglobulinähnlichen Rezeptoren, wurden näher untersucht. Da auch Migrations- und Adhäsionsverhalten wichtige Aspekte der Zellfunktion sind, wurden zudem entsprechende Moleküle auf den Zelloberflächen analysiert, darunter fallen beispielsweise CD11, die α -Kette des Integrins LFA-1, oder CD62L, welches die Zellen ins Knochenmark lenkt.

4.4.3.1 Aktivierungsrezeptoren

Zunächst wurde der Einfluss der verschiedenen Expansionsprotokolle auf die Expression einer Reihe ausgewählter aktivierender und teilweise zytotoxizitätsvermittelnder Rezeptoren untersucht und ihre Expressionsdichte anhand der mittleren Fluoreszenzintensität dargestellt.

Die Todesrezeptoren TRAIL (*tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand*) und FasL, die beide durch Bindung an ihre spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche direkt den programmierten Zelltod der Zielzellen auslösen, wurden durch Kultivierung der NK-Zellen mit IL-15 signifikant erhöht und nach zusätzlicher Applikation von IL-21 weiter hochreguliert (siehe Abb. 4-11). Ein ähnlicher, additiver Effekt von IL-15 und IL-21 konnte für DNAM-1 und den natürlichen Zytotoxizitätsrezeptor (NCR) NKp46 beobachtet werden (siehe Abb. 4-12).

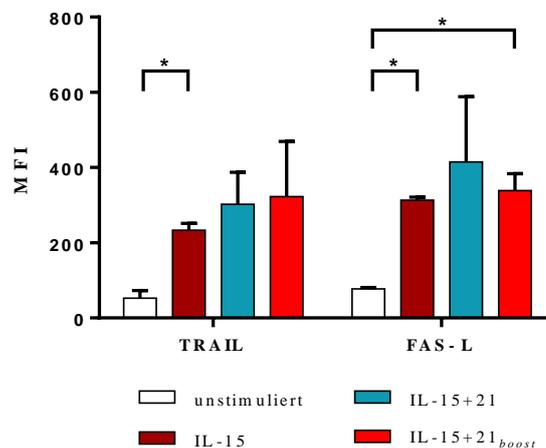


Abb. 4-11: Expressionsdichte apoptosevermittelnder Todesrezeptoren. Dargestellt sind die gemittelten Fluoreszenzintensitäten (MFI) nach durchflusszytometrischer Analyse der Oberflächenmarker frisch aufgereinigter NK-Zellen (unstimuliert) bzw. nach sechstägiger Expansion mit ausgewählten Zytokinkombinationen. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte von drei Spendern, die senkrechten Linien zeigen entsprechende Standardabweichungen an. Signifikante Unterschiede werden durch Sterne angezeigt (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, one-way ANOVA).

Interessanterweise hatte IL-21 im Falle der anderen NCRs, NKp30 und NKp44 keinen zusätzlich fördernden, sondern einen inhibierenden Effekt auf die Expression an der NK-Zelloberfläche. Mit IL-15 im Kulturmedium waren diese zwar hochreguliert, bei zusätzlicher Anwesenheit von IL-21 aber war die Expression schwächer ausgeprägt. Auch der aktivierende Rezeptor NKG2D war IL-15-vermittelt an der Zelloberfläche detektierbar, wurde aber bei IL-21-Exposition signifikant reduziert (siehe Abb. 4-12).

ERGEBNISSE

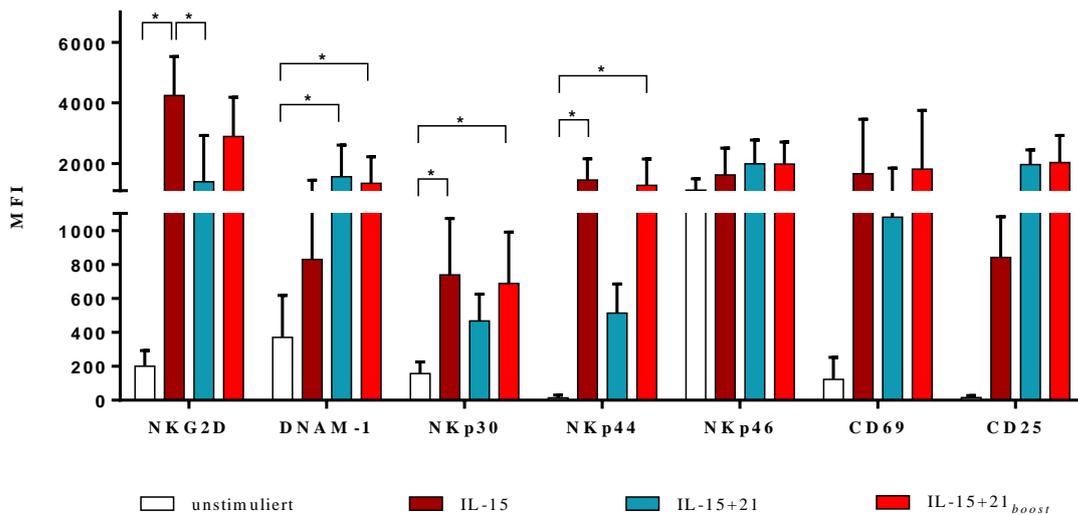


Abb. 4-12: Expressionsdichte aktivierender Rezeptoren. Dargestellt sind die gemittelten Fluoreszenzintensitäten (MFI) nach durchflusszytometrischer Analyse der Oberflächenmarker frisch aufgereinigter NK-Zellen (unstimuliert) bzw. nach sechstägiger Expansion mit ausgewählten Zytokinkombinationen. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte von drei Spendern, die senkrechten Linien zeigen entsprechende Standardabweichungen an. Signifikante Unterschiede werden durch Sterne angezeigt (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, one-way ANOVA).

Der frühe Aktivierungsmarker CD69 wurde am sechsten Tag der Expansion mit den Protokollen IL-15, IL-2¹⁰⁰+15 und IL-15+21_{boost} stärker exprimiert als nach permanenter IL-21-Stimulation ausgesetzt waren. Für den späten Aktivierungsmarker CD25 verhielt es sich genau andersherum, wobei schon eine kurze IL-21-Exposition im IL-15+21_{boost} Protokoll zu einer Erhöhung des Markers führte im Vergleich zum IL-15 Protokoll.

Über einen längeren Kultivierungszeitraum wurden alle aktivierenden Oberflächenmarker verstärkt exprimiert (siehe Abb. 4-13). Dabei spielte das jeweilige Expansionsprotokoll eine untergeordnete Rolle, wie die gleichmäßige Zunahme der Moleküle an der Zelloberfläche mit allen drei Zytokinkombinationen zeigte. Nur die Marker CD69 und CD25 waren in allen Expansionskulturen am Tag 18 im Vergleich zu Tag 6 herunter reguliert.

ERGEBNISSE

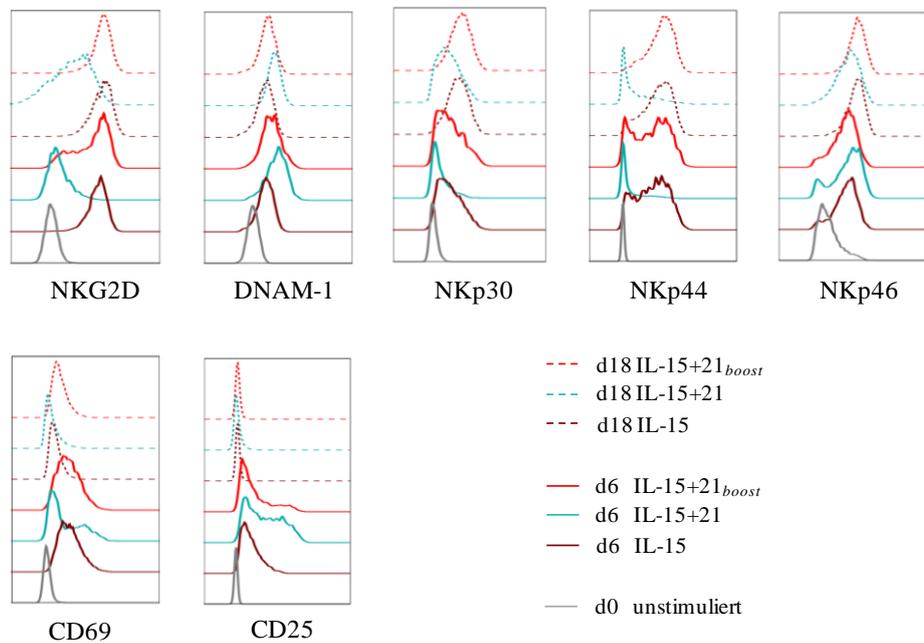


Abb. 4-13: Regulierung der Expression aktivierender Oberflächenmarker in Abhängigkeit vom Expansionsprotokoll und der Zeit. Die aufgereinigten CD3neg CD56pos NK-Zellen wurden mit ausgewählten Protokollen über sechs (d6) bzw. 18 Tage (d18) expandiert. An den entsprechenden Tagen wurden frische, d.h. unstimulierte Zellen oder expandierte Zellen durchflusszytometrisch auf die genannten aktivierenden Rezeptoren untersucht. In den übereinander abgebildeten Histogrammen sind die Messungen eines exemplarischen Spenders an verschiedenen Tagen nach Anwendung unterschiedlicher Expansionsprotokolle dargestellt.

Zudem wurde untersucht ob die aktivierenden Rezeptoren NKG2D, NKp44 und DNAM-1 gemeinsam exprimiert werden und welche Subpopulation diese koexprimiert. Dazu wurden Antikörper mit entsprechenden Spezifitäten mit unterschiedlichen konjugierten Fluorochromen eingesetzt und in einem gemeinsamen Ansatz in verschiedenen Kanälen am Durchflusszytometer gemessen. In der Auswertung wurden die CD56^{bright}CD16^{neg} und CD56^{dim}CD16^{pos} NK-Zellsubpopulationen im Histogramm in eine negative und eine positive DNAM-1-Fraktion eingeteilt, diese wurden weiter in positive und negative NKp44-Fraktionen und schließlich in positive und negative NKG2D-Fraktionen gegliedert. Die Aufteilung der einfach, doppelt und dreifach positiven Populationsanteile wurde schließlich als Kreisdiagramm dargestellt (siehe Abb. 4-14).

ERGEBNISSE

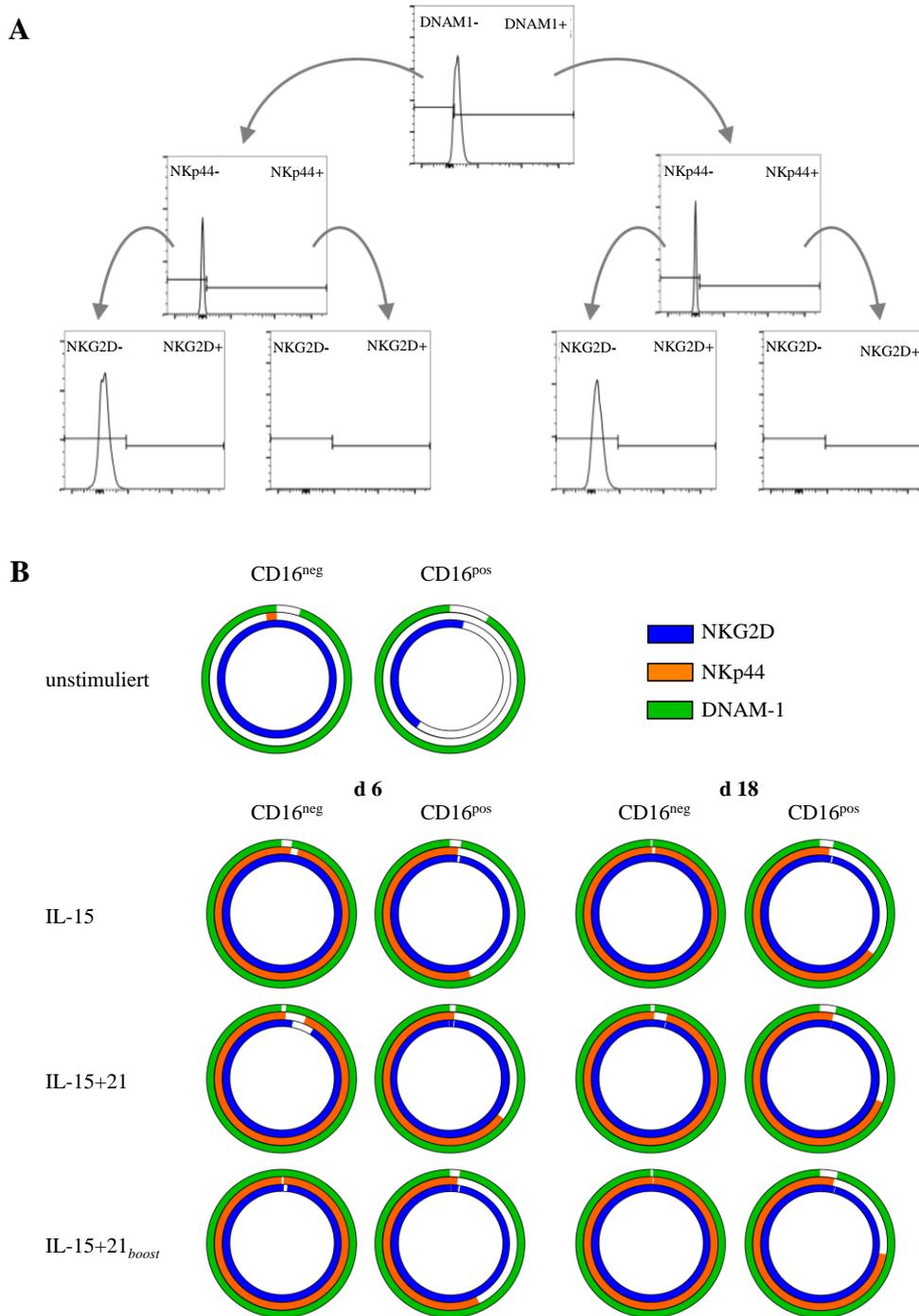


Abb. 4-14: Populationsidentifikationsstrategie zur Koexpressionsanalyse und Koexpression aktivierender Rezeptoren. **A** Dargestellt ist die Populationsidentifikationsstrategie, bei der zunächst eine Einteilung in DNAM-1^{neg} und DNAM-1^{pos} Zellen erfolgte. Anschließend wurden die resultierenden Populationen in NKp44^{neg} und NKp44^{pos} Zellen eingeteilt und schließlich davon der NKG2D^{neg} und NKG2D^{pos} Anteil bestimmt. **B** Die Kreisdiagramme zeigen die Anteile der NK-Zellpopulationen an, die NKG2D, NKp44 oder DNAM-1 tragen bzw. die Anteile der Zellen, die einen, zwei oder drei dieser Rezeptoren koexpressieren. Gezeigt sind Koexpressionsdaten unstimulierter Zellen und Daten von Zellen, die sechs bzw. 18 Tage mit verschiedenen, ausgewählten Protokollen expandiert wurden.

Fast alle CD16^{neg} NK-Zellen exprimierten mindestens zwei der drei Rezeptoren gleichzeitig, nur ein kleiner Teil exprimierte nur NKG2D und ein noch kleinerer Anteil exprimierte keinen dieser Rezeptoren. Am sechsten Tag der Expansionskultur koexprimierten fast alle Zellen alle drei aktivierenden Rezeptoren, nur sehr wenige Zellen wiesen nur einen oder zwei Rezeptoren auf. In der Fraktion der unstimulierten, CD16^{pos} Zellen exprimierte die Hälfte nur NKG2D und die andere Hälfte NKG2D zusammen mit DNAM-1. Wurden die Zellen dann mit IL-15 oder IL-15+21_{boost} expandiert, so erhöhte sich die Koexpression am Tag 6 um einen weiteren Rezeptor, das heißt, die Hälfte der CD16^{pos} Zellen zeigte alle drei Rezeptoren auf der Oberfläche und die andere Hälfte exprimierte zwei, nämlich NKG2D mit DNAM-1. Wurden die Zellen durchgängig IL-21 ausgesetzt, so erhöhte sich der Anteil dreifach exprimierender NK-Zellen auf etwa zwei Drittel. Mit längerer Kultivierungszeit erhöhte sich die Anzahl NKp44 tragender CD16^{pos} Zellen leicht. Zusammengenommen ergaben sich keine gravierenden Unterschiede in der Koexpression von NKG2D, NKp44 und DNAM-1 durch Expansion der NK-Zellen mit den verschiedenen Zytokinprotokollen.

4.4.3.2 Inhibierende Rezeptoren

Zusätzlich zu den aktivierenden wurden auch inhibitorische NK Zellrezeptoren der KIR2D- und KIR3D-Familie sowie NKG2A untersucht (siehe Abb. 4-15). Schon bei nicht stimulierten Zellen zeigte sich eine NK Zellsubpopulation, die KIR2D- und KIR3D-Rezeptoren in geringem Maße exprimieren. Während der Kultivierung nahm die Anzahl KIR2D^{pos} und KIR3D^{pos} Zellen ab, solche Zellen aber, die die Marker trugen, regulierten die Expression dieser wiederum hoch. Zwischen den getesteten Expansionsprotokollen ergaben sich kaum Unterschiede hinsichtlich der KIR2D- und KIR3D-Rezeptorexpression. Bei Expansion über einen längeren Zeitraum wurde die Rezeptordichte auf den NK-Zellen nicht weiter erhöht und die rezeptortragende Population verkleinerte sich.

Im Gegensatz zu den Rezeptoren der KIR2D- und KIR3D-Familie wurde NKG2A mittels aller getesteten Expansionsprotokolle signifikant erhöht, wobei dieser Effekt durch IL-21 im Vergleich zu alleinigem IL-15 und durch einen längeren Expansionszeitraum verstärkt wurde.

ERGEBNISSE

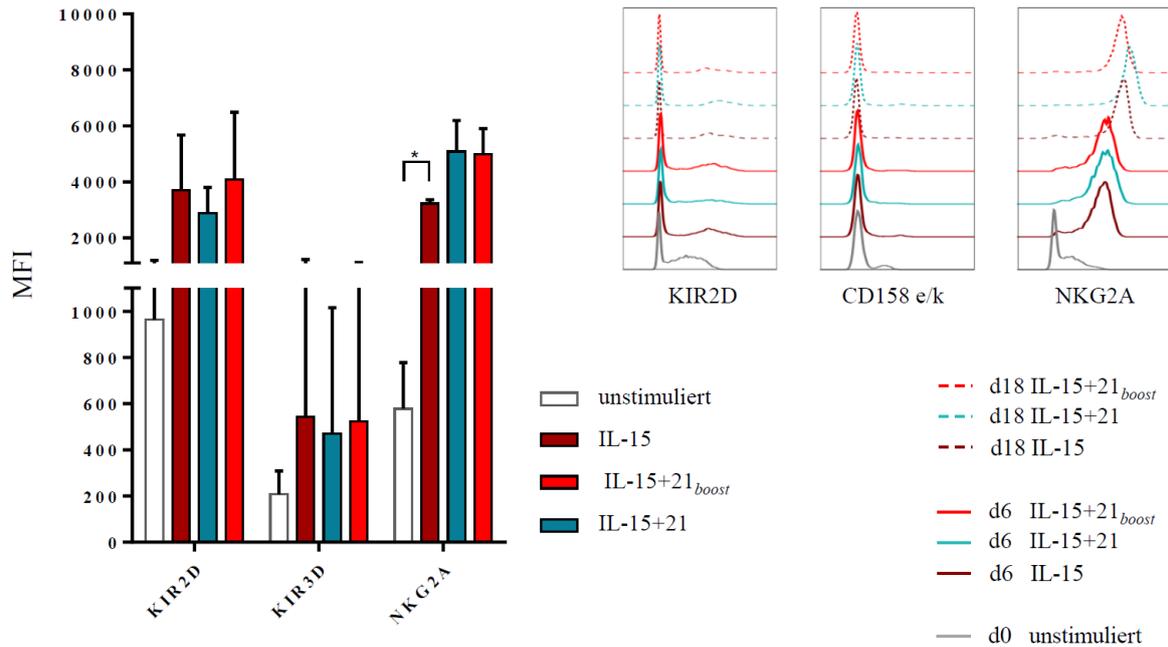


Abb. 4-15: Regulierung der Expression inhibitorischer Rezeptorfamilien in Abhängigkeit vom Expansionsprotokoll und der Zeit. Links sind die gemittelten Fluoreszenzintensitäten (MFI) nach durchflusszytometrischer Analyse der Oberflächenmarker frisch aufgereinigter NK-Zellen (unstimuliert) bzw. nach sechstägiger Expansion mit ausgewählten Zytokinkombinationen dargestellt. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte von drei Spendern, die senkrechten Linien zeigen entsprechende Standardabweichungen an. Signifikante Unterschiede werden durch Sterne angezeigt (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, one-way ANOVA). Rechts sind die übereinander gestapelten Histogramme der Messung eines exemplarischen Spenders nach sechs bzw. 18 Tagen im Vergleich zu unstimulierten NK-Zellen gezeigt.

Während NKG2A auf CD16^{pos} NK-Zellen nach Zytokinstimulation zunahm, sank der Anteil KIR2D^{neg} CD16^{pos} Zellen mit länger anhaltender Expansionskultur. Unter dem CD16^{neg} Anteil nahm die Frequenz KIR2D-Rezeptoren exprimierender Zellen zunächst zu. Das hohe Expressionsniveau konnte allerdings nicht dauerhaft gehalten werden. Vor allem der ständige Einfluss von IL-21 trieb die Zahl KIR2D^{pos} Zellen zunächst hoch, war aber im Vergleich zu IL-15 oder einem kurzen IL-21 Schub für eine verminderte Frequenz an Tag 18 der Expansionskultur verantwortlich.

Interessanterweise wurden nach 18 Tagen NK-Zellexpansion die Rezeptoren der KIR2D- und der KIR3D-Familie zwar auf der Oberfläche einiger CD16^{neg} Zellen exprimiert, jedoch nie koexprimiert (siehe Abb. 4-16). Auch bei CD16^{pos} Zellen war der koexprimierende Anteil nach sechs Tagen NK-Zellexpansion größer als nach 18 Tagen, allerdings blieb immer ein kleiner koexprimierender Anteil erhalten.

ERGEBNISSE

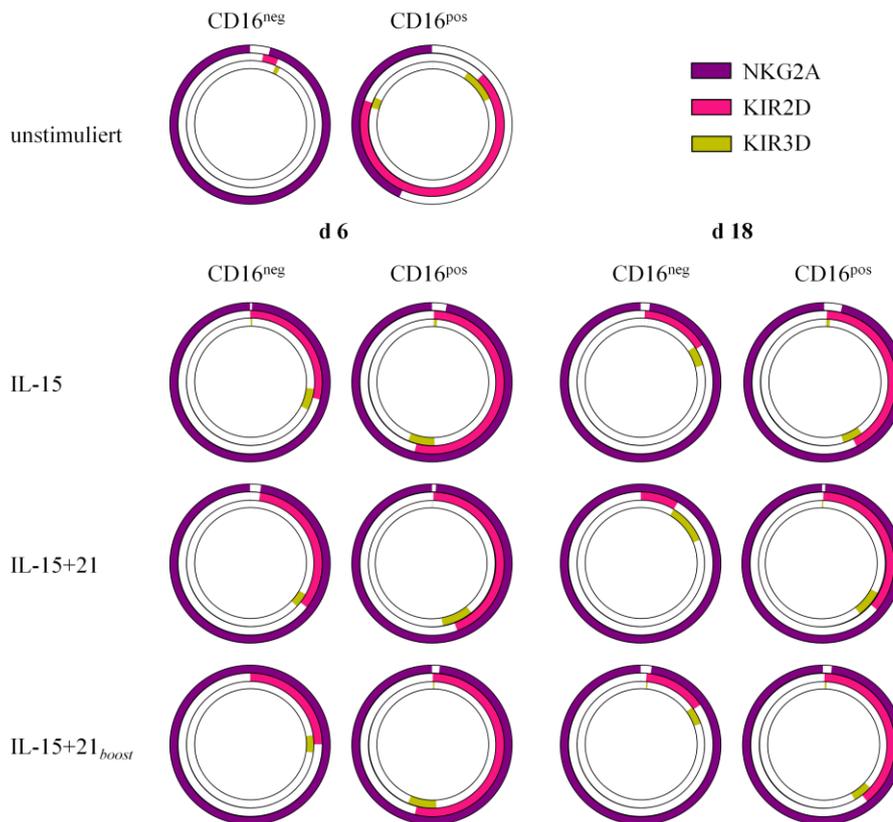


Abb. 4-16: Koexpressionsdiagramme inhibitorisch wirkender Rezeptorfamilien. Die Kreisdiagramme zeigen die Anteile der NK-Zellpopulationen an, die NKG2A oder KIR2D- bzw. KIR3D-Rezeptoren tragen und die Anteile der Zellen, die einen, zwei oder drei dieser Rezeptoren koexprimieren. Gezeigt sind Koexpressionsdaten unstimulierter Zellen und von Zellen, die sechs bzw. 18 Tage mit verschiedenen, ausgewählten Protokollen expandiert wurden.

4.4.3 Migrations- und Adhäsionsrezeptoren

Die Rezeptoren CCR7 und CD62L, die die Migrationskompetenz der Zellen in lymphoides Gewebe, bzw. ins Knochenmark, widerspiegeln, waren nach 6 Tagen vor allem unter permanenter Zugabe von IL-21 in einer kleinen Fraktion der NK-Zellen etwas erhöht, wurden aber nach längerer Kultivierung wieder herunter reguliert. Die Marker CX3CR1 und CXCR4 wurden zu keinem der untersuchten Zeitpunkte exprimiert (siehe Abb. 4-17).

Der aktivierende Adhäsionsrezeptor DNAM-1 wurde nach sechstägiger Expansion der Zellen mit allen Protokollen erhöht. Unter Zugabe von IL-21 war diese Expressionszunahme verstärkt und bei permanenter Anwesenheit von IL-21 sogar signifikant. In einer späteren

ERGEBNISSE

Kultivierungsphase wurde die Expression von DNAM-1 auf den Zelloberflächen jedoch wieder leicht reduziert. Auch das Adhäsionsmolekül LFA-1 wurde durch Zytokinstimulation zunächst hoch reguliert, blieb dann aber nach sechs Tagen stabil exprimiert bis zur folgenden Messung an Tag 18, unabhängig vom getesteten Expansionsprotokoll. Im Gegensatz dazu wurde 4-1BB (CD137) spät hoch reguliert und konnte erst mit der Messung an Tag 18 auf den NK-Zellen nachgewiesen werden. Die Regulation dieses Rezeptors erfolgte ebenfalls unabhängig vom getesteten Expansionsprotokoll.

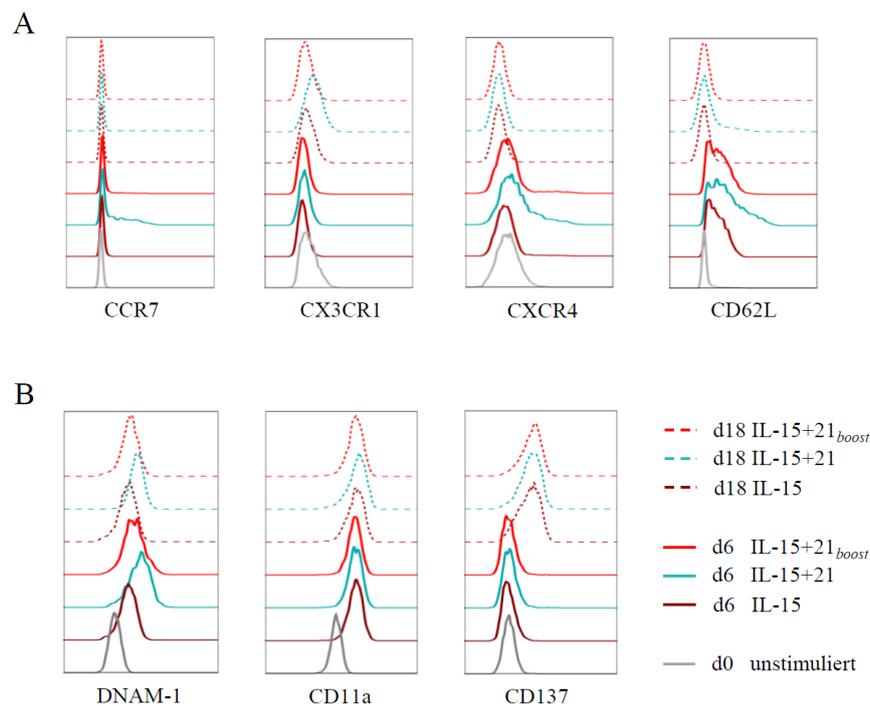


Abb. 4-17: Regulierung der Expression von Migrationsrezeptoren und Adhäsionsmolekülen in Abhängigkeit vom Expansionsprotokoll und der Zeit. Dargestellt sind die Histogramme von durchflusszytometrischen Messungen eines Spenders zu Beginn (d0), an Tag sechs und Tag 18 der NK-Zellexpansion mit ausgewählten Protokollen.

