

**Einfluss von Natürlichen Killer (NK) Zellen auf den Graft versus  
Leukämie/Tumor Effekt und die Immunrekonstitution bei  
pädiatrischen Patienten mit malignen Erkrankungen nach  
haploidenter Stammzelltransplantation.**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
**Sabine Hünecke**  
aus Nordhausen

Frankfurt 2009  
(D30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Dieter Steinhilber

Erster Gutachter: Prof. Dr. Walter E. Müller

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Thomas Klingebiel

Datum der Disputation: 16.12.2009

Unsere Wünsche sind die Vorboten der Fähigkeiten, die in uns liegen.  
(Johann Wolfgang von Goethe)

Meinen Eltern



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	MALIGNER ERKRANKUNGEN IM KINDESALTER . . . . .	1
1.2	STAMMZELLTRANSPLANTATION . . . . .	3
1.2.1	Autologe und allogene SZT . . . . .	3
1.2.2	Stammzellquellen . . . . .	8
1.2.3	Zellaufarbeitung von Stammzellprodukten . . . . .	9
1.3	ZELLULÄRE IMMUNREKONSTITUTION NACH SZT . . . . .	13
1.4	IMMUNOLOGISCHE TRANSPLANTATREAKTIONEN NACH ALLOGENER SZT	16
1.4.1	Graft versus Host Reaktionen . . . . .	16
1.4.2	Graft versus Leukämie-/ Tumor-Effekt . . . . .	18
1.4.3	Komplikationen nach allogener SZT . . . . .	19
1.5	NATÜRLICHE KILLER ZELLEN . . . . .	21
1.5.1	NK-Zell-Rezeptoren (aktivierende und inhibierende) . . . . .	21
1.5.2	Effektormechanismen . . . . .	26
1.5.3	Wirkhypothesen . . . . .	28
1.6	NK-ZELLTHERAPIEN NACH HAPLOIDENTER SZT . . . . .	32
1.6.1	Potentieller therapeutischer Nutzen von NK-Zellen . . . . .	32
1.6.2	Klinische Studienprotokolle mit allogenen NK-Zellen . . . . .	32
<b>2</b>	<b>Zielsetzung dieser Arbeit</b>	<b>35</b>
<b>3</b>	<b>Spender, Patienten, Material und Methoden</b>	<b>37</b>
3.1	SPENDER . . . . .	37
3.1.1	Spender Validierungsläufe . . . . .	37
3.1.2	Spender klinische Applikation . . . . .	37
3.1.3	Spender Normwertstudie . . . . .	38
3.2	PATIENTEN . . . . .	38
3.2.1	Patienten der NK-Zell-Studie . . . . .	38
3.2.2	Patienten der Vergleichskohorte . . . . .	39
3.3	MATERIALIEN . . . . .	41
3.3.1	Geräte und Software . . . . .	41
3.3.2	Verbrauchsmaterialien . . . . .	42
3.3.3	Chemikalien, Medien, Puffer und Reagenzien . . . . .	42
3.3.4	Antikörper . . . . .	43

## *Inhaltsverzeichnis*

3.4	METHODEN . . . . .	45
3.4.1	Ficoll Trennung zur Isolierung mononukleärer Zellen . . . . .	45
3.4.2	Isolierung primärer humaner NK-Zellen im Labormaßstab . . . . .	45
3.4.3	Isolierung primärer humaner Monozyten im Labormaßstab . . . . .	47
3.4.4	Isolierung primärer humaner NK-Zellen im klinischen Maßstab . . . . .	47
3.4.5	Kultivierung primärer humaner Spender NK-Zellen . . . . .	49
3.4.6	Kultivierung humaner Zelllinien . . . . .	49
3.4.7	Durchflusszytometrische Messung . . . . .	50
3.4.8	Untersuchung der zellulären Zytokinausschüttung mittels Cytometric Bead Array und ELISA . . . . .	62
3.4.9	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen bei Effektor:Target Interaktionen . . . . .	66
3.4.10	KIR- und HLA-Typisierung . . . . .	66
3.4.11	Statistische Methoden . . . . .	67
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>68</b>
4.1	IN VITRO UNTERSUCHUNGEN DER NK-ZELLEN . . . . .	68
4.1.1	Isolierung primärer humaner NK-Zellen . . . . .	68
4.1.2	Expansion primärer humaner NK-Zellen . . . . .	70
4.1.3	Untersuchung der Rezeptorveränderungen unter IL-2 Stimulierung . . . . .	72
4.1.4	Untersuchung der Funktionalität . . . . .	80
4.2	IN VIVO UNTERSUCHUNGEN NACH ALLOGENER NK-ZELL-APPLIKATION	84
4.2.1	Klinisches Monitoring der Lymphozyten sowie Antigen-präsentierender Zellen nach NK-Zell-Gabe . . . . .	85
4.2.2	Zusammenhang zwischen NK- und T-Zell-Dosis mit dem Auftreten einer GvHD . . . . .	90
4.3	EINFLUSS DER NK-ZELLEN AUF DIE IMMUNREKONSTITUTION NACH SZT	92
4.3.1	Messung von Lymphozytenpopulationen zur Erhebung von Normwerten gesunder Kinder . . . . .	92
4.3.2	Entwicklung eines stetigen Exponential-Modells . . . . .	94
4.3.3	Einfluss von Zellaufarbeitung auf die zelluläre Immunrekonstitution nach haploidenter SZT . . . . .	97
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>105</b>
5.1	IN VITRO AKTIVIERUNG DER NK-ZELLEN . . . . .	105
5.1.1	Aufreinigung und Expansion der NK-Zellen . . . . .	105
5.1.2	Der immunologische Phänotyp der expandierten NK-Zellen . . . . .	109
5.1.3	Gewichtung der veränderten Rezeptorzusammensetzung auf die Wirkhypothesen der NK-Zellen . . . . .	112

## *Inhaltsverzeichnis*

5.1.4	Bewertung der Funktionalität von NK-Zellen . . . . .	114
5.2	IN VIVO EINFLUSS DER NK-ZELLTHERAPIE NACH ALLOGENER SZT . . .	118
5.2.1	NK-Zellen in der allogenen SZT . . . . .	118
5.2.2	Allogene NK-Zell-Immuntherapie . . . . .	121
5.2.3	Beurteilung des Monitoring und der Immunrekonstitution . . . . .	123
5.3	SCHLUSSFOLGERUNG FÜR DIE KLINISCHE ANWENDUNG VON IL-2 STI- MULIERTEN NK-ZELLEN . . . . .	129
<b>6</b>	<b>Ausblick</b>	<b>131</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>133</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>135</b>
	<b>Anhang</b>	<b>152</b>
<b>A</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>B</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>C</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>D</b>	<b>CD-Nomenklatur</b>	<b>VII</b>
<b>E</b>	<b>Pipettierschema und neu entwickelter Normwert-Kalkulator</b>	<b>IX</b>
<b>F</b>	<b>Protokolle des Immunstatus</b>	<b>X</b>
<b>G</b>	<b>Zytokine/ Chemokine und ihre Wirkweise</b>	<b>XI</b>
<b>H</b>	<b>Danksagung</b>	<b>XIII</b>
<b>I</b>	<b>Eigene Publikationsliste</b>	<b>XV</b>
<b>J</b>	<b>Kongressbeiträge</b>	<b>XVI</b>
<b>K</b>	<b>Eidesstattlicher Erklärung</b>	<b>XVII</b>
<b>L</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>XVIII</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Maligne Erkrankungen im Kindesalter

Malignität (von lat. *malignitas*) bedeutet Bösartigkeit. Maligne Erkrankungen sind laut aktuellen Statistiken in Deutschland die zweithäufigste Todesursache bei Kindern. Das Deutsche Kinderkrebsregister [1] erfasst seit 1980 Krebserkrankungen bei Kindern unter 15 Jahren. Der Jahresbericht 2006/2007 umfasst Daten von 41.185 Erkrankungsfällen bei Kindern. Laut Informationen des deutschen Kinderkrebsregisters – ermittelt aus den Jahren 1980-2006 – entfallen 34,8 % der malignen Erkrankungen bei Kindern auf Leukämien, 20,5 % auf ZNS Tumoren, 12,1 % auf Lymphome, 7,9 % auf Tumoren des sympathischen Nervensystems (Neuroblastom), 6,3 % auf Weichteiltumoren, 6,0 % auf Nierentumoren (Nephroblastom), 4,8 % auf Knochentumoren, 3,2 % auf Keimzelltumoren und 4,4 % auf sonstige Tumoren. Bis zu einem Alter von 15 Jahren liegt die jährliche Inzidenzrate bei durchschnittlich 15 von 100.000 Kindern, wobei im Säuglingsalter ein Erkrankungsgipfel zu verzeichnen ist (25 von 100.000 Kindern).

**Das Neuroblastom** ist eine maligne Erkrankung des sympathischen Nervensystems und im Kindesalter der häufigste extrakranielle solide Tumor. Bundesweit erkranken jährlich ca. 150 Kinder an diesem Tumor. Neuroblastome sind embryonale Tumoren, weshalb sich ihr Auftreten auf das frühe Kindesalter konzentriert. Etwa 40 % der Kinder erkranken im ersten Lebensjahr. Mit zunehmendem Lebensalter ist die Inzidenz rückläufig. 90 % der Patienten sind jünger als 6 Jahre. Vom autonomen Nervengewebe – der embryonalen Neuralleiste – ausgehend handelt es sich um einen Tumor, dessen Zellen (sogenannte Neuroblasten) in einem unreifen Stadium verblieben sind. Neuroblastome können überall dort auftreten, wo sich sympathisches Gewebe findet: Nebennieren, cervikaler, thorakaler und abdomineller Grenzstrang, Paraganglien. Etwa die Hälfte aller Neuroblastome sind bei Diagnosestellung bereits metastasiert. Metastasen werden in regionalen und entfernten Lymphknoten, Knochenmark, Knochen, Leber oder Haut beobachtet, seltener im

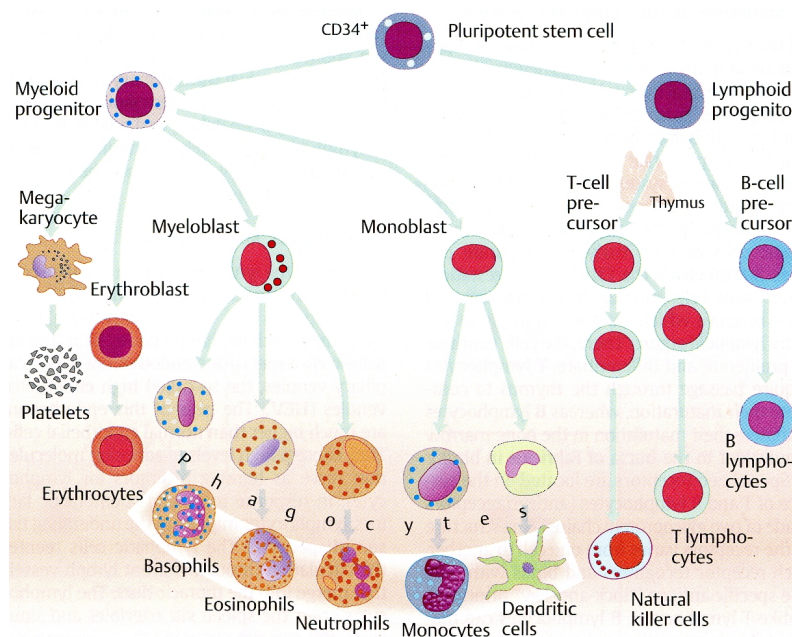


## 1 Einleitung

ZNS, höchst selten in der Lunge. Das Beschwerdebild des Neuroblastoms wird durch den Ort des Primärtumors oder der Metastasen bestimmt. Die Stadieneinteilung erfolgt nach INSS-Kriterien (*International Neuroblastoma Staging System*) (Brodeur et al. 1993). Die 5-Jahres-Überlebensrate hängt stark vom Stadium selbst ab: Im Stadium 1 bis 2 meist über 90 %, im Stadium 3 ca. 75 %, im Stadium 4 weniger als 35 % (Berthold et al. 2003). Die Prognose für Hochrisiko-Neuroblastom Patienten ist mit konventioneller Chemotherapie sehr schlecht (Berthold et al. 2003, Handgretinger et al. 2002). Die ereignisfreie Überlebensrate, drei Jahre nach Randomisierung bei Neuroblastom Patienten mit Stadium IV, die älter als 1 Jahr bei Diagnose sind, liegt trotz multimodaler Therapieprotokolle (Operation, Chemotherapie, Radiotherapie und Megatherapie mit autologer Stammzellgabe) bei 34 % (Matthay et al. 1999). Aktuell werden Neuroblastome im Stadium IV nach dem NB-2004 Protokoll behandelt. Zur Anwendung kommen Alkylanzien (Stickstofflost-Analoga: Cyclophosphamid, Ifosfamid, Melphalan, Dacarbazin), Antrazykline (Doxorubicin), Topoisomerase Hemmer (Etoposid, Topotecan), Platinverbindungen (Carboplatin, Cisplatin), Vinca-Alkaloide (Vincristin, Vindesin), 13-cis-Retinsäure in Kombination [2] sowie eine Behandlungen mit therapeutischen Dosen MIBG (<sup>131</sup>Jod-markiertes Meta-jodobenzylguanidin) in Kombination mit externer Strahlenbehandlung. In der Rezidivsituation können weitere Therapieverfahren (z.B.: Studien mit neuen Zytostatika, Anti-Neuroblastom-Antikörper sowie eine haploidente Stammzelltransplantation mit neuen innovativen Therapieansätzen wie z.B.: additive NK-Zell-Immuntherapie) zur Anwendung kommen.

## 1.2 Stammzelltransplantation

Die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen (Stammzelltransplantation=SZT) hat in den letzten 30 Jahren für die Therapie hämato-onkologischer Erkrankungen zunehmend an Bedeutung gewonnen und ist heute integraler Bestandteil vieler Therapiekonzepte. Aus der hämatopoetischen Stammzelle können alle Differenzierungslinien des hämatopoetischen Systems (wie z.B.: Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten) gebildet werden (► Abb. 1.1).



**Abbildung 1.1: Die Differenzierungsmöglichkeiten der hämatopoetischen Stammzelle.** Die Abbildung ist aus dem Taschenatlas der Immunologie (Thieme Verlag, 2.Auflage, 2006) entnommen.

### 1.2.1 Autologe und allogene SZT

Bei der **autologen** SZT werden die Stammzellen dem Patienten selbst entnommen. Diese Stammzellen werden kryokonserviert, gelegentlich auch CD34<sup>+</sup> angereichert und dem Patienten je nach Studienprotokoll zum entsprechenden Zeitpunkt reinfundiert. Eine autologe SZT wird unverzichtbar, wenn aufgrund einer Krebserkrankung eine hochintensive chemo- oder radiochemotherapeutische Behandlung notwendig wird. Da diese aber das

## 1 Einleitung

eigene blutbildende System schwer schädigt, müssen dem Patienten vor Beginn der Behandlung gesunde Stammzellen entnommen werden, die ihm nach der myeloablativen (Knochenmark eliminierenden) Therapie wieder zurückgegeben werden. Die Funktion des blutbildenden Systems kann somit wiederhergestellt werden. Die Entnahme der Stammzellen erfolgt zu einem Zeitpunkt, bei dem sich der Patient möglichst in kompletter Remission (=temporäre oder dauerhaftes Nachlassen von Krankheitheitssymptomen) befindet. Die in den 1970er Jahren eingeführte autologe SZT machte eine Hochdosis-Chemotherapie z.B. beim Neuroblastom erst möglich und erhöhte somit wesentlich die Heilungschancen insbesondere bei kindlichen malignen Tumoren.