4.5 OBERFLÄCHENTYPISIERUNG DER ZIELZELLEN

Auch die in der vorliegenden Studie verwendeten Zelllinien malignen Gewebes wurden auf Expression von Oberflächenmarkern untersucht. Hierbei wurde der Fokus auf NKG2D Liganden MIC-A, MIC-B und ULBP-1 bis ULBP-4 gelegt. Die Erythroleukämiezelllinie

ERGEBNISSE

K562, die standardmäßig als Zielzelle zur Testung der Zytotoxizität von NK-Zellen eingesetzt wird, wurde auf all diese NKG2D Liganden negativ getestet. Abb. 4-18 zeigt, dass die RMS-Zelllinie RD die Oberflächenmoleküle MIC-A und ULBP-1 bis ULBP-3 aufwies, während die RH30-Zelllinie MIC-A und außerdem ULBP-2 und ULBP-3 exprimierte.

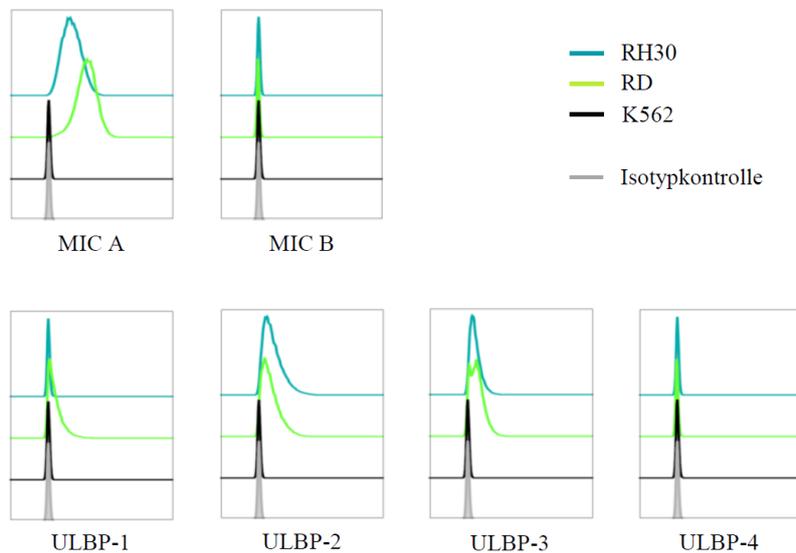


Abb. 4-18: NKG2D-Ligandenanalyse auf malignen Zielzellen. Dargestellt sind die Histogramme der durchflusszytometrischen NKG2D-Ligandenanalyse der verwendeten Leukämiezelllinie K562 und der Rhabdomyosarkomzelllinien RD und RH30 im Vergleich zur Isotypkontrolle. Die Zellen wurden auf die Liganden MIC-A/B und ULBP-1/2/3/4 untersucht.

4.6 FUNKTIONALITÄT DES NK-ZELLPRODUKTS

Die Funktionalität der NK-Zellen umfasst verschiedene Bereiche. Bei der Zellexpansion geht es darum durch die Einwirkung der Zytokine eine gute Aktivierung der Zellen zu erzielen und damit eine direkte zytotoxische Wirkung gegen Tumorzellen. Neben der Ligation der Todesrezeptoren, können NK-Zellen durch Ausschüttung apoptoseinduzierender Mediatoren ihre lytische Wirkung entfalten. Zudem können NK-Zellen durch Sekretion von Zytokinen und Chemokinen sowohl ihre eigene Aktivität fördern als auch andere Immunzellen beeinflussen.

4.6.1 *In vitro* Zytotoxizität ausgewählt expandierter NK-Zellen

Neben der Steigerung der Zellausbeute, ist ein weiteres wichtiges Kriterium eines guten Expansionsprotokolls, dass damit effiziente Effektorzellen generiert werden, die eine optimale anti-tumorale Zytotoxizität aufweisen. Da die Expansionsprotokolle IL-15, IL-15+21 und IL-

ERGEBNISSE

15+21_{boost} aus den vorangegangenen Analysen als die aufschlussreichsten galten, wurden die NK-Zellen für funktionelle Untersuchungen nur noch unter Anwendung dieser ausgewählten Zytokinprotokolle expandiert. Nach sechs Tagen wurden die NK-Zellen geerntet und in verschiedenen Zellzahlverhältnissen mit entsprechenden Zielzellen koinkubiert. Im Falle von K562 Zellen reichte eine Inkubationszeit von zwei Stunden für die Zytotoxizitätstests, während bei Analysen mit RD- oder RH30-Zellen fünf Stunden Koinkubation abgewartet werden mussten. Wie in Abb. 4-19 zu sehen ist, wurde die spezifische Lyse der Tumorzellen mit zunehmender Effektorzellzahl gesteigert.

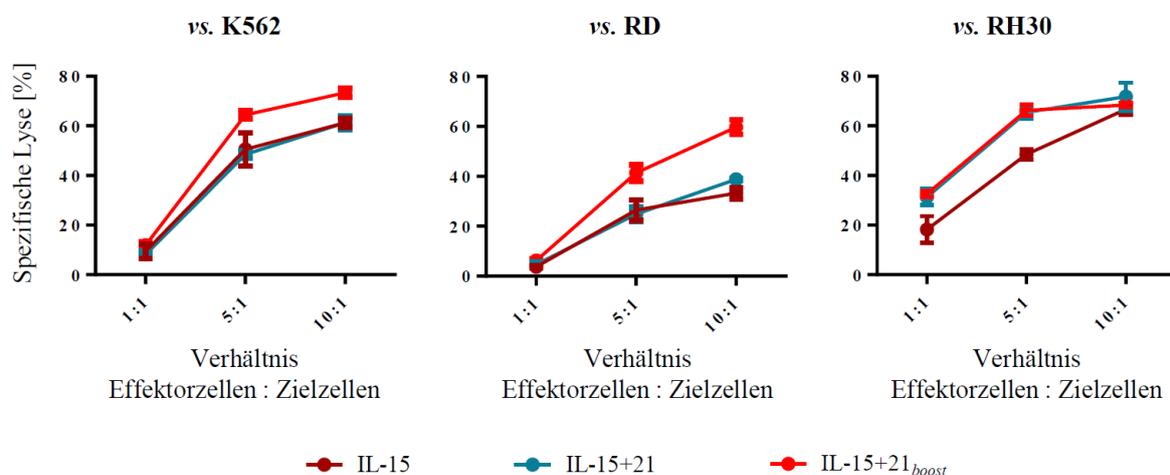


Abb. 4-19: Abhängigkeit der spezifischen Lyse vom E:T-Verhältnis. Die Abbildung zeigt exemplarisch einen Zytotoxizitätstest eines Spenders jeweils gegen K562, RD und RH30 mit den E:T-Verhältnissen 1:1, 5:1 und 10:1. Verwendet wurden NK-Zellen, die über sechs Tage mittels ausgewählter Protokolle expandiert wurden. Die spezifische Lyse berechnet sich aus der Subtraktion des Anteils toter Zielzellen durch Spontanlyse vom Anteil toter Zielzellen durch Koinkubation mit NK-Zellen. Die gezeigten Daten entsprechen Mittelwerten aus drei technischen Replikaten und den dazugehörigen Standardabweichungen (senkrechte Balken).

Das Expansionsprotokoll unter Verwendung von IL-15 zur Vermehrung der Zellen und einem IL-21-Boost über drei Tagen führte zu signifikant erhöhter anti-tumoraler Wirkung der NK-Zellen (siehe Abb. 4-20). Im Vergleich zur Expansion unter ausschließlicher Verwendung von IL-15 wurde die spezifische Zielzellyse um etwa 10% gesteigert. Auch die permanente Verwendung von IL-21 zusätzlich zu IL-15 führte zu einer Verstärkung der NK-Zellwirkung gegen K562- und RH30-Zellen. Im Falle der RD-Zellen führte die permanente IL-21-

Exposition zu Verminderung der Tumorzelllyse, der dreitägige IL-21-Boost jedoch zu einem Anstieg der Zytotoxizität.

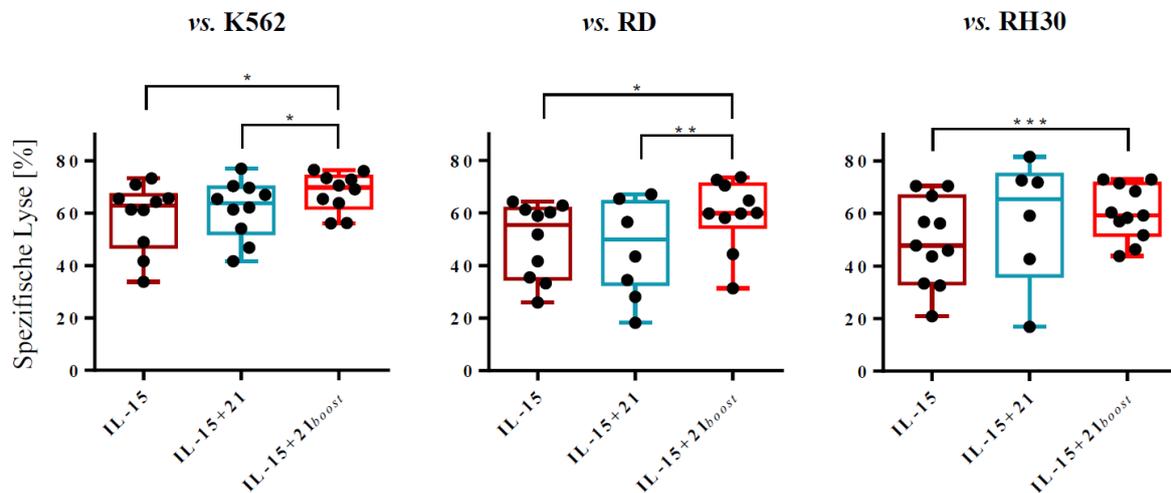


Abb. 4-20: Steigerung der Zytotoxizität durch Anwendung des IL-15+21_{boost} Expansionsprotokolls. Die NK-Zellen wurden über sechs Tage mit ausgewählten Expansionsprotokollen kultiviert und anschließend mit den Tumorzelllinien K562, RD oder RH30 über 2 h (K562) bzw. 5 h (RD und RH30) koinkubiert. Die Kastengrafik zeigt die Verteilungen der Einzelwerte verschiedener Spender, die bei einem Effektorzell-zu-Zielzell-Verhältnis von 10:1 gewonnen wurden, sowie den Median dieser Werte an. Signifikante Unterschiede werden durch Sterne angezeigt (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, one-way ANOVA). Einige der Daten wurden im Rahmen der Masterarbeit von Viktoria Pfannenstiel und des Praktikums von Sarah Kehr unter eigener Anleitung erhoben.

4.6.2 Zytotoxizität nach Kryokonservierung

Um zu ermitteln ob es für wiederholte Applikationen von NK-Zellen besser ist, diese über einen längeren Zeitraum fortwährend zu kultivieren oder diese frühzeitig nach Expansion zu kryokonservieren, wurden Zytotoxizitätsversuche mit NK-Zellen durchgeführt, die bis zu 14 Tage mit dem IL-15+21_{boost}-Protokoll expandiert wurden. Die Zellen wurden dementsprechend mit IL-15 expandiert und jeweils drei Tage vor Ernte mit einem IL-21-Boost stimuliert. An den Tagen 6, 10 und 14 wurden die Zellen geerntet und in verschiedenen Effektorzellkonzentrationen mit RD-Zellen koinkubiert. Außerdem wurde eine an Tag sechs der Expansion geerntete NK-Zellfraktion kryokonserviert, nach zwei Wochen aufgetaut und gegen RD-Zellen eingesetzt (siehe Abb. 4-21).

Obwohl die Zytotoxizität der NK-Zellen nach 10 und 14 Tagen im Vergleich zu frischen, sechs Tage kultivierten Zellen sank, war sie dennoch höher als bei kryokonservierten Zellen.

ERGEBNISSE

So wurde nach sechstägiger Expansion bei einem Effektorzell-zu-Zielzell-Verhältnis von 10:1 eine spezifische Tumorzelllyse von 66% erreicht, welche innerhalb der folgenden Kultivierungswoche auf 42% sank. Mit den expandierten, kryokonservierten NK-Zellen wiederum wurden im Vergleich dazu lediglich 10% der Tumorzellen abgetötet.

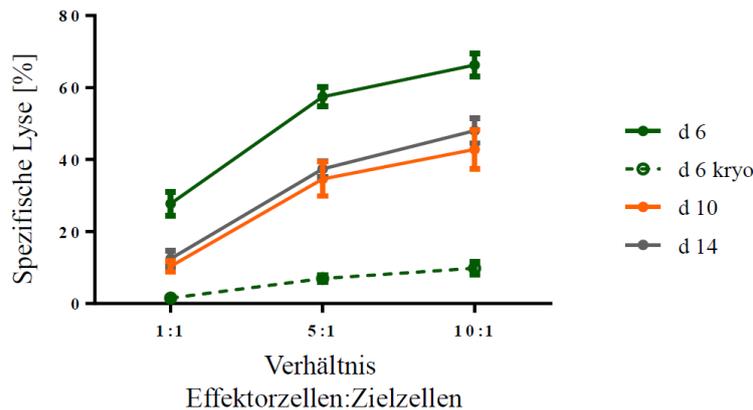


Abb. 4-21: Einfluss der Kryokonservierung und der kontinuierlichen Expansion auf die Zytotoxizität von NK-Zellen. Aufgereinigte CD56^{pos} CD3^{neg} NK-Zellen wurden über sechs, zehn und 14 Tage mit dem IL-15+21_{boost}-Protokoll expandiert. An entsprechenden Tagen wurden die NK-Zellen geerntet und ihre zytolytische Aktivität gegen RD-Zellen getestet. Im Vergleich dazu wurde eine NK-Zellfraktion nach sechstägiger Expansion kryokonserviert und nach dem Auftauen ebenfalls im Zytotoxizitätstest gegen RD-Zellen eingesetzt. Alle Tests wurden aus demselben Spender in drei Replikaten angesetzt, wiedergegeben sind die Mittelwerte und entsprechende Standardabweichungen (senkrechte Balken).

Da neben der höheren Zytotoxizität durch kontinuierliche Expansion auch insgesamt höhere NK-Zellzahlen erreicht werden konnten, wurden die Zellen bei allen nachfolgenden Versuchen, in denen mehrere NK-Zellapplikationen erforderlich waren, kontinuierlich weiter kultiviert, um einen Qualitätsverlust durch Kryokonservierung zu vermeiden.

4.6.3 Zytotoxizitätssteigerung durch NK-Zellpassagierung

Obwohl bekannt ist, dass es für NK-Zellen besonders gut ist, wenn sie in hoher Zelldichte kultiviert werden, wurden in dieser Studie Tests durchgeführt, ob durch regelmäßige NK-Zellpassagierung die Zytotoxizität weiter gesteigert werden kann. Dazu wurden im Rahmen einer betreuten Masterarbeit aufgereinigte Zellen unter Anwendung der Protokolle IL-15 und IL-15+21_{boost} expandiert. Die Kulturen wurden jeweils in zwei Ansätze aufgeteilt, von denen

einer kontinuierlich kultiviert wurde, wobei alle drei bis vier Tage eine Erneuerung der Hälfte des Mediums stattfand, und der andere an den Tagen 6, 10 und 17/18 mit einer 1:2 Teilung passagiert wurde. Die expandierten NK-Zellen wurden anschließend an den Tagen 6, 10 und 21 in Zytotoxizitätstests gegen die RMS-Zelllinie RH30 eingesetzt (siehe Abb. 4-22).

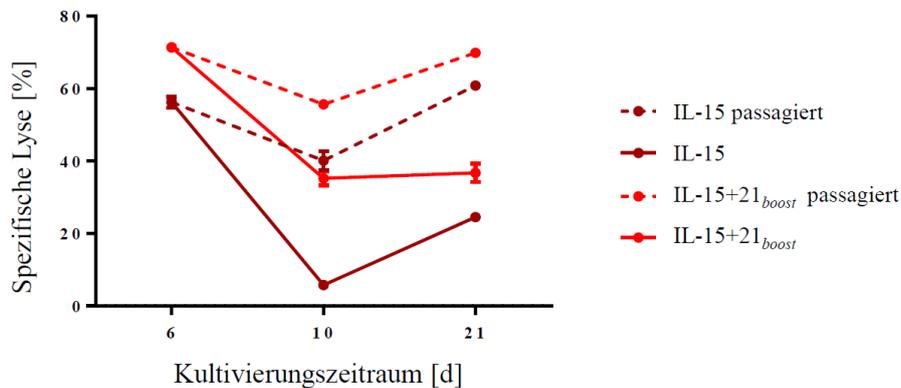


Abb. 4-22: Zytotoxizitätssteigerung durch Passagierung der NK-Zellen während der Expansion. Die aufgereinigten NK-Zellen wurden über drei Wochen mit den Protokollen IL-15 oder IL-15+21_{boost} expandiert, dabei wurden sie entweder alle drei bis vier Tage ausschließlich gefüttert (durchgehende Linien) oder zusätzlich 1:2 passagiert (gestrichelte Linien). An den Tagen sechs, zehn und 21 wurden die expandierten NK-Zellen für Zytotoxizitätsanalysen gegen RH30-Zellen in einem E:T-Verhältnis von 10:1 eingesetzt. Alle Tests wurden aus demselben Spender in drei Replikaten angesetzt, wiedergegeben sind die Mittelwerte. Die Daten wurden unter eigener Anleitung im Rahmen der Masterarbeit von Viktoria Pfannenstiel erhoben.

Nicht passagierete Zellen erlitten einen Funktionsverlust von 50% (IL-15) bzw. 36% (IL-15+21_{boost}), während dieser bei passagierten Zellen 16% betrug. Vor allem bei längerer Kultivierung, konnte durch regelmäßige Passagierung die zytolytische NK-Zellfunktion auf hohem Niveau gehalten werden. So erreichten die NK-Zellen auch nach 21 Tagen nahezu ihre anfängliche zytolytische Leistung. Kontinuierlich kultivierte Zellen wiesen eine um 35% reduzierte zytotoxische Aktivität auf.

4.6.4 Antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität

Über die direkte Zytotoxizität hinaus wurde in dieser Arbeit auch die ADCC, die Antikörpervermittelte Zytotoxizität der NK-Zellen Adressiert. Die ADCC erfolgt nur in Anwesenheit von an Tumorantigene gebundenen Antikörpern und trägt somit zu einer zielgerichteten NK-Zellantwort bei. Für die Untersuchung wurden RD-Zellen, die den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor HER2/neu, auch ErbB2 genannt, an ihrer Oberfläche

ERGEBNISSE

tragen (siehe Abb. 4-23 A), mit Trastuzumab behandelt, einem Antikörper, der in seiner Spezifität gegen das ErbB2-Antigen gerichtet ist. Anschließend wurden über zehn Tage expandierte NK-Zellen hinzugegeben und die Zytotoxizität ermittelt. Die ADCC-Ansätze wurden mit Ansätzen ohne Trastuzumab hinsichtlich ihrer zytolytischen Wirkung verglichen (siehe Abb. 4-23 B).

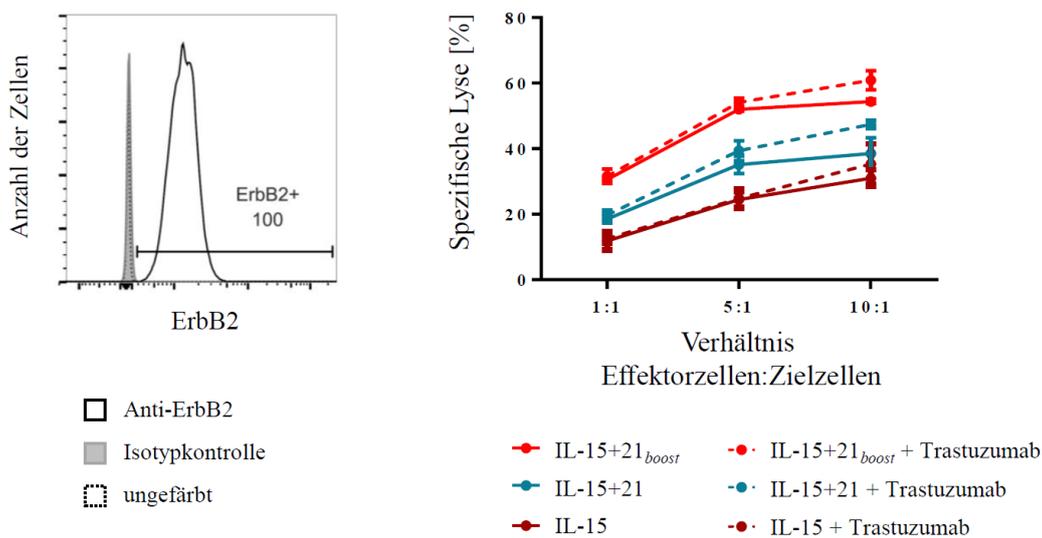


Abb. 4-23: Trastuzumab unterstützte zelluläre Zytotoxizität expandierter NK-Zellen. Auf der linken Seite ist die durchflusszytometrische Expressionsanalyse von ErbB2 (HER2/neu) auf RD-Zellen dargestellt. Alle Zellen waren ErbB2^{pos}. Die NK-Zellen wurden über 10 Tage mit ausgewählten Protokollen expandiert und mit dem Anti-ErbB2-Antikörper Trastuzumab (gestrichelte Linien) oder ohne (durchgehende Linien) gegen RD-Zellen im Zytotoxizitätstest eingesetzt.

Die Zugabe von Trastuzumab bewirkte bei einem Effektor-zu-Zielzellverhältnis von 10:1 einen Anstieg der spezifischen Lyse um durchschnittlich 6,5%. Nach IL-15-Expansion konnte bei diesen Bedingungen eine durch ADCC hervorgerufene Zunahme der Lyse um 4,5% beobachtet werden, nach IL-15+21-Expansion eine um 9%, nach IL-15+21_{boost}-Expansion lag der Wert der Zunahme mit 6,5% genau dazwischen. Die Verdopplung der ADCC nach permanenter IL-21-Exposition zeigt, dass die unterschiedliche Verteilung der CD16^{pos} Subpopulationen nach NK-Zellexpansion mit verschiedenen Protokollen (s. Kapitel 4.4.2) die lytische Funktion von NK-Zellen tatsächlich weiter fördern kann, auch wenn die ADCC im Vergleich zur direkten Zytotoxizität nur einen geringen Teil von 1/10 ausmachte.

4.6.5 NK-Zellaktivität und Degranulation

Um die Hintergründe der durch das IL-15+21_{boost} Protokoll herbeigeführten Steigerung der Zytotoxizität genauer zu analysieren, wurde im Folgenden die Degranulationskapazität der NK-Zellen nach Expansion mit ausgewählten Protokollen untersucht (siehe Abb. 4-24). Im Moment der Verschmelzung der granulären Vesikel mit der äußeren Zellmembran wird der transmembrane Vesikelmarker CD107a auch bekannt als LAMP-1 (*lysosomal-associated-membrane protein 1*) an die Zelloberfläche gebracht und ist dort detektierbar. Damit lässt sich die Exozytose der intrazellulären Granula genauer beurteilen.

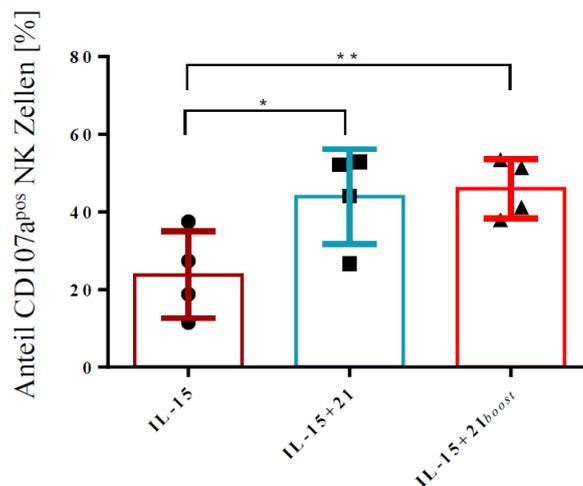


Abb. 4-24: Degranulationskapazität expandierter NK-Zellen. Aufgereinigte NK-Zellen wurden über sechs Tage mit ausgewählten Protokollen expandiert und in Anwesenheit eines Anti-CD107a-Antikörpers mit K562-Zellen koinkubiert. Die Häufigkeit des an der Zelloberfläche präsentierten CD107a-Antigens korreliert mit der Degranulation der Zellen. Dargestellt sind die Einzelmessungen von vier Spendern, sowie die entsprechenden Mittelwerte und Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede werden durch Sterne angezeigt (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, one-way ANOVA).

Die NK-Zellen wurden nach sechs Tagen Expansion für drei Stunden mit K562-Zellen koinkubiert und dabei gegen CD107a auf ihrer Oberfläche gefärbt. Die Zugabe von IL-21 bewirkte durchschnittlich eine Verdopplung der Degranulationsaktivität im Vergleich zur einfachen IL-15-basierten Expansion (1,3- bis 3,3-fach). Der Anteil degranulierender NK-Zellen war nach einem vergleichsweise kurzem IL-21-Boost wiederum kaum geringer als nach permanenter IL-21-Exposition im IL-15+21-Protokoll.

Zusätzlich zur Degranulation wurde als weiterer Aktivitätsnachweis die intrazelluläre Produktion von IFN- γ untersucht. IL-21-Exposition bewirkte im Vergleich zu IL-15-Einwirkung allein einen starken Anstieg des innerhalb der NK-Zellen akkumulierten Zytokins

ERGEBNISSE

(siehe Abb. 4-25). Nach dauerhafter IL-21-Exposition wurden durchschnittlich 8% (0-16%) mehr IFN- γ -produzierende Zellen nachgewiesen als nach einem vergleichsweise kurzem IL-21-Boost.

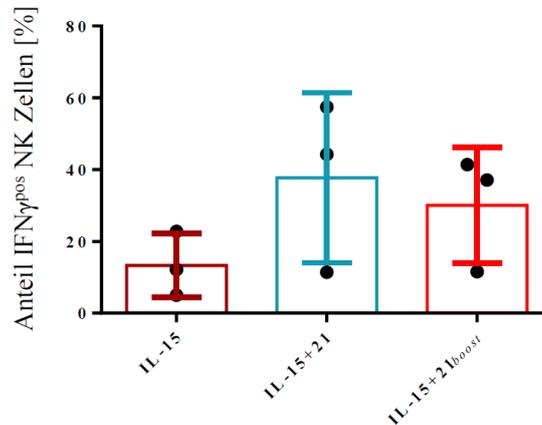


Abb. 4-25: Intrazellulärer Nachweis der IFN- γ -Produktion durch expandierte NK-Zellen. Aufgereinigte NK-Zellen wurden über sechs Tage mit ausgewählten Protokollen expandiert und anschließend mit K562-Zellen koinkubiert. Durch Zugabe von Golgi-Stop wurde die Prozessierung von Proteinen durch das endoplasmatische Retikulum blockiert. Somit akkumulierte gebildetes IFN- γ und konnte mittels durchflusszytometrischer Messungen intrazellulär detektiert werden. Dargestellt sind die Einzelmessungen von drei Spendern, sowie die entsprechenden Mittelwerte und Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede werden durch Sterne angezeigt (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, one-way ANOVA).

Mit der Degranulation hängt die Exozytose intrazellulärer Granula, die zytolytische Substanzen enthalten, zusammen. Bei diesen Substanzen handelt es sich vorrangig um Perforin und Granzym B, welche zusammen für die Auslösung des programmierten Zelltods der Zielzelle verantwortlich sind. Mittels Immunoblotanalysen sollte untersucht werden in welchem Maße expandierte NK-Zellen diese apoptoseinduzierenden Proteine produzieren und an die Umgebung abgeben. Expandierte NK-Zellen wurden chemisch lysiert und das Lysat auf neu gebildetes untersucht. Zudem wurde der Zellkulturüberstand auf sekretiertes Perforin und Granzym B analysiert (siehe Abb. 4-26).

ERGEBNISSE

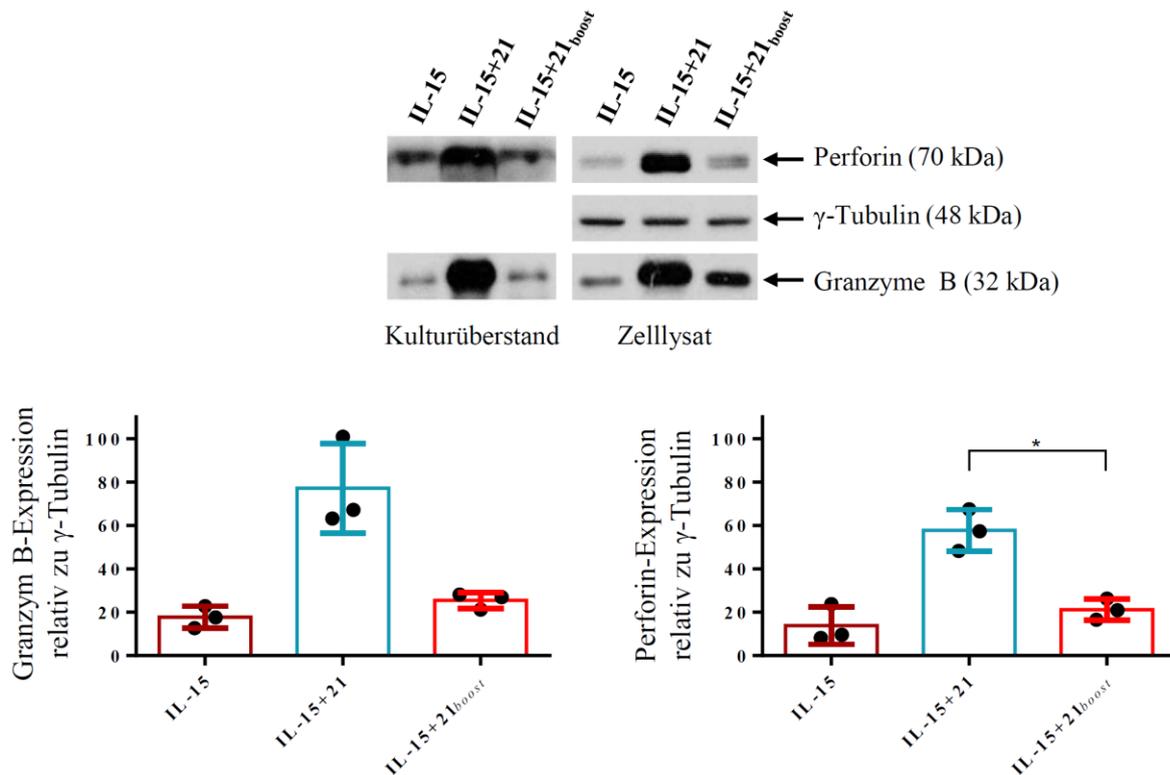


Abb. 4-26: Produktion und Ausschüttung von Zytotoxizitätsmediatoren. Aufgereinigte NK-Zellen wurden über sechs Tage mit ausgewählten Protokollen expandiert. Mit Hilfe von Antikörpern wurden Perforin, Granzym B und als Referenz γ -Tubulin sowohl in Kulturüberständen als auch in Zelllysaten nachgewiesen. A Immunoblot eines exemplarischen Spenders. B Die Menge an produziertem Perforin und Granzym B wurde in Relation zu gleichmäßig exprimiertem γ -Tubulins ermittelt. Dargestellt sind die Daten der dreier Spender, sowie die entsprechenden Mittelwerte und Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede werden durch Sterne angezeigt (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, one-way ANOVA).

Die Produktion und Sekretion beider Proteine konnte nach Expansion der NK-Zellen mit allen drei getesteten Protokollen beobachtet werden. IL-15- und IL15+21_{boost}-expandierte Zellen wiesen eine geringere Menge Perforin und Granzym B auf als Zellen, die längerer mit IL-21 inkubiert worden waren.

4.6.6 Ausschüttung von Zytokinen

Neben der Degranulation und der damit zusammenhängenden Lyse der Tumorzellen, ist die Produktion und Sekretion von Zytokinen, wie bereits in Kapitel 4.6.5 erwähnt, eine wichtige Funktion von NK-Zellen. Damit tragen sie nicht nur intrinsisch zur weiteren, eigenen Aktivierung bei, sondern stimulieren im Kontext eines ganzen Organismus auch andere Immunzellen. In diesem Zusammenhang wurde untersucht, welche Auswirkungen die

ERGEBNISSE

verschiedenen ausgewählten Expansionsprotokolle auf die Zytokinsekretion haben. Dazu wurde der Kulturüberstand expandierter NK-Zellen an Tag 6 entnommen und mittels partikelbasierter Zytokinanalyse am Durchflusszytometer (*Cytometric-Bead-Array*, CBA) untersucht (siehe Abb. 4-27).

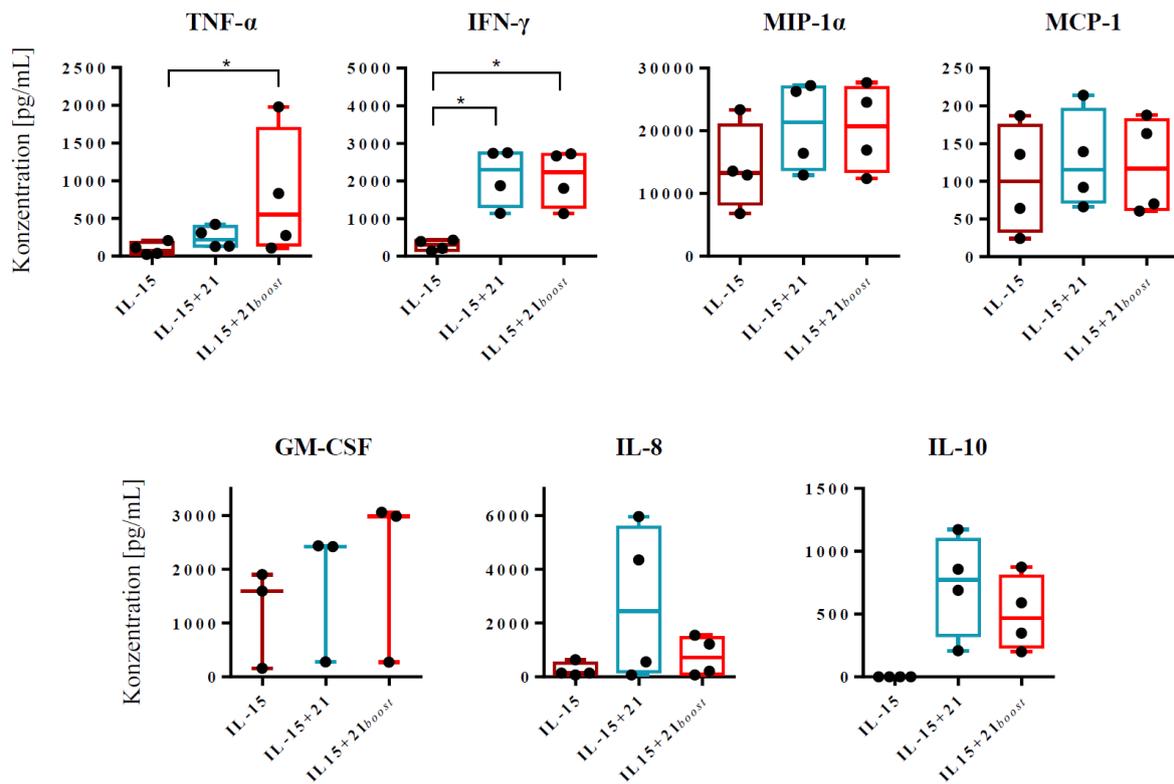


Abb. 4-27: Ausschüttung von Zytokinen durch expandierte NK-Zellen. Aufgereinigte NK-Zellen wurden über sechs Tage unter Anwendung ausgewählter Protokolle expandiert. Dargestellt sind die jeweiligen Konzentrationen an Anschließend wurden in den entsprechenden Kulturüberständen TNF- α , IFN- γ , MIP-1 α , MCP-1, GM-CSF, IL-8 sowie IL-10 mittels CBA analysiert. Neben den Mittelwerten ist die Verteilung der Einzelwerte wiedergegeben. Signifikante Unterschiede werden durch Sterne angezeigt (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, one-way ANOVA).

Über IFN- γ hinaus wurden weitere proinflammatorische Zytokine bei Anwesenheit von IL-21 in der Expansionskultur verstärkt sekretiert, so auch der anti-tumoral wirkende Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und das entzündungsinduzierende Chemokin MIP-1 α (*macrophage inflammatory protein 1 α*), auch bekannt als CCL3. Auch die Sekretion des Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktors, kurz GM-CSF, der die Differenzierung von Granulozyten und Makrophagen unterstützt, ist unter IL-21-Einfluss

erhöht. Für alle genannten Zytokine und Chemokine gilt, dass ihre verstärkte Sekretion schon mit einem kurzen, dreitägigen IL-21-Boost angeregt wurde. Im Vergleich dazu wurde die IL-8 erst nach längerer Anwesenheit von IL-21 verstärkt sezerniert. Das immunsuppressiv wirkende IL-10 wurde nur mithilfe von IL-21 induziert und wurde umso stärker von den NK-Zellen abgegeben, je länger das IL-21 wirken konnte.

4.7 IN VIVO ANWENDUNG DES NK-ZELLPRODUKTS

4.7.1 Transduktion der RMS Zelllinien

Um die RMS-Zellen, die für das Xenograftmodell verwendet werden sollten, für die Biolumineszenzbildgebung (BLI) detektierbar zu machen, mussten diese Zellen das Enzym Luciferase exprimieren. Die Luciferase des Leuchtkäfers (*Photinus pyralis*) setzt in Anwesenheit von Sauerstoff und ATP D-Luciferin zu Oxyluciferin um. Bei diesem Prozess werden Photonen emittiert (Biolumineszenz), die mit einer hochsensitiven Kamera detektiert werden können.

Der Gentransfer erfolgte über Transduktion mit einem lentiviralen Vektor. Das Transferplasmid pSL2GW bestand aus dem Gen für die Luciferase, welches über eine T2A-Schnittstelle an das Gen für grün fluoreszierendes Protein (GFP) gekoppelt war, dem U3-Abschnitt der *long-terminal-repeats* (LTR) des Spleen Focus Forming Virus (SFFV-U3LTR) als Promotor und dem WPRE (*Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element*), das zur Stabilisierung der RNA beitrug.

Nach Transduktion der Zellen wurden diese mittels ihrer GFP-Expression am Durchflusszytometer auf ihre Transduktionsrate untersucht und schließlich GFP^{POS} transduzierte Zellen mit Hilfe der fluoreszenzaktivierten Zellseparation (FACS) isoliert. Während direkt nach Transduktion nur die Hälfte der RH30-Zellen GFP exprimierten, so bestand die Population im Anschluss an die durchflusszytometrische Zellsortierung zu 95% aus transduzierten Tumorzellen (siehe Abb. 4-28).

ERGEBNISSE

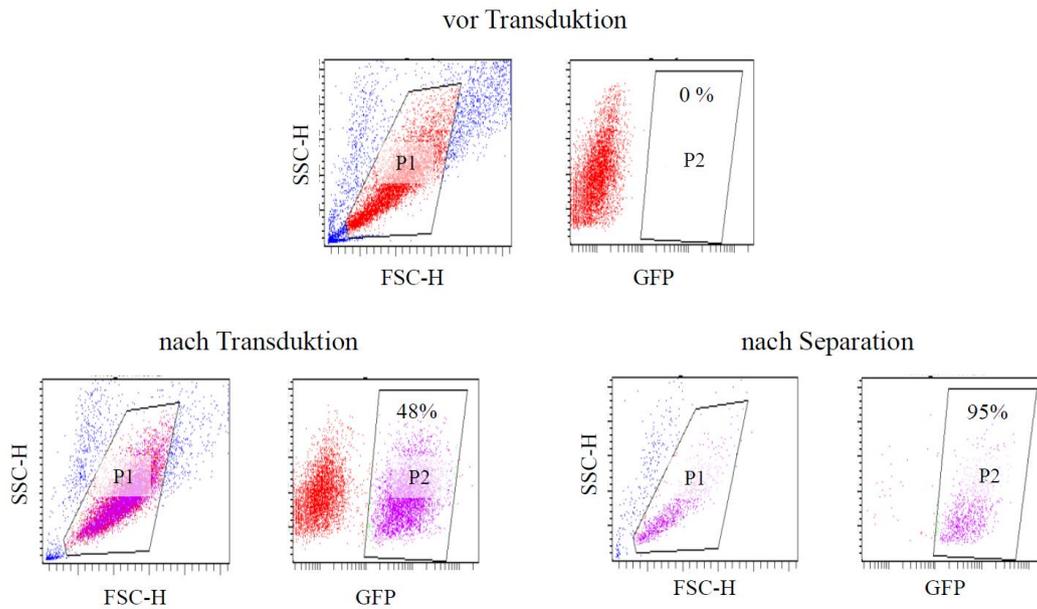


Abb. 4-28: Generierung Luc/GFP exprimierender RH30-Zellen. Durch lentivirale Transduktion wurde das Fusionsgen für Luc/GFP in das Tumorzellgenom integriert. Erfolgreich transduzierte Zellen können mittels Durchflusszytometrie identifiziert und mittels FACS von nicht transduzierten Zellen separiert werden. Dargestellt sind FACS-Bilder der Zellen vor Transduktion (oben), nach Transduktion (unten links) und nach Separation mittels FACS (unten rechts). Der linke Plot zeigt jeweils alle aufgenommenen Ereignisse an, P1 identifiziert die Tumorzellen anhand von Größe und Granularität. Der rechte Plot zeigt alle Ereignisse aus P1 an, P2 definiert alle GFP^{pos} Tumorzellen.

ERGEBNISSE

RD-Zellen waren direkt nach Transduktion zu über 98% GFP^{POS} und wurden dementsprechend nicht extra separiert (siehe Abb. 4-29). Die Luc/GFP^{POS} Zellen wurden schließlich amplifiziert und kryokonserviert. Vor Verwendung für *in vivo* Versuche wurden diese erneut im Durchflusszytometer analysiert, um zu überprüfen, dass die Luc/GFP-Expression stabil ist.

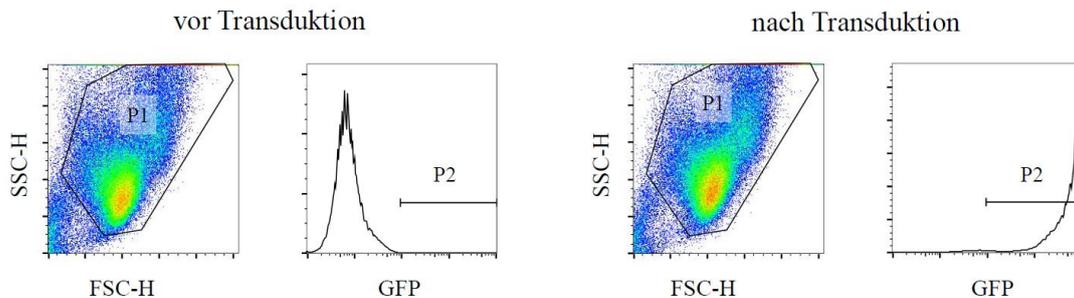


Abb. 4-29: Generierung Luc/GFP exprimierender RD-Zellen. Durch lentivirale Transduktion wurde das Fusionsgen für Luc/GFP in das Tumorzellgenom integriert. Erfolgreich transduzierte Zellen können mittels Durchflusszytometrie identifiziert und mittels FACS von nicht transduzierten Zellen separiert werden. Die FACS-Bilder zeigen die Zellen vor Transduktion (links) und nach Transduktion (rechts). Der jeweils linke Plot zeigt alle aufgenommenen Ereignisse an, P1 identifiziert die Tumorzellen anhand von Größe und Granularität. Der rechte Plot zeigt alle Ereignisse aus P1 an, P2 definiert alle GFP^{POS} Tumorzellen.

4.7.2 Tumorkontrolle durch adoptive NK-Zelltherapie

Die transduzierten RMS-Zelllinien wurden im Xenograftmodell eingesetzt, um die Wirksamkeit von expandierten, humanen NK-Zellen *in vivo* zu testen. In ersten Versuchen wurden NK-Zellen verwendet, die mithilfe der Zytokinkombination IL-2+15+21 expandiert wurden. Zur Behandlung von RMS-Erkrankungen wurden die NK-Zellen zu sehr frühen Zeitpunkten nach Tumorzellinokulation (innerhalb der ersten drei bis 14 Tage) injiziert. Schon nach einfacher Applikation ließ sich ein wachstumshemmender Effekt der NK-Zellen erkennen (siehe Abb. 4-30). BLI-Messungen zeigten, dass die tumornahe, subkutane Gabe von expandierten NK-Zellen zwölf Tage nach Behandlung zu einer um die Hälfte minimierten durchschnittlichen Wachstumsrate von subkutanen RH30-Tumoren führte. Die in Abb. 4-30 exemplarisch dargestellten Mäuse wiesen vor NK-Zellgabe, an Tag drei, ähnlich starke BLI-Signale auf, nach NK-Zellinjektion zeigte die behandelte Maus jedoch ein wesentlich schwächeres Signal als die unbehandelte.

ERGEBNISSE

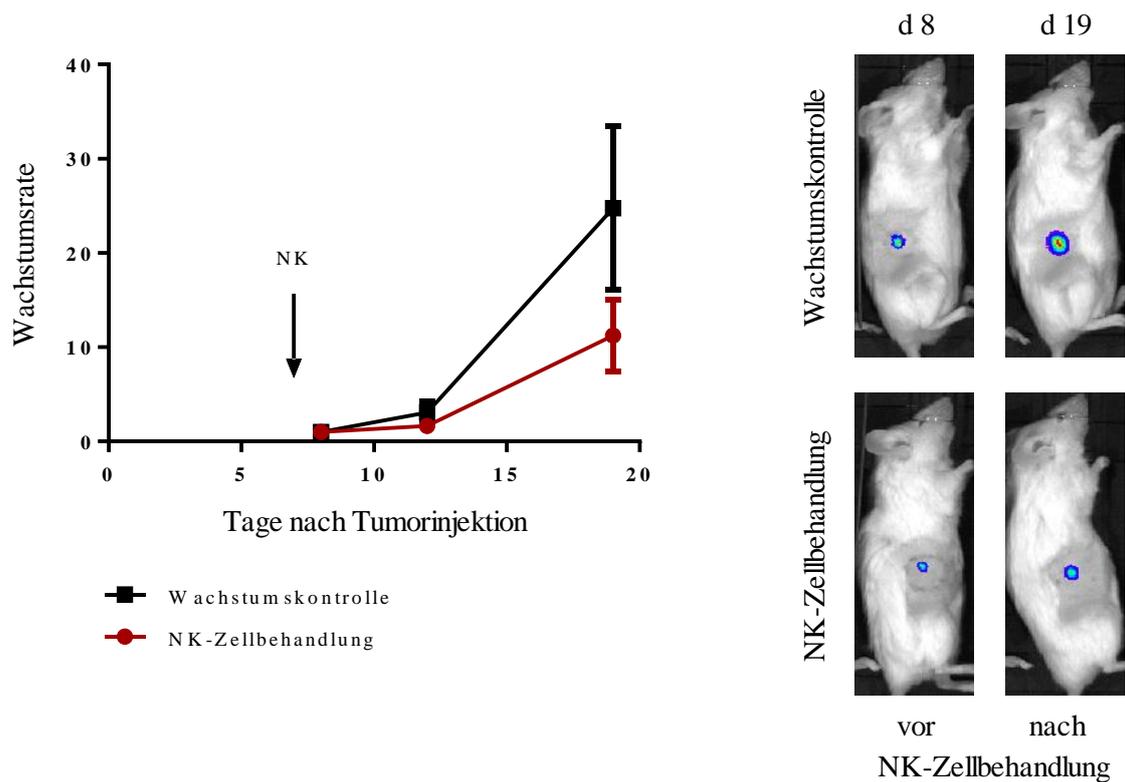


Abb. 4-30: *In vivo* Behandlungsversuch von RH30-Tumoren mit expandierten NK-Zellen. Transduzierte, Luc/GFP^{pos} RH30-Zellen wurden NSG-Mäusen in einer Zahl von 2×10^5 pro Tier an der Flanke subkutan injiziert. Das Anwachsen der Tumore wurde mittels BLI verfolgt. Acht Tage nach Tumorzellinjektion wurde die Therapie durch subkutane Applikation von 10^7 IL-2¹⁰⁰+15+21 expandierten NK-Zellen nahe den Tumorzellen eingeleitet. Das Wachstumsverhalten der Tumore wurde weiter mit Hilfe von BLI verfolgt. Mit dem Quotienten aus dem jeweiligen Messwert und dem letzten gemessenen Wert vor Therapiebeginn ließ sich die jeweilige Wachstumsrate berechnen. In der Kurve der Wachstumsrate sind die Mittelwerte von drei Tieren pro Versuchsgruppe und die Standardfehler wiedergegeben. Auf der rechten Seite sind BLI-Aufnahmen einer exemplarischen Maus aus jeder Versuchsgruppe vor Behandlungsbeginn und zu einem späteren Zeitpunkt, nach erfolgtem NK-Zelltransfer, abgebildet.

Da die NK-Zellen im subkutanen Modell die Tumorzellen nur eingeschränkt erreichen können, wurden im Folgeversuch sowohl Tumor- als auch NK-Zellen intraperitoneal verabreicht. Während die Migrationsfähigkeit der NK-Zellen nach subkutaner Applikation limitiert ist, können sie sich in der Peritonealhöhle frei bewegen, haben leichteren Zugang zu den Zielzellen und können diese besser attackieren. Der dreifache adoptive Transfer von expandierten NK-Zellen, drei, sieben und 14 Tage nach Tumorzellinokulation, hemmte das durchschnittliche RD-Tumorwachstum (siehe Abb. 4-31). Die anhand von BLI-Messungen ermittelte Wachstumsrate stieg unter NK-Zelltherapie nur leicht an, während die Wachstumsrate der unbehandelten Kontrollen diese an Tag 24 durchschnittlich 20-fach höher

ERGEBNISSE

lag. Exemplarische BLI-Aufnahmen von Mäusen beider Gruppen vor, während und nach der NK-Zellbehandlung zeigten für das Tier aus der behandelten Gruppe an den Tagen 10 und 31, d.h. während und nach der NK-Zelltherapie schwächere Tumorsignale als für das unbehandelte Tier.

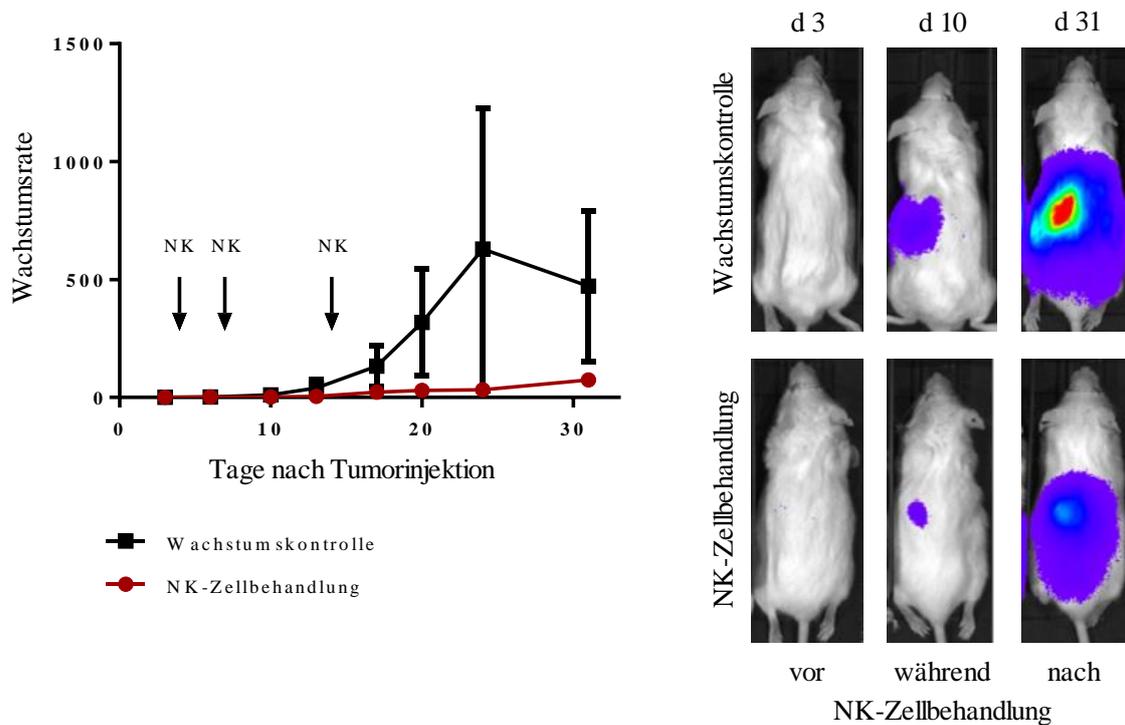


Abb. 4-31: In vivo Behandlungsversuch von RD-Tumoren mit expandierten NK-Zellen. Transduzierte, Luc/GFP^{POS} RD-Zellen wurden NSG-Mäusen in einer Zahl von 2×10^5 pro Tier intraperitoneal injiziert. Das Anwachsen der Tumore wurde mittels BLI verfolgt. Vier Tage nach Tumorzellinjektion wurde die Therapie durch intraperitoneale Applikation von 10^7 IL-2¹⁰⁰+15+21 expandierten NK-Zellen eingeleitet. Die NK-Zellgabe wurde zweimal, an den Tagen sieben und 14, wiederholt. Das Wachstumsverhalten der Tumore wurde weiter mit Hilfe von BLI verfolgt. Mit dem Quotienten aus dem jeweiligen Messwert und dem letzten gemessenen Wert vor Therapiebeginn (Messwert von Tag drei) ließ sich die jeweilige Wachstumsrate berechnen. In der Kurve der Wachstumsrate sind die Mittelwerte von zwei bis drei Tieren pro Versuchsgruppe und die Standardfehler wiedergegeben (eine Maus der Wachstumskontrollgruppe war bereits an Tag sechs nach Tumorzellapplikation verstorben). Auf der rechten Seite sind BLI-Aufnahmen einer exemplarischen Maus aus jeder Versuchsgruppe vor Behandlungsbeginn (d 3), nach erfolgtem NK-Zelltransfer, aber vor Abschluss der Therapie (d 10) und zu einem späteren Zeitpunkt, nach Abschluss der NK-Zelltherapie (d 31), abgebildet.