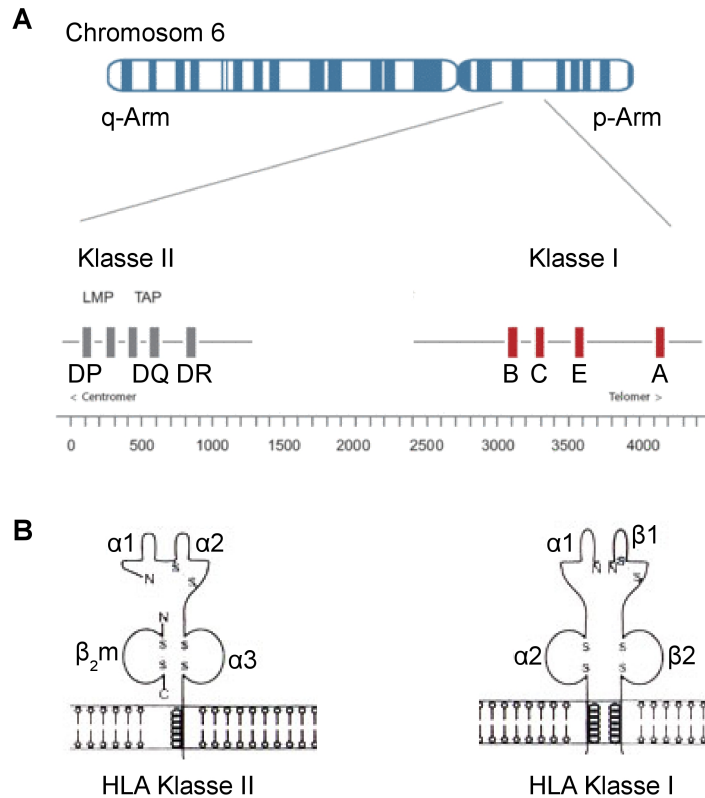
Bei der **allogenen** SZT werden dem Patienten die Stammzellen eines anderen, gesunden Stammzellspenders übertragen. Dabei müssen bestimmte Gewebemerkmale bei Spender und Empfänger gleich sein. Hierbei handelt es sich um das humane Leukozytenantigen-System (HLA-System, humane MHC). HLA-Moleküle bestimmen den genetischen Fingerabdruck jeder Körperzelle. Sie bilden eine in Abbildung 1.2 B dargestellte Oberflächenstruktur auf den Leukozyten. Das HLA-System wird in zwei funktionelle Genregionen unterteilt:

- Klasse I  
HLA-A, -B, -C und -E  
auf allen kernhaltigen Zellen, Thrombozyten
- Klasse II  
HLA-DR, -DP und -DQ  
auf Antigen-präsentierenden Zellen (dendritische Zellen (DZ), Makrophagen)

In jeder dieser Gruppen gibt es eine Vielzahl unterschiedlicher Antigene. Die Gene für die HLA-Proteine finden sich auf dem Chromosom 6 (► Abb. 1.2 A). Da jeder Mensch jeweils ein Chromosom von der Mutter und eines vom Vater ererbt, besitzt er für jedes HLA-Merkmal jeweils 2 Allele (z.B. B\*4001 und B\*1501).

Bei der HLA-Kompatibilität wird nach internationalem Standard die Übereinstimmung in  $2 \times 5$  HLA-Antigenen (bestehend aus HLA-A, -B, -C, -DR und -DQ) gefordert.

# 1 Einleitung



**Abbildung 1.2: Das humane Leukozytenantigen-System (HLA-System, engl. *human leukocyte antigene*).** **A** Ideogramm von Chromosom 6 (oben) und schematische Darstellung der Gene des MHC-Komplexes im Bereich 6p21.1- 6p21.3. Die kodierenden Regionen sind als kleine Rechtecke (grau und rot) dargestellt. Die Abbildung ist der Homepage des Zentrums für Humangenetik und Laboratoriumsmedizin [3] entnommen. **B** HLA-Moleküle bestehen aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten, die polygen durch MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II-Genen codiert werden, so dass jedes Individuum über mehrere Moleküle mit verschiedenen Peptidbindungsspezifitäten verfügt.

## 1 Einleitung

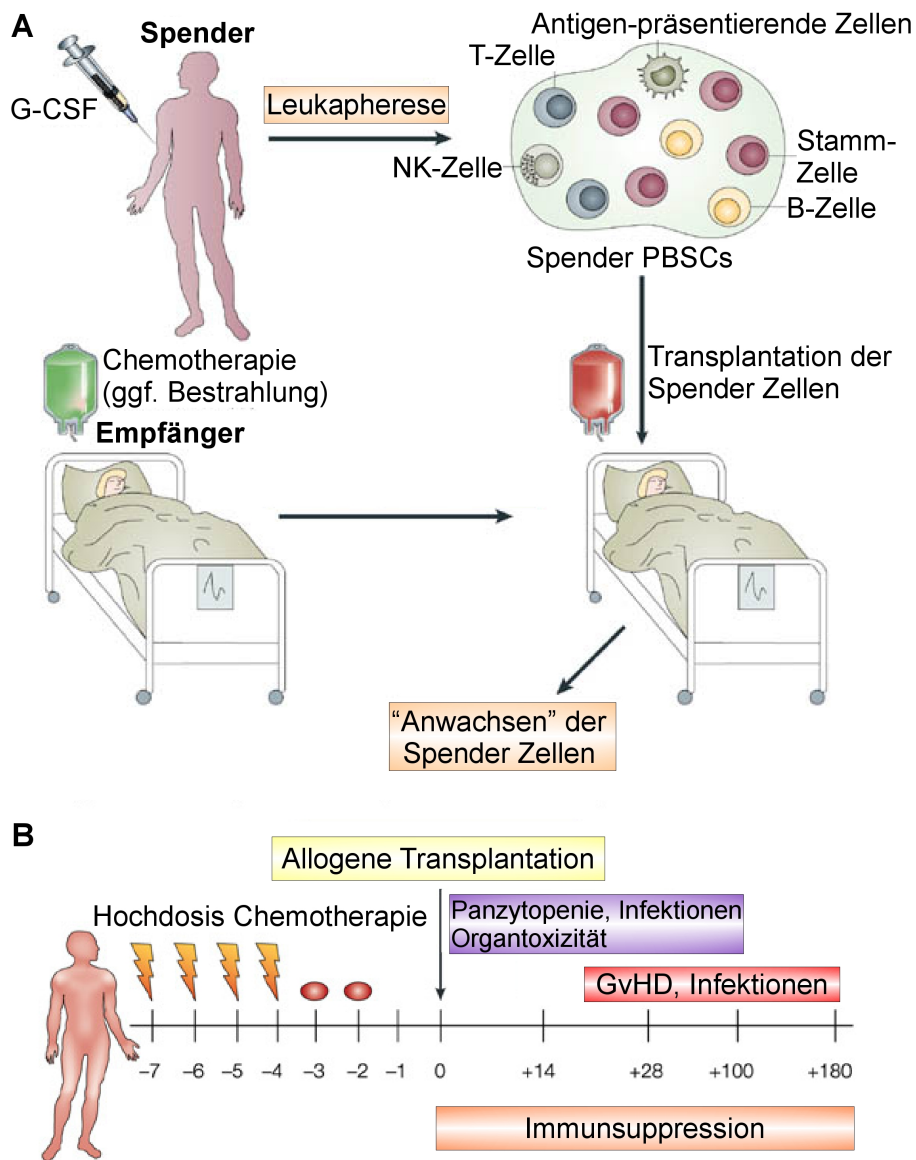
Anhand der HLA-Merkmale und/oder Verwandtschaft ergibt sich folgende Spenderhierarchie:

- 1. 10/10 HLA-genidenten Geschwister  
= MSD (= *matched sibling donor*)
- 2. 10/10 identer Familien -oder Fremdspender  
= MFD (= *matched family donor*)  
= MUD (= *matched unrelated donor*)
- 3. 9/10 identer Familien -oder Fremdspender  
= MFD, MUD
- 4. weniger als 9/10 identer Familien -oder Fremdspender  
= MMFD (= *mismatched family donor*)  
= MMUD (= *mismatched unrelated donor*)

Bei Unverträglichkeiten in HLA-Merkmalen gilt derzeit zusätzlich folgende Reihung: C-Mismatch **vor** A- oder B-Mismatch **vor** DQB1-Mismatch **vor** DRB1-Mismatch. Ein Spender mit einem Allel-Mismatch (der Unterschied liegt in der dritten und vierten Ziffer des HLA-Typs, z.B. B\*3501 und B\*3502) ist geeigneter als einer mit einem Antigen-Mismatch (der Unterschied liegt in der ersten und zweiten Ziffer des HLA-Typs, z.B. B\*3502 und B\*2705) (Protokoll ALL-SZT BFM 2003).

Wie bei der autologen SZT erfolgt auch bei der allogenen SZT eine in der Regel myeloablative Konditionierungsbehandlung, die hierbei zwei Ziele verfolgt: Eradikation der malignen Zellen **und** die Immunsuppression des Empfängers, um eine Abstoßungsreaktion gegen das Transplantat zu vermeiden (► Abb. 1.3). Die Eradikation des hämatopoetischen immunologischen Empfängergewebes (=Konditionierung) ist notwendig, um schwere immunologische Komplikationen zu vermeiden. Die hierzu verwendeten Methoden sind Chemotherapie, insbesondere Fludarabin, Thiotepa, Melphalan und OKT 3 je nach Erkrankung kombiniert mit Ganzkörperbestrahlung (TBI=*total body irradiation*). Die allogene SZT wird vor allem bei den verschiedenen Formen der Leukämie eingesetzt, wenn andere Behandlungsmethoden nicht zum Erfolg geführt haben, aber auch bei verschiedenen anderen Erkrankungen, wie z.B. soliden Tumoren, sehr schwere aplastische Anämien (VSAA) oder Schwere kombinierte Immundefekte (SCID). Oftmals ist eine allogene SZT die einzige Möglichkeit für eine vollständige Heilung des Patienten.

## 1 Einleitung



**Abbildung 1.3: Hämatopoetische SZT.** **A** Spender erhalten den Granulozyten Kolonie-stimulierenden Faktor (G-CSF). Dieser bewirkt die Proliferation von Vorläuferzellen (Stammzellen) im Knochenmark und die Abgabe aus dem Knochenmark in das periphere Blut, aus dem sie gesammelt werden können. Dieser Sammelvorgang heißt Leukapherese. Durch die Hochdosis-Chemotherapie (und ggf. Bestrahlung) kommt es beim Patienten zu einem kompletten Ausfall der körpereigenen Blutbildung und des körpereigenen Immunsystems. Mit der allogenen SZT werden ein fremdes Blutsystem und ein fremdes Immunsystem eingeführt. Sobald die Stammzellen des Spenders ihre Funktion im Körper aufnehmen, kommt es zu einer neuen Blutbildung. Die Abbildung ist aus der Publikation von Shlomchik (2007) *Nat Rev Immunol* entnommen und übersetzt. **B** Darstellung einer Zeitachse zum Ablauf einer allogenen SZT. Die Abbildung ist aus der Publikation von Bleakley & Ridell (2004) *Nat Rev Cancer* entnommen und übersetzt.

### Haploidente SZT

Die haploidente SZT ist eine Sonderform der allogenen SZT. Bei der haploidenten SZT stimmt nur die Hälfte der HLA-Merkmale überein. Man spricht streng genommen von einer Fehlanpassung (*Mismatch*) von 5 aus 10 passend. Wenn ein Elternteil der Spender ist, werden auch Mismatches von 6/10 bzw. 7/10 als haploidente SZT bezeichnet. Diese Transplantation stellt eine der schwierigsten Therapieformen im Rahmen der SZT dar, da sie mit einer hohen Nebenwirkungsrate verbunden ist. Die Risiken der haploidenten SZT sind das Transplantatversagen bzw. die Abstoßung, die erhöhte Inzidenz einer schweren »Transplantat gegen Spender Krankheit« (GvHD=*graft versus host disease*) sowie die durch lange Aplasiephase verbundenen infektiösen und toxischen Komplikationen, die mit entsprechend erhöhter therapieinduzierter Mortalität (TRM=*treatment related mortality*) einhergehen können. Zur Vermeidung einer schweren GvHD ist es notwendig, unverträgliche Zellen aus dem Transplantat zu entfernen (T-Lymphozyten).

Die haploidente SZT stellt eine neue Therapieoption dar, um schwer therapierbare Leukämien und Tumoren mit schlechter Prognose zu behandeln, wenn kein passender Fremd- oder Familienspender zur Verfügung steht oder wenn eine schnelle klinische Verschlechterung des Patienten einer schnellen SZT bedarf.

### 1.2.2 Stammzellquellen

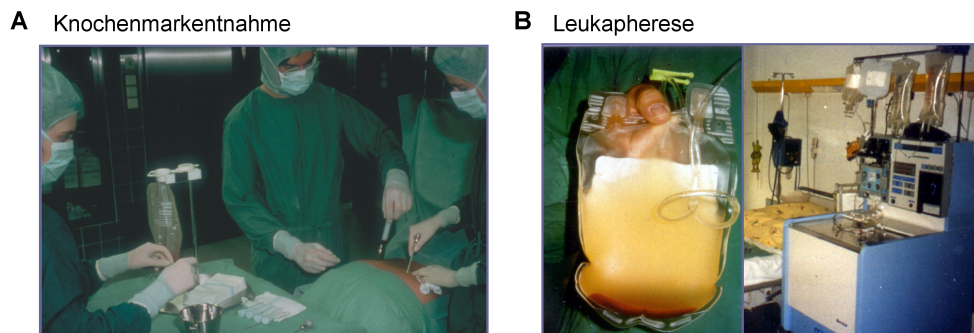
Stammzellen können durch Knochenmarkentnahme aus dem Beckenkamm oder durch periphere Stammzellsammlung aus dem Blut des Spenders gewonnen werden. Weiterhin kann man Stammzellen aus dem Nabelschnurblut gewinnen. Letztere Stammzellquelle spielt für den klinischen Einsatz einer SZT bei malignen Erkrankungen in Deutschland eine untergeordnete Rolle.

Bei der **Knochenmarkentnahme** wird ca. 1- 1,5 Liter Knochenmark-Blut-Gemisch durch Punktion aus dem Beckenkamm des erwachsenen Spenders entnommen (► Abb. 1.4), bei Kindern ist es abhängig vom Körpergewicht und ist dementsprechend weniger. Hierfür wird der Spender stationär aufgenommen. Die Entnahme erfolgt unter sterilen Bedingungen und dauert etwa eine Stunde.

In den letzten 10 Jahren hat die sogenannte **periphere Stammzellsammlung** als alter-

## 1 Einleitung

native Methode zur Herstellung von Stammzellen an Bedeutung gewonnen. Hierfür wird dem Spender 4- 5 Tage vor der Stammzellsammlung der Wachstumsfaktor (G-CSF) unter die Haut (subcutan) gespritzt (► Abb. 1.3). G-CSF bewirkt, dass die Stammzellproduktion im Knochenmark des Spenders angeregt wird und die Stammzellen in dessen Blut übertreten, so dass sie dort »gesammelt« werden können (=Leukapherese). Bei der Leukapherese (von griech. *Apherese*=Wegnahme, Trennen) findet mittels Zentrifugation eine Gewinnung mononukleärer Zellen (Lymphozyten und Monozyten) statt. Hierbei wird das Blut des Spenders in einem ständigen Kreislauf aus einer Armvene durch eine Apparatur geleitet und über die andere Armvene wieder zurückgeführt. In dem Zellseparator werden die Stammzellen aus dem Blut des Spenders in einem Beutel angereichert (► Abb. 1.4 B). Man unterscheidet normalvolumige Leukapheresen, wobei das 2 bis 3-fache Blutvolumen des Spenders prozessiert wird (8-12 l) und sogenannte »*large-volume*«-Pheresen, wobei das bis zu 6-fache Blutvolumen des Spenders prozessiert wird (max. 36 l, Pheresedauer bis zu 6h).



**Abbildung 1.4: Stammzellquellen für den klinischen Einsatz einer SZT.** A Knochenmarkentnahme, bei der einem freiwilligen Spender unter Vollnarkose 15 ml/kg Körpergewicht (=KG) Knochenmark-Blut-Gemisch aus dem Beckenkamm entnommen wird. Die Abbildung wurde freundlicherweise von PD Dr. Hans Martin (Innere Medizin, Frankfurt) zur Verfügung gestellt. B Leukapherese - Leukapheresat (links) und Zellseparator (rechts).

### 1.2.3 Zellaufarbeitung von Stammzellprodukten

Für die Zellaufarbeitung von Stammzellprodukten werden Leukapheresate (PBSC=*peripheral blood stem cells*) verwendet. Die Voraussetzung für die Aufreinigung von Stammzellen mittels Antikörpern (Ak) ist, dass die Stammzellantigene sowohl in ausreichender



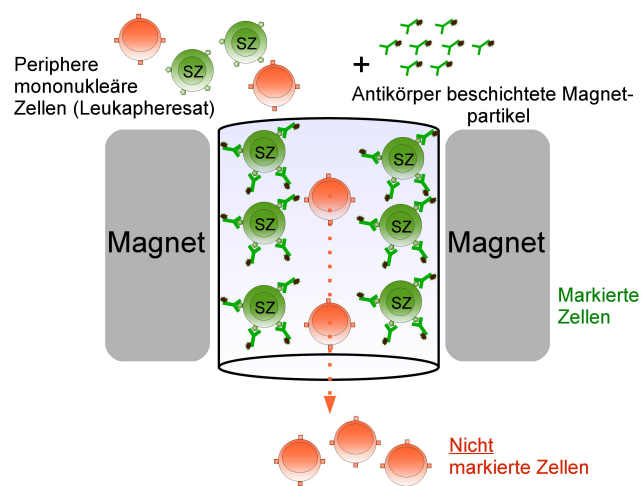
## 1 Einleitung

hoher Dichte als auch möglichst selektiv auf der Zellmembran von Stammzellen exprimiert werden, die für die Charakterisierung von Stammzellen verwendet werden. Als hochauflösender selektiver Marker hat sich hierbei das CD34-Antigen durchgesetzt (Sutherland & Keating, 1992).

In dieser Arbeit handelt es sich hauptsächlich um MMFD oder im besonderen um die haploidente SZT (von den Eltern). Bei dieser Transplantation ist es Grundvoraussetzung, die T-Zell-Menge im Stammzelltransplantat stark zu vermindern. Hierfür stehen zwei Methoden zur Verfügung:

### CD34-Selektion und CD3/CD19-Depletion

Eine bewährte Form der Anreicherung von hämatopoetischen Stammzellen erfolgt über die **Positiv-Selektion** von CD34<sup>+</sup> Zellen. Das Prinzip der magnetischen Zellisolierung ist stark vereinfacht in Abbildung 1.5 dargestellt.

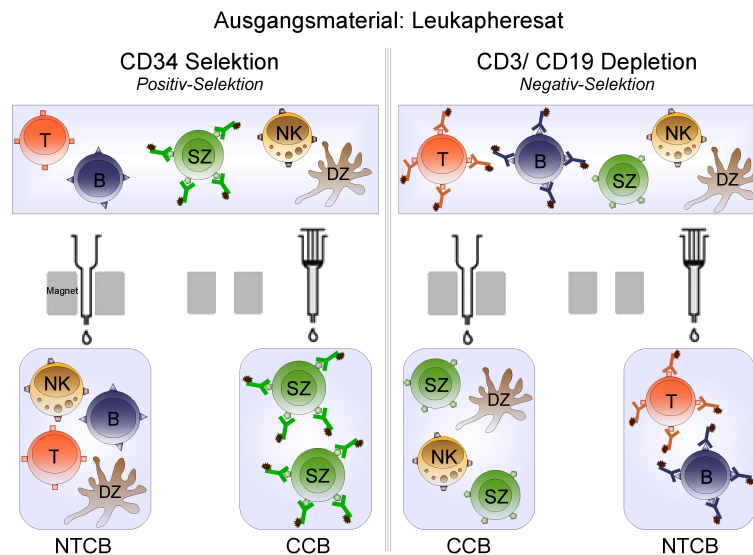


**Abbildung 1.5: Prinzip der magnetischen Zellisolierung.** Ak gegen das CD34-Antigen, die mit Magnetpartikeln gekoppelt sind, werden mit einem Leukapheresat vermischt. Die Ak binden spezifisch an das CD34-Antigen und die Stammzellen werden in einem Magnetfeld von den übrigen Blut- oder Knochenmarkzellen getrennt.

Das Prinzip beruht auf einer magnetischen Markierung mittels antikörperbeschichteter Magnetpartikel (magnetische Microbeads, die aus einer superparamagnetischen Eisen-

## 1 Einleitung

Dextranverbindung bestehen), welche anschließend über eine Säule, die in einem Magnetfeld eines Separators platziert ist, gewonnen werden. Wenn das Magnetfeld aktiviert ist, bleiben die Stammzellen auf der Säule und die unerwünschten Zellen werden nicht im magnetischen Feld festgehalten, da sie keinen Magnetpartikel tragen und werden unterhalb der Säule in einem *non target cell bag* (NTCB, unerwünschte Zellfraktion) aufgefangen. Nachdem alle Zellen einmal über die Säule gelaufen sind, wird das Magnetfeld entfernt. Nun werden auch die Stammzellen nicht mehr auf der Säule gehalten und man kann sie separat in einem zweiten Beutel auffangen, dem sogenannten *cell collection bag* (CCB, erwünschte Zellfraktion).



**Abbildung 1.6: Vereinfachte Darstellung der CD34-Selektion und CD3/CD19-Depletion.** Ausgangsmaterial ist bei beiden Aufreinigungsverfahren üblicherweise ein Leukapheresat. Nach der Inkubation mit antikörperbeschichteten Magnetpartikeln; im Fall der CD34-Selektion (Ak gegen CD34) und im Fall der CD3/CD19 (Ak gegen CD3 und CD19) werden die markierten Zellen durch ein Magnetfeld von den übrigen Blut- oder Knochenmarkzellen getrennt und getrennt voneinander aufgefangen. CCB=*cell collection bag* (erwünschte Zellfraktion=Transplantat), NTCB=*non target cell bag* (unerwünschte Zellfraktion=Abfallprodukt), T=T-Zelle, B=B-Zelle, SZ=Stammzelle, NK=NK-Zelle, DZ=dendritische Zelle.

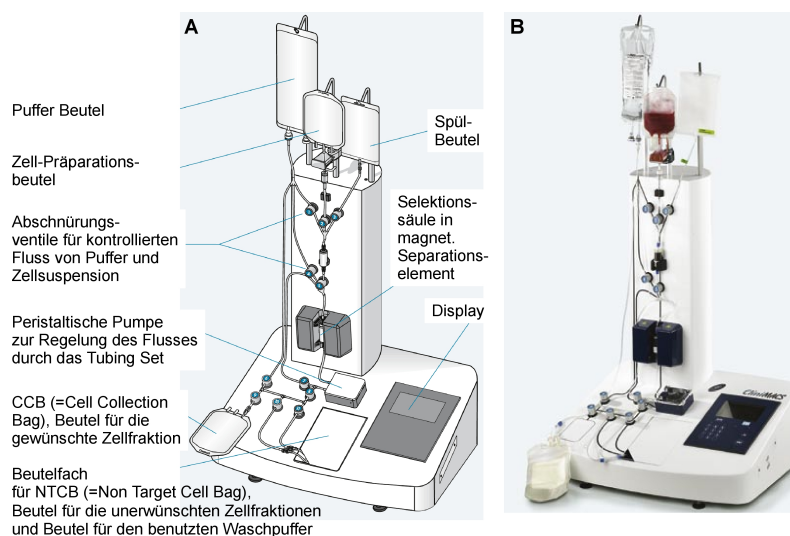
Bei der CD3/CD19-Depletion handelt es sich um eine **Negativ-Selektion**. Hierbei werden anstelle von anti-CD34 Ak, anti-CD3- und anti-CD19 Ak-beschichtete Magnetpartikel verwendet (Schumm et al. 2006). Es werden  $CD3^+$  T- und  $CD19^+$  B-Lymphozyten mar-

## 1 Einleitung

kiert und im magnetischen Feld auf der Säule gehalten. In diesem Fall gehören diese aber zu den unerwünschten Zellen und landen deshalb im NTCB (► Abb. 1.6). Die Strategie der Depletion besteht darin, die unerwünschten Zellen zu markieren und zu eliminieren, d.h. die nicht markierten Zellen stellen die Zielzellen dar.

Neben den Stammzellen, die sich im CD3/CD19-Depletions-CCB befinden, sind weiterhin NK-Zellen und Antigen-präsentierende Zellen (DZ, Monozyten) vorhanden. Durch das Zurückbleiben von NK-Zellen im Transplantat erhofft man sich ein verbessertes Engraftment, eine schnellere Immunregeneration sowie eine gesteigerte »Transplantat gegen Leukämie/ Tumor-Antwort« (GvL/GvT-Effekt) (Lang et al. 2005).

Bei der technischen Umsetzung der magnetischen Zellisolierung hat sich als Standardverfahren in Europa das CliniMACS System von Miltenyi Biotec durchgesetzt (► Abb. 1.7), mit dessen Hilfe die CD34-Selektion sowie die CD3/CD19-Depletion durchgeführt wird.

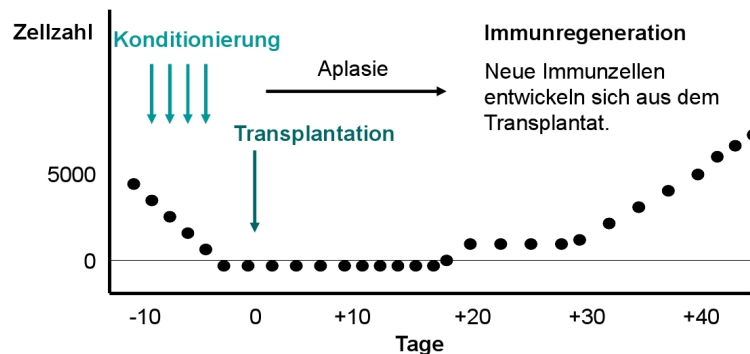


**Abbildung 1.7: Der Aufbau eines CliniMACS.** Die Abbildung stellt einen CliniMACS mit eingespanntem Beutel-/ Schlauchset zur magnetischen Isolierung von Zellen dar. Die einzelnen Elemente sind gekennzeichnet. Die Abbildung ist einem technischen Datenblatt der Firma Miltenyi Biotec GmbH entnommen.

Die CliniMACS CD34-Zell-Separation war das erste zugelassene Medizinprodukt für die Zell-Separation im klinischen Maßstab mit CE-Zulassung. Es wird im Reinraum unter GMP-Bedingungen eingesetzt. Das Schlauchsystem (Tubing Set) gewährleistet eine komplett sterile Handhabung.

### 1.3 Zelluläre Immunrekonstitution nach SZT

Nach SZT regeneriert sich ein neues Immunsystem aus den Stammzellen des Spenders. Eine vereinfachte Darstellung der Immunrekonstitution ist in Abbildung 1.8 gezeigt. Als



**Abbildung 1.8: Allgemeine Darstellung der Immunregeneration.** Durch die Konditionierung vor SZT kommt es zu einem Funktionsausfall des Knochenmarks (Zustand der Aplasie). In der Phase der Knochenmarkaplasie ist der Patient ausgesprochen gefährdet, da sich keine blutbildenden Zellen mehr im Knochenmark befinden. Diese werden mit der SZT von gesunden Spenderzellen wieder zugeführt und es regeneriert sich ein neues Immunsystem.

**Engraftment** bezeichnet man nach SZT den Zeitpunkt, an dem das Transplantat eine ausreichende Anzahl an Leukozyten, Neutrophilen und Thrombozyten zu bilden vermag, um eine bestimmte Menge an peripheren Blutzellen aufrechtzuerhalten, ohne dass Zellkonzentrate gegeben werden müssen. Es wird auch umgangssprachlich als »**Anwachsen des Transplantates**« bezeichnet. Von einem Engraftment spricht man, wenn die Leukozyten/ $\mu\text{l}$   $>1000$ , die Neutrophilen/ $\mu\text{l}$   $>500$  und die Thrombozyten/ $\mu\text{l}$   $>20.000$  liegen und die letzte Thrombozyten-Substitution mehr als drei Tage zurückliegt. In der Regel findet ein Engraftment nach 14 bis 28 Tagen statt.

Lymphohämatopoetische Toxizität der Vorbehandlung, die HLA-Kompatibilität (Übereinstimmung in den HLA-Merkmalen), das Alter des Patienten, die Anzahl der transplantierten Zellen (Stammzelldosis bei haploidenter SZT mind.  $7 \times 10^6$  Zellen/KG) und schließlich der T-Zell-Gehalt des Transplantates bzw. die Intensität der GvH-Prophylaxe beeinflussen die Kinetik der Immunrekonstitution. Die Immunrekonstitution hängt somit von der Fähigkeit des Transplantates ab, *de novo* lymphoide und myeloide Zellen zu generieren.