4.7.3 Kombinationsstrategie – Radiotherapie und adoptiver NK Zelltransfer

Um einen größtmöglichen Therapieerfolg zu erzielen, sollte der Tumor zunächst mit ionisierender Strahlung behandelt werden, bevor die adoptive NK-Zelltherapie eingesetzt wurde. Zunächst musste getestet werden wie die Zellen sich unter dem Einfluss ionisierender Strahlung verhalten und welche Tumorzelllinie für einen Testansatz, in dem Bestrahlung und NK-Zelltherapie kombiniert werden sollten, in Frage käme.

4.7.3.1 Auswirkung von RT auf RMS

Drei Wochen nach der Injektion von 10^5 Tumorzellen hatten sich bei den meisten Tieren (im RH30-Modell bei 75%, im RD-Modell bei 88%) visuell und haptisch erfassbare Tumorknoten an den Injektionsstellen gebildet, die damit die Mindestgröße für die Detektion mittels CBCT (*cone beam computer tomography*) am SARRP erreicht hatten. In dieser Phase wurde das Tumorstadium zweimal wöchentlich anhand von BLI-Messungen erfasst. Vor Beginn der Strahlentherapie wurden die Tiere so in Gruppen eingeteilt, dass die durchschnittliche Größe der Tumore zwischen den unterschiedlichen Kontroll- und Behandlungsgruppen vergleichbar war. Unabhängig von Tumormodell verliefen die gemittelten Kurven der BLI-Messungen behandelter und unbehandelter Tiere vor Therapiebeginn nahezu gleich (siehe Abb. 4-32 A und Abb. 4-33 A). Nach der Strahlentherapie wiesen die behandelten Tiere alle geringere Tumorsignale auf als die unbehandelten Kontrollen (siehe Abb. 4-32 B und Abb. 4-33 B).

Da die Mäuse zur Strahlenbehandlung viermal wöchentlich in Narkose gelegt werden mussten, wurde im Zeitraum der Strahlentherapie die BLI-Messung ausgesetzt, um die Tiere zu schonen. Stattdessen wurden die Tumorgößen mit dem Messschieber ermittelt. Die Messungen erfolgten im Zeitraum der Radiotherapie viermal wöchentlich, parallel zur Bestrahlung, und im Anschluss zweimal wöchentlich, parallel zu den wieder aufgenommenen BLI-Messungen. Ab der dritten Therapiewoche (d. h. ab Versuchstag 36) zeigte die Bestrahlung Wirkung und die RH30-Tumore behandelter Tiere waren durchschnittlich um die Hälfte kleiner als die unbehandelten (siehe Abb. 4-32 C). Zudem nahmen die Tumorgößen in der RT-Gruppe langsamer zu als die der Wachstumskontrollen, so dass am Ende der RT (Versuchstag 42) das Volumen der RH30-Tumore behandelter Tiere ein Viertel von dem Tumolvolumen unbehandelter Tiere betrug. Dieser Unterschied verstärkte sich im Folgenden auf eine 14-fache Differenz zwischen den Tumolvolumina behandelter und unbehandelter Mäuse eine Woche nach Abschluss der RT (Versuchstag 49).

ERGEBNISSE

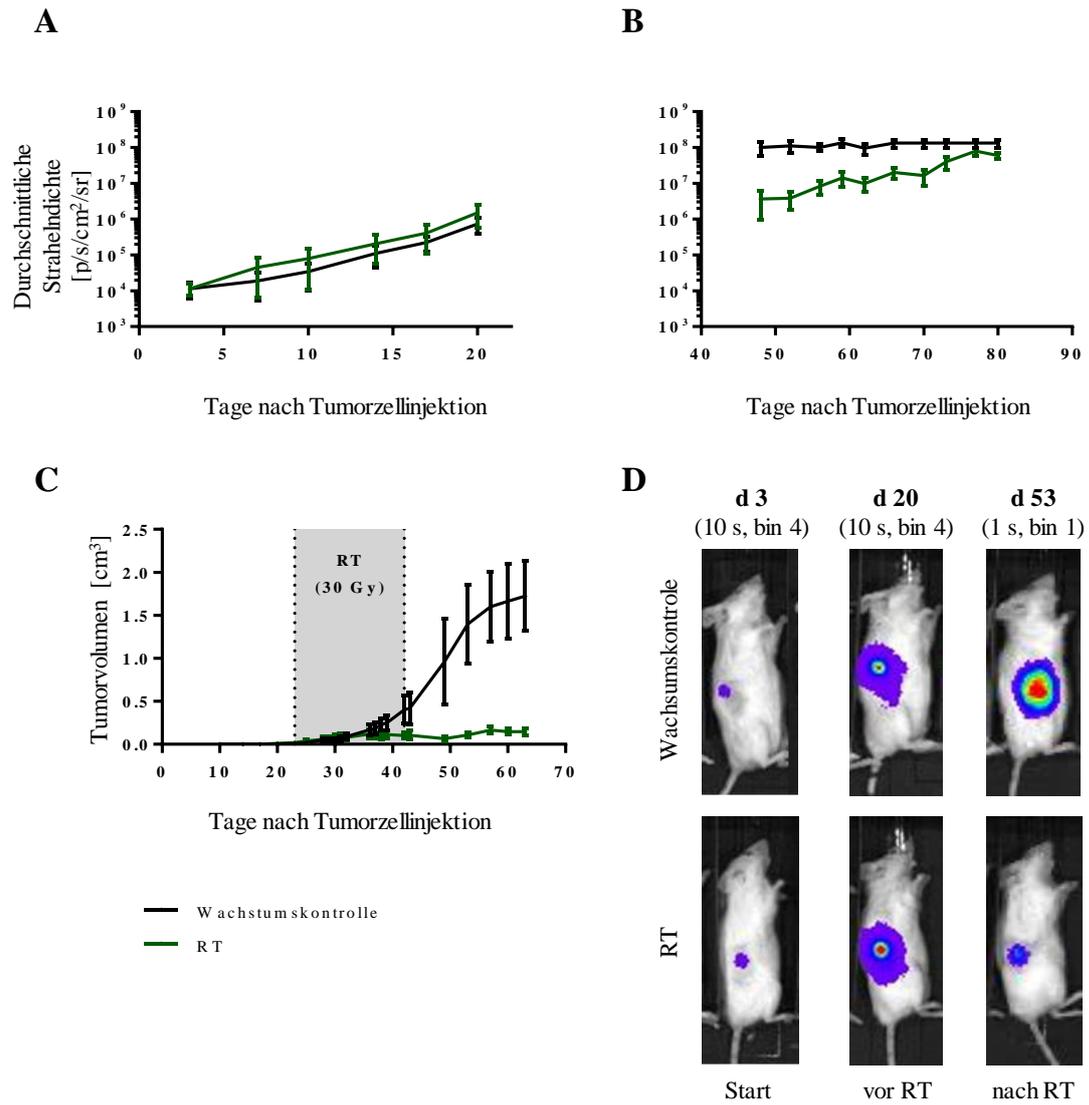


Abb. 4-32: Sensibilität von RH30-Tumoren auf ionisierende Strahlung. Vor und nach RT wurden zweimal wöchentlich BLI-Aufnahmen von Mäusen gemacht, denen Tumorzellen im Bereich der Flanke injiziert worden waren. Im Zeitraum der RT wurden keine BLI-Aufnahmen gemacht und die Tumorgößen ausschließlich mittels Messschieber erfasst. Dargestellt sind die Mittelwerte der BLI-Signale von vier Tieren und die Standardfehler. **A** Vor der RT wurden die BLI-Signale mit 10 s Belichtungszeit und einer Zusammenfassung von vier Signalpixeln (Binning 4) aufgenommen. **B** Nach der RT wurden die BLI-Signale mit 1 s Belichtungszeit und ohne Zusammenfassung von Signalpixeln (Binning 1) aufgenommen. **C** Gezeigt ist der Verlauf der Tumorgößenmessungen mit einem Messschieber über den gesamten Versuchszeitraum mit Mittelwerten und Standardfehlern. **D** Dargestellt sind BLI-Aufnahmen von je einer exemplarischen Maus pro Versuchsgruppe zu Beginn des Versuchs, vor Einleitung der RT und zu einem späten Zeitpunkt nach Abschluss der RT.

ERGEBNISSE

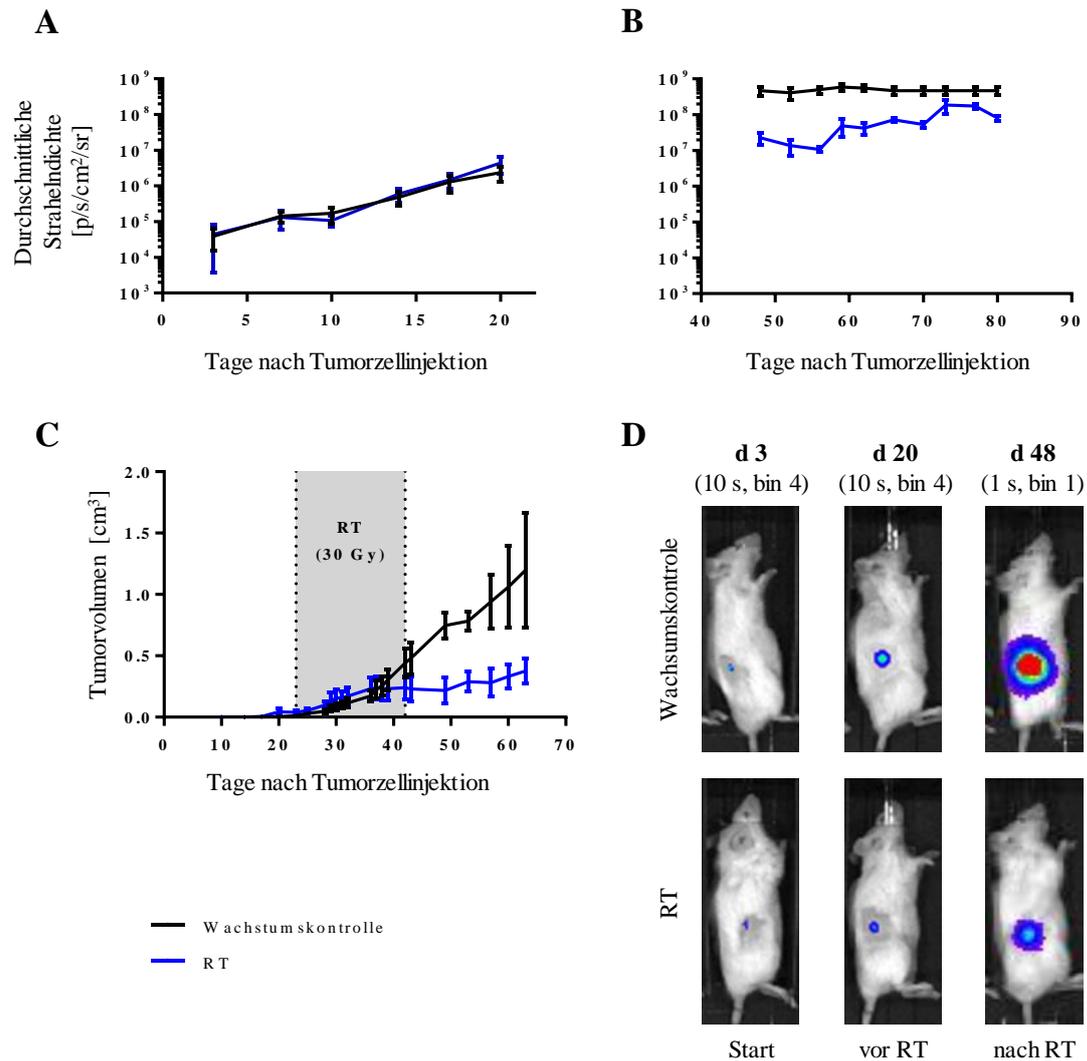


Abb. 4-33: Sensibilität von RD-Tumoren auf ionisierende Strahlung. Vor und nach RT wurden zweimal wöchentlich BLI-Aufnahmen von Mäusen gemacht, denen Tumorzellen im Bereich der Flanke injiziert worden waren. Im Zeitraum der RT wurden keine BLI-Aufnahmen gemacht und die Tumorgößen ausschließlich mittels Messschieber erfasst. Dargestellt sind die Mittelwerte der BLI-Signale von vier Tieren und die Standardfehler. **A** Vor der RT wurden die BLI-Signale mit 10 s Belichtungszeit und einer Zusammenfassung von vier Signalpixeln (Binning 4) aufgenommen. **B** Nach der RT wurden die BLI-Signale mit 1 s Belichtungszeit und ohne Zusammenfassung von Signalpixeln (Binning 1) aufgenommen. **C** Gezeigt ist der Verlauf der Tumorgößenmessungen mit dem Messschieber über den gesamten Versuchszeitraum mit Mittelwerten und Standardfehlern. **D** Dargestellt sind BLI-Aufnahmen von je einer exemplarischen Maus pro Versuchsgruppe zu Beginn des Versuchs, vor Einleitung der RT und zu einem späten Zeitpunkt nach Abschluss der RT.

Im RD-Tumormodell war der Effekt ebenfalls, jedoch schwächer ausgeprägt, zu beobachten. Am Ende der RT waren die Tumore behandelter Tiere halb so groß wie Tumore der unbehandelten Kontrollgruppe und im gesamten Versuchsverlauf waren bestrahlte RD-Tumore bis zu dreimal kleiner als unbehandelte Tumore (siehe Abb. 4-33).

Trotz des wachstumsinhibierenden Effekts konnten durch die RT nicht alle Tumorzellen eliminiert werden und die Knoten wuchsen erneut. Dieser Effekt zeigte sich vor allem in den BLI-Messungen nach Strahlenbehandlung (siehe Abb. 4-32 B und Abb. 4-33 B). Kurz nach der Radiotherapie lagen die Werte der Wachstumskontrollgruppen und der RT-Gruppen weit auseinander, aber auch die RT-Gruppen erreichten etwa vier Wochen nach Beendigung der Strahlentherapie ähnlich hohe BLI-Werte.

Exemplarische BLI-Aufnahmen von Mäusen zeigten ähnliche Tumorsignale für Tiere aus den Wachstumskontrollgruppen bis zum Beginn der RT. Nach der RT waren die Signale der behandelten Tiere jedoch wesentlich geringer als die der Kontrolltiere (siehe Abb. 4-32 D und Abb. 4-33 D).

Beide Zelllinien, RH30 und RD, verhielten sich ähnlich im subkutanen Xenograftmodell und bei Bestrahlung. Aufgrund homogenerer Messdaten, die durch Verwendung der RD-Zelllinie gewonnen werden konnten, wurde diese für den Folgeversuch, die Kombination von RT und adoptiven NK-Zelltransfer, verwendet. Zudem konnte das Wachstum der RD-Zellen durch die RT zwar eingedämmt, jedoch nicht gänzlich unterbunden werden und ließ somit Spielraum für die Wirkung der NK-Zelltherapie.

4.7.3.2 Tumorkontrolle durch adoptive NK-Zelltherapie nach Bestrahlung

Ebenso wie in den vorangegangenen Versuchen hatten sich drei Wochen nach subkutaner Injektion von 10^5 RD-Zellen bei 71% der Versuchstiere visuell erfassbare Tumorknoten im Bereich der Flanken gebildet. Die Tiere wurden viermal wöchentlich mit 2,5 Gy Einzeldosen bestrahlt, bis eine Gesamtdosis von 27,5 Gy erreicht war. Nach Beendigung der Strahlentherapie wurden den Tieren dreimal im Abstand von einer Woche 10^7 expandierte NK-Zellen intravenös verabreicht (siehe Abb. 4-34 A).

ERGEBNISSE

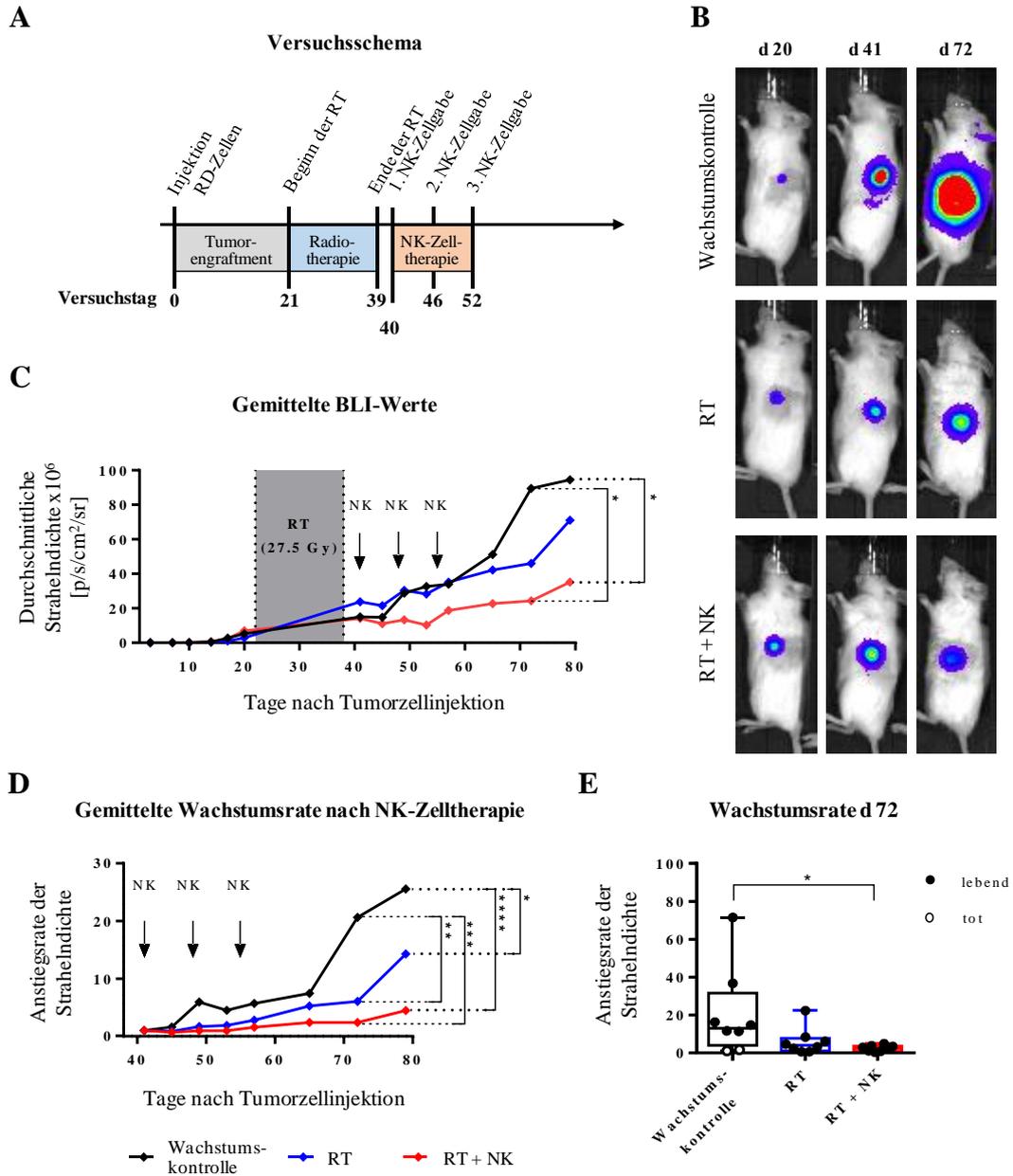


Abb. 4-34: Behandlungsversuch von RD-Tumoren mit IL-15+21_{boost} expandierten NK-Zellen nach erfolgter RT. **A** Der Versuchsablauf ist in Form einer schematischen Zeitleiste dargestellt. Von den Tieren der RT-Gruppe und der RT+NK-Gruppe wurden in narkotisiertem Zustand CT-Bilder gemacht, anhand welcher die einzusetzende Collimatorgröße und die Richtung der Strahlengänge für die RT geplant wurden. Die Bestrahlungen erfolgten über drei Wochen, viermal pro Woche mit 2,5 Gy Einzeldosen, die auf zwei Strahlen mit je 50% Intensität aufgeteilt wurden. **B** Dargestellt sind BLI-Aufnahmen von je einer exemplarischen Maus pro Versuchsgruppe vor RT (d 20), nach RT, vor Transfer IL-15+21_{boost} expandierter NK-Zellen (d 41) und zu einem Zeitpunkt nach Abschluss der NK-Zelltherapie (d72). **C** Vor und nach RT wurden zweimal wöchentlich BLI-Aufnahmen von den Mäusen gemacht und die gemessenen Signale als Mittelwerte der verschiedenen Versuchsgruppen dargestellt. **D** Zur Verdeutlichung des Einflusses des NK-Zelltransfers auf den Gesamttherapieerfolg wurden die Wachstumsraten bezogen auf die Tumorsignale, die vor der ersten NK-Zellapplikation gemessen wurden, berechnet und in Form von Mittelwerten wiedergegeben. **E** Die Verteilung der Wachstumsraten der einzelnen Tiere wurde für einen Zeitpunkt wiedergegeben, zu dem alle Therapien beendet und in jeder Versuchsgruppe noch viele Tiere am Leben waren.

ERGEBNISSE

Die NK-Zellen waren zuvor aus Lymphozytenpräparaten elf gesunder Spender wie in Kapitel 3.2 beschrieben angereichert und über zehn bis 27 Tage kultiviert worden. Für die Expansion wurde das IL-15+21_{boost} Protokoll verwendet worden, wobei die Zellen durchgängig in Anwesenheit von IL-15 kultiviert wurden und einem Teil jeweils drei Tage vor Ernte zusätzlich IL-21 zugefügt wurde. Um Spenderunterschiede in den Ergebnissen zu minimieren, wurden die Zellen der verschiedenen Spender (n=11) nach der Ernte zusammengefügt. Das vereinigte Zellgemisch wurde schließlich den Mäusen in die Schwanzvene injiziert.

In den BLI-Aufnahmen exemplarischer Mäuse aus jeder Versuchsgruppe spiegelten sich sowohl der RT-Effekt als auch der anti-tumorale NK-Zelleffekt wieder (Abb. 4-34 B).

In der Woche nach RT-Abschluss wurden Unterschiede in den Anstiegen der Signalkurven behandelter Gruppen und der unbehandelten Gruppe ersichtlich (Abb. 4-34 C). Durch den adoptiven NK-Zelltransfer wurde die Tumorstadiumsrate in der RT+NK-Gruppe um die Hälfte vermindert im Vergleich zur RT-Gruppe, die keine NK-Zellen erhalten hatte (siehe Abb. 4-34 D). Zwei Wochen nach der letzten NK-Zellgabe war die Wachstumsrate bestrahlter und NK-zellbehandelter Tumore 2,5-fach geringer als die ausschließlich bestrahlter Tumore nach drei Wochen dreifach niedriger. Im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe war das Tumorstadium bei Mäusen, die bestrahlt wurden und NK-Zellen bekommen hatten zwei Wochen nach der letzten NK-Zellinjektion um das Achtfache kleiner (siehe Abb. 4-34 E). Auch die BLI-Signale waren zudesem Zeitpunkt signifikant reduziert (siehe Abb. 4-34 B). Obgleich nicht alle Tumorzellen eliminiert wurden, dämmte die zusätzliche NK-Zellbehandlung das Tumorstadium eindeutig weiter ein.

5 DISKUSSION

5.1 NK-ZELLEXPANSION UND PHÄNOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG

Die Immunzellforschung beschäftigt sich seit vielen Jahren mit der möglichst effizienten Nutzung von humanen NK-Zellen. Dabei verfolgen verschiedene Forschergruppen unterschiedliche Interessen und Ziele, beispielsweise Expansionsraten, Zytotoxizität, Aufklärung von Wirkmechanismen oder klinische Sicherheit. Die daraus resultierende Diversität der angewendeten und untersuchten Parameter macht eine Vergleichbarkeit der Modelle und Ergebnisse schwierig bis unmöglich.

Bei der Expansion von NK-Zellen gibt es zwei Hauptkriterien, die erfüllt werden sollen. Zum einen geht es darum eine möglichst hohe Zellausbeute zu erreichen, zum anderen soll eine optimale Funktionalität der Zellen im finalen Produkt gewährleistet werden. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von verschiedenen Protokollen getestet [128]. Fast allen Protokollen gemeinsam ist, dass sie nicht ohne die Verwendung von Zytokinen auskommen. Besonders die Gruppe der Gammakettenzytokine wird häufig für die Expansion von NK-Zellen verwendet. Dem IL-21 werden dabei sowohl positive Eigenschaften zugeschrieben als auch nachteilige Effekte auf NK-Zellen, nämlich zum Einen die Förderung der Differenzierung und die Steigerung der Funktionalität und zum Anderen induziert es Apoptose [156,157,160]. Dabei liegen bisher kaum Daten zum Einfluss von IL-21 auf aufgereinigte NK-Zellen, ohne die Verwendung von Feederzellen oder anderen Hilfszellen, vor. In der vorliegenden Arbeit sollte dementsprechend die Wirkung von IL-21 in Kombination und im Vergleich mit den viel verwendeten und gut charakterisierten Gammakettenzytokinen IL-2 und IL-15 untersucht werden.

Mit dem Einsatz von Feederzellen zur NK-Zellexpansion konnten bisher besonders hohe Expansionsraten von mehr als 100-fach mit bestrahlten allogenen PBMCs oder über 1000-fach mit gentechnisch manipulierten K562-Zellen oder der lymphoblastoide LCL-Zelllinie erreicht werden [178–181]. Granzin *et al.* gelang es nicht nur NK-Zellen über sechs Wochen am Leben zu erhalten, sondern außerdem innerhalb der sechs Wochen die anfängliche NK-Zellzahl um den Faktor $2,7 \times 10^{11}$ zu vermehren [180]. Wie auch in der vorliegenden Arbeit wurden für dieses Protokoll NK-Zellen als Ausgangsmaterial verwendet, die durch negative Selektion aus PBMCs angereichert wurden. Diese wurden wiederholt mit bestrahlten Zellen der Epstein-Barr Virus transformierten Lymphoblastoidzelllinie, EBV-LCL, stimuliert und

der Kultur zu Beginn IL-21 und stetig IL-2 hinzugefügt. Schon nach 14 Tagen wurde eine um das 2900-Fache gestiegene Zellzahl gewonnen und das finale Produkt bestand zu 99% aus NK-Zellen, die zudem die aktivierenden Rezeptoren TRAIL, NKG2D und DNAM-1 verstärkt exprimierten. Außerdem zeigten die Zellen eine erhöhte Produktion von IFN- γ und TNF- α und ihre Zytotoxizität konnte sowohl *in vitro* gegen verschiedene Tumorzelllinien als auch im Xenograftmausmodell gegen Melanomzellen nachgewiesen werden [180].

In ähnlichen Ansätzen mit CD3-depletierten und positiv selektionierten PBMCs unter Verwendung von bestrahlten EBV-LCL Zellen und IL-2 ohne Zugabe von IL-21 wurden nach 14 Tagen immer noch hohe, aber etwas geringere 800-1000-fache Expansionsraten erzielt [182,183]. Produkte solcher Protokolle bestanden zu 98% und mehr aus NK-Zellen, auf denen aktivierende Rezeptoren wie TRAIL, FasL, NKG2D und die NCRs hoch reguliert waren. Diese Zellen zeigten nicht nur eine erhöhte Zytotoxizität gegen verschiedene Tumorzelllinien, sondern auch eine Steigerung der antikörpervermittelte zelluläre Zytotoxizität (ADCC) [183]. Der Einsatz anderer Feederzellentitäten, so z. B. genmodifizierte K562-Zellen, die membrangebunden IL-15 und 4-1BB-Liganden exprimieren, resultierte in Verbindung mit IL-2 ebenfalls in 100- bis 1000-fachen Expansionsraten innerhalb von zwei bis drei Wochen [179,184] mit 88-97% NK-Zellreinheit ausgehend von PBMCs [129,179].