### **Monitoring der Erholung des zellulären Immunsystems**

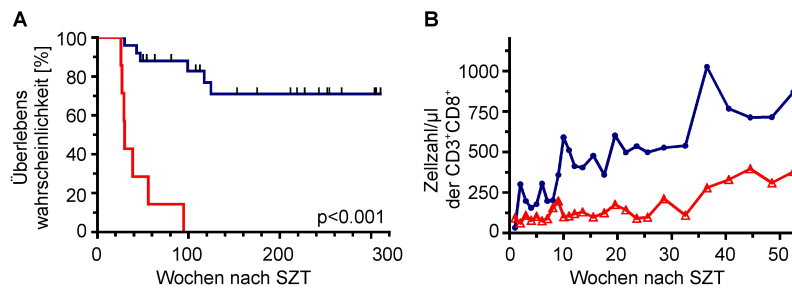
In der Zeit nach SZT werden die Patienten hinsichtlich ihres sogenannten zellulären Immunstatus (Zellpopulationen im peripheren Blut) engmaschig überwacht (=Monitoring). Mit Hilfe der fluoreszenzaktivierten Zellanalyse (Durchflusszytometrie) ist es möglich, verschiedenste lymphoide und myeloide Zellen im peripheren Blut genau zu charakterisieren. Sie ermöglicht die Phänotypisierung der Lymphozyten (T-, B- und NK-Zellen sowie deren Untergruppen: Naïve, Gedächtnis-Zellen), Antigen-präsentierende Zellen (Monozyten, DZ) und der Granulozyten (Neutrophile, Eosinophile).

Nach SZT rekonstituieren diese verschiedenen Zellpopulationen in unterschiedlicher Schnelligkeit. Innerhalb der ersten 100 Tage erscheinen hauptsächlich Zellen der angeborenen Immunabwehr (NK-Zellen, Monozyten, Makrophagen und Granulozyten). Im Gegensatz dazu rekonstituieren die T (vorallem die T<sub>Helfer</sub>)-Zellen und die B-Zellen stark verzögert und sie zeigen eine beeinträchtigte Funktion von einigen Monaten bis Jahren nach SZT. Diese erworbene Immundefizienz des Patienten nach SZT zeigt sich in erhöhter Anfälligkeit für schwere Infektionen bis weit über ein Jahr nach SZT und in einem erhöhtem Risiko für einen Rückfall der Erkrankung (=Rezidiv). Die Infektionsgefahr ist in der Phase der Knochenmarkaplasie sehr hoch und deshalb erfolgt die Betreuung und Behandlung der Patienten für diese Zeit auf einer besonderen Station in sogenannten »Laminar Air Flow« Einzelzimmern (mit Hilfe von Überdruck werden Partikel und Keime im Raum minimiert) um eine Kontamination mit Krankheitskeimen möglichst zu vermeiden.

### **Zusammenhang der Immunrekonstitution mit dem Überleben der Patienten**

Neben den in Kapitel 1.3 beschriebenen Einflussfaktoren in Bezug auf die Kinetik der Immunrekonstitution nach SZT gibt es Hinweise, dass die Regeneration bestimmter Zellpopulationen wie z.B. der zytotoxischen CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit hindeutet. Patienten mit einer zu langsamen Regeneration der CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen hatten ein höheres Risiko, an einem Rezidiv oder an einer lebensgefährlichen Infektion zu versterben, unabhängig davon, ob sie ein Knochenmark, ein CD34-selektiertes Stammzellpräparat oder ein unmanipuliertes PBSC erhielten (► Abb. 1.9).

## 1 Einleitung

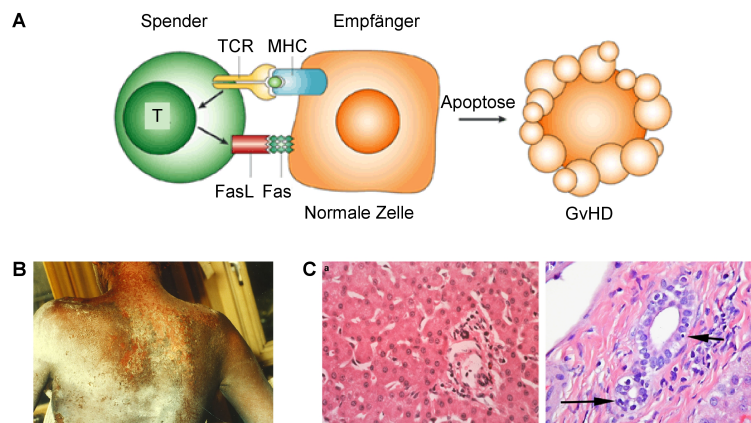


**Abbildung 1.9: Zusammenhang der  $CD3^+CD8^+$  T-Zellen mit dem Überleben der Patienten nach allogener SZT.** **A** Gezeigt ist der Zusammenhang einer schnellen Regeneration der  $CD3^+CD8^+$  zytotoxischen T-Zellen mit dem Überleben (Kaplan-Meier Kurve,  $n=32$ ). Die Patienten, die innerhalb der ersten 6 Monate den Normbereich für die  $CD3^+CD8^+$  T-Zellen erreichten und ihn für mindestens 6 Wochen nicht wieder unterschritten, sind als (—) dargestellt und die Patienten, die diese Bedingungen nicht erfüllten, sind als (—) dargestellt. Eine schnelle Regeneration der zytotoxischen T-Zellen ging mit einem signifikant erhöhten Überlebensvorteil einher. **B** Die Immunrekonstitution der zytotoxischen T-Zellen ist gezeigt für die Überlebenden in blau und für die Verstorbenen in rot (Koehl et al. (2007) *BMT*).

## 1.4 Immunologische Transplantatreaktionen nach allogener SZT

### 1.4.1 Graft versus Host Reaktionen

Die GvHD ist eine wichtige Komplikation nach allogener SZT: T-Zellen des Transplantats erkennen Histokompatibilitätsantigene des Patienten als »fremd« und reagieren gegen die Zellen und Gewebe, die diese exprimieren. Es handelt sich vorwiegend um  $CD3^+CD8^+$  T-Zellen, die MHC-Klasse-I Moleküle auf den normalen Zellen als fremd erkennen (Kalwak et al. 2003). Da die GvHD auch bei HLA-identen Spendern auftreten kann, vermutet man, dass ebenfalls minor Histokompatibilitätsantigene (mHA) bei der Entwicklung einer GvHD eine Rolle spielen (Falkenburg et al. 2003).



**Abbildung 1.10: GvHD.** **A** Alloreaktive T-Zellen aus dem Transplantat (=graft) reagieren gegen die gesunde normale Zelle des Patienten (=host) und führen sie in Apoptose. Die Abbildung ist der Publikation von Trapani & Smyth (2002) *Nat Rev Immunol* entnommen und übersetzt. **B** Bild einer akuten GvHD Grad IV der Haut. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Dr. Jan Gratama zur Verfügung gestellt. **C** Histologische Aufnahme von gesundem Lebergewebe (links) und im Vergleich dazu eine histologische Aufnahme von Lebergewebe, welches deutliche Anzeichen einer GvHD zeigt (rechts). Kurzer Pfeil deutet auf einen sogenannten *apoptotic body* und der längere Pfeil deutet auf zerstörtes Gewebe mit deutlicher Lymphozyteninfiltration hin. Die Abbildung ist der Publikation von Choi et al. (2005) *BMT* entnommen.

## 1 Einleitung

Die **akute GvHD** manifestiert sich innerhalb der ersten 100 (meist 30- 40) Tage nach SZT als Dermatitis, Enteritis und/oder Hepatitis. Die **chronische GvHD** ist ein autoimmunähnliches Syndrom und tritt ab dem 3. Monat (Tag 100) auf (Thomas et al. 1975). Sie kann ohne vorausgegangene akute GvHD, *de novo*, oder nach abgeklungener bzw. im direkten Anschluss an eine akute GvHD auftreten. Die chronische GvHD geht immer mit unvollständiger Erholung des Immunsystems und rezidivierenden Infektionen einher. Die akute GvHD wird nach Schweregraden einzelner Organe eingeteilt (► Tab. 1.1). Weiterhin gibt es eine Einteilung der akuten GvHD in ihrer Gesamtheit (Gesamtgraduierung).

**Tabelle 1.1: Einteilung der akuten GvHD nach Toxizität einzelner Organe.**

Organ	Kriterium	Grad I	Grad II	Grad III	Grad IV
Haut	Exanthem [% KOF]	<25 %	25-50 %	>50 %	Blasenbildung
Leber	Bilirubin [mg/dl]	2-3	3,1-6,0	6,1-15	>15
Darm	Diarrhö [ml/d]	500-1000	1000-1500	>1500	blutig/ Ileus

KOF=Körperoberfläche

Zur Prophylaxe wird meistens Cyclosporin A (CsA) ab dem Vortag der SZT gegeben, das durch Blockade von  $\text{NF}\kappa\text{B}$  die Sekretion von Interleukin (IL)-2 und Interferon (IFN)- $\gamma$  aus aktivierten  $\text{T}_{\text{Helfer}}$ -Zellen inhibiert. Diese Prophylaxe wird ergänzt durch die Gabe von Methothrexat (MTX) oder durch Gabe von Methyl-Mycophenolat (MMF), das durch die Synthesehemmung von Inositol T-Zellen blockiert. Bereits während der Konditionierungsphase wird Muromonab-CD3 (Orthoclone OKT<sup>®</sup> 3, Janssen-Cilag), ein muriner therapeutischer monoklonaler Antikörper (mAk), gegen den CD3-Rezeptor eingesetzt. Er bindet an die  $\epsilon$ -Protein-Untereinheit des CD3-Rezeptors, interagiert mit dieser und führt zur Blockierung der Funktion der T-Zellen und zur Induktion der Apoptose. Es kann zusätzlich Antithymozytenglobin (ATG), ein Gemisch polyklonaler Ak, ebenfalls gegen T-Lymphozyten eingesetzt werden. Diese bewirken eine Induktion der antikörperabhängigen, zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC=*antibody dependent cell cytotoxicity*) und es kommt auch hier zur Apoptose der T-Lymphozyten.

Therapeutisch werden hohe CsA-Spiegel angestrebt und bei einer akuten Haut GvHD hochdosierte Steroide eingesetzt (Prednisolon), die langsam über 3 bis 4 Wochen ausgeschlichen werden. Bei einer Leber- bzw. Darm-GvHD stehen dagegen ergänzende Immun-



## 1 Einleitung

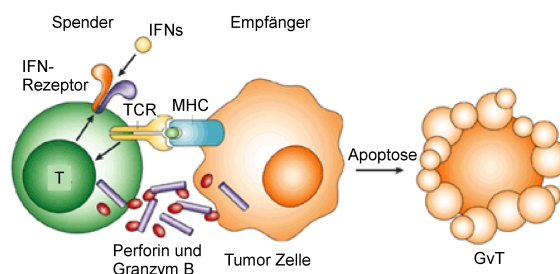
suppressiva wie z.B. Rapamycin, Etanercept oder Daclizumab zur Verfügung.

Die beste Prophylaxe zur Vermeidung der chronischen GvHD ist es, die akute Form zu verhindern bzw. erfolgreich zu behandeln. Therapeutisch setzt man die gleichen Medikamente wie bei der akuten Form ein.

### 1.4.2 Graft versus Leukämie-/ Tumor-Effekt

Im Gegensatz zu der GvHD ist der GvL/GvT-Effekt ein wesentliches Therapieprinzip der allogenen SZT und trägt in erheblichem Maß zum Heilungserfolg bei (Kolb et al. 2004). Ähnlich der GvHD wird die Eliminierung von Rest-Leukämie- oder Tumorzellen den alloreaktiven T-Zellen im Transplantat zugeschrieben, weil diese malignen Zellen das gleiche HLA-Klasse-I auf der Zelloberfläche tragen wie die normalen Zellen des Patienten. Dies ist schematisch in Abbildung 1.11 wiedergegeben.

Auch NK-Zellen scheinen in der Lage zu sein, einen GvL/GvT-Effekt auslösen zu können (Hallett & Murphy, 2004). Das Auftreten von spezifischer Wirksamkeit gegen maligne Zellen wird durch Unterschiede von HLA-C, B und A zwischen Spender und Empfänger erklärt. Die effektorische Immunantwort wird durch NK-Zell-Subpopulationen erklärt, die sogenannte Killerzell-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren (KIR=*killer immunoglobuline-like receptors*) auf der Zelloberfläche tragen. Durch nicht-passende HLA-Moleküle der malignen Zellen werden die NK-Zellen zum Abtöten dieser Zellen aktiviert. Dabei scheinen NK-Zellen keine GvHD auszulösen. Ob sie die GvHD auch verhindern können, ist noch nicht eindeutig gezeigt.



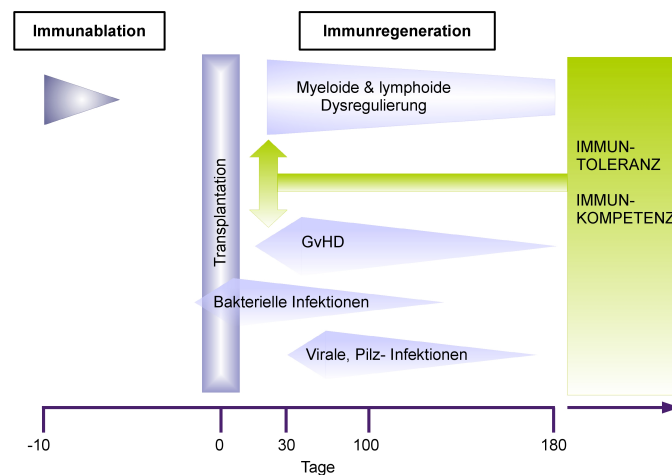
**Abbildung 1.11: GvL/GvT-Effekt.** Alloreaktive T-Zellen aus dem Transplantat (=graft) reagieren gegen die Rest-Leukämie bzw. Tumor Zellen des Patienten (=host) und führen diese in Apoptose. Die Abbildung ist der Publikation von Trapani & Smyth (2002) *Nat Rev Immunol* entnommen und übersetzt.

## 1 Einleitung

Einige klinische Studien vermuten einen direkten Zusammenhang zwischen dem GvL/GvT-Effekt und einer GvHD. Es ist daher nicht geklärt, ob der GvL-Effekt von der GvHD getrennt betrachtet werden kann. Klinische Daten zeigen, dass das Auftreten einer GvHD auch mit einer besseren Überlebenswahrscheinlichkeit einhergehen kann. Allogene Transplantationen scheinen vorteilhafter als Transplantationen von Zwillingen (syngene SZT) zu sein (Horowitz et al. 1990). Ebenso ist gezeigt worden, dass starke T-Zell-Depletionen bei HLA-identen Spender (MD=*matched donor*) mit einer erhöhten Rezidiv-Rate assoziiert war (Kalwak et al. 2003).

### 1.4.3 Komplikationen nach allogener SZT

Infektiöse Komplikationen stellen nach Rezidiven der Grunderkrankung die zweithäufigste Todesursache von Patienten nach allogener hämatopoetischer SZT dar. Dabei ist die Schwere der Immunsuppression bzw. der Grad der Immunrestitution für die Infektionsgefahr ausschlaggebend (Davison et al. 2000).



**Abbildung 1.12: Komplikationen nach SZT.** Immuntoleranz=spezifische Akzeptanz gegenüber dem Transplantat bei gleichzeitiger Reaktivität gegen nicht-verwandte Antigene (durch Anergie, Deletion oder Suppression).

## 1 Einleitung

Man unterteilt die Zeit nach SZT bezogen auf die infektiösen Komplikationen in 3 Phasen (Dykewicz 2001):

- **Phase I (< 30 Tage) Pre-Engraftment**

Neutropenie

Schrankenstörungen an der Haut und an den Schleimhäuten

⇒ Infektionen: Candida und Aspergillus, Herpes-simplex-Virus

- **Phase II (30- 100 Tage) Post-Engraftment**

Beeinträchtigung der zellulären Immunität

Gefahr der akuten GvHD

⇒ Infektionen: Zytomegalie-Virus (CMV), Pneumocystis carinii, Aspergillus

- **Phase III (100- 360 Tage) Late Phase**

weiterhin beeinträchtigte zelluläre und humorale Immunantwort

Gefahr der chronischen GvHD

⇒ Infektionen: CMV, Varizella-Zoster-Virus, Epstein-Barr-Virus

⇒ respiratorische Infektionen: Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae

Durch konsequent durchgeführte medikamentöse Infektprophylaxe und durch antivirale Frühtherapie ließ sich die Inzidenz opportunistischer Infektionen in den letzten Jahren deutlich senken (Trenschel et al. 2000). In Abbildung 1.12 ist dargestellt, welche Komplikationen nach SZT zu welchem Zeitpunkt auftreten können.

## 1.5 Natürliche Killer Zellen

Natürliche Killer Zellen werden morphologisch zu den großen granulären Lymphozyten (*large granular lymphocytes*) gezählt, machen 6- 15 % der peripheren Blutlymphozyten aus und werden zum angeborenen Immunsystem gezählt. NK-Zellen und T-Zellen entwickeln sich aus einem gemeinsamen lymphoiden Knochenmarkvorläufer (Lanier et al. 1992) und sind somit eng miteinander verwandt. Im Gegensatz zu den T-Zellen differenzieren NK-Zellen unabhängig vom Thymus. Sie stellen eine heterogene Lymphozytengruppe dar. NK-Zellen unterscheiden sich nicht nur im Phänotyp von T-Lymphozyten, sondern vor allem in ihrer Fähigkeit, ohne vorherige Sensibilisierung durch eine nicht-antigenabhängige Erkennung schnell und direkt gegen entartete Zellen bzw. pathogene Organismen vorgehen zu können (Robertson & Ritz, 1990). NK-Zellen wirken daher komplementär zu den T-Zellen, indem sie MHC-I<sup>negative</sup> Zellen lysieren. Durch die Überwachung der MHC-Klasse-I Expression bei anderen Zellen spielt die NK-Zelle eine große Rolle bei der Beseitigung von virusinfizierten und tumorinfizierten Zellen, da diese durch Transformation ihre MHC-Klasse-I Expression vermindert bzw. verloren haben (Trinchieri 1989, Lanier 2005).

Bei einer Erstinfektion erreicht die NK-Zell-Aktivität nach 1- 3 Tagen ihr Maximum, während die primäre spezifische T-Zellantwort erst nach 7- 9 Tagen erfolgt. NK-Zellen bilden im Gegensatz zu T-Zellen kein »immunologisches Gedächtnis«.

Die Steuerung der NK-Zell-Zytotoxizität sowie der Zytokinausschüttung wird durch eine Vielzahl von Rezeptoren beeinflusst, auf die im nächsten Kapitel näher eingegangen werden soll.

### 1.5.1 NK-Zell-Rezeptoren (aktivierende und inhibierende)

Humane NK-Zellen werden phänotypisch charakterisiert durch die Expression von CD56 und die Abwesenheit von CD3 (Robertson & Ritz, 1990). Im peripheren Blut unterscheidet man 2 verschiedene NK-Zell-Populationen, die immunregulatorischen CD56<sup>bright</sup> und die zytotoxischen CD56<sup>dim</sup>. Die Unterschiede dieser beiden Populationen sind in tabellarischer Form in Tabelle 1.2 zusammengefasst (Cooper et al. 2001).

Eine Reihe von Rezeptoren sind für die Ziel-Zell-Erkennung notwendig, wie z.B. KIRs,

## 1 Einleitung

CD94+NKG2A/C oder die Toll-like Rezeptoren (TLR) (► Abb. 1.13). Die TLRs sind ausschlaggebender Bestandteil einer ursprünglichen Immunabwehr, die krankheitsassoziierte molekulare Muster erkennen. Man spricht hier von sogenannten pathogenassoziierten molekularen Mustern (PAMPs=*pathogen associated molecular patterns*). Die verschiedenen TLRs reagieren selektiv auf bakterielle Komponenten wie z.B. Lipopolysaccharide und führen zu einer verstärkten Aktivität entsprechender Zytokine.

Mit Hilfe der **KIRs** erkennt die NK-Zelle krankhafte Zellen wie virusinfizierte oder Tumorzellen. Dies geschieht mit Hilfe von kurzen Peptiden, die jede Zelle ihrem Stoffwechsel entnimmt und an der Plasmamembran mit Hilfe der HLA-Moleküle präsentiert. An diese kann ein spezifischer KIR nun binden oder eben nicht und so zwischen kranken und gesunden Zellen unterscheiden. Auf den Wirkmechanismus der KIRs wird im Abschnitt 1.5.3 unter der »*Missing-self*«-Hypothese noch genauer eingegangen.

**Tabelle 1.2: NK-Zell-Subpopulationen.**

Immunregulatorische CD56 <sup>bright</sup>	Zytotoxische CD56 <sup>dim</sup>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\leq 10\%</math></li> <li>• CD16<sup>dim/negativ</sup></li> </ul> <p>⇒ Geringe ADCC</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• KIR<sup>gering bis negativ</sup></li> <li>• Enthalten wenig Perforin und Granzym B</li> </ul> <p>⇒ niedrige Natürliche Zytotoxizität</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Zytokinproduktion<sup>hoch</sup></li> <li>• CD62L<sup>bright</sup>, CCR7<sup>bright</sup></li> </ul> <p>⇒ Homing in lymphoide Organe vorhanden</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• CD25<sup>hoch</sup></li> </ul> <p>⇒ Sehr gute Proliferation unter IL-2</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\geq 90\%</math></li> <li>• CD16<sup>bright</sup></li> </ul> <p>⇒ Potente ADCC</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• KIR<sup>positiv</sup></li> <li>• Enthalten viel Perforin und Granzym B</li> </ul> <p>⇒ sehr hohe Natürliche Zytotoxizität</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Zytokinproduktion<sup>niedrig</sup></li> <li>• CD62L<sup>negativ</sup>, CCR7<sup>negativ</sup></li> </ul> <p>⇒ Homingfähigkeit nicht vorhanden</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• CD25<sup>intermediär</sup></li> </ul> <p>⇒ Moderate Proliferation unter IL-2</p>

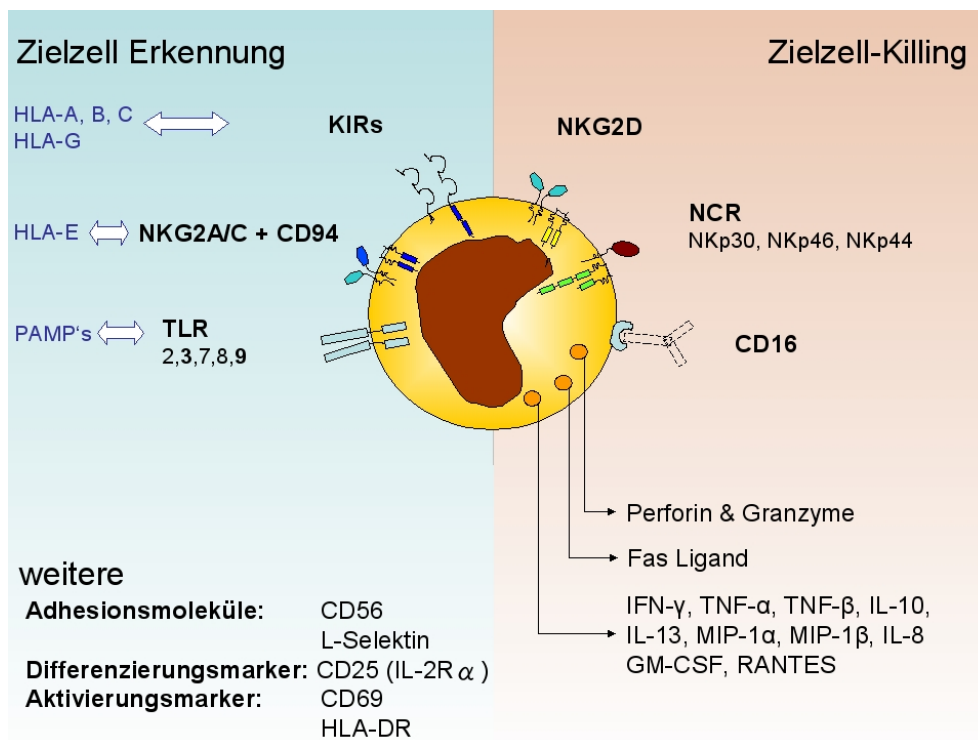
ADCC=*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, KIR=*killer cell immunoglobulin-like receptors*, bright=gleichbedeutend mit einer hohen Rezeptordichte, dim=gleichbedeutend mit einer niedrigen Rezeptordichte

Die drei wichtigsten Rezeptoren und die dazugehörigen apoptoseinduzierenden Proteine (Perforin, Granzyme und FasL), die für das Ziel-Zell-Killing der NK-Zelle verantwortlich sind, sind in Abbildung 1.13 dargestellt. Weiterhin sind die Zytokine gelistet, die durch immunregulatorische NK-Zellen produziert werden können (Biron et al. 1999). NK-Zellen sezernieren neben dem Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$ , der am Anfang proinflammatorischer Zytokin-Kaskaden steht (O'Shea et al. 2002), auch in großen Mengen IFN- $\gamma$ , das

## 1 Einleitung

zum einen die Differenzierung von  $T_{\text{Helfer}}$ -Zellen anregt, eine starke antimykobakterielle und antivirale Wirkung besitzt (Novelli & Casanova, 2004, Dorman et al. 2004) und die Expression von MHC steigert (Rock et al. 2002).

Durch aktivierende Rezeptoren werden positive Signale über Signalkaskaden weitergeleitet und führen zur Aktivierung spezifischer Gene, die die Funktion der NK-Zelle in Richtung einer zytotoxischen Antwort oder Sezernierung bestimmter Zytokine bzw. Chemokine lenkt (Robertson 2002). Durch diese Freisetzung und der Interaktion mit anderen Zellen des adaptiven Immunsystems (DZ) haben NK-Zellen einen indirekten Einfluss auf die adaptive Immunantwort (Bryceson et al. 2006).



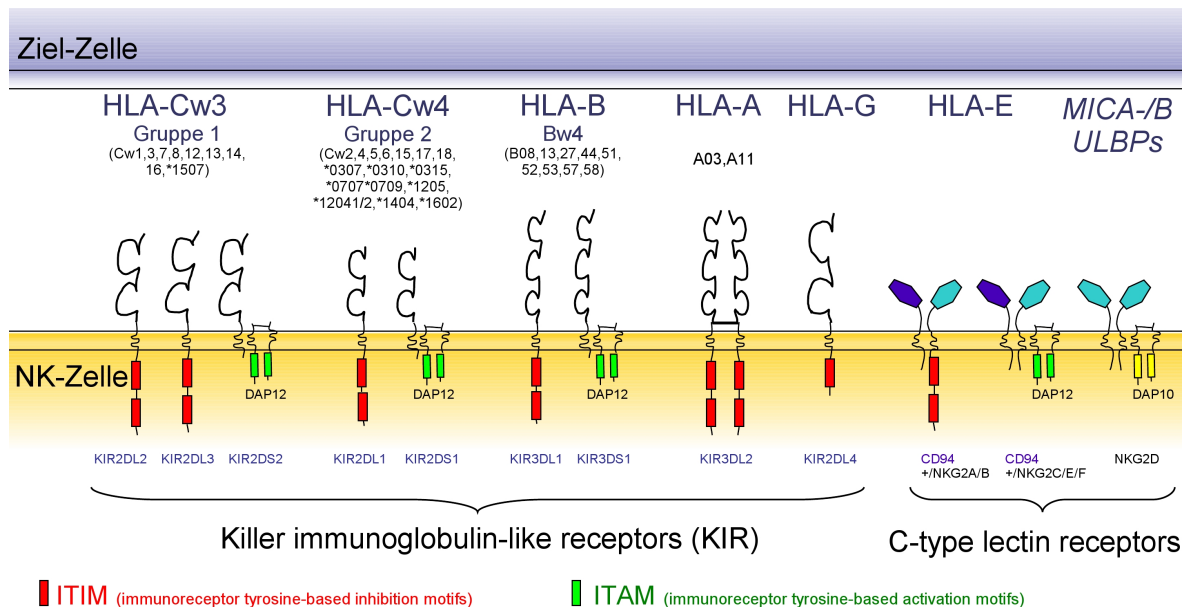
**Abbildung 1.13: NK-Zell-Rezeptoren und ihre Signalstoffe.** Dargestellt sind Rezeptoren, die für die Ziel-Zell-Erkennung (links) notwendig sind, wie die KIRs, NKG2A/C Rezeptoren und die TLRs. Auf der rechten Seite sind Rezeptoren dargestellt, die für das Zielzell-Killing bekannt sind, wie den NKG2D, die *natural cytotoxicity receptors* (NCRs) sowie der CD16, der für die zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) verantwortlich ist.

Die KIR-Gene bilden eine Genfamilie, die sich auf dem menschlichen Chromosom 19 (19q13.4) befindet und zu der Immunglobulin Superfamilie gehört. Die von diesen Genen kodierten Rezeptoren werden auf NK-Zellen sowie auf kleineren Untergruppen der

## 1 Einleitung

T-Zellen ( $\gamma\delta$ -,  $\alpha\beta$ -T-Zellen und NK-T-Zellen) exprimiert.

Man unterscheidet bei den KIRs zwischen aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren, die sich hauptsächlich in der transmembranen Region und dem zytoplasmatischen Schwanz unterscheiden. Der inhibitorische Signalweg findet mit Hilfe von sogenannten »*long tails*«, bestehend aus *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs* (ITIMs), statt (Lanier 1998). Dagegen werden aktivierende Signale durch sogenannte »*short tails*«, bestehend aus *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs* (ITAMs) weitergeleitet (Bottino et al. 2005, Lanier 2005). Sowohl den inhibierenden als auch den aktivierenden KIRs dienen MHC-Klasse-I-Moleküle als Liganden. Die genauen Rezeptor-Liganden Paare sind in Abbildung 1.14 zu finden.