Ohne Feederzellen konnte lediglich eine 13- bis 14-fache NK-Zellexpansion erreicht werden [183]. Iliopoulou *et al.* zeigte, dass mit IL-15 die Expansionsrate nach knapp drei Wochen auf das 23-fache gesteigert werden kann. Die Forscher generierten ein Endprodukt, das zu 98% aus NK-Zellen bestand, die außerdem NKG2D und die NCRs verstärkt exprimierten [123]. Die zusätzliche Applikation von IL-21 hingegen drückte die Expansionsrate auf 3,7 [185]. Aus diesem Protokoll resultierten über 90% CD56^{POS} Zellen, von denen 67% auch CD16 exprimierten. Trotz der niedrigen Proliferationskapazität, zeigten diese Zellen zytotoxische Wirkung gegen primäre Knochenmarksblasten, die vor Transplantation aus Patienten gewonnen wurden, und Infusionen solcher Zellen korrelierten mit verlangsamtem Leukämieverlauf [185].

Ebenso wie bei Granzin *et al.* 2016 wurden in der vorliegenden Arbeit durch Negativselektion aus PBMCs angereicherte NK-Zellen als Startmaterial für die Expansionskulturen verwendet. Im Gegensatz zur der dort beschriebenen feederzellunterstützten Kultur, hatte die permanente Zugabe von IL-21 hier einen hemmenden Effekt auf die Expansionsrate und reduzierte die durchschnittliche vierfache Vervielfältigung, die mit IL-15 erreicht wurde, auf eine

durchschnittlich dreifache (siehe Abb. 4-5) und bestätigt damit die Resultate von Choi *et al.* [185]. Die in dieser Arbeit erzielten Expansionsraten lagen zwar weit niedriger als solche, von denen unter Verwendung von Feederzellen berichtet wurde, allerdings konnte hier gezeigt werden, dass sich der Einfluss von IL-21 auf eine angereicherte NK-Zellkultur von den bisher beobachteten IL-21-Effekten auf eine Mischkultur mit Feederzellen unterscheidet. Im direkten Vergleich der verschiedenen Zytokine und Zytokinkombinationen stellten sich in Experimenten der vorliegenden Studie ausgehend von NK-zellangereicherten Startmaterial die Zytokine IL-15, IL-2¹⁰⁰+15 und IL-15+21_{boost} hinsichtlich der erzielten Expansionsraten als überlegen heraus (siehe Abb. 4-4 und Abb. 4-5). Auch wenn dauerhaftes IL-21 nachteilig war, so wirkte eine kurze Expositionszeit hinsichtlich der Expansion und der zytotoxischen Aktivität unterstützend (siehe Abb. 4-5 und Abb. 4-20). Dass der Zeitpunkt und vor allem Zeitraum der IL-21-Exposition von Bedeutung sind, zeigten nicht nur die Ergebnisse der vorliegenden Studie, sondern wurde auch durch die Arbeiten von Granzin *et al.* 2016 und Lim *et al.* 2014 bestätigt [161,180]. Im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit beobachteten positiven Effekt von spät eingesetztem IL-21 (siehe Abb. 4-5, Abb. 4-7 und Abb. 4-20), verweisen Lim *et al.* auf einen förderlichen Effekt von IL-21, wenn es nur in der ersten Woche der Expansionskultur angewendet wird [161]. Die Erkenntnisse von Lim *et al.* lassen sich allerdings nicht direkt mit den Resultaten dieser Arbeit vergleichen, da die Autoren wiederum Feederzellkulturen verwendeten. Oyer *et al.* zeigten zudem mit der Verwendung von Partikeln, auf deren Oberfläche Zelltrümmer genmodifizierter Feederzellen hafteten, dass so präsentiertes, membrangebundenes IL-21 sich positiv auf die NK-Zellexpansion auswirkt [186,187]. Dass letal bestrahlte Feederzellen, bzw. sogar Zelltrümmer von Feederzellen ausreichen um NK-Zellen effizient zu expandieren, unterstützt die Annahme, dass oberflächenassoziierte Faktoren der Feederzellen für die positiven Effekte von membrangebundenem IL-21 mit verantwortlich sind. Ein Beispiel könnte das kostimulatorisch wirkende Signal sein, das durch Bindung des Rezeptors 4-1BB ausgelöst wird. So werden in vielen Ansätzen gentechnisch manipulierte K562-Zellen, die 4-1BB-Ligand zusätzlich zu IL-15 auf ihrer Oberfläche tragen, als Feederzellen eingesetzt [129,184,188]. Li *et al.* wiesen außerdem nach, dass 4-1BB-Ligand in membrangebundener Form bei gleichzeitig vorhandenem membrangebundenem IL-21 zu 140-facher NK-Zellexpansion führte, während die Expansion mit löslichem 1-1BB-Ligand zehnmal geringer ausfiel [189]. Da jedoch PBMCs als Ausgangsmaterial verwendet wurden, wurde ein direkter expansionsinduzierender Effekt von 4-1BB-Ligand auf NK-Zellen in diesen Studien nicht

DISKUSSION

nachgewiesen. Andere Zellen des Zellgemischs könnten stattdessen beeinflusst gewesen sein und ihre Aktivierung NK-zellstimulierende Faktoren, wie z. B. Zytokine, induzieren.

NK Zellen expandieren nicht nur aus CD56^{pos} CD3^{neg} Zellen, sondern entwickeln sich auch aus CD56^{neg} CD3^{neg} Zellen [190]. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass mit längerer Zytokinexpansion die CD56-Dichte auf den NK-Zellen zunimmt und der Anteil CD56^{neg} Zellen geringer wird (siehe Abb. 4-9). Durch IL-21 wurde hier auch die CD16-Dichte (FcγRIII) erhöht (siehe Abb. 4-10), ein Ergebnis, das durch die Arbeit von Choi *et al.* 2014 bestätigt wurde [185]. Die Interaktion von CD16 mit seinen Liganden ist für eine erhöhte Zellaktivität verantwortlich und hat eine Verstärkung der ADCC zur Folge [183,191]. Eine Hochregulierung von CD16 bedeutet eine Sensitivierung der NK-Zellen für die Bindung antigengebundener Immunglobuline zur Vermittlung der ADCC, die in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde (siehe Abb. 4-23). Protokolle ohne Verwendung von IL-21 führten wiederum zu einer Verminderung von CD16 auf der Oberfläche expandierter NK-Zellen bzw. zu einer größeren CD16^{neg} Fraktion [186,192,193]. NK-Zellen mit einem geringeren CD16^{pos} Anteil, besaßen zwar direkte tumorlysierende Funktion, die ADCC-basierte zytotoxische Aktivität machte jedoch nur einen geringen Anteil von 4,5 bis 9% aus. Dennoch war zu beobachten, dass der Zugewinn an Zytotoxizität durch ADCC bei IL-15-expandierten NK-Zellen, die weniger CD16exprimierten, um die Hälfte geringer ausfiel als bei NK-Zellen mit verstärkter, IL-21-induzierter CD16-Expression (siehe Abb. 4-23).

Interessanterweise ist den meisten *ex vivo* Expansionsprotokollen gemeinsam, dass im Vergleich zu unstimulierten Zellen Aktivierungsrezeptoren erhöht sind während inhibitorisch wirkende Rezeptoren oft nicht untersucht wurden [128]. Die Analysen, die bezüglich NKG2A durchgeführt wurden, zeigten allerdings eine Erhöhung der Expression dieses inhibitorischen Rezeptors [142,194,195]. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass IL-15 in Verbindung mit IL-21 verschiedene Rezeptoren auf unterschiedliche Weise ansprechen. Für die Expression der apoptoseinduzierenden Todesrezeptoren TRAIL und Fas-L ergab sich z. B. ein additiver Effekt von IL-15 und IL-21, ebenso für die aktivierenden Rezeptoren DNAM-1 und CD25 und das inhibitorische NKD2A. Die IL-15-induzierte Expression anderer Rezeptoren wie NKG2D, Nkp30, Nkp44 oder der KIR-Familien wurde wiederum durch IL-21 geschwächt (siehe Abb. 4-11, Abb. 4-12 und Abb. 4-15). Eine bevorzugte Expression einer bestimmten Rezeptorgruppe, die zu einer verstärkten oder verminderten Funktionalität der NK-Zellen führte, konnte wiederum nicht beobachtet werden.

Obwohl Expansionsprotokolle unter Verwendung von zusätzlichen Hilfs- oder genmanipulierten Feederzellen zu extrem hohen Zellzahlen führen, ist es in solchen Fällen unabdingbar, regulatorische und sicherheitsrelevante Aspekte streng zu beachten. So dürfen keinesfalls potentiell GvHD (Transplantat-gegen-Wirt-Krankheit) auslösenden Bestandteile, die bei Expansion aus PBMCs berücksichtigt werden müssen, in den Blutkreislauf von Patienten gelangen. Restliche T-Zellen im finalen Produkt könnten zwar ebenfalls einen GvT-Effekt (Transplantat-gegen-Tumor-Effekt) haben und Tumorzellen angreifen, sind aber ein Risikofaktor für die Auslösung einer GvHD. In der vorliegenden Arbeit sollte ein möglichst reines NK-Zellprodukt generiert werden, da von NK-Zellen bekannt ist, dass sie den GvT-Effekt vermitteln, aber vor GvHD schützen [72,196,197]. Auf die Verwendung von Feederzellen sollte verzichtet werden, da Feederzellen, die von Tumorzellen abgeleitet wurden, ebenfalls ein Risiko ausgeht. Werden diese nach NK-Zellexpansion nicht sauber vom eigentlichen Zellprodukt abgetrennt oder durch Bestrahlung abgetötet, können sie im Patienten proliferieren und erneut zu einer Tumorerkrankung führen. Zudem muss die Sicherheit solcher Feederzellen für den Herstellungsprozess von NK-Zellen gewährleistet sein und regelmäßig kontrolliert werden, dass keine Verunreinigung durch Bakterien-, Virus- oder Mykoplasmenkontamination besteht [198].

5.2 BEWERTUNG DER NK-ZELLFUNKTIONALITÄT

Zur Beurteilung der Zellfunktionalität eignen sich hauptsächlich drei Parameter. Diese umfassen a) die Degranulationskapazität, welche sich anhand des Lysosommarkers LAMP-1, auch bekannt als CD107a, der nach Degranulation auf der Zelloberfläche erscheint, ermitteln lässt, b) die Produktion von IFN- γ , welche über intrazelluläre Färbung nachgewiesen wird, und c) die tatsächliche Zytotoxizität, die im direkten Einsatz gegen Tumorzellen gemessen [199–201]. Dabei wird typischerweise die Erythroleukämiezelllinie K562 als Zielzelllinie eingesetzt, da sie aufgrund mangelnder MHC-I- und MHC-II-Expression als NK-zellsensitiv gilt [202]. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden all diese Parameter für die Funktionsanalysen untersucht (siehe Abb. 4-24, Abb. 4-25 und Abb. 4-20). Zusätzlich zur Zytotoxizität gegenüber K562-Zellen wurde die lytische Wirkung expandierter NK-Zellen gegen zwei verschiedene Rhabdomyosarkomzelllinien (RD und RH30), die schwer behandelbare solide Tumorerkrankungen repräsentieren, getestet.

DISKUSSION

Die Stimulation von NK-Zellen mit Zytokinen bewirkte eine Steigerung der zytotoxischen Aktivität (siehe Abb. 4-20). Getestet wurden NK-Zellen, die mit den Protokollen IL-15, IL-15+21 oder IL-15+21_{boost} expandiert worden waren, da diese sich in den vorangegangenen Untersuchungen bezüglich der Expansionsraten und Subtypenverteilung (CD16^{neg}/ CD16^{pos}) vor allem im Vergleich zu IL-2- oder IL-21-expandierten NK-Zellen als am vielversprechendsten herausstellten (siehe Abb. 4-5 und Abb. 4-10). IL-15+21_{boost}-expandierte NK-Zellen die höchste Lysekapazität gegenüber K562- RD- und RH30-Zellen (siehe Abb. 4-20). Zudem war der Anteil degranulierender NK-Zellen und die intrazelluläre IFN- γ -Produktion nach IL-15+21_{boost}-Expansion am höchsten (Abb. 4-24 und Abb. 4-25). Koehl *et al.* demonstrierte in verschiedenen Ansätzen, dass NK-Zellen, die hohen IL-2-Konzentrationen von 1000 U/mL ausgesetzt waren, nicht nur vermehrt proliferierten und einen aktivierten Phänotyp zeigten, sondern außerdem K562-Zellen und Neuroblastomzellen besser lysierten als frisch isolierte, unstimulierte NK-Zellen [130,193,203]. Die Daten von Huenecke *et al.* zeigten, dass der Anstieg der Zytotoxizität mit erhöhten Expressionsniveaus aktivierender Rezeptoren wie den NCRs, NKG2D und CD69, aber auch inhibitorischer KIRs und NKG2A, einherging [193]. Degranulation oder Ausschüttung von Granzym B und Perforin wurden in diesen Ansätzen nicht weiter untersucht. Vergleiche von NK-Zellen, die mit 1000 U/mL IL-2 oder 10 ng/mL IL-15 expandiert wurden, zeigten im Einsatz gegen K562-, Neuroblastom-, Daudi- und Ewing-Sarkom-Zellen keine Unterschiede in ihrer lytischen Leistung [204]. Ausschlaggebender für die Zytotoxizität war die Dauer der Expansionskultur. Dementsprechend waren die Zellen nach der längsten Kultivierungszeit von fünf Tagen am potentesten [204]. Boermann *et al.* testeten NK-Zellen gegen verschiedene Rhabdomyosarkomzelllinien und konnten eine signifikante Verstärkung der lytischen Aktivität IL-15 aktivierter NK-Zellen im Vergleich zu der frisch isolierter Zellen verzeichnen [153]. Diese Untersuchungen zeigten, dass ruhende NK-Zellen eine intrinsische Lysekapazität besaßen, die durch das Zusammenspiel von DNAM-1 und NKG2D gesteuert wurde. Durch Stimulation mit 10 ng/mL IL-15 wurden weitere Faktoren, wie NCRs, aktiviert, die die zytotoxische Wirkung steigerten [153]. Anzumerken ist, dass auch Boermann *et al.* weder die Degranulation noch die Ausschüttung apoptoseinduzierender Proteine näher untersuchte.

Die vorliegende Arbeit unterstreicht die Ergebnisse dieser vorangegangenen Forschungen hinsichtlich der gesteigerten Expression aktivierender NK-Zellrezeptoren nach Zytokinstimulation (siehe Abb. 4-12 und Abb. 4-13). Die Koexpressionsanalysen ausgewählter aktivierender Rezeptoren zeigte, dass DNAM-1 auf einem großen Anteil

DISKUSSION

unstimulierter Zellen exprimiert wurde (auf 95% CD16^{neg} und auf 90% CD16^{pos}), NKG2D wurde auf allen CD16^{neg}, aber nur auf der Hälfte der CD16^{pos} Zellen exprimiert, der NCR NKp40 wurde dagegen kaum exprimiert (auf <5% CD16^{neg}, 0% CD16^{pos}). Durch Stimulation mit IL-15, auch in Kombination mit IL-21 wurde zusätzlich NKp44 koexprimiert. Obwohl nur geringe Unterschiede in den Koexpressionsdaten mit und ohne IL-21-Exposition in Anwesenheit von IL-15 zu erkennen waren, so gab es doch Differenzen in der Expressionsdichte der aktivierenden Rezeptoren auf den Zelloberflächen (siehe Abb. 4-14). Außer bei DNAM-1 wurde bei allen aktivierenden Rezeptoren die IL-15 abhängige Expression durch dauerhafte Anwesenheit von IL-21 inhibiert, nicht aber durch einen dreitägigen IL-21-Boost (siehe Abb. 4-12). Gleichzeitig hatte die dauerhafte Anwesenheit von IL-21 zusätzlich zu IL-15 eine ähnliche Wirkung auf die zytotoxische Funktion expandierter NK-Zellen gegen K562- oder RD-Zellen wie IL-15 allein, gegen RH30-Zellen konnte die Zytotoxizität so sogar noch gesteigert werden. Ein dreitägiger IL-21-Boost führte wiederum immer zu einer signifikanten Steigerung der lytischen Aktivität um 10% im Vergleich zur einfachen IL-15 Behandlung (siehe Abb. 4-20). Diese Ergebnisse legen nahe, dass IL-21 vielmehr zur Feinsteuerung der NK-Zellaktivität genutzt und vorsichtig und gezielt eingesetzt und mehr als Hilfsmittel unterstützend zu anderen Zytokinen wie IL-15 gegeben werden sollte. Ähnliches bestätigen auch Wendt *et al.*, die mit einer kurzen, 20-stündigen, Stimulation mit 10 U/mL IL-2 und 20 ng/mL IL-21 einen positiven additiven Effekt auf die Aktivität von NK-Zellen erzielten, während die Einzelstimulationen mit den beiden Zytokinen jedoch weniger ausgeprägte Steigerungen der Zytotoxizität bewirkten [155].

Zusätzlich zu Oberflächenanalysen und Zytotoxizitätstests wurden Degranulationstests und Immunoblotanalysen durchgeführt, die zur Aufklärung der Mechanismen, die für die Steigerung der lytischen Aktivität durch den IL-21-Boost verantwortlich waren, führen sollten. Vorangegangene Studien zeigten, dass solche Mechanismen unabhängig von Todesrezeptoren ablaufen können, dafür aber perforinvermittelt sind [156,205]. Dementsprechend wurde in der vorliegenden Studie die Degranulationskapazität der expandierten NK-Zellen näher betrachtet. Anhand des lysosomassoziierten Markers CD107a wurde nach Einwirkung von IL-21 ein verstärkter Vesikeltransport an die Zelloberfläche nachgewiesen (siehe Abb. 4-24). Es ist davon auszugehen, dass bei der folgenden Verschmelzung solcher Granula mit der äußeren NK-Zellmembran eine gesteigerte Ausschüttung von lysevermittelnden Enzymen einhergeht. Tatsächlich wurde gezeigt, dass auch die Produktion von Perforin und Granzym B unter Einfluss von IL-21 zunahm (siehe

Abb. 4-26). Zudem wurden diese apoptosevermittelnden Enzyme im Kulturüberstand von NK-Zellen gefunden, die unter IL-21 Exposition expandiert worden waren, was auf eine gesteigerte Sekretion solcher schließen ließ (siehe Abb. 4-26). Davis *et al.* beschrieben erhöhte Perforin und Granzym B mRNA Level in IL-21 ausgesetzten CD8^{pos} T-Zellen und NK-Zellen von Patienten mit fortgeschrittenen Melanomerkrankungen [206]. Weiter wurde in PBMCs eine gesteigerte Granzym B- und Perforinproduktion durch IL-21 Einwirkung auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen [207]. Die intrazelluläre Mobilisierung von Perforin und Granzym B ist wiederum auf die IL-21-induzierte Aktivierung von AKT- und ERK-Signalwegen zurückzuführen [208].

NK-Zellen selbst sind vor der Lyse geschützt, da in ihren Granula die lysosomale Protease Cathepsin B vorkommt. Diese bleibt nach der Degranulation auf der Effektorzellmembran zurück und kann das Perforin im Mikromilieu inaktivieren [209]. In diesem Zusammenhang empfiehlt es sich, IL-21 erst nach einer initialen Expansionsphase einzusetzen, um so eine verfrühte Degranulation und eine mögliche Perforininaktivierung zu unterbinden. Stattdessen sollte die Degranulation erst eingeleitet werden, wenn oder kurz bevor die NK-Zellen auf ihre Zielzellen treffen, so wie es die hier vorgestellte Zwei-Phasen-Expansion mit dem IL-15+21_{boost} Protokoll erlaubt.

Mit der Zunahme der Zytotoxizität ging eine gesteigerte Zytokinsekretion einher. Im Vergleich zur Kultivierung mit IL-15 bewirkte die Zugabe von IL-21 höhere Zytokinmengen im Kulturüberstand. Dieser Zusammenhang ist überraschend, da die Verwendung von IL-21 bei der Expansion die immunregulatorische CD16^{neg} NK-Zellfraktion gering hielt. Es gibt allerdings Hinweise, dass, auch wenn die Signalwege der Degranulation und der Zytokinsekretion sich voneinander unterscheiden, sie ähnlichen Mechanismen folgen [210]. Im Kontext eines funktionierenden Immunsystems wirken NK-Zellen damit nicht nur durch ihre direkte natürliche Zytotoxizität, sondern stimulieren durch die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie IFN- γ und TNF- α auch andere Immunzellen und wirken so an der Schnittstelle zwischen angeborener und erworbener Immunität [211,212]. MIP-1 α und MCP-1 fördern die Aktivierung und Mobilisierung des monozytären Systems, während Zytokine wie IL-8 und GM-CSF Granulozyten stimulieren können. Interessanterweise war auch IL-10, dem eine immunsupprimierende Rolle zugeschrieben wird, durch IL-21-Einfluss stark erhöht, nicht aber durch IL-15 allein.

DISKUSSION

Die Kryokonservierung der expandierten NK-Zellen wird unterschiedlich diskutiert. Zytokinexpandierte Zellen wiesen nach dem Auftauprozess eine bessere Rückgewinnungsrate vitaler Zellen auf als unstimulierte Zellen [203]. Jedoch ist der Erhalt der Vitalität der Zellen und ihrer zytotoxischen Funktion nach Kryokonservierung stark abhängig vom vorangegangenen Expansionsprotokoll. Die feederzellunterstützte Expansion von NK-Zellen mit IL-2 führte nach dem Einfrieren und Auftauen zu einer Reduktion der Vitalität und vor allem der Zytotoxizität, wengleich letztere durch eine zusätzliche, 24-stündige IL-2 Inkubation wieder hergestellt werden konnte [182], und auch Kryokonservation nach IL-15 basierter Expansion bewirkte einen starken Verlust an Vitalität und zytolytischer Aktivität [204]. NK-Zellen, die in Anwesenheit von CD3 (OKT-3) Antikörper, IL-2 und Alemtuzumab (CD52-Antikörper) aus PBMCs generiert wurden erlitten wiederum durch Kryokonservierung weder einen Verlust an Vitalität noch an antitumoraler Wirkung [213]. Ebenso die Expansion von NK-Zellen in Gegenwart von IL-2 und bestrahlten K562-Feederzellen mit membrangebundenem IL-15 und 4-1BB aus PBMCs führte zu einem Erhalt der Zellintegrität nach Kryokonservierung. In der vorliegenden Studie führten der Einfrier- und Auftauprozess zu unterschiedlich stark ausgeprägter Reduktion der Rückgewinnungsrate und Vitalität der NK-Zellen, wobei der Einfluss von IL-21 die Zahl lebender NK-Zellen senkte (siehe Abb. 4-8). Auch die erneute Versorgung aufgetauter Zellen mit Zytokinen bewirkte keine Wiederherstellung der ursprünglichen Zellvitalität, sondern führte zu stärker ausgeprägten Einbußen an lebenden Zellen. Zudem wurde ein Funktionsverlust im Einsatz gegen RD-Zellen beobachtet (siehe Abb. 4-21), woraufhin entschieden wurde die NK-Zellen in präklinischen *in vivo* Untersuchungen, in denen mehrere Applikationsrunden nötig waren, kontinuierlich zu expandieren statt sie zu kryokonservieren.

Die komplexen Vorgänge der antitumoralen Immunzellantwort lassen sich allein im Zellkultursystem noch nicht hinreichend wiedergeben. Bevor neue Zelltherapiekonzepte für die klinische Anwendung in Erwägung gezogen werden können, sind daher neben *in vitro* Analysen ebenso Untersuchungen anhand adäquater *in vivo* Modelle unerlässlich. Für die *in vivo* Analysen wurde ein Xenograftmodell mit humanen Rhabdomyosarkomzellen in immundefizienten NSG-Mäusen etabliert, anhand dessen mittels des Biolumineszenz-Bildgebefahrens das Wachstumsverhalten von Tumoren beobachtet werden konnte (siehe Abschnitt 3.9). Erste Versuche mit IL-2¹⁰⁰+15+21 expandierten NK-Zellen, zeigten bereits Erfolge gegen subkutan inokulierte RMS Zellen und auch bei intraperitonealer Applikation der Tumor- und der NK-Zellen. In diesen Versuchen wurde die Behandlung durch adoptiven

NK-Zelltransfer schon kurz nach Tumorzellinjektion begonnen und stellte somit einen präventiven, eher artifiziellen Ansatz dar. Dennoch konnte gezeigt werden, dass schon eine einzelne Gabe von zytokinexpandierten NK-Zellen das Tumorzellwachstum hemmen kann (siehe Abb. 4-30). Für einen klinisch relevanteren Ansatz wurde schließlich ein Versuch in Kombination mit Bestrahlung von etablierten Rhabdomyosarkomtumorknoten durchgeführt (siehe Abb. 4-34). Es gibt Hinweise darauf, dass ionisierende Strahlen molekulare Veränderungen im Tumorgewebe bewirken, die die Metastasierung fördern [170,214]. Adoptiv transferierte NK-Zellen sollten somit nicht nur gegen Primärtumore eingesetzt werden, sondern auch gegebenenfalls entstehende Mikrometastasen angreifen. In dieser Studie konnte jedoch weder im Xenograftmodell mit RH30- noch mit RD-Zellen die Bildung von Metastasen beobachtet werden. Auch wenn die niedrig dosierte lokale Radiotherapie über drei Wochen zu einer Verminderung des Tumorwachstums führte, so reichte diese nicht aus um alle Rhabdomyosarkomzellen abzutöten. Die nachfolgende Applikation von IL-15+21_{boost} expandierten NK-Zellen konnte das Wachstum der Tumore weiter unterdrücken, wenngleich nicht komplett unterbinden. In den hier gewählten Ansätzen wurden die Effektorzellen maximal dreimal im Abstand von einer Woche infundiert. In diesem Zeitraum konnte die Tumorgröße nahezu stabil gehalten werden. Nach Beendigung der NK-Zelltherapie nahmen die Tumore erneut an Größe zu. Hieraus lässt sich schließen, dass eine Therapieverlängerung mit wiederholtem NK-Zelltransfer bis zur endgültigen Kontrolle und Eliminierung der Tumore erforderlich wäre. Die damit einhergehende Problematik liegt in der Limitation verfügbarer primärer NK-Zellen eines Spenders. In der vorliegenden Studie wurden im finalen *in vivo* Versuch NK-Zellen aus verschiedenen Spendern direkt vor Injektion vereinigt und als Gemisch appliziert. Bisher ist nicht hinreichend untersucht worden ob oder wie stark sich NK-Zellen mit unterschiedlichem KIR-Profil verschiedener Spender sich gegenseitig behindern können. Die *in vivo* Versuche am Xenograftmodell zeigten in der vorliegenden Studie wiederum, dass der positive Effekt, die antitumorale Aktivität der NK-Zellen in einem solchen Ansatz aufrechterhalten werden konnte.

5.3 KOMBINATIONSTRATEGIE – RADIOTHERAPIE UND NK-ZELLTHERAPIE

Das klinische Protokoll zur Behandlung von RMS-Erkrankungen sieht in erster Instanz die lokale Entfernung des Tumors vor. Dies kann durch einen operativen Eingriff erfolgen oder, wenn dies nicht möglich ist, durch lokale Radiotherapie. In diesem Zusammenhang sollte in

dieser Studie nicht nur die Wirkung von NK-Zellen allein auf das Wachstum von RMS-Tumoren untersucht werden, sondern auch der klinisch nähere Ansatz des adoptiven NK-Zelltransfers nach Bestrahlung des Tumorgewebes. In der Radiotherapie erfolgt die Bestrahlung meist hyperfraktioniert, d.h. in mehreren niedriger dosierten Einzeldosen, bis die endgültige Gesamtdosis erreicht ist. Auf diese Weise werden die Tumorzellen geschädigt, das umliegende gesunde Gewebe wird jedoch geschont. Dementsprechend wurden in dieser Arbeit die RD-Tumore der Mäuse gezielt mittels SARRP (*Small Animal Radiation Research Platform*) über drei Wochen viermal wöchentlich mit 2,5 Gy Einzeldosen bestrahlt, bis eine Gesamtdosis von 27,5 Gy erreicht worden war. Anschließend wurden den Tieren dreimal im Abstand von einer Woche IL-15+21_{boost} expandierte NK-Zellen appliziert. Woods *et al.* berichteten von einem metastasefördernden Effekt ionisierender Strahlung auf RH30- und RH18-Zellen, nachdem *ex vivo* bestrahlte Tumorzellen Mäusen subkutan injiziert worden waren [215]. In der vorliegenden Arbeit wurden die RD-Zellen *in vivo* bestrahlt und bei keinem der Tiere die Entstehung von Metastasen beobachtet.