**Abbildung 1.14: KIR.** Die KIRs sind durch einen extrazellulären Liganden-bindenden Abschnitt gekennzeichnet, welcher entweder aus zwei (KIR2D) oder drei Immunglobulin-ähnlichen Domänen (KIR3D) besteht. Obwohl es jeweils Paare von aktivierenden und inhibierenden KIRs mit identisch extrazellulärer Domäne gibt, entscheidet der zytoplasmatische Molekülabschnitt des Rezeptors über die Inhibition (»*long tail*=L«) oder die Aktivierung (»*short tail*=S«) der NK-Zelle. HLA-A,-B,-C,-E und -G (HLA-Klasse-I Moleküle) stellen Liganden für KIRs dar und sind mit Beispiel aufgeführt. Die gepaarten C-Typ-Lektin Rezeptoren bestehen aus einer invariablen Untereinheit CD94 und einem Heterodimer. CD94/NKG2A und -B wirken inhibitorisch, wohingegen CD94/NKG2C, -E und -F stimulatorisch fungieren. Zu den aktivierenden MHC-unabhängigen Rezeptoren zählt der NKG2D. Dieser erkennt die polymorphen »*MHC-class-I-chain related*« MIC-Peptide A und B sowie Proteine des humanen Zytomegalievirus (ULBPs).

## 1 Einleitung

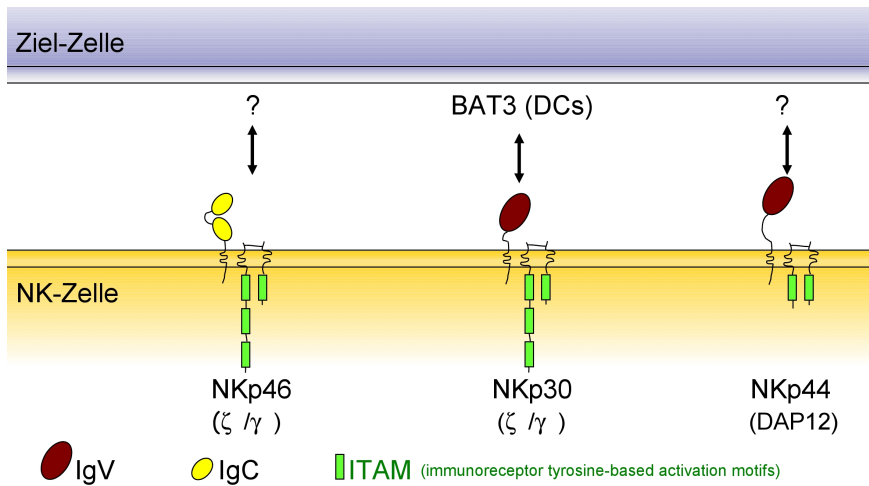
Beim Menschen sind derzeit 17 KIR-Gene bekannt. Jedoch variiert die Anzahl der vorhandenen KIR-Gene im Genom von unterschiedlichen Menschen. Auch die Expression der unterschiedlichen Kombinationen von KIR-Molekülen auf den Zellen variiert. KIR mit einer stimulierenden und einer hemmenden Funktion können gemeinsam und in stabiler Kombination durch NK-Zellen exprimiert werden, so dass ein breites Repertoire unterschiedlicher KIRs in der NK-Zell-Population eines Individuums existiert. KIR Gene werden stochastisch unabhängig auf NK-Zellen exprimiert. Die Frequenz der Expression ist nicht von dem MHC-Klasse-I Molekül beeinflusst. Die Diversität der NK-Zellen ergibt sich aus dieser individuellen Rezeptorexpression, die als Plastizität bezeichnet wird.

Obwohl der **NKG2D** zu den C-Lektin-ähnlichen Typ-II-Transmembranproteinen gezählt wird (► Abb. 1.14), nimmt er doch eine eigenständige Stellung ein. Der NKG2D wirkt immer aktivierend (Bauer et al. 1999, Wu et al. 1999) direkt auf die Effektorfunktion (Zellyse) wie auch auf die Zytokinproduktion (z.B. IFN- $\gamma$ ). Die humanen Liganden für NKG2D werden in der Regel nicht auf der Oberfläche von ausdifferenzierten Zellen exprimiert, sondern nur während der Differenzierung und nach zellulärem Stress, zu dem virale Infektionen oder maligne Transformationen gehören (Cerwenka & Lanier, 2003 und Groh et al. 2001). NKG2D Liganden sind häufig auf Tumorzellen exprimiert. Infizierte Zellen bzw. Zellen unter Stressbedingungen exprimieren die ULBP-Moleküle 1-4 sowie die MIC-Moleküle MICA und MICB verstärkt auf der Zelloberfläche. NK-Zellen sind in der Lage die Dichte der genannten Liganden durch NKG2D zu erkennen und werden aktiviert (Bauer et al. 1999). Die Moleküle MICA/B können mittels Immunhistochemie *in situ* und per Flowzytometrie *in vitro* auf verschiedenen Tumoren gefunden werden und es zeigt sich, dass die induzierte Expression dieser Liganden die Eliminierung experimenteller Tumoren begünstigt (Menier et al. 2002).

Ebenfalls MHC-unabhängig agieren neben dem NKG2D die Immunglobulin-ähnlichen **Natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren**, kurz NCR (= *natural cytotoxicity receptors*) genannt. Sie werden ausschließlich von NK-Zellen exprimiert. Zu Ihnen gehören der NKp30, NKp44 und NKp46. Während NKp30 und NKp46 sowohl auf aktivierten und auf ruhenden NK-Zellen exprimiert werden, ist NKp44 nur auf aktivierten NK-Zellen beschrieben (Bottino et al. 2004).



## 1 Einleitung



**Abbildung 1.15: NCR.** Die Oberflächenstrukturen der NCRs sind aus Immunglobulinen (IgV und IgC) aufgebaut. Diese sind mit Signalmolekülen assoziiert (DAP12,  $\zeta$  und  $\gamma$ ). Kürzlich wurde das HLA-B-assoziierte Transkript 3 (BAT3) als Ligand für NKp30 identifiziert.

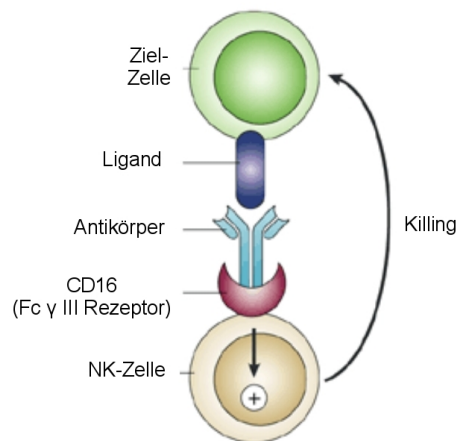
Durch die Blockierung der NCRs mit mAk fand man heraus, dass die NK-Zell-Zytotoxizität gegenüber verschiedenster Tumorzellen blockiert werden kann (Pessino et al. 1998, Cantoni et al. 1999). Diesem Phänomen verdanken sie ihren Namen. Glioblastom- und Neuroblastom-Zellen werden effizient von NCR<sup>bright</sup> (=gleichbedeutend mit einer hohen Rezeptordichte) NK-Zellen abgetötet (Sivori et al. 2000). Der strukturelle Aufbau dieser Rezeptoren mit seinen noch hauptsächlich unbekanntem Liganden ist in Abbildung 1.15 dargestellt. BAT3 wurde kürzlich als Ligand für NKp30 beschrieben und stimuliert durch seine Bindung an den Rezeptor NKp30 die Zytotoxizität und Zytokinfreisetzung bei NK-Zellen (Simhadri et al. 2008).

### 1.5.2 Effektormechanismen

#### ADCC via CD16

NK-Zellen können neben Makrophagen und Neutrophilen über das CD16 Antigen (Fc $\gamma$ III Rezeptor) Tumorzellen, die spezifisch komplexiertes IgG an ihrer Oberfläche tragen (Perussia 1998), durch den Mechanismus der antikörperabhängigen, zellvermittelten Zytotoxizität lysieren (► Abb. 1.16).

## 1 Einleitung



**Abbildung 1.16: ADCC.** Vereinfachte Darstellung der Antikörper-abhängigen, zellvermittelten Zytotoxizität von NK-Zellen. Die Abbildung ist der Publikation von Yokoyama & Plougastel (2003) *Nat Rev Immunol* entnommen und übersetzt.

### Apoptose-induzierende Signalwege

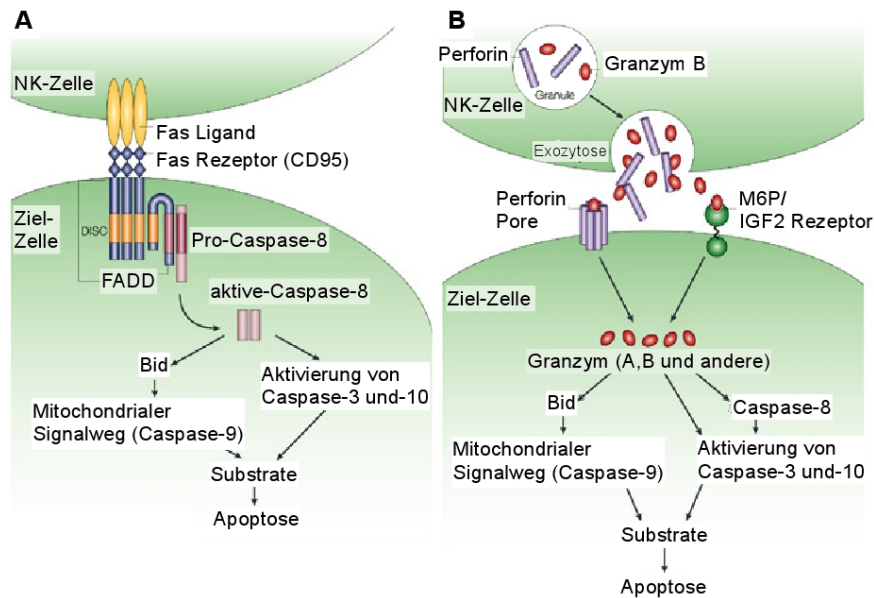
**Fas/FasL-Aktivierung** Ein Effektormechanismus, über den NK-Zellen, ähnlich den T-Zellen ihre zytotoxische Effektorfunktion umsetzen, ist das Oberflächenmolekül FasL (=CD95L). FasL induziert als Mitglied der TNF-Zytokin-Familie die Apoptose, in dem es an seinen CD95 (=FasR) Oberflächenrezeptor bindet. Er kann auf NK- und aktivierten T-Zellen als membrangebundene Form (Zamai et al. 1998) oder als lösliche Form (sFasL=*soluble Fas Ligand*) vorkommen. Die Bindung von FasL an Fas führt zur Oligomerisierung des Rezeptors, damit zur Aktivierung einer Anzahl von nachgeschalteten Signalmolekülen (Kaspasen) und letztlich zur Weiterleitung von apoptotischen Signalen (► Abb. 1.17 A).

**Perforin/Granzyme** Ein weiterer Effektormechanismus stellt der Perforin/ Granzym Weg dar. Perforin und Granzyme sind in Vesikeln zytotoxischer Lymphozyten (NK- und T-Zellen) gespeichert und werden durch Exozytose des zytoplasmatischen Granulainhaltes in den synapsenähnlichen Spalt zwischen NK-Zelle und Zielzelle abgegeben (Trapani & Smyth, 2002 und Bossi & Griffiths, 2005).

Unterstützt von dem Enzym Perforin, das die Zellwand durchlöchert, können die Granzyme in die Zelle eindringen und induzieren den programmierten Zelltod (Apoptose) der Zielzelle (Krähenbühl & Tschopp, 1991 und Kägi et al. 1994). Es gibt ebenfalls einen

## 1 Einleitung

Perforin-unabhängigen Prozess, in dem Granzym B durch eine Calcium-unabhängige Bindung an den Mannose-6-Phosphat Rezeptor an der Zelloberfläche der Zielzelle binden kann und dadurch in der Lage ist, Apoptose zu induzieren (► Abb. 1.17 B).



**Abbildung 1.17: Apoptose-induzierende Signalwege.** **A** Nicht-sekretorischer Mechanismus der Zytolyse über die Fas/FasL- Aktivierung und **B** der sekretorische Mechanismus der Zytolyse über Perforin/Granzym. FADD=*Fas-associated death domain*, Bid=*BCL2 interacting domain*, M6P/IGF2 Rezeptor=*Mannose-6-Phosphat/Insulin-like growth factor II receptor*, DISC=*Death-inducing signaling complex*. Die Abbildung ist der Publikation von van den Brink & Burakoff (2002) *Nat Rev Immunol* entnommen und übersetzt.

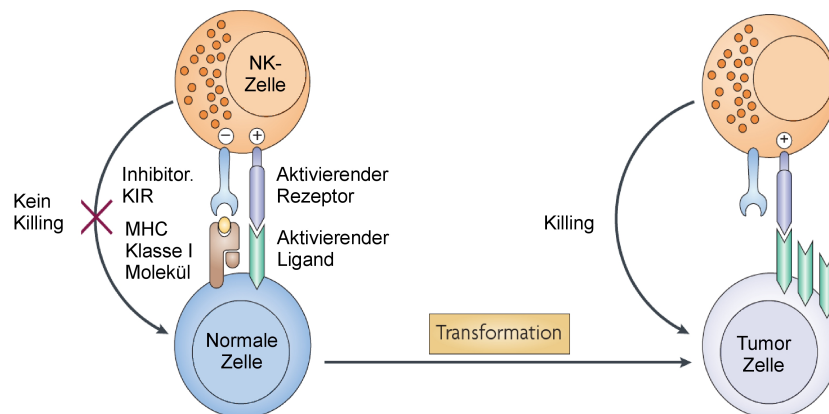
### 1.5.3 Wirkhypothesen

#### »Missing-self«-Hypothese

Die *Missing-self*-Hypothese wurde in der Mitte der 80er Jahre durch Klas Kärre aufgestellt und stellt eine grundlegende Hypothese über die zytotoxische Wirkweise von NK-Zellen dar. Es wurde beobachtet, dass syngenen (genetisch identisch) Tumoren, die kein MHC auf der Oberfläche exprimierten, von NK-Zellen lysiert wurden (Kärre et al. 1986). Diese Beobachtung führte zu der Identifizierung von inhibitorischen Rezeptoren (KIRs, CD94/NKG2A), die auf NK-Zellen exprimiert wurden. Diese inhibitorischen Rezeptoren erkennen Gruppen der HLA-Klasse-I Moleküle. Wenn eine körpereigene NK-Zelle auf eine normale gesunde Zelle trifft und diese sich über KIR-HLA Rezeptoren erkennen, ist

## 1 Einleitung

die NK-Zelle gehemmt, diese zu lysieren (Selbst-Toleranz). Wenn die NK-Zelle aber auf eine Tumorzelle trifft, die kein passendes MHC Klasse-I Molekül auf ihrer Oberfläche exprimiert, ist dies das Signal der NK-Zelle, diese Zelle zu lysieren. Die »*missing self recognition*«-Hypothese ist in Abbildung 1.18 dargestellt.