Insgesamt wurden die Tumorzellen in ihrem Wachstum durch die Radiotherapie gebremst. Dieser Effekt konnte durch den zusätzlichen adoptiven Transfer von NK-Zellen verstärkt werden. Tatsächlich wurde berichtet, dass eine subletale Ganzkörperbestrahlung von 5 Gy für die antitumorale Wirkung von IL-12+15+18 aktivierten murinen NK-Zellen essenziell war. Aktivierte Zellen, die in nicht bestrahlte Mäuse injiziert worden waren, hatten keinerlei inhibierenden Effekt auf das Wachstum von murinen RMA-S-Lymphomzellen oder B16/RAE-1 ϵ -Melanomzellen [169]. Die Autoren fanden bei bestrahlten Tieren eine höhere Anzahl an Effektorzellen im Tumorgewebe als bei nicht bestrahlten und führten dieses Phänomen darauf zurück, dass die ionisierende Strahlung modulierende Wirkung auf das den Tumor umgebende Gefäßsystem hat, welche durch verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen die Infiltration von Immunzellen fördert [216,217]. In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Ames *et al.* wurde ein gehäuftes Auftreten von stammzellartigen Zellen unter den Tumorzellen nach dem Einsatz von ionisierender Strahlung beobachtet. Die verstärkte Expression von Stressliganden auf solchen stammzellartigen Tumorzellen führte bei anschließender Applikation von feederzell- und zytokinstimulierten NK-Zellen zu gezielter lytischer Aktivität gegen sie. Durch die Eliminierung der Tumorstammzellen wurde das gesamte Tumorgewebe aufgebrochen und konnte wiederum leichter von den zytotoxischen Effektorzellen angegriffen werden [168].

Das in der vorliegenden Studie angewandte Zwei-Phasen-Protokoll zur Expansion von NK-Zellen, förderte die Expression von Fas-Ligand und NKG2D auf den Immunzellen (siehe Abb. 4-11 bis Abb. 4-14). Die von Ames *et al.* beschriebene verstärkte Expression von Fas und NKG2D-Liganden in bestrahlten Tumorzelllinien und Sarkomen radiotherapierter Patienten lässt die Kombination von ionisierender Strahlung und IL-15+21_{boost}-expandierten NK-Zellen vielversprechend erscheinen. Tatsächlich war im Vergleich zur Radiotherapie allein mit aufeinanderfolgender Anwendung von lokalisierter Bestrahlung und IL-15+21_{boost}-expandierten NK-Zellen eine verbesserte Kontrolle des Tumorwachstums zu beobachten (siehe Abb. 4-34).

5.4 KLINISCHE ANWENDUNG VON ZYTOKINEXPANDIERTEN NK-ZELLPRODUKTEN

NK-Zellen eignen sich besonders gut für den adoptiven Transfer, da es sich um spezialisierte Lymphozyten mit einer natürlichen Aktivität gegen maligne Zellen handelt, die keine oder nur wenig GvHD auslösen [218,219]. AML-Patienten, die eine haploidente Stammzelltransplantation mit alloreaktiven NK-Zellen erhielten, zeigten ein geringeres Rezidivrisiko, keine GvHD und bessere ereignisfreie Überlebensraten als Patienten, die kein alloreaktives Transplantat erhielten [53,220]. Auch im Nicht-Transplantat-Ansatz fanden NK-Zellinfusionen Anwendung gegen AML, Non-Hodgkin-Lymphom und in ersten Phase/II Studien gegen solide Tumore wie dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom sowie Eierstock- und Brustkrebs [122,123,221]. Dabei wurden *ex vivo* mit IL-15 und Hydrokortison expandierte alloreaktive NK-Zellen in Kombination mit Chemotherapie als sicher und potentiell wirksam befunden [123]. Um NK-Zellen standardisiert für den klinischen Einsatz nutzbar zu machen, müssen jedoch Herausforderungen wie die limitierte Zahl an NK-Zellen mit optimaler Funktion überwunden werden. Die NK-Zellen vorzubereiten und funktionsfähig zu machen, ihre Funktion aber erst auszulösen, wenn sie auf ihre Zielzellen treffen, ist ein vielversprechender Ansatz, der auch in dieser Arbeit verfolgt wurde, jedoch ohne den Einsatz von *Feeder*-Zellen [222].

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigten, dass es möglich ist primäre humane NK-Zellen *ex vivo* mit dem IL-15+21_{boost} Protokoll zu expandieren und sie zur verbesserten Kontrolle von Rhabdomyosarkomtumoren eingesetzt werden können. Die Applikation von expandierten NK-Zellen stellt eine sicherere Therapiemöglichkeit dar als die direkte Infusion von Zytokinen. Nebenwirkungen wie das durch IL-2 ausgelöste systemische

DISKUSSION

Kapillarlecksyndrom können schwerwiegende Folgen für Patienten haben und auch Bolusinjektionen von IL-15 lösten Komplikationen wie Fieber, Blutdruckabfall und vorübergehende Thrombozytopenie aus [223–225]. IL-21 scheint bei direkter Injektion vergleichsweise gut vertragen zu werden, kann aber, in hohen Dosen verabreicht, auch zu Leberschäden führen [226]. Die Infusion von expandierten NK-Zellen dahingegen gilt als sicher [123,124], mit dem Adoptivtransfer von NK-Zellen wird sogar das verminderte Risiko der Entstehung einer GvHD in Zusammenhang gebracht [227,228]. Dennoch gab es vereinzelt Hinweise auf Vorfälle von akuter GvHD nach Applikation von NK-Zellen, die mit genmanipulierten K562-Zellen als Feederzellen expandiert wurden [229].

In der vorliegenden Arbeit wurden NK-Zellen ohne die Verwendung von Feederzellen expandiert und sollten daher auch für zukünftige klinische Anwendungen unbedenklich sein. Diese Zellen wiesen trotzdem eine ausreichende zytotoxische Aktivität auf um sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gegen das schwer behandelbaren Rhabdomyosarkom wirksam zu sein. Limitiert ist die klinische Anwendung solcher zytokinexpandierter Zellen vor allem durch die geringen Expansionsraten. In einer Reihe von Studien wurde dennoch die Realisierbarkeit der adoptiven Immuntherapie mit IL-2 expandierten NK-Zellen bei Patienten mit leukämischen Erkrankungen odersoliden Tumoren bewiesen [130,193,203,230].

Um größere Mengen an NK-Zellen zu generieren, scheint der Einsatz von zusätzlichen Zellen wie Feederzellen oder anderen Hilfszellen nötig zu sein (als Übersicht zusammengefasst von [128]). Die gezielte Depletion von CD3^{pos} T- und NK-ähnlichen T-Zellen und CD19^{pos} B-Zellen aus PBMCs könnte es ermöglichen ein sicheres Produkt zu schaffen, dass durch die Anwesenheit von zusätzlichen Zellen wie z. B. Makrophagen und Dendritischen Zellen die NK-Zellexpansion unterstützt und größere NK-Zellmengen zugänglich macht. Weiter gilt es, die Faktoren solcher Hilfszellen, die die NK-Zellexpansion fördern, zu identifizieren und sie vorzugsweise für eine feederzellfreie Expansion nutzbar zu machen. Denn wie sich in der vorliegenden Studie zeigte reichen einzelne Zytokine und auch die Kombination mehrerer Zytokine nicht aus, um an die Expansionsraten, die mit Feederzellen erzielt werden können, heranzureichen. Ob die Expansionsprotokolle von Oyer *et al.* mit Partikeln, die mit Feederzellfragmenten beladen wurden, als feederzellfrei gelten können, ist fraglich. Jedoch könnten sie als Grundlage herangezogen werden, um Wachstumsfördernde Faktoren näher zu bestimmen [186,187]. Membrangebundene 4-1BB-Liganden und ebenso immobilisierte Interleukine sind bisher die einzigen identifizierten Kenngrößen. Interessanterweise scheinen

diese tatsächlich nur in immobilisierter Form entsprechende Wirkung zu haben. Li *et al* zeigte, dass die Expansionsrate von NK-Zellen zehnmal höher war, wenn 4-1BB-Ligand und IL-21 an Partikel gebunden vorlagen, anstatt in ihren löslichen Varianten [189]. In diesem Ansatz waren die NK-Zellen aus PBMCs expandiert worden, nicht aus aufgereinigten NK-Zellen, und waren dementsprechend von akzessorischen Zellen umgeben.

Obwohl viele NK-Zellexpansionstrategien schon in der klinischen Anwendung ausgetestet werden, so hat sich die Gemeinschaft der NK-Zellforscher und Ärzte bisher nicht auf ein einheitliches Protokoll geeinigt. Die gravierendsten Unterschiede liegen dabei im Ausgangsmaterial, in den Kulturgefäßen und in der Verwendung von Feederzellen oder anderen Hilfszellen. Dies macht es schwierig die Ergebnisse miteinander zu vergleichen. Auch die vorliegende Studie reiht sich in gewisser Weise in diese Flut an Möglichkeiten ein, dient aber in erster Linie der simplen Aufklärung welche Wirkung die für die meisten Protokolle genutzten Gammakettenzytokine auf NK-Zellen haben und dabei die unbekanntesten Faktoren anderer Zellen außen vor zu lassen. Zu diesem Zweck wurden möglichst reine NK-Zellen als Ausgangsmaterial verwendet. *In vivo* Versuche wurden zudem mit humanen Zellen im immuninkompetenten murinen System durchgeführt, in dem ebenso keine weiteren Faktoren Einfluss haben sollten. In beiden Ansätzen, *in vitro* und *in vivo* konnten die expandierten NK-Zellen erfolgreich gegen Rhabdomyosarkomzellen eingesetzt werden. Zukünftige präklinische Untersuchungen sowie nachfolgende Phase I/II Studien werden zeigen mit welcher Methode NK-Zellen sicher und in ausreichenden Mengen produziert oder vermehrt werden können.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Statistisches Bundesamt. Statistisches Bundesamt Gesundheit Todesursachen in Deutschland Gestorbene in Deutschland an ausgewählten Todesursachen. *Wirtsch Stat* 2015;2. doi:2120400107004.
- [2] Yiallourous M, Kube S, Koscielniak E. Weichteilsarkome und seltene Weichteiltumoren (Kurzinformation) 2012.
- [3] Kaatsch P, Spix C. German Childhood Cancer Registry - Annual Report 2015 (1980-2014). *Inst Med Biostat Epidemiol Informatics Univ Med Cent Johannes Gutenb Univ Mainz* 2015:1–127.
- [4] Petersen I. Die neue WHO-Klassifikation und aktuelle Ergebnisse in der Weichteiltumorpathologie. *Pathologe* 2013;34:436–48. doi:10.1007/s00292-013-1784-z.
- [5] Ries L a. G, Smith M a., Gurney JG, Linet M, Tamra T, Young JL, et al. Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER Program 1975-1995. *NIH Pub No 99-4649* 1999:179 pp.
- [6] Barr FG, Smith LM, Lynch JC, Strzelecki D, Parham DM, Qualman SJ, et al. Examination of gene fusion status in archival samples of alveolar rhabdomyosarcoma entered on the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study-III trial: a report from the Children's Oncology Group. *J Mol Diagn* 2006;8:202–8. doi:10.2353/jmoldx.2006.050124.
- [7] Linardic CM, Naini S, Herndon JE, Kesserwan C, Qualman SJ, Counter CM. The PAX3-FKHR fusion gene of rhabdomyosarcoma cooperates with loss of p16INK4A to promote bypass of cellular senescence. *Cancer Res* 2007;67:6691–9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3210.
- [8] Skapek SX, Anderson J, Barr FG, Bridge JA, Gastier-Foster JM, Parham DM, et al. PAX-FOXO1 fusion status drives unfavorable outcome for children with rhabdomyosarcoma: a children's oncology group report. *Pediatr Blood Cancer* 2013;60:1411–7. doi:10.1002/pbc.24532.

- [9] Williamson D, Missiaglia E, de Reyniès A, Pierron G, Thuille B, Palenzuela G, et al. Fusion gene-negative alveolar rhabdomyosarcoma is clinically and molecularly indistinguishable from embryonal rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol* 2010;28:2151–8. doi:10.1200/JCO.2009.26.3814.
- [10] Davicioni E, Anderson JR, Buckley JD, Meyer WH, Triche TJ. Gene expression profiling for survival prediction in pediatric rhabdomyosarcomas: a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol* 2010;28:1240–6. doi:10.1200/JCO.2008.21.1268.
- [11] Rudzinski ER, Anderson JR, Lyden ER, Bridge JA, Barr FG, Gastier-Foster JM, et al. Myogenin, AP2 β , NOS-1, and HMGA2 are surrogate markers of fusion status in rhabdomyosarcoma: a report from the soft tissue sarcoma committee of the children's oncology group. *Am J Surg Pathol* 2014;38:654–9. doi:10.1097/PAS.0000000000000195.
- [12] Chen X, Stewart E, Shelat AA, Qu C, Bahrami A, Hatley M, et al. Targeting oxidative stress in embryonal rhabdomyosarcoma. *Cancer Cell* 2013;24:710–24. doi:10.1016/j.ccr.2013.11.002.
- [13] Oberlin O, Rey A, Lyden E, Bisogno G, Stevens MC, Meyer WH, et al. Prognostic factors in metastatic rhabdomyosarcomas: results of a pooled analysis from United States and European cooperative groups. *J Clin Oncol* 2008;26:2384–9. doi:10.1200/JCO.2007.14.7207.
- [14] Pappo AS, Shapiro DN, Crist WM, Maurer HM. Biology and therapy of pediatric rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol* 1995;13:2123–39. doi:10.1200/JCO.1995.13.8.2123.
- [15] Hawkins DS, Gupta AA, Rudzinski ER. What is new in the biology and treatment of pediatric rhabdomyosarcoma? *Curr Opin Pediatr* 2014;26:50–6. doi:10.1097/MOP.0000000000000041.
- [16] Alexander N, Lane S, Hitchcock R. What is the evidence for radical surgery in the management of localized embryonal bladder/prostate rhabdomyosarcoma? *Pediatr Blood Cancer* 2012;58:833–5. doi:10.1002/pbc.24087.
- [17] Rodeberg DA, Wharam MD, Lyden ER, Stoner JA, Brown K, Wolden SL, et al. Delayed primary excision with subsequent modification of radiotherapy dose for intermediate-risk rhabdomyosarcoma: a report from the Children's Oncology Group

- Soft Tissue Sarcoma Committee. *Int J Cancer* 2015;137:204–11. doi:10.1002/ijc.29351.
- [18] Barcellos-Hoff MH, Park C, Wright EG. Radiation and the microenvironment – tumorigenesis and therapy. *Nat Rev Cancer* 2005;5:867–75. doi:10.1038/nrc1735.
- [19] Walterhouse DO, Meza JL, Breneman JC, Donaldson SS, Hayes-Jordan A, Pappo AS, et al. Local control and outcome in children with localized vaginal rhabdomyosarcoma: a report from the Soft Tissue Sarcoma committee of the Children’s Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer* 2011;57:76–83. doi:10.1002/pbc.22928.
- [20] Rodeberg DA, Anderson JR, Arndt CA, Ferrer FA, Raney RB, Jenney ME, et al. Comparison of outcomes based on treatment algorithms for rhabdomyosarcoma of the bladder/prostate: Combined results from the Children’s Oncology Group, German Cooperative Soft Tissue Sarcoma Study, Italian Cooperative Group, and International Society of P. *Int J Cancer* 2011;128:1232–9. doi:10.1002/ijc.25444.
- [21] Million L, Anderson J, Breneman J, Hawkins DS, Laurie F, Michalski J, et al. Influence of noncompliance with radiation therapy protocol guidelines and operative bed recurrences for children with rhabdomyosarcoma and microscopic residual disease: a report from the Children’s Oncology Group. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011;80:333–8. doi:10.1016/j.ijrobp.2010.01.058.
- [22] Lin C, Donaldson SS, Meza JL, Anderson JR, Lyden ER, Brown CK, et al. Effect of radiotherapy techniques (IMRT vs. 3D-CRT) on outcome in patients with intermediate-risk rhabdomyosarcoma enrolled in COG D9803--a report from the Children’s Oncology Group. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2012;82:1764–70. doi:10.1016/j.ijrobp.2011.01.036.
- [23] Ladra MM, Szymonifka JD, Mahajan A, Friedmann AM, Yong Yeap B, Goebel CP, et al. Preliminary results of a phase II trial of proton radiotherapy for pediatric rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol* 2014;32:3762–70. doi:10.1200/JCO.2014.56.1548.
- [24] Hettmer S, Li Z, Billin AN, Barr FG, Cornelison DD, Ehrlich AR, et al. Rhabdomyosarcoma: current challenges and their implications for developing therapies. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014;4:a025650. doi:10.1101/cshperspect.a025650.
- [25] Breitfeld PP, Meyer WH. Rhabdomyosarcoma: new windows of opportunity.

- Oncologist 2005;10:518–27. doi:10.1634/theoncologist.10-7-518.
- [26] Arndt CAS, Stoner JA, Hawkins DS, Rodeberg DA, Hayes-Jordan AA, Paidas CN, et al. Vincristine, actinomycin, and cyclophosphamide compared with vincristine, actinomycin, and cyclophosphamide alternating with vincristine, topotecan, and cyclophosphamide for intermediate-risk rhabdomyosarcoma: children's oncology group study D9803. *J Clin Oncol* 2009;27:5182–8. doi:10.1200/JCO.2009.22.3768.
- [27] Crist WM, Anderson JR, Meza JL, Fryer C, Raney RB, Ruymann FB, et al. Intergroup rhabdomyosarcoma study-IV: results for patients with nonmetastatic disease. *J Clin Oncol* 2001;19:3091–102. doi:10.1200/JCO.2001.19.12.3091.
- [28] Oberlin O, Rey A, Sanchez De Toledo J, Martelli H, Jenney MEM, Scopinaro M, et al. Randomized comparison of intensified six-drug versus standard three-drug chemotherapy for high-risk nonmetastatic rhabdomyosarcoma and other chemotherapy-sensitive childhood soft tissue sarcomas: Long-term results from the International Society of Pediatr. *J Clin Oncol* 2012;30:2457–65. doi:10.1200/JCO.2011.40.3287.
- [29] Yang L, Takimoto T, Fujimoto J. Prognostic model for predicting overall survival in children and adolescents with rhabdomyosarcoma. *BMC Cancer* 2014;14:654. doi:10.1186/1471-2407-14-654.
- [30] Perez EA, Kassira N, Cheung MC, Koniaris LG, Neville HL, Sola JE. Rhabdomyosarcoma in Children: A SEER Population Based Study. *J Surg Res* 2011;170:e243–51. doi:10.1016/j.jss.2011.03.001.
- [31] Klingebiel T, Boos J, Beske F, Hallmen E, Int-Veen C, Dantonello T, et al. Treatment of children with metastatic soft tissue sarcoma with oral maintenance compared to high dose chemotherapy: Report of the HD CWS-96 trial. *Pediatr Blood Cancer* 2008;50:739–45. doi:10.1002/pbc.21494.
- [32] Koscielniak E, Klingebiel TH, Peters C, Hermann J, Burdach ST, Bender-Götze C, et al. Do patients with metastatic and recurrent rhabdomyosarcoma benefit from high-dose therapy with hematopoietic rescue? Report of the German/Austrian Pediatric Bone Marrow Transplantation Group. *Bone Marrow Transplant* 1997;19:227–31. doi:10.1038/sj.bmt.1700628.
- [33] Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH). (www.Kinderkrebsinfo.de) Informationsportal zu Krebs- und Bluterkrankungen bei Kindern

und Jugendlichen. n.d.

- [34] Van Gaal JC, Van Der Graaf WTA, Rikhof B, Van Hoesel QGCM, Teerenstra S, Suurmeijer AJH, et al. The impact of age on outcome of embryonal and alveolar rhabdomyosarcoma patients. A multicenter study. *Anticancer Res* 2012;32:4485–98.
- [35] Busch W. Einfluss von Erysipel auf organisirte Neubildungen. *Berliner Klin Wochenschriften* 1866;3:245–6.
- [36] Coley WB. II. Contribution to the Knowledge of Sarcoma. *Ann Surg* 1891;14:199–220.
- [37] McCarthy EF. The Toxins of William B. Coley and the Treatment of Bone and Soft-Tissue Sarcomas. *Iowa Orthop J* 2006;26:154.
- [38] Mitsis D, Francescutti V, Skitzki J. Current Immunotherapies for Sarcoma: Clinical Trials and Rationale. *Sarcoma* 2016;2016:9757219. doi:10.1155/2016/9757219.
- [39] Roberts SS, Chou AJ, Cheung N-K V. Immunotherapy of Childhood Sarcomas. *Front Oncol* 2015;5:181. doi:10.3389/fonc.2015.00181.
- [40] Finkel P, Frey B, Mayer F, Bösl K, Werthmüller N, Mackensen A, et al. The dual role of NK cells in antitumor reactions triggered by ionizing radiation in combination with hyperthermia. *Oncoimmunology* 2016;5:e1101206. doi:10.1080/2162402X.2015.1101206.
- [41] Roth M, Linkowski M, Tarim J, Piperdi S, Sowers R, Geller D, et al. Ganglioside GD2 as a therapeutic target for antibody-mediated therapy in patients with osteosarcoma. *Cancer* 2014;120:548–54. doi:10.1002/cncr.28461.
- [42] Malempati S, Weigel B, Ingle AM, Ahern CH, Carroll JM, Roberts CT, et al. Phase I/II Trial and Pharmacokinetic Study of Cixutumumab in Pediatric Patients With Refractory Solid Tumors and Ewing Sarcoma: A Report From the Children’s Oncology Group. *J Clin Oncol* 2012;30:256–62. doi:10.1200/JCO.2011.37.4355.
- [43] Dillman RO, Wiemann M, Nayak SK, Deleon C, Hood K, Depriest C, et al. Interferon-Gamma or Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Administered as Adjuvants With a Vaccine of Irradiated Autologous Tumor Cells From Short-Term Cell Line Cultures: A Randomized Phase 2 Trial of the Cancer Biotherapy Research Group. *J Immunother* 2001;26:367–73.
- [44] Carvajal RD, Agulnik M, Ryan CW. Trivalent ganglioside vaccine and immunologic

- adjuvant versus adjuvant alone in metastatic sarcoma patients rendered disease-free by surgery: a randomized phase 2 trial. *Proc. ASCO Annu.*, 2014, p. abstract10520.
- [45] Li Q, Rao R, Vazzana J, Goedegebuure P, Odunsi K, Gillanders W, et al. Regulating mammalian target of rapamycin to tune vaccination-induced CD8(+) T cell responses for tumor immunity. *J Immunol* 2012;188:3080–7. doi:10.4049/jimmunol.1103365.
- [46] Yee C, Thompson JA, Byrd D, Riddell SR, Roche P, Celis E, et al. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:16168–73. doi:10.1073/pnas.242600099.
- [47] Mackensen A, Meidenbauer N, Vogl S, Laumer M, Berger J, Andreesen R. Phase I study of adoptive T-cell therapy using antigen-specific CD8 + T cells for the treatment of patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2006;24:5060–9. doi:10.1200/JCO.2006.07.1100.
- [48] June CH. Principles of adoptive T cell cancer therapy. *J Clin Invest* 2007;117:1204–12. doi:10.1172/JCI31446.1204.
- [49] Koehl U, Brehm C, Huenecke S, Zimmermann SY, Kloess S, Bremm M, et al. Clinical grade purification and expansion of NK cell products for an optimized manufacturing protocol. *Front Oncol* 2013;3:118. doi:10.3389/fonc.2013.00118.
- [50] Koehl U, Esser R, Zimmermann S, Tonn T, Kotchetkov R, Bartling T, et al. Ex vivo expansion of highly purified NK cells for immunotherapy after haploidentical stem cell transplantation in children. *Klin Pädiatrie* 2005;217:345–50. doi:10.1055/s-2005-872520.
- [51] Oelsner S, Friede ME, Zhang C, Wagner J, Badura S, Bader P, et al. Continuously expanding CAR NK-92 cells display selective cytotoxicity against B-cell leukemia and lymphoma. *Cytotherapy* 2016. doi:10.1016/j.jcyt.2016.10.009.
- [52] Oelsner S, Wagner J, Friede ME, Pfirrmann V, Genßler S, Rettinger E, et al. Chimeric antigen receptor-engineered cytokine-induced killer cells overcome treatment resistance of pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia and enhance survival. *Int J Cancer* 2016;139:1799–809. doi:10.1002/ijc.30217.

- [53] Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* (80-) 2002;295:2097–100. doi:10.1126/science.1068440.
- [54] Lee PP, Yee C, Savage PA, Fong L, Brockstedt D, Weber JS, et al. Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nat Med* 1999;5:677–85. doi:10.1038/9525.
- [55] Peinemann F, Kröger N, Bartel C, Grouven U, Pittler M, Erttmann R, et al. High-Dose Chemotherapy Followed by Autologous Stem Cell Transplantation for Metastatic Rhabdomyosarcoma—A Systematic Review. *PLoS One* 2011;6:e17127. doi:10.1371/journal.pone.0017127.
- [56] Dantonello TM, Int-Veen C, Harms D, Leuschner I, Schmidt BF, Herbst M, et al. Cooperative Trial CWS-91 for Localized Soft Tissue Sarcoma in Children, Adolescents, and Young Adults. *J Clin Oncol* 2009;27:1446–55. doi:10.1200/JCO.2007.15.0466.
- [57] Carli M, Colombatti R, Oberlin O, Stevens M, Masiero L, Frascella E, et al. High-dose melphalan with autologous stem-cell rescue in metastatic rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol* 1999;17:2796–803. doi:10.1200/jco.1999.17.9.2796.
- [58] Zittoun RA, Mandelli F, Willemze R, de Witte T, Labar B, Resegotti L, et al. Autologous or Allogeneic Bone Marrow Transplantation Compared with Intensive Chemotherapy in Acute Myelogenous Leukemia. *N Engl J Med* 1995;332:217–23. doi:10.1056/NEJM199501263320403.
- [59] Gorin N, Labopin M, Fouillard L, Meloni G, Frassoni F, Iriando A, et al. Retrospective evaluation of autologous bone marrow transplantation vs allogeneic bone marrow transplantation from an HLA identical related donor in acute myelocytic leukemia. A study of the European Cooperative Group for Blood and Marrow Transplan. *Bone Marrow Transplant* 1996;18:111–7.
- [60] Kolb HJ, Mittermüller J, Clemm C, Holler E, Ledderose G, Brehm G, et al. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* 1990;76:2462–5.
- [61] Drobyski W, Roth M, Thibodeau S, Gottschall J. Molecular remission occurring after donor leukocyte infusions for the treatment of relapsed chronic myelogenous leukemia

- after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1992;10:301–4.
- [62] Childs R, Clave E, Contentin N, Jayasekera D, Hensel N, Leitman S, et al. Engraftment kinetics after nonmyeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: full donor T-cell chimerism precedes alloimmune responses. *Blood* 1999;94:3234–41.
- [63] Giralt S, Hester J, Huh Y, Hirsch-Ginsberg C, Rondón G, Seong D, et al. CD8-depleted donor lymphocyte infusion as treatment for relapsed chronic myelogenous leukemia after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1995;86:4337–43.
- [64] Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 1990;75:555–62.
- [65] Childs R, Chernoff A, Contentin N, Bahceci E, Schrupp D, Leitman S, et al. Regression of metastatic renal-cell carcinoma after nonmyeloablative allogeneic peripheral-blood stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 2000;343:750–8. doi:10.1056/NEJM200009143431101.
- [66] Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, Prentice R, Fefer A, Buckner CD, et al. Antileukemic Effect of Graft-versus-Host Disease in Human Recipients of Allogeneic-Marrow Grafts. *N Engl J Med* 1979;300:1068–73. doi:10.1056/NEJM197905103001902.
- [67] Sullivan KM, Storb R, Buckner CD, Fefer A, Fisher L, Weiden PL, et al. Graft-versus-Host Disease as Adoptive Immunotherapy in Patients with Advanced Hematologic Neoplasms. *N Engl J Med* 1989;320:828–34. doi:10.1056/NEJM198903303201303.
- [68] Marmont AM, Horowitz MM, Gale RP, Sobocinski K, Ash RC, van Bekkum DW, et al. T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia. *Blood* 1991;78:2120–30.
- [69] Lundqvist A, Childs R. Allogeneic hematopoietic cell transplantation as immunotherapy for solid tumors: current status and future directions. *J Immunother (Hagerstown, Md)* 1997;28:281–8.
- [70] Giebel S, Locatelli F, Lamparelli T, Velardi A, Davies S, Frumento G, et al. Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood* 2003;102:814–9. doi:10.1182/blood-2003-01-0091.
- [71] Parham P, McQueen KL. Alloreactive killer cells: hindrance and help for haematopoietic transplants. *Nat Rev Immunol* 2003;3:108–22. doi:10.1038/nri999.