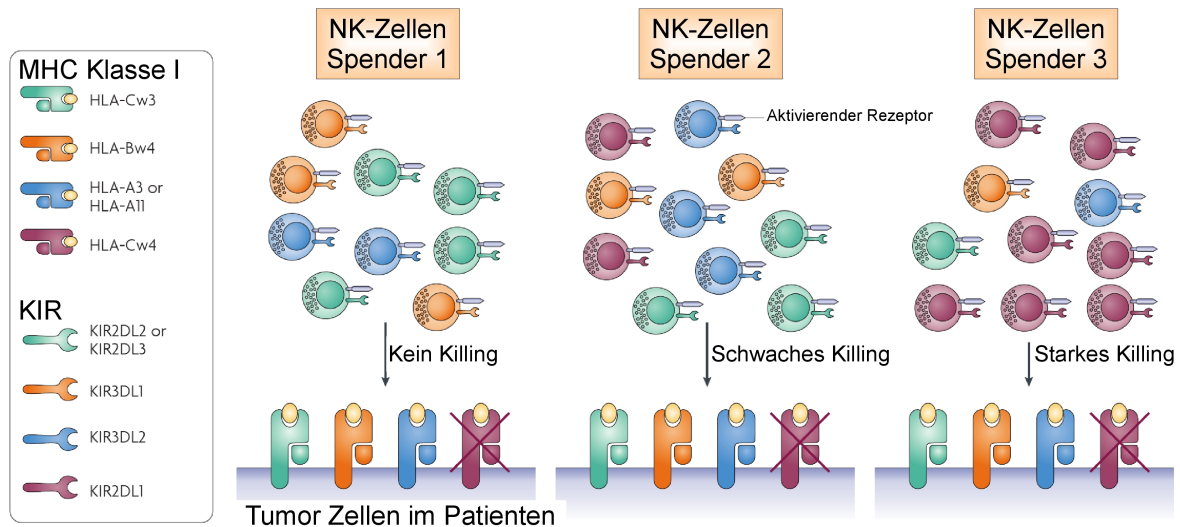
**Abbildung 1.18: Hypothese nach Kärre *et al.*** Die Abbildung ist dem Review von Ljunggren & Malmberg (2007) *Nat Rev Immunol* entnommen und übersetzt.

Das Fehlen von MHC-Klasse-I war aber nicht das einzige Merkmal, welches NK-Zellen zum Killen befähigte. Bei virusinfizierten Zellen fand man stabile MHC Expression auf den Zellen und trotzdem wurden sie von NK-Zellen lysiert. Dies deutete auf die Anwesenheit von weiteren funktionalen aktivierenden Rezeptoren hin (Leiden *et al.* 1989 und Peña *et al.* 1990). Farag *et al.* 2002 beschrieb die Regulation der NK-Zell-Zytotoxizität durch aktivierende und inhibierende Rezeptoren als ein Balancieren von Signalen. Trägt die Zielzelle zwar MHC auf der Zelloberfläche, dazu aber in ausreichender Menge aktivierende Signalproteine, überwiegt in diesem Falle die Aktivierung der NK-Zelle und führt zum Einleiten der Effektormechanismen. Wohingegen eine hohe Dichte von MHC mit geringer Anzahl von aktivierenden Signalproteinen auf der Zielzelloberfläche in der Inhibition der NK-Zelle endet und dies eine Möglichkeit des Entkommens der Tumorzelle darstellt.

Um den zugrunde liegenden Mechanismus der »KIR-Liganden Mismatch«-Hypothese zu nutzen, wurde klinisch versucht, dieses Wissen bei der Auswahl der »richtigen« Spender bei der allogenen SZT bzw. Immuntherapie mit NK-Zellen anzuwenden. Deswegen erhofft

## 1 Einleitung

man sich weitaus mehr Erfolg bei der allogenen und im speziellen der haploidenten SZT, da die Chance steigt, ein bis mehrere KIR-Liganden Mismatches vorzufinden.



**Abbildung 1.19: Größe der alloreaktiven NK-Zellen nach Ljunggren *et al.*** Auf der Basis von genotypischen Untersuchungen der KIRs im Zusammenspiel mit Mehrfarb-Flowzytometrie wurde die Existenz sowie die Populationsgröße der alloreaktiven NK-Zellen bestimmt. Spender 1 zeigt überhaupt keinen KIR-Liganden Mismatch, wohingegen Spender 2 und 3 einen KIR2DL1-HLA-Cw4 Mismatch (■) aufweisen. Der Anteil der alloreaktiven NK-Zellen von Spender 3 ist am größten und hat somit das größte zytotoxische Potential. Die Abbildung ist dem Review von Ljunggren & Malmberg (2007) *Nat Rev Immunol* entnommen und übersetzt.

Folgendes ist bei dieser Suche zu beachten: NK-Zellen stellen eine heterogene Zellpopulation dar und bestehen aus verschiedenen Klonen mit unterschiedlichem KIR-Repertoire und unterschiedlicher Populationsgröße. Zur Erläuterung siehe Abbildung 1.19. Spender 2 besitzt einen Anteil von einem KIR2DL1 NK-Zell-Klon (■) von nur 20 %, wohingegen Spender 3 einen KIR2DL1 NK-Zell-Klon mit einem Anteil von 70 % innehat. In diesem Beispiel gibt es einen KIR-Liganden Mismatch, der dem Fehlen von HLA-Cw4 auf der Empfängerseite zugrunde liegt. Aufgrund dieser Verteilung hat Spender 2 nur 20 % zytotoxisch aktive NK-Zellen, wohingegen Spender 3 einen alloreaktiven NK-Zell-Anteil von 70 % hat und somit ein starkes Killing vorweisen kann.

»Self tolerance«-Hypothesen

Damit bei der »*self tolerance*« (=Selbsttoleranz) der NK-Zellen die Missing-self-Hypothese Bestand hat, muss jede NK-Zelle mindestens 1 inhibitorischen KIR auf der Oberfläche tragen, »*at least one*« Hypothese (Moretta et al. 2006). HLA- und KIR-Gene werden wie unter Kapitel 1.2 und 1.5.1 beschrieben auf unterschiedlichen Chromosomen codiert (6p21.3 und 19q13.4) und unabhängig voneinander weitervererbt (Yokoyama & Plougas-tel, 2003). Die Frage kam auf, wie die NK-Zelle ihre Selbsttoleranz dabei sicherstellt. Daraufhin fand man in Mäusen NK-Zellen, die keine inhibitorischen KIRs gegen die eigenen MHC-spezifischen Rezeptoren besaßen (Fernandez et al. 2005, Kim et al. 2005). Somit war die Hypothese, dass »mindestens ein« inhibitorischer Rezeptor pro NK-Zelle die Selbsttoleranz garantiert, widerlegt. Es existieren nun zwei Modelle, die versuchen die vorhandene Selbsttoleranz zu erklären (► Tab. 1.3).

**Tabelle 1.3: Modelle zur Erklärung der Selbsttoleranz.**

»(Non-)licensing«-Modell Kim und Yokoyama <i>et al.</i> (2005) <i>Nature</i>	»Hyporesponsiveness«-Modell Raulet (2006) <i>Semin Immunol</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nur die NK-Zellen, die zu dem KIR auch das <i>self</i>-MHC besitzen, haben die ⇒ »<i>licence to kill</i>«</li> <li>⇒ Lizenz zum Töten</li> <li>• Funktionale Kompetenz durch KIR und den entsprechenden MHC</li> <li>• KIR<sup>negativ</sup> NK-Zellen sind nicht reaktiv</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kontinuierliche Stimulierung durch normale Zellen über die aktivierenden Rezeptoren</li> <li>⇒ Status der »<i>anergy</i>«</li> <li>⇒ Nichtreagieren auf ein Antigen bei herabgesetzter Immunlage</li> <li>• »<i>hyporesponsiveness</i>« kann durch Voraktivierung mit Zytokinen überwunden werden</li> </ul>

Die NK-Zellen, die keinen self-MHC-spezifischen inhibitorischen Rezeptor auf der Oberfläche tragen, verhalten sich im »humanen«-System ebenso selbsttolerant (Hasenkamp et al. 2008). Unlizenzierte NK-Zellen, die keinen inhibitorischen KIR gegen self-HLA-Moleküle aufweisen, zeigen auch keine funktionale Kompetenz gemessen an der zytotoxischen Aktivität und an der intrazellulären IFN- $\gamma$  Produktion (Yu et al. 2007).

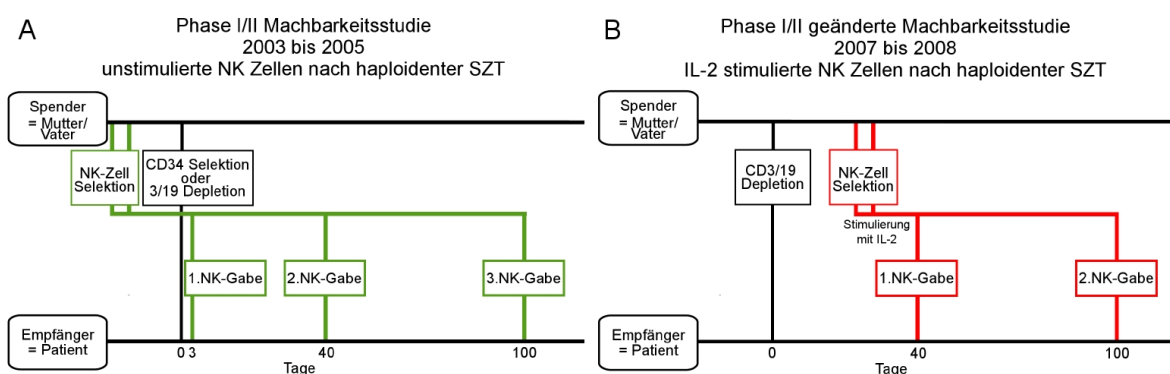
## 1.6 NK-Zelltherapien nach haploidenter SZT

### 1.6.1 Potentieller therapeutischer Nutzen von NK-Zellen

Da NK-Zellen gezeigt haben, dass sie in der Lage sind, ohne vorheriges Priming, Tumor- und Leukämiezellen abzutöten, versucht man seit wenigen Jahren, NK-Zellen durch eine CD3/CD19-Depletion im haploidenten Stammzelltransplantat zu erhalten oder als additive NK-Zell-Immuntherapie zu nutzen. Um eine NK-Zelltherapie nach haploidenter SZT durchführen zu können, musste sichergestellt werden, dass ausreichend NK-Zellen in hoher Reinheit (mit geringem T-Zell-Anteil) im klinischen Maßstab herstellbar waren. In Frankfurt am Main wurde in Zusammenarbeit mit dem Kantonsspital in Basel ein gemeinsames Studienprotokoll erarbeitet.

### 1.6.2 Klinische Studienprotokolle mit allogenen NK-Zellen

Patienten, die haploident mit einem T-Zell-depletierten Stammzelltransplantat behandelt werden, haben ein hohes Risiko einer Transplantatabstoßung oder eines Rückfalls. Da NK-Zellen das Engraftment und den GvL/GvT-Effekt fördern können, wurde eine erste klinische Phase I/II Studie initiiert, bei der hochaufgereinigte, unstimulierte NK-Zellen zu drei Zeitpunkten verabreicht werden sollten (► Abb. 1.20 A).



**Abbildung 1.20: NK-Zell-Studienprotokolle.** Studienprotokoll in **A** für unstimulierte NK-Zellen (—) und in **B** für IL-2 stimulierte NK-Zellen (—) nach haploidenter SZT.

In der ersten Phase stand die Machbarkeit der NK-Zellaufreinigung im klinischen Maßstab unter *good manufacturing practise* (GMP) Bedingungen im Vordergrund. Weiterhin sollte

## 1 Einleitung

beobachtet werden, wie die unstimulierten NK-Zellen bei Patienten nach allogener SZT toleriert würden (Toxizität, Inzidenz und Schwere einer auftretenden GvHD, Einfluss auf das Engraftment). Ziel war es,  $10 \times 10^6$  NK-Zellen pro kg Körpergewicht (KG) mit weniger als  $1 \times 10^5$  T-Zellen an Tag (+3), +40 und +100 nach SZT zu verabreichen. Da bei diesem Studienprotokoll NK-Zellen zwischenzeitlich kryokonserviert wurden, sollte ferner die Vitalität (Lebensfähigkeit) und die Zytotoxizität der NK-Zellen nach dem Auftauprozess untersucht werden. Eingeschlossen in die Studie wurden Patienten mit malignen Erkrankungen, die eine allogene SZT benötigten, aber keinen HLA-identen Stammzellspender zur Verfügung hatten und daher haploident transplantiert wurden. Ausschlusskriterium war Transplantatversagen und Patienten mit bereits vorliegender akuter oder chronischer GvHD. Stoppkriterien der Studie waren das Auftreten einer schweren GvHD (ab Grad III) oder andere auftretende Toxizitäten bei mehr als drei Patienten, die in direktem Zusammenhang mit der NK-Zell-Applikation standen. Die Studiendauer war mit bis 180 Tage nach SZT angesetzt. In die erste Phase der Studie wurden auf Frankfurter Seite 7 Patienten ( $4 \times$  ALL,  $1 \times$  AML,  $1 \times$  Morbus Hodgkin und  $1 \times$  Rhabdomyosarkom) aufgenommen.

Nachdem die Herstellung der NK-Zellen gezeigt werden konnte, sollte in der zweiten Phase der Studie die Machbarkeit der Expansion und Aktivierung von NK-Zellen mit IL-2 unter GMP-Bedingungen gezeigt werden. In diesem Teil der Studie sollten nur Patienten mit Neuroblastom (NB) IV aufgenommen werden.

Das Fehlen von NK-Zellen führte im Mausmodell zu einer gesteigerten Tumorgenese (Smyth et al. 2001). Aufgrund dessen wurden experimentelle Untersuchungen mit NK-Zellen durchgeführt, um *in vitro* die Zytolyse von bestimmten Tumorzellen zu bestätigen (Becker et al. 1978). Speziell beim NB wurde ein zytotoxischer NK-Zell-Effekt belegt (Sivori et al. 2000, Castriconi et al. 2004). Durch die Expression von NK-Zell-aktivierenden Liganden wie MICA/B (Groh et al. 1999) und durch herunterreguliertes MHC-Klasse-I Expression auf den Neuroblastomzellen stellt eine NK-Zell-Immuntherapie bei dieser Erkrankung einen vielversprechenden Ansatz dar (Leiden et al. 1989, Prigione et al. 2004). Es wurde festgelegt, die Patienten nach der myeloablativen Konditionierung mit Fludarabin, Thiotepa, Melphalan und OKT-3 mit einem CD3/CD19-depletierten Stammzellpräparat zu transplantieren, um einen möglichen Gewinn Antigen-präsentierender Zellen



## 1 Einleitung

(DZ, Monozyten) auf den GvT-Effekt auszunutzen. Die NK-Zellen der haploidenten Spender sollten aufgereinigt und bis zu 14 Tage mit 1000 U/ml IL-2 aktiviert und expandiert werden.