- [72] Meinhardt K, Kroeger I, Bauer R, Ganss F, Ovsy I, Rothamer J, et al. Identification and characterization of the specific murine NK cell subset supporting graft-versus-leukemia- and reducing graft-versus-host-effects. *Oncoimmunology* 2015;4:e981483. doi:10.4161/2162402X.2014.981483.
- [73] Shlomchik WD, Couzens M, Tang C, McNiff J, Robert M, Liu J, et al. Prevention of Graft Versus Host Disease by Inactivation of Host Antigen-Presenting Cells. *Science* (80-) 1999;285:412–5. doi:10.1126/science.285.5426.412.
- [74] Kärre K, Locatelli F, Lamparelli T, Velardi A, Davies S, Frumento G, et al. Immunology. A perfect mismatch. *Science* 2002;295:2029–31. doi:10.1126/science.1070538.
- [75] Kondo M, Weissman IL, Akashi K, Akashi K, Weissman IL, Akashi K, et al. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 1997;91:661–72. doi:10.1016/s0092-8674(00)80453-5.
- [76] Cerwenka A, Lanier LL. Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat Rev Immunol* 2001;1:41–9. doi:10.1038/35095564.
- [77] Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001;22:633–40. doi:10.1016/S1471-4906(01)02060-9.
- [78] Nagler A, Lanier LL, Cwirla S, Phillips JH, Phillips JH. Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells Information about subscribing to The Journal of Immunology is COMPARATIVE STUDIES OF HUMAN FcRIII-POSITIVE AND NEGATIVE NATURAL KILLER CELLS 2009.
- [79] Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Bone* 2008;112:461–9. doi:10.1182/blood-2007-09-077438.
- [80] Fischer K, Tognarelli S, Roesler S, Boedicker C, Schubert R, Steinle A, et al. The smac mimetic BV6 improves NK cell-mediated killing of rhabdomyosarcoma cells by simultaneously targeting tumor and effector cells. *Front Immunol* 2017;8:1–11. doi:10.3389/fimmu.2017.00202.
- [81] Robertson M, Ritz J. Biology and Clinical Relevance of Human Natural Killer Cells. *Blood* 1990;76:2421–38.
- [82] Ziegler S, Weiss E, Schmitt A-L, Schlegel J, Burgert A, Terpitz U, et al. CD56 Is a

- Pathogen Recognition Receptor on Human Natural Killer Cells. *Sci Rep* 2017;7:6138. doi:10.1038/s41598-017-06238-4.
- [83] Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H. NEW ASPECTS OF NATURAL-KILLER- CELL SURVEILLANCE AND THERAPY OF CANCER. *Nat Rev Genet* 2002;3:827–37. doi:10.1038/nrg928.
- [84] Valiante NM, Uhrberg M, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Arnett KL, D'Andrea A, et al. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity* 1997;7:739–51. doi:10.1016/S1074-7613(00)80393-3.
- [85] Chan H-W, Kurago ZB, Stewart CA, Wilson MJ, Martin MP, Mace BE, et al. DNA Methylation Maintains Allele-specific *KIR* Gene Expression in Human Natural Killer Cells. *J Exp Med* 2003;197:245–55. doi:10.1084/jem.20021127.
- [86] Norman PJ, Abi-rached L, Gendzekhadze K, Hammond JA, Moesta AK, Sharma D, et al. Meiotic recombination generates rich diversity in NK cell receptor Meiotic recombination generates rich diversity in NK cell receptor genes , alleles , and haplotypes 2009;757–69. doi:10.1101/gr.085738.108.
- [87] Kelley J, Walter L, Trowsdale J. Comparative genomics of natural killer cell receptor gene clusters. *PLoS Genet* 2005;1:0129–39. doi:10.1371/journal.pgen.0010027.
- [88] Campbell KS, Dessing M, Lopez-Botet M, Cella M, Colonna M. Tyrosine phosphorylation of a human killer inhibitory receptor recruits protein tyrosine phosphatase 1C. *J Exp Med* 1996;184:93–100. doi:10.1084/jem.184.1.93.
- [89] Natarajan K, Dimasi N, Wang J, Mariuzza RA, Margulies DH. STRUCTURE AND FUNCTION OF NATURAL KILLER CELL RECEPTORS: Multiple Molecular Solutions to Self, Nonself Discrimination. *Annu Rev Immunol* 2002;20:853–85. doi:10.1146/annurev.immunol.20.100301.064812.
- [90] Raulet DH, Vance RE. Self-tolerance of natural killer cells. *Nat Rev Immunol* 2006;6:520–31. doi:10.1038/nri1863.
- [91] Wu J, Cherwinski H, Spies T, Phillips JH, Lanier LL. DAP10 and DAP12 form distinct, but functionally cooperative, receptor complexes in natural killer cells. *J Exp Med* 2000;192:1059–68. doi:10.1084/jem.192.7.1059.

- [92] Ullrich E, Koch J, Cerwenka A, Steinle A. New prospects on the NKG2D/NKG2DL system for oncology. *Oncoimmunology* 2013;2:e26097. doi:10.4161/onci.26097.
- [93] Wu J, Song Y, Bakker ABH, Bauer S, Spies T, Lanier LL, et al. An Activating Immunoreceptor Complex Formed by NKG2D and DAP10. *Science* (80-) 1999;285:730–2. doi:10.1126/science.285.5428.730.
- [94] Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 1999;285:727–9.
- [95] Gilfillan S, Ho EL, Cella M, Yokoyama WM, Colonna M. NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cell activation and costimulation. *Nat Immunol* 2002;3:1150–5. doi:10.1038/ni857.
- [96] Welte S, Kuttruff S, Waldhauer I, Steinle A. Mutual activation of natural killer cells and monocytes mediated by NKp80-AICL interaction. *Nat Immunol* 2006;7:1334–42. doi:10.1038/ni1402.
- [97] Narni-Mancinelli E, Gauthier L, Baratin M, Guia S, Fenis A, Deghmane A-E, et al. Complement factor P is a ligand for the natural killer cell-activating receptor NKp46. *Sci Immunol* 2017;2. doi:10.1126/sciimmunol.aam9628.
- [98] Mandelboim O, Lieberman N, Lev M, Paul L, Arnon TI, Bushkin Y, et al. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* 2001;409:1055–60. doi:10.1038/35059110.
- [99] Jarahian M, Watzl C, Fournier P, Arnold A, Djandji D, Zahedi S, et al. Activation of natural killer cells by newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase. *J Virol* 2009;83:8108–21. doi:10.1128/JVI.00211-09.
- [100] Koch J, Steinle A, Watzl C, Mandelboim O. Activating natural cytotoxicity receptors of natural killer cells in cancer and infection. *Trends Immunol* 2013;34:182–91. doi:10.1016/j.it.2013.01.003.
- [101] Sivori S, Parolini S, Marcenaro E, Castriconi R, Pende D, Millo R, et al. Involvement of natural cytotoxicity receptors in human natural killer cell-mediated lysis of neuroblastoma and glioblastoma cell lines. *J Neuroimmunol* 2000;107:220–5. doi:10.1016/S0165-5728(00)00221-6.

- [102] Ferlazzo G, Tsang ML, Moretta L, Melioli G, Steinman RM, Münz C. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med* 2002;195:343–51. doi:10.1084/jem.20011149.
- [103] Moretta A, Biassoni R, Bottino C, Mingari MC, Moretta L. Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity. *Immunol Today* 2000;21:228–34. doi:10.1016/S0167-5699(00)01596-6.
- [104] Pende D, Parolini S, Pessino A, Sivori S, Augugliaro R, Morelli L, et al. Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med* 1999;190:1505–16.
- [105] Brandt CS, Baratin M, Yi EC, Kennedy J, Gao Z, Fox B, et al. The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *J Exp Med* 2009;206:1495–503. doi:10.1084/jem.20090681.
- [106] Arase H, Arase N, Saito T. Fas-mediated cytotoxicity by freshly isolated natural killer cells. *J Exp Med* 1995;181:1235–8. doi:10.1084/jem.181.3.1235.
- [107] Dunn C, Brunetto M, Reynolds G, Christophides T, Kennedy PT, Lampertico P, et al. Cytokines induced during chronic hepatitis B virus infection promote a pathway for NK cell-mediated liver damage. *J Exp Med* 2007;204:667–80. doi:10.1084/jem.20061287.
- [108] Rousalova I, Krepela E. Granzyme B-induced apoptosis in cancer cells and its regulation (Review). *Int J Oncol* 2010;37:1361–78. doi:10.3892/ijo_00000788.
- [109] Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Immunologie*. 5th ed. Heidelberg, Berlin: Spektrum, Akademischer Verlag; 2002.
- [110] Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA. Review article Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood* 2002;100:1935–47. doi:10.1182/blood-2002-02-0350.Supported.
- [111] Kärre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 1986;319:675–8. doi:10.1038/319675a0.

- [112] Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Leitman S, Chang AE, Ettinghausen SE, et al. Observations on the Systemic Administration of Autologous Lymphokine-Activated Killer Cells and Recombinant Interleukin-2 to Patients with Metastatic Cancer. *N Engl J Med* 1985;313:1485–92. doi:10.1056/NEJM198512053132327.
- [113] Parkhurst MR, Riley JP, Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive transfer of autologous natural killer cells leads to high levels of circulating natural killer cells but does not mediate tumor regression. *Clin Cancer Res* 2011;17:6287–97. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1347.
- [114] Benson Jr. DM, Cohen AD, Jagannath S, Munshi NC, Spitzer G, Hofmeister CC, et al. A phase I trial of the anti-KIR antibody IPH2101 and lenalidomide in patients with relapsed/refractory multiple myeloma 2016;21:4055–61. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-0304.A.
- [115] Lundqvist A, Berg M, Smith A, Childs RW. Bortezomib treatment to potentiate the anti-tumor immunity of ex-vivo expanded adoptively infused autologous natural killer cells. *J Cancer* 2011;2:383–5. doi:10.7150/jca.2.383.
- [116] Wu L, Adams M, Carter T, Chen R, Muller G, Stirling D, et al. Lenalidomide enhances natural killer cell and monocyte-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity of rituximab-treated CD20+ tumor cells. *Clin Cancer Res* 2008;14:4650–7. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-4405.
- [117] Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, Volpi I, Tosti A, Perruccio K, et al. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 1999;94:333–9.
- [118] Skeate R, Singh C, Cooley S, Geller M, Northouse J, Welbig J, et al. Hemolytic anemia due to passenger lymphocyte syndrome in solid malignancy patients treated with allogeneic natural killer cell products. *Transfusion* 2013;53:419–23. doi:10.1111/j.1537-2995.2012.03942.x.
- [119] Rizzieri DA, Storms R, Chen D-F, Long G, Yang Y, Nikcevich DA, et al. Natural Killer Cell Enriched Donor Lymphocyte Infusions From a 3-6 / 6 HLA Matched Family Member Following Non-Myeloablative Allogeneic Stem Cell. *Biol Blood Marrow Transpl* 2013;16:1107–14. doi:10.1016/j.bbmt.2010.02.018.
- [120] Knorr D a., Bachanova V, Verneris MR, Miller JS. Clinical utility of natural killer cells

- in cancer therapy and transplantation. *Semin Immunol* 2014;26:161–72. doi:10.1016/j.smim.2014.02.002.
- [121] Miller JS, Soignier Y, Panoskaltsis-mortari A, Mcnearney SA, Yun GH, Fautsch SK, et al. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Cancer* 2005;105:3051–7. doi:10.1182/blood-2004-07-2974.Supported.
- [122] Geller MA, Cooley S, Judson PL, Ghebre R, Carson LF, Argenta PA, et al. A phase II study of allogeneic natural killer cell therapy to treat patients with recurrent ovarian and breast cancer. *Cytotherapy* 2011;13:98–107. doi:10.3109/14653249.2010.515582.
- [123] Iliopoulou EG, Kountourakis P, Karamouzis M V, Doufexis D, Ardavanis A, Baxevanis CN, et al. A phase I trial of adoptive transfer of allogeneic natural killer cells in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2010;59:1781–9. doi:10.1007/s00262-010-0904-3.
- [124] Bachanova V, Burns LJ, McKenna DH, Curtsinger J, Panoskaltsis-Mortari A, Lindgren BR, et al. Allogeneic natural killer cells for refractory lymphoma. *Cancer Immunol Immunother* 2010;59:1739–44. doi:10.1007/s00262-010-0896-z.
- [125] Terme M, Ullrich E, Delahaye NF, Chaput N, Zitvogel L. Natural killer cell–directed therapies: moving from unexpected results to successful strategies. *Nat Immunol* 2008;9:486–94. doi:10.1038/ni1580.
- [126] Sim GC, Radvanyi L. The IL-2 cytokine family in cancer immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2014;25:377–90. doi:10.1016/j.cytogfr.2014.07.018.
- [127] Parrish-Novak J, Dillon SR, Nelson a, Hammond a, Sprecher C, Gross J a, et al. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* 2000;408:57–63. doi:10.1038/35040504.
- [128] Granzin M, Wagner J, Köhl U, Cerwenka A, Huppert V, Ullrich E. Shaping of Natural Killer Cell Antitumor Activity by Ex Vivo Cultivation. *Front Immunol* 2017;8. doi:10.3389/fimmu.2017.00458.
- [129] Fujisaki H, Kakuda H, Shimasaki N, Imai C, Ma J, Lockey T, et al. Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy. *Cancer Res* 2009;69:4010–7. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3712.

- [130] Koehl U, Sorensen J, Esser R, Zimmermann S, Gruttner HP, Tonn T, et al. IL-2 activated NK cell immunotherapy of three children after haploidentical stem cell transplantation. *Blood Cells Mol Dis* 2004;33:261–6. doi:10.1016/j.bcmd.2004.08.013.
- [131] Lotze MT, Grimm EA, Mazumder A, Strausser JL, Rosenberg SA. Lysis of fresh and cultured autologous tumor by human lymphocytes cultured in T-cell growth factor. *Cancer Res* 1981;41:4420–5.
- [132] Grimm EA, Mazumder A, Zhang HZ, Rosenberg SA. Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* 1982;155:1823–41.
- [133] Burns LJ, Weisdorf DJ, DeFor TE, Vesole DH, Repka TL, Blazar BR, et al. IL-2-based immunotherapy after autologous transplantation for lymphoma and breast cancer induces immune activation and cytokine release: a phase I/II trial. *Bone Marrow Transplant* 2003;32:177–86.
- [134] Bamford RN, Grant a J, Burton JD, Peters C, Kurys G, Goldman CK, et al. The interleukin (IL) 2 receptor beta chain is shared by IL-2 and a cytokine, provisionally designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:4940–4. doi:10.1073/pnas.91.11.4940.
- [135] Carson WE, Giri JG, Lindemann MJ, Linett ML, Ahdieh M, Paxton R, et al. Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J Exp Med* 1994;180:1395–403. doi:10.1084/jem.180.4.1395.
- [136] Carson WE, Fehniger TA, Haldar S, Eckhert K, Lindemann MJ, Lai CF, et al. A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival. *J Clin Invest* 1997;99:937–43. doi:10.1172/JCI119258.
- [137] Grabstein KH, Eisenman J, Shanebeck K, Rauch C, Srinivasan S, Fung V, et al. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science* 1994;264:965–8. doi:10.1126/science.8178155.
- [138] Waldmann TA. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat Rev Immunol* 2006;6:595–601.

doi:10.1038/nri1901.

- [139] Marks-Konczalik J, Dubois S, Losi JM, Sabzevari H, Yamada N, Feigenbaum L, et al. IL-2-induced activation-induced cell death is inhibited in IL-15 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:11445–50. doi:10.1073/pnas.200363097.
- [140] Fehniger TA, Cooper MA, Caligiuri MA. Interleukin-2 and interleukin-15: Immunotherapy for cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002;13:169–83.
- [141] Schluns KS, Klonowski KD, Lefranc L. Transregulation of memory CD8 T-cell proliferation by IL-15R α + bone marrow – derived cells. *Cancer* 2004;103:988–94. doi:10.1182/blood-2003-08-2814.Supported.
- [142] Romee R, Schneider SE, Leong JW, Chase JM, Keppel CR, Sullivan RP, et al. Cytokine activation induces human memory-like NK cells. *Blood* 2012;120:4751–60. doi:10.1182/blood-2012-04-419283.
- [143] Cooper M a, Elliott JM, Keyel P a, Yang L, Carrero J a, Yokoyama WM. Cytokine-induced memory-like natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:1915–9. doi:10.1073/pnas.0813192106.
- [144] Doherty TM, Seder R a, Sher a. Induction and regulation of IL-15 expression in murine macrophages. *J Immunol* 1996;156:735–41.
- [145] Oppenheimer-Marks N, Brezinschek RI, Mohamadzadeh M, Vita R, Lipsky PE. Interleukin 15 is produced by endothelial cells and increases the transendothelial migration of T cells in vitro and in the SCID mouse-human rheumatoid arthritis model in vivo. *J Clin Invest* 1998;101:1261–72. doi:10.1172/JCI1986.
- [146] Schneider R, Mohebiany AN, Ifergan I, Beauseigle D, Duquette P, Prat A, et al. B cell-derived IL-15 enhances CD8 T cell cytotoxicity and is increased in multiple sclerosis patients. *J Immunol* 2011;187:4119–28. doi:10.4049/jimmunol.1100885.
- [147] Khawam K, Giron-Michel J, Gu Y, Perier A, Giuliani M, Caignard A, et al. Human renal cancer cells express a novel membrane-bound interleukin-15 that induces, in response to the soluble interleukin-15 receptor?? chain, epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Res* 2009;69:1561–9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3198.
- [148] Cui G, Hara T, Simmons S, Wagatsuma K, Abe A, Miyachi H, et al. Characterization of the IL-15 niche in primary and secondary lymphoid organs in vivo. *Proc Natl Acad*

- Sci 2014;111:1915–20. doi:10.1073/pnas.1318281111.
- [149] Mortier E, Woo T, Advincula R, Gozalo S, Ma A. IL-15/Ralpha chaperones IL-15 to stable dendritic cell membrane complexes that activate NK cells via trans presentation. *J Exp Med* 2008;205:1213–25. doi:10.1084/jem.20071913.
- [150] Mortier E, Advincula R, Kim L, Chmura S, Barrera J, Reizis B, et al. Macrophage- and Dendritic-Cell-Derived Interleukin-15 Receptor Alpha Supports Homeostasis of Distinct CD8+ T Cell Subsets. *Immunity* 2009;31:811–22. doi:10.1016/j.immuni.2009.09.017.
- [151] Ochoa MC, Mazzolini G, Hervas-Stubbs S, de Sanmamed MF, Berraondo P, Melero I. Interleukin-15 in gene therapy of cancer. *Curr Gene Ther* 2013;13:15–30. doi:10.2174/156652313804806561.
- [152] Mao Y, Van Hoef V, Zhang X, Wennerberg E, Lorent J, Witt K, et al. IL-15 activates mTOR and primes stress-activated gene expression leading to prolonged antitumor capacity of NK cells. *Blood* 2016;128:1475–89. doi:10.1182/blood-2016-02-698027.
- [153] Boerman GH, van Ostaijen-ten Dam MM, Kraal KCJM, Santos SJ, Ball LM, Lankester AC, et al. Role of NKG2D, DNAM-1 and natural cytotoxicity receptors in cytotoxicity toward rhabdomyosarcoma cell lines mediated by resting and IL-15-activated human natural killer cells. *Cancer Immunol Immunother* 2015;64:573–83. doi:10.1007/s00262-015-1657-9.
- [154] Kasaian MT, Whitters MJ, Carter LL, Lowe LD, Jussif JM, Deng B, et al. IL-21 Limits NK Cell Responses and Promotes Antigen-Specific T Cell Activation: A Mediator of the Transition from Innate to Adaptive Immunity. *Immunity* 2002;16:559–69. doi:10.1016/S1074-7613(02)00295-9.
- [155] Wendt K, Wilk E, Buyny S, Schmidt RE, Jacobs R. Interleukin-21 differentially affects human natural killer cell subsets. *Immunology* 2007;122:486–95. doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02675.x.
- [156] Brady J, Hayakawa Y, Smyth MJ, Nutt SL. IL-21 induces the functional maturation of murine NK cells. *J Immunol* 2004;172:2048–58.
- [157] Strbo N, de Armas L, Liu H, Kolber M a, Lichtenheld M, Pahwa S. IL-21 augments natural killer effector functions in chronically HIV-infected individuals. *AIDS*

- 2008;22:1551–60. doi:10.1097/QAD.0b013e3283089367.
- [158] Mcmichael EL, Jaime-Ramirez AC, Guenterberg KD, Luedke E, Atwal LS, Campbell AR, et al. IL-21 Enhances Natural Killer Cell Response to Cetuximab-Coated Pancreatic Tumor Cells. *Clin Cancer Res* 2017;23:489–503. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-0004.
- [159] Iannello A, Boulassel MR, Samarani S, Tremblay C, Toma E, Routy JP, et al. IL-21 enhances NK cell functions and survival in healthy and HIV-infected patients with minimal stimulation of viral replication. *J Leukoc Biol* 2010;87:857–67. doi:10.1189/jlb.1009701.
- [160] Li Q, Ye LJ, Ren HL, Ting HY, Li J, Shi JL, et al. Multiple effects of IL-21 on human NK cells in ex vivo expansion. *Immunobiology* 2015;220:876–88. doi:10.1016/j.imbio.2015.01.009.
- [161] Lim DP, Jang YY, Kim S, Koh SS, Lee JJ, Kim JS, et al. Effect of exposure to interleukin-21 at various time points on human natural killer cell culture. *Cytotherapy* 2014;16:1419–30. doi:10.1016/j.jcyt.2014.04.008.
- [162] Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, Gott B, Tennent B, Mckenna S, et al. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD / LtSz-scid mice. *J Immunol* 2010;154:180–91.
- [163] Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, Gott B, Chen X, Chaleff S, et al. Human Lymphoid and Myeloid Cell Development in NOD/LtSz-scid IL2R null Mice Engrafted with Mobilized Human Hemopoietic Stem Cells. *J Immunol* 2005;174:6477–89. doi:10.4049/jimmunol.174.10.6477.
- [164] Chen ML, Wang FH, Lee PK, Lin CM. Interleukin-10-induced T cell unresponsiveness can be reversed by dendritic cell stimulation. *Immunol Lett* 2001;75:91–6. doi:10.1016/S0165-2478(00)00301-1.
- [165] Pardali K, Moustakas A. Actions of TGF- β as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* 2007;1775:21–62. doi:10.1016/j.bbcan.2006.06.004.
- [166] Heo W, Lee YS, Son CH, Yang K, Park YS, Bae J. Radiation-induced matrix metalloproteinases limit natural killer cell-mediated anticancer immunity in NCI-H23

- lung cancer cells. *Mol Med Rep* 2015;11:1800–6. doi:10.3892/mmr.2014.2918.
- [167] Son C-H, Keum J-H, Yang K, Nam J, Kim M-J, Kim S-H, et al. Synergistic enhancement of NK cell-mediated cytotoxicity by combination of histone deacetylase inhibitor and ionizing radiation. *Radiat Oncol* 2014;9:49. doi:10.1186/1748-717X-9-49.
- [168] Ames E, Canter RJ, Grossenbacher SK, Mac S, Smith RC, Monjazebe AM, et al. Enhanced targeting of stem-like solid tumor cells with radiation and natural killer cells. *Oncoimmunology* 2015;4:e1036212. doi:10.1080/2162402X.2015.1036212.
- [169] Ni J, Miller M, Stojanovic A, Garbi N, Cerwenka A. Sustained effector function of IL-12/15/18-preactivated NK cells against established tumors. *J Exp Med* 2012;209:2351–65. doi:10.1084/jem.20120944.
- [170] Sofia Vala I, Martins LR, Imaizumi N, Nunes RJ, Rino J, Kuonen F, et al. Low doses of ionizing radiation promote tumor growth and metastasis by enhancing angiogenesis. *PLoS One* 2010;5. doi:10.1371/journal.pone.0011222.
- [171] Vicini FA, Kestin L, Huang R, Martinez A. Does local recurrence affect the rate of distant metastases and survival in patients with early-stage breast carcinoma treated with breast-conserving therapy? *Cancer* 2003;97:910–9. doi:10.1002/cncr.11143.
- [172] Bartelink H, Horiot J-C, Poortmans P, Struikmans H, Van den Bogaert W, Barillot I, et al. Recurrence Rates after Treatment of Breast Cancer with Standard Radiotherapy with or without Additional Radiation. *N Engl J Med* 2001;345:1378–87. doi:10.1056/NEJMoa010874.
- [173] Abel T, El Filali E, Waern J, Schneider IC, Yuan Q, Münch RC, et al. Specific gene delivery to liver sinusoidal and artery endothelial cells. *Blood* 2013;122.
- [174] Wolpert F, Tritschler I, Steinle A, Weller M, Eisele G. A disintegrin and metalloproteinases 10 and 17 modulate the immunogenicity of glioblastoma-initiating cells. *Neuro Oncol* 2014;16:382–91. doi:10.1093/neuonc/not232.
- [175] Welte SA, Sinzger C, Lutz SZ, Singh-Jasuja H, Sampaio KL, Eknigk U, et al. Selective intracellular retention of virally induced NKG2D ligands by the human cytomegalovirus UL16 glycoprotein. *Eur J Immunol* 2003;33:194–203. doi:10.1002/immu.200390022.
- [176] Poli A, Michel T, Thérésine M, Andrès E, Hentges F, Zimmer J. CD56bright natural

- killer (NK) cells: An important NK cell subset. *Immunology* 2009;126:458–65. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.03027.x.
- [177] Chan A, Hong D-L, Atzberger A, Kollnberger S, Filer AD, Buckley CD, et al. CD56bright Human NK Cells Differentiate into CD56dim Cells: Role of Contact with Peripheral Fibroblasts. *J Immunol* 2007;179:89–94. doi:10.4049/jimmunol.179.1.89.
- [178] Kim E-K, Ahn Y-O, Kim S, Kim TM, Keam B, Heo DS. Ex vivo activation and expansion of natural killer cells from patients with advanced cancer with feeder cells from healthy volunteers. *Cytotherapy* 2013;15:231–241.e1. doi:10.1016/j.jcyt.2012.10.019.
- [179] Garg TK, Szmania SM, Khan JA, Hoering A, Malbrough PA, Moreno-Bost A, et al. Highly activated and expanded natural killer cells for multiple myeloma immunotherapy. *Haematologica* 2012;97:1348–56. doi:10.3324/haematol.2011.056747.
- [180] Granzin M, Stojanovic A, Miller M, Childs R, Huppert V, Cerwenka A. Highly efficient IL-21 and feeder cell-driven ex vivo expansion of human NK cells with therapeutic activity in a xenograft mouse model of melanoma. *Oncoimmunology* 2016;5:e1219007. doi:10.1080/2162402X.2016.1219007.
- [181] Childs RW, Berg M. Bringing natural killer cells to the clinic: ex vivo manipulation. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr* 2013;2013:234–46. doi:10.1182/asheducation-2013.1.234.
- [182] Berg M, Lundqvist A, McCoy P, Samsel L, Fan Y, Tawab A, et al. Clinical-grade ex vivo-expanded human natural killer cells up-regulate activating receptors and death receptor ligands and have enhanced cytolytic activity against tumor cells. *Cytotherapy* 2009;11:341–55. doi:10.1080/14653240902807034.
- [183] Granzin M, Soltenborn S, Müller S, Kollet J, Berg M, Cerwenka A, et al. Fully automated expansion and activation of clinical-grade natural killer cells for adoptive immunotherapy. *Cytotherapy* 2015;17:621–32. doi:10.1016/j.jcyt.2015.03.611.
- [184] Imai C. Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells. *Blood* 2005;106:376–83. doi:10.1182/blood-2004-12-4797.

- [185] Choi I, Yoon SR, Park SY, Kim H, Jung SJ, Jang YJ, et al. Donor-derived natural killer cells infused after human leukocyte antigen-haploidentical hematopoietic cell transplantation: a dose-escalation study. *Biol Blood Marrow Transpl* 2014;20:696–704. doi:10.1016/j.bbmt.2014.01.031.
- [186] Oyer JL, Igarashi RY, Kulikowski AR, Colosimo DA, Solh MM, Zakari A, et al. Generation of highly cytotoxic natural killer cells for treatment of acute myelogenous leukemia using a feeder-free, particle-based approach. *Biol Blood Marrow Transpl* 2015;21:632–9. doi:10.1016/j.bbmt.2014.12.037.
- [187] Oyer JL, Pandey V, Igarashi RY, Somanchi SS, Zakari A, Solh M, et al. Natural killer cells stimulated with PM21 particles expand and biodistribute in vivo: Clinical implications for cancer treatment. *Cytotherapy* 2016;18:653–63. doi:10.1016/j.jcyt.2016.02.006.
- [188] Zhang H, Cui Y, Voong N, Sabatino M, Stroncek DF, Morisot S, et al. Activating signals dominate inhibitory signals in CD137L/IL-15 activated natural killer cells. *J Immunother* 2011;34:187–95. doi:10.1097/CJI.0b013e31820d2a21.
- [189] Li XM, He CH, Liu CZ, Ma J, Ma P, Cui HL, et al. Expansion of NK cells from PBMCs using immobilized 4-1BBL and interleukin-21. *Int J Oncol* 2015;47:335–42. doi:10.3892/ijo.2015.3005.
- [190] Harada H, Watanabe S, Saijo K, Ishiwata I, Ohno T. A Wilms tumor cell line, HFWT, can greatly stimulate proliferation of CD56+ human natural killer cells and their novel precursors in blood mononuclear cells. *Exp Hematol* 2004;32:614–21. doi:10.1016/j.exphem.2004.03.011.
- [191] Cassatella MA, Anegón I, Cuturi MC, Griskey P, Trinchieri G, Perussia B. Fc gamma R(CD16) interaction with ligand induces Ca²⁺ mobilization and phosphoinositide turnover in human natural killer cells. Role of Ca²⁺ in Fc gamma R(CD16)-induced transcription and expression of lymphokine genes. *J Exp Med* 1989;169:549–67. doi:10.1084/jem.169.2.549.
- [192] Lapteva N, Durett AG, Sun J, Rollins LA, Huye LL, Fang J, et al. Large-scale ex vivo expansion and characterization of natural killer cells for clinical applications. *Cytotherapy* 2012;14:1131–43. doi:10.3109/14653249.2012.700767.
- [193] Huenecke S, Zimmermann SY, Kloess S, Esser R, Brinkmann A, Tramsen L, et al. 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* 2010;33:200–10. doi:10.1097/CJI.0b013e3181bb46f7.
- [194] Barkholt L, Alici E, Conrad R, Sutlu T, Gilljam M, Stellan B, et al. Safety analysis of ex vivo-expanded NK and NK-like T cells administered to cancer patients: a phase I clinical study. *Immunotherapy* 2009;1:753–64.
- [195] Leong JW, Chase JM, Romee R, Schneider SE, Sullivan RP, Cooper MA, et al. Preactivation with IL-12, IL-15, and IL-18 induces CD25 and a functional high-affinity IL-2 receptor on human cytokine-induced memory-like natural killer cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014;20:463–73. doi:10.1016/j.bbmt.2014.01.006.
- [196] Huenecke S, Cappel C, Esser R, Pfirmann V, Salzmann-Manrique E, Betz S, et al. Development of three different NK cell subpopulations during immune reconstitution after pediatric allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Prognostic markers in GvHD and viral infections. *Front Immunol* 2017;8:1–10. doi:10.3389/fimmu.2017.00109.
- [197] Ullrich E, Salzmann-Manrique E, Bakhtiar S, Bremm M, Gerstner S, Herrmann E, et al. Relation between Acute GVHD and NK Cell Subset Reconstitution Following Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol* 2016;7:595. doi:10.3389/fimmu.2016.00595.
- [198] Schüle S, Renner M, Longhurst S, Narayanan G. Regulatory requirements for clinical trial and marketing authorisation application for gene therapy medicinal products. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz* 2010;53:30–7. doi:10.1007/s00103-009-0988-0.
- [199] Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods* 2004;294:15–22. doi:10.1016/j.jim.2004.08.008.
- [200] Claus M, Greil J, Watzl C. Comprehensive analysis of NK cell function in whole blood samples. *J Immunol Methods* 2009;341:154–64. doi:10.1016/j.jim.2008.11.006.
- [201] Tognarelli S, Jacobs B, Staiger N, Ullrich E. Flow Cytometry-based Assay for the Monitoring of NK Cell Functions. *J Vis Exp* 2016:e54615–e54615. doi:10.3791/54615.

- [202] Lozzio C, Lozzio B. Human With Chronic Positive. *Blood* 1975;45:321–34.
- [203] Koehl U, Brehm C, Huenecke S, Zimmermann S-Y, Kloess S, Bremm M, et al. Clinical grade purification and expansion of NK cell products for an optimized manufacturing protocol. *Front Oncol* 2013;3:118. doi:10.3389/fonc.2013.00118.
- [204] van Ostaijen-ten Dam MM, Prins HJ, Boerman GH, Vervat C, Pende D, Putter H, et al. Preparation of Cytokine-activated NK Cells for Use in Adoptive Cell Therapy in Cancer Patients: Protocol Optimization and Therapeutic Potential. *J Immunother* 2016;39:90–100. doi:10.1097/Cji.0000000000000110.
- [205] Ma H-L, Whitters MJ, Konz RF, Senices M, Young DA, Grusby MJ, et al. IL-21 Activates Both Innate and Adaptive Immunity to Generate Potent Antitumor Responses that Require Perforin but Are Independent of IFN- γ . *J Immunol* 2003;171:608–15. doi:10.4049/jimmunol.171.2.608.
- [206] Davis ID, Brady B, Kefford RF, Millward M, Cebon J, Skrumsager BK, et al. Clinical and Biological Efficacy of Recombinant Human Interleukin-21 in Patients with Stage IV Malignant Melanoma without Prior Treatment: A Phase IIa Trial. *Clin Cancer Res* 2009;15.
- [207] Skak K, Frederiksen KS, Lundsgaard D. Interleukin-21 activates human natural killer cells and modulates their surface receptor expression. *Immunology* 2008;123:575–83. doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02730.x.
- [208] Wei S, Gamero AM a. M, Liu JHJH, Daulton a. a. A a, Valkov NINI, Trapani J a J a., et al. 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* 1998;187:1753–65. doi:10.1084/jem.187.11.1753.
- [209] Balaji KN, Schaschke N, Machleidt W, Catalfamo M, Henkart PA. Surface Cathepsin B Protects Cytotoxic Lymphocytes from Self-destruction after Degranulation. *J Exp Med* 2002;196:493–503. doi:10.1084/jem.20011836.
- [210] Reefman E, Kay JG, Wood SM, Offenhäuser C, Brown DL, Roy S, et al. Cytokine Secretion Is Distinct from Secretion of Cytotoxic Granules in NK Cells. *J Immunol* 2010;184.

- [211] Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004;4:11–22. doi:10.1038/nrc1252.
- [212] Moretta L, Ferlazzo G, Bottino C, Vitale M, Pende D, Mingari MC, et al. Effector and regulatory events during natural killer?dendritic cell interactions. *Immunol Rev* 2006;214:219–28. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00450.x.
- [213] Masuyama J, Murakami T, Iwamoto S, Fujita S. Ex vivo expansion of natural killer cells from human peripheral blood mononuclear cells co-stimulated with anti-CD3 and anti-CD52 monoclonal antibodies. *Cytotherapy* 2016;18:80–90. doi:10.1016/j.jcyt.2015.09.011.
- [214] Kuonen F, Secondini C, Rüegg C. Molecular pathways: Emerging pathways mediating growth, invasion, and metastasis of tumors progressing in an irradiated microenvironment. *Clin Cancer Res* 2012;18:5196–202. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1758.
- [215] Woods GM, Bondra K, Chronowski C, Leasure J, Singh M, Hensley L, et al. Radiation therapy may increase metastatic potential in alveolar rhabdomyosarcoma. *Pediatr Blood Cancer* 2015;62:1550–4. doi:10.1002/pbc.25516.
- [216] Ganss R, Ryschich E, Klar E, Arnold B, Hämmerling GJ. Combination of T-cell therapy and trigger of inflammation induces remodeling of the vasculature and tumor eradication. *Cancer Res* 2002;62:1462–70.
- [217] Quezada SA, Peggs KS, Simpson TR, Shen Y, Littman DR, Allison JP. Limited tumor infiltration by activated T effector cells restricts the therapeutic activity of regulatory T cell depletion against established melanoma. *J Exp Med* 2008;205:2125–38. doi:10.1084/jem.20080099.
- [218] Parham P. MHC class I molecules and kirs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol* 2005;5:201–14. doi:10.1038/nri1570.
- [219] Eissens DN, Michelo CM, Preijers FW, van Cranenbroek B, van Houwelingen K, van der Meer A, et al. Selective expansion of human natural killer cells leads to enhanced alloreactivity. *Cell Mol Immunol* 2014;11:160–8. doi:10.1038/cmi.2013.56.
- [220] Baggio L, Laureano AM, Silla LM, Lee DA. Natural killer cell adoptive immunotherapy: Coming of age. *Clin Immunol* 2016. doi:10.1016/j.clim.2016.02.003.

- [221] Krause SW, Gastpar R, Andreesen R, Gross C, Ullrich H, Thonigs G, et al. Treatment of colon and lung cancer patients with ex vivo heat shock protein 70-peptide-activated, autologous natural killer cells: a clinical phase I trial. *Clin Cancer Res* 2004;10:3699–707. doi:10.1158/1078-0432.ccr-03-0683.
- [222] North J, Bakhsh I, Marden C, Pittman H, Addison E, Navarrete C, et al. Tumor-primed human natural killer cells lyse NK-resistant tumor targets: evidence of a two-stage process in resting NK cell activation. *J Immunol* 2007;178:85–94. doi:10.4049/jimmunol.178.1.85.
- [223] Peace DJ, Cheever MA. Toxicity and therapeutic efficacy of high-dose interleukin 2. In vivo infusion of antibody to NK-1.1 attenuates toxicity without compromising efficacy against murine leukemia. *J Exp Med* 1989;169:161–73.
- [224] Assier E, Jullien V, Lefort J, Moreau JL, Di Santo JP, Vargaftig BB, et al. NK cells and polymorphonuclear neutrophils are both critical for IL-2-induced pulmonary vascular leak syndrome. *J Immunol* 2004;172:7661–8.
- [225] Conlon KC, Lugli E, Welles HC, Rosenberg SA, Fojo AT, Morris JC, et al. Redistribution, hyperproliferation, activation of natural killer cells and CD8 T cells, and cytokine production during first-in-human clinical trial of recombinant human interleukin-15 in patients with cancer. *J Clin Oncol* 2015;33:74–82. doi:10.1200/JCO.2014.57.3329.
- [226] Sivakumar P V., Garcia R, Waggle KS, Anderson-Haley M, Nelson A, Hughes SD. Comparison of vascular leak syndrome in mice treated with IL21 or IL2. *Comp Med* 2013;63:13–21.
- [227] Asai O, Longo DL, Tian ZG, Hornung RL, Taub DD, Ruscetti FW, et al. Suppression of graft-versus-host disease and amplification of graft-versus-tumor effects by activated natural killer cells after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 1998;101:1835–42. doi:10.1172/JCI1268.
- [228] Olson JA, Leveson-Gower DB, Gill S, Baker J, Beilhack A, Negrin RS. NK cells mediate reduction of GVHD by inhibiting activated, alloreactive T cells while retaining GVT effects. *Blood* 2010;115:4293–301. doi:10.1182/blood-2009-05-222190.
- [229] Shah NN, Baird K, Delbrook CP, Fleisher T a., Kohler ME, Rampertaap S, et al. Acute GVHD in patients receiving IL-15/4-1BBL activated NK cells following T cell

LITERATURVERZEICHNIS

- depleted stem cell transplantation. *Blood* 2014. doi:10.1182/blood-2014-07-592881.
- [230] Stern M, Passweg JR, Meyer-Monard S, Esser R, Tonn T, Soerensen J, et al. Pre-emptive immunotherapy with purified natural killer cells after haploidentical SCT: a prospective phase II study in two centers. *Bone Marrow Transplant* 2013;48:433–8. doi:10.1038/bmt.2012.162.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bedeutung
x g	x-fache Erdbeschleunigung
Abb.	Abbildung
ADCC	Antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (engl.: <i>Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity</i>)
A. dest.	<i>Aqua destillata</i> (destilliertes Wasser)
AICL	engl.: <i>Activation-Induced C-type Lectin</i> ,
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARMS	Alveoläres Rhabdomyosarkom
bzw.	Beziehungsweise
CD	Unterscheidungsgruppe (engl.: <i>Cluster of Differentiation</i>)
CIK-Zelle	zytokininduzierte Killerzelle engl.: <i>Cytokine Induced Killer Cell</i>
CFSE	Carboxyfluoreszein-Succinimidyl-Ester
d	Tag€
DAP12	engl.: <i>DNAX activation protein of 12 kDa</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
d.h.	das heißt
dim	vermindert exprimiert (engl.: <i>diminished</i>)
DLI	Spenderlymphozyteninfusion (engl.: <i>Donor Lymphocyte Infusion</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNAM-1	engl.: <i>DNAX Accessory Molecule-1</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EMT	Epithel-Mesenchym-Übergang (engl.: <i>Epithelial-Mesenchymal-Transition</i> ,)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bedeutung
engl.	Englisch
ERMS	Embryonales Rhabdomyosarkom
FACS	fluoreszenzaktivierte Zellseparation
FasL	Fas-Ligand
FDA	Zulassungsbehörde der USA (engl.: <i>Food and Drug Administration</i>)
FFS	ausfallfreies Überleben (engl.: <i>failure-free survival</i>)
FKS	fötales Kälberserum
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Gt	Ziege
GvHD	Transplantat-gegen-Wirt-Krankheit (engl.: <i>Graft-versus-Host-Disease</i>)
GvT/L-Effekt	Transplantat-gegen-Tumor/Leukämie-Effekt
h	Stunde(n)
HLA	humanes Leukozytenantigen
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IL-2R	IL-2-Rezeptor
IMRT	Intensitätsmodulierte Radiotherapie
ITAM	engl.: <i>immunoreceptor tyrosine-based activating motif</i>
ITIM	engl.: <i>immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>
IVA	Ifosfamid, Vincristin und Actinomycin-D
kDa	Kilodalton
KIR	killerimmunglobulinähnlichen Rezeptoren (engl.: <i>Killer Immunglobulin-like Receptors</i>)
LAK-Zellen	lymphokinaktivierten Killerzellen
Luc	Luciferase
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MIC-A/B	engl.: <i>MHC class I polypeptide-related sequence A/B</i>
MCP-1	engl.: <i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bedeutung
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: <i>Major Histocompatibility Complex</i>)
min	Minute(n)
MIP-1 α	engl.: <i>macrophage inflammatory protein 1α</i>
Ms	Masu
NCR	natürlicher Zytotoxizitätsrezeptor (engl.: <i>Natural Cytotoxicity Receptor</i>)
Neg	negativ
NKG	natürliche Killergruppe (engl.: <i>Natural Killer Group</i>)
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NSG	NOD/Scid/IL2R γ ^{-/-} engl.: <i>Non-Obese Diabetic/ Severe Combined Immunodeficiency/ Interleukin-2-Receptor-γ-Chain Knock Out</i>)
PBMCs	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl.: <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PE	Phycoerythrin
pos	positiv
Rbt	Kaninchen
rh	rekombinant human
RMS	Rhabdomyosarkom
RT	Radiotherapie
rt	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SEER	<i>Surveillance, Epidemiology, and End Results</i> Programm des Nationalen Krebsinstituts der USA
SFFV	Spleen-Focus-Forming-Virus
STAT	engl.: <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bedeutung
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor (engl.: <i>Transforming Growth Factor</i>)
TNF	Tumornekrosefaktor
T _{reg} -Zellen	regulatorische T-Zellen
TRAIL	engl.: <i>Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand</i>
ULBP	UL-16-bindendes Protein
VA	Vincristin und Actinomycin-D
VAC	Vincristin, Actinomycin-D und Cyclophosphamid
VTC	Vincristin, Topotecan und Cyclophosphamid
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl.: <i>World Health Organization</i>)
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1-1 Prozentuale Verteilung von embryonalen und alveolären Rhabdomyosarkomen über verschiedene anatomische Bereiche.....	2
Abb. 1-2 Überlebensraten bei verschiedenen malignen Erkrankungen	5
Abb. 1-3 Schematische Darstellung der NK-Subpopulationen.....	9
Abb. 1-4 Szenarien der NK-Zellaktivierung	12
Abb. 1-5: Schematischer Aufbau der Gammakettenrezeptoren zur Bindung der Zytokine IL-2, IL-15 und IL-21 und ihre Wirkung.	15
Abb. 3-1: Identifikationsstrategie (Gating) beim Zytotoxizitätstest mittels Durchflusszytometrie.	35
Abb. 4-1: NK-Zell-Definitionsstrategie.	44
Abb. 4-2: Zusammensetzung des Zellproduktes vor (PBMCs) und nach NK-Zellaufreinigung (Angereicherte NK-Zellen).	45
Abb. 4-3: Proliferationsverhalten verschiedenartig stimulierter NK-Zellen.....	46
Abb. 4-4: Exemplarische Expansionskurven dreier Spender.....	48
Abb. 4-5: Expansionsverhalten von NK Zellen in ex vivo Kultur unter Einfluss verschiedener Zytokine und Zytokinkombinationen.....	49
Abb. 4-6: Kontamination durch CD3pos Zellen und Reinheitsgrad von NK-Zellen nach ex vivo Expansion unter Einfluss verschiedener Zytokine und Zytokinkombinationen.	51
Abb. 4-7: Einfluss verschiedener Expansionsprotokolle auf die Vitalität von CD56posCD3neg NK-Zellen.....	52
Abb. 4-8: Einfluss des Kryokonservierungs- und Auftauprozesses auf die Ausbeute an vitalen NK-Zellen.....	53
Abb. 4-9: CD56-Expression auf expandierten NK-Zellen.....	55
Abb. 4-10: CD16-Expression auf expandierten NK-Zellen.....	56
Abb. 4-11: Expressionsdichte apoptosevermittelnder Todesrezeptoren.	58

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 4-12: Expressionsdichte aktivierender Rezeptoren.	59
Abb. 4-13: Regulierung der Expression aktivierender Oberflächenmarker in Abhängigkeit vom Expansionsprotokoll und der Zeit.	60
Abb. 4-14: Populationsidentifikationsstrategie zur Koexpressionsanalyse und Koexpression aktivierender Rezeptoren.....	61
Abb. 4-15: Regulierung der Expression inhibitorischer Rezeptorfamilien in Abhängigkeit vom Expansionsprotokoll und der Zeit.	63
Abb. 4-16: Koexpressionsdiagramme inhibitorisch wirkender Rezeptorfamilien.	64
Abb. 4-17: Regulierung der Expression von Migrationsrezeptoren und Adhäsionsmolekülen in Abhängigkeit vom Expansionsprotokoll und der Zeit.	65
Abb. 4-18: NKG2D-Ligandenanalyse auf malignen Zielzellen.....	66
Abb. 4-19: Abhängigkeit der spezifischen Lyse vom E:T-Verhältnis.	67
Abb. 4-20: Steigerung der Zytotoxizität durch Anwendung des IL-15+21boost Expansionsprotokolls.	68
Abb. 4-21: Einfluss der Kryokonservierung und der kontinuierlichen Expansion auf die Zytotoxizität von NK-Zellen.....	69
Abb. 4-22: Zytotoxizitätssteigerung durch Passagierung der NK-Zellen während der Expansion.....	70
Abb. 4-23: Trastuzumab unterstützte zelluläre Zytotoxizität expandierter NK-Zellen.	71
Abb. 4-24: Degranulationskapazität expandierter NK-Zellen.	72
Abb. 4-25: Intrazellulärer Nachweis der IFN- γ -Produktion durch expandierte NK-Zellen. ...	73
Abb. 4-26: Produktion und Ausschüttung von Zytotoxizitätsmediatoren.....	74
Abb. 4-27: Ausschüttung von Zytokinen durch expandierte NK-Zellen.	75
Abb. 4-28: Generierung Luc/GFP exprimierender RH30-Zellen.	77
Abb. 4-29: Generierung Luc/GFP exprimierender RD-Zellen.	78
Abb. 4-30: In vivo Behandlungsversuch von RH30-Tumoren mit expandierten NK-Zellen..	79
Abb. 4-31: In vivo Behandlungsversuch von RD-Tumoren mit expandierten NK-Zellen.....	80

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 4-32: Sensibilität von RH30-Tumoren auf ionisierende Strahlung	82
Abb. 4-33: Sensibilität von RD-Tumoren auf ionisierende Strahlung	83
Abb. 4-34: Behandlungsversuch von RD-Tumoren mit IL-15+21boost expandierten NK-Zellen nach erfolgter RT.	85

9 TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 2-1 Auflistung der verwendeten Zellen und Zelllinien	20
Tab. 2-2 Auflistung aller verwendeter Plasmide	21
Tab. 2-3 Auflistung aller angewandter Antikörper.	22
Tab. 2-4 Auflistung der verwendeten Medien und Puffer.....	23
Tab. 2-5 Auflistung der verwendeten Kits und Reagenzien	24
Tab. 2-6 Auflistung verwendeter Verbrauchsmaterialien	26
Tab. 2-7 Auflistung verwendeter Geräte	27
Tab. 2-8 Auflistung der verwendeten Computerprogramme	28
Tab. 3-1 Zusammensetzung der Gele, die für die SDS-PAGE verwendet wurden.	37

10 ANHANG

10.1 PUBLIKATIONSLISTE

Wagner J, Pfannenstiel V, Waldmann A, Bergs JWJ, Brill B, Hünecke S, Klingebiel T, Rödel F, Buchholz C, Wels WS, Bader P, Ullrich E (2017) *A Two-Phase Expansion Protocol Combining Interleukin (IL)-15 and IL-21 Improves Natural Killer Cell Proliferation and Cytotoxicity against Rhabdomyosarcoma*. Front Immunol. doi: 10.3389/fimmu.2017.00676.

Granzin M, **Wagner J**, Köhl U, Cerwenka H, Huppert V, Ullrich E (2017) *Shaping of NK cell anti-tumor activity by ex vivo cultivation*. Front Immunol. doi: 10.3389/fimmu.2017.00458.

Oelsner S, **Wagner J**, Friede ME, Pfirrmann V, Genßler S, Rettinger E, Buchholz CJ, Pfeifer H, Schubert R, Ottmann OG, Ullrich E, Bader P, Wels WS (2016) *Chimeric antigen receptor-engineered cytokine-induced killer cells overcome treatment resistance of pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia and enhance survival*. Int J Cancer. doi: 10.1002/ijc.30217.

Oelsner S, Friede ME, Zhang C, **Wagner J**, Badura S, Bader P, Ullrich E, Ottmann OG, Klingemann H, Tonn T, Wels WS (2016) *Continuously expanding CAR NK-92 cells display selective cytotoxicity against B-cell leukemia and lymphoma*. Cytotherapy doi: 10.1016/j.jcyt.2016.10.009.

Pförtner H, **Wagner J**, Surmann K, Hildebrandt P, Ernst S, Bernhardt J, Schurmann C, Gutjahr M, Depke M, Jehmlich U, Dhople V, Hammer E, Steil L, Völker U, Schmidt F (2014) *A proteomics workflow for quantitative and time-resolved analysis of adaption reactions of internalized bacteria*. Methods. doi:pii: S1046-2023(13)00113-8.10.1016/j.ymeth.2013.04.009.

Jouy F, Müller SA, **Wagner J**, Otto W, Bergen Mv, Tamm JM (2014) *Integration of conventional quantitative and phosphor-proteomics reveals new elements in activated Jurkat T-cell receptor pathway maintenance*. Proteomics. doi: 10.1002/pmic.201400119.

Murugayan J, Rockstroh M, **Wagner J**, Baumann S, Schorsch K, Trump S, Lehmann I, Bergen Mv, Tamm JM (2013) *Benzo[a]pyrene affects Jurkat T cells in the activated state via the antioxidant response element dependent Nrf2 pathway leading to decreased IL-2 secretion and redirecting glutamine metabolism*. Toxicol Appl Pharmacol. doi:1016/j.taap.2013.03.0322013.

10.2 AUSGEWÄHLTE ÖFFENTLICHE PRÄSENTATIONEN

10.2.1 Posterbeiträge

Wagner J, Pfannenstiel V, Klingebiel T, Wels WS, Rödel F, Bader P, Ullrich E. *A Two-Phase NK Cell Expansion Protocol for Adoptive Immunotherapy of Rhabdomyosarcoma*. Posterbeitrag 47th Annual Meeting of the German Society for Immunology, Erlangen, 2017

Wagner J, Pfannenstiel V, Klingebiel T, Wels WS, Rödel F, Bader P, Ullrich E. *A Feeder-Cell-Free Two-Phase NK Cell Expansion Protocol for Adoptive Immunotherapy of Rhabdomyosarcoma*. Natural Killer Cell Symposium, Düsseldorf, 2017

Wagner J, Tognarelli S, Winterling K, Giannattasio A, Muth A, Koch J, Buchholz CJ, Klingebiel T, Wels WS, Bader P, Ullrich E. *Optimization of Cytokine Activation by Addition of IL-21 Enhances Antitumor Impact of Adoptive NK Cell Therapy Protocols against Rhabdomyosarcoma*. 8th Cellular Therapy Congress, Erlangen 2015

Wagner J, Tognarelli S, Winterling K, Giannattasio A, Rasbach A, Koch J, Buchholz CJ, Klingebiel T, Wels WS, Bader P, Ullrich E. *Optimization of Cytokine Activation by Addition of IL-21 Enhances Antitumor Impact of Adoptive NK Cell Therapeutic Protocols against Rhabdomyosarcoma*. Natural Killer Cell Symposium, Hannover, 2014

10.2.2 Vorträge

Influence of Common γ Chain Cytokines on NK Cell Function for Immunotherapy of Rhabdomyosarcoma. NK Cell and ILC Retreat, Kleinwalsertal, 2016

Influence of Common γ Chain Cytokines on NK Cell Function within Therapy of Rhabdomyosarcoma. Wissenschaftliche Arbeitstagung zur Immun- und Zelltherapie in der Onkologie, Glashütten, 2015

Impact of common gamma chain mediated cytokines on NK cell function for adoptive NK cell therapy in Rhabdomyosarcoma Workshop for Experimental Blood & Marrow Transplantation & Cell Therapy, Berlin, 2015

Optimization of cytokine activation by addition of IL-21 enhances antitumor impact of adoptive NK cell therapy protocols against solid tumors. ZKI Science Meeting, 2014

Bioluminescence and Fluorescence Analysis of Anti-Tumoral Efficiencies of Different Effector Immune Cells in Various NSG Tumor Models. LOEWE Afternoon Workshop, 2013