Im Vergleich zu einem CD34-selektionierten Stammzellpräparat erhält der Patient mit dem CD3/CD19-depletierten Stammzellprodukt neben den Stammzellen eine 3-4-fach höhere Menge residualer T-Zellen, sodass die Gabe der immunsuppressiven Therapie (MMF) bei dieser Art der SZT intensiviert und verlängert wird. Da der Patient dann einerseits diese intensive immunsuppressive Therapie erhält, andererseits durch das CD3/CD19-depletierte Stammzellprodukt schon Spender NK-Zellen zum Zeitpunkt der SZT transfundiert bekommt, erhält der Patient die IL-2 stimulierten NK-Zellen nicht an Tag 3, sondern nur an den Tagen +40 und +100 nach haploidenter SZT (► Abb. 1.20 B).

## 2 Zielsetzung dieser Arbeit

Die physiologische Bedeutung von NK-Zellen für die Immunantwort besteht in ihrer Fähigkeit, tumor- und virusinfizierte Zellen zu zerstören. Ihre Zelloberfläche ist charakterisiert durch aktivierende und inhibierende Rezeptoren. Weiterhin sind NK-Zellen in der Lage, proinflammatorische Zytokine zu produzieren und können somit effizient andere Immunzellen aktivieren. Die adoptive Immuntherapie mit NK-Zellen kann die Möglichkeit bieten, Patienten mit malignen Erkrankungen nach haploidenter SZT zu behandeln, um einen verstärkten GvL/GvT-Effekt zu bewirken, eventuell ohne eine gefürchtete GvHD auszulösen. Publikationen über die immunologischen Mechanismen von NK-Zellen konzentrieren sich auf die letzten 30 Jahre. Dagegen gibt es bisher nur sehr wenige Daten über einen klinischen Einsatz von NK-Zellen.

Ziel der vorliegenden Arbeit sind daher *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen als Begleitmonitoring im Rahmen der bi-nationalen klinischen Studie (Frankfurt-Basel), in der Patienten mit malignen Erkrankungen nach haploidenter SZT aufgereinigte humane NK-Zellen erhalten. Dabei gliedert sich die Arbeit in drei Hauptschwerpunkte (► Abb. 2.1):

1. ***In vitro* Untersuchungen von NK-Zellen zur Steigerung des GvL/GvT-Effektes**

Primäre humane NK-Zellen sollen durch Interleukin-2 expandiert und aktiviert werden. Dabei sollen Rezeptorveränderungen auf der NK-Zell-Oberfläche, die zytotoxische Aktivität und die Funktionalität (Zytokinproduktion) dieser *ex vivo* stimulierten NK-Zellen untersucht werden.

2. ***In vivo* Untersuchungen hinsichtlich der Entwicklung einer GvHD**

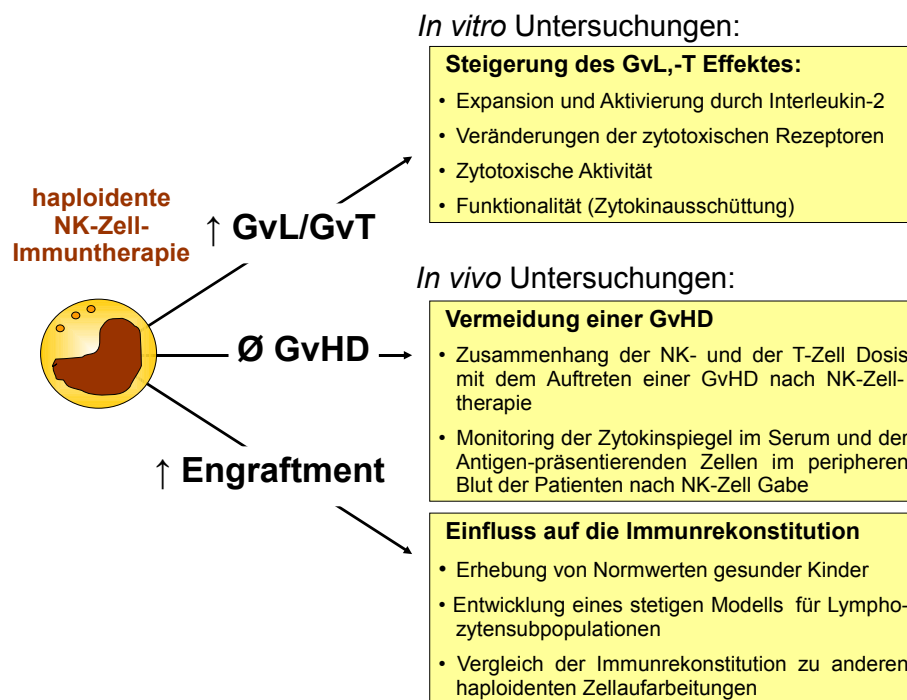
In Frankfurt erhielten 7 Patienten insgesamt 12 NK-Zell-Infusionen mit frisch isolierten und 3 Patienten 6 Applikationen mit IL-2 stimulierten NK-Zellen. Retrospektiv soll für unstimulierte und stimulierte NK-Zelltherapie der Zusammenhang zwischen der applizierten NK- bzw. T-Zell-Dosis und dem Auslösen einer GvHD untersucht werden. Weiterhin soll die Messung und Auswertung von Zytokinen im Serum von

## 2 Zielsetzung dieser Arbeit

Patienten mit akuter und chronischer GvHD beitragen, Signalstoffe zu finden, die auf ein frühes Anzeichen einer GvHD hinweisen. Außerdem soll die Absolutzellzahl Antigen-präsentierender Zellen (DZ, Monozyten) im Blut der Patienten bestimmt werden, da sie in der Lage sind, NK-Zellen *in vitro* zu aktivieren.

### 3. *In vivo* Untersuchungen in Bezug auf die Immunrekonstitution:

Schließlich soll ermittelt werden, ob die allogene haploidente NK-Zell-Immuntherapie zu einem verbesserten Engraftment im Vergleich zur haploidenten SZT ohne diese Immuntherapie beiträgt. Um eine Auswertung hinsichtlich einer beschleunigten Immunrekonstitution zu ermöglichen, bedarf es zunächst der Generierung von Normwerten für Lymphozytensubpopulationen gesunder Kinder (Daten aus der Literatur stehen nur begrenzt zur Verfügung), um eine Vergleichskohorte gegenüberstellen zu können. Dazu soll auf der Basis von Normwerten gesunder Kinder ein Modell für die verschiedenen Lymphozytensubpopulationen entwickelt werden.



**Abbildung 2.1: Potentielle Effekte der haploidenten NK-Zell-Immuntherapie.** Steigerung des *graft versus leukemia/ graft versus tumor*-Effektes (GvL/GvT) unter Vermeidung einer *graft versus host disease* (GvHD), Verbesserung des Engraftments (Anwachsen des Transplantats).

# 3 Spender, Patienten, Material und Methoden

## 3.1 Spender

### 3.1.1 Spender Validierungsläufe

Gesunde Spender, die im Rahmen von Validierungsläufen für die Generierung von IL-2 stimulierten NK-Zellen zur Verfügung standen, sind in Tabelle 3.1 A-B mit Alter, Geschlecht und Leukaphereseinformationen dargestellt. Die sogenannten »*steady-state*« Leukapheresen, das heißt unter Ruhebedingungen gewonnen, wurden gemäß der Standard Arbeitsanweisung (SOP) im Blutspendedienst (BSD) Frankfurt durchgeführt, dem auch die Herstellungserlaubnis vorliegt.

### 3.1.2 Spender klinische Applikation

Gesunde Spender, die im Rahmen der klinischen Phase I/II Studie für die Generierung von IL-2 stimulierten NK-Zellen zur Verfügung standen, sind in Tabelle 3.1 C-E mit Alter, Geschlecht, Anwendung und Leukaphereseinformationen zusammengefasst. Die *steady-state* Leukapheresen sowie die Herstellung der NK-Zellen erfolgte gemäß SOP im BSD.

**Tabelle 3.1: Spender, deren Leukapheresate zur NK-Zellaufreinigung verwendet wurden.**

Nr.	Geschlecht Alter	Anwendung	Leukapheresat (Anzahl, Dauer der Leukapherese)
A	w, 26	Validierungslauf	» <i>non-large volume</i> « (<8- 12 l [<3 h])
B	w, 28	Validierungslauf	» <i>non-large volume</i> « (<8- 12 l [<3 h])
C	m, 37	Klinische Applikation für Patient 1	» <i>large volume</i> « (21 l [4:37 h], 21 l [4:42 h])
D	m, 37	Klinische Applikation für Patient 2	» <i>large volume</i> « (19 l [4:33 h], 17 l [5:00 h])
E	m, 40	Klinische Applikation für Patient 3	» <i>large volume</i> « (16 l [4:30 h], 16 l [4:11 h])

Die NK-Zellen der 5 Spender wurden mit IL-2 expandiert, phänotypisch charakterisiert und hinsichtlich ihrer Funktion untersucht.

### 3.1.3 Spender Normwertstudie

Gesunde Spender, die im Rahmen einer Normwertstudie zur Bestimmung von Lymphozytensubpopulationen zugrunde lagen, bestanden aus 80 Kindern (Alter: 2 Monate bis 18 Jahre) und 20 Erwachsenen (Alter: 19 bis 40 Jahre). Die Geschlechterverteilung war 1,86 (65 männlich/35 weibliche Spender). Die Spenderverteilung war wie folgt: Kinder unter 1 Jahr (n=14), 1- 4 Jahre (n=25), 4- 10 Jahre (n=31), 10- 18 (n=10) und 19- 40 (n=20). Die Blutproben der 2 Monatigen bis 18 Jährigen stammten von prä-OP Kindern, die wegen kleiner chirurgischer Eingriffe aufgrund von Lippen-Kiefer-Gaumen-Segelspalten oder Phimosen in Behandlung der Kinderklinik standen.

Die Einwilligung der Eltern, dass die Reste der Blutproben von den prä-OP Kindern für Forschungszwecke genutzt werden dürfen, lag vor und erfolgte nach den Richtlinien der Ethikkommission des Frankfurter Universitätsklinikums. Bei den Erwachsenen handelte es sich um Labor-Mitarbeiter der Kinderklinik.

## 3.2 Patienten

### 3.2.1 Patienten der NK-Zell-Studie

Patienten, die im Rahmen der klinischen Phase I/II Studie IL-2 stimulierte NK-Zellen (Patienten 1-3) oder frisch isolierte NK-Zellen (Patienten 4-10) erhielten, sind in Tabelle 3.2 mit Geschlecht, Alter, Diagnose, Art der Zellaufarbeitung und Verlaufsdaten zusammengefasst.

Die Aufklärung und Unterzeichnung der Einverständniserklärung erfolgte durch die Eltern vor der Aufnahme in die Studie nach den Richtlinien der Ethikkommission des Frankfurter Universitätsklinikums (Referenznummer: 262/03).

Die Daten der Patienten, die eine zusätzliche NK-Zelltherapie erhielten, dienten den *in vivo* Untersuchungen nach NK-Zell-Applikation (der IL-2 stimulierten NK-Zellen), dem Aufstellen einer NK-/ T-Zell-Dosis-Korrelation, um einen Zusammenhang mit dem Auftreten einer GvHD herzuleiten und der Auswertung der Immunrestitution im Zusammenhang mit dem Überleben der Patienten.

### 3 Spender, Patienten, Material und Methoden

**Tabelle 3.2: Daten der Patienten (Diagnose, Art der Stammzellaufarbeitung), die haploident ein Stammzelltransplantat erhielten mit einer zusätzlichen allogenen NK-Zell-Immuntherapie.**

Nr.	Geschlecht Alter	Diagnose Status	CD3/CD19 Depletion	CD34 Selektion	zusätzliche NK-Therapie	GvHD	momentaner Zustand
1	m, 4	NB IV, CR2	+	—	IL-2 stim.	I	+ 184 †, R
2	m, 7	NB IV, CR2	+	—	IL-2 stim.	I/II	+ 410
3	m, 8	NB IV, PR	+	—	IL-2 stim.	Ø	+ 190
4	m, 11	ALL, CR3	+	—	unstim.	I/II	+ 359 †, R
5	m, 10	ALL, CR4	+	—	unstim.	II/III	+1322
6	m, 22	RMS IV, PR	+	—	unstim.	III/IV	+ 233 †, R
7	w, 7	M. Hodgkin III	—	+	unstim.	I/II	+ 126 †, R
8	w, 9	ALL, CR2	—	+	unstim.	III/IV,c	+ 498 †, TRM
9	m, 23	ALL, CR3	—	+	unstim.	Ø	+1406
10	m, 15	AML M6, NR	—	+	unstim.	Ø	+ 160 †, R

NB=Neuroblastom, ALL=akute lymphatische Leukämie, AML=akute myeloische Leukämie, RMS=Rhabdomyosarkom, CR=komplette Remission, PR=partielle Remission, NR=keine Remission, †=verstorben, R=Rezidiv/Progress, TRM=therapieinduzierte Mortalität, Ø=keine, c=chronische GvHD.

#### 3.2.2 Patienten der Vergleichskohorte

Patienten, die in Tabelle 3.3 mit Geschlecht, Alter, Diagnose, Art der Zellaufarbeitung und Verlaufsdaten zusammengefasst sind, stellen in dieser Arbeit die Vergleichskohorte dar, um die Immunrestitution und das Überlebens der NK-Zelltherapie Patienten zu bewerten. Die Tabelle 3.3 zeigt Patienten, die ein CD3/CD19-depletiertes (Patienten 11-32) oder ein CD34-selektioniertes Stammzellprodukt (Patienten 33-36) erhalten haben.

### 3 Spender, Patienten, Material und Methoden

**Tabelle 3.3:** Daten der Patienten (Diagnose, Art der Stammzellaufarbeitung), die haploident ein Stammzelltransplantat erhielten ohne eine zusätzliche allogene NK-Zell-Immuntherapie.

Nr.	Geschlecht Alter	Diagnose Status	CD3/CD19 Depletion	CD34 Selektion	zusätzliche NK-Therapie	GvHD	momentaner Zustand
11	m, 17	ALL, CR1	+	+	—	Ø	+ 699
12	m, 26	ALL, CR1	+	—	—	II	+ 614
13	w, 3	prä B-ALL, CR3	+	—	—	I	+ 342 †, R
14	m, 9	prä B-ALL, CR3	+	—	—	II	+ 259 †, R
15	m, 16	T-ALL, NR	+	—	—	I	+ 96 †, TRM
16	m, 6	AML M1, CR2	+	—	—	Ø	+ 705
17	m, 11	AML, CR3	+	—	—	I	+1244
18	m, 5	MDS, NR	+	—	—	II	+1105
19	m, 16	MDS, NR	+	+	—	c	+ 575 †, TRM
20	w, 16	MDS, NR	+	+	—	III	+ 275 †, TRM
21	m, 17	RMS IV, CR1	+	—	—	I	+ 523 †, R
22	m, 20	RMS IV, PR	+	+	—	Ø	+ 362 †, R
23	m, 20	RMS IV, CR1	+	—	—	II	+ 308 †, TRM
24	m, 5	RMS IV, CR2	+	—	—	II	+ 222 †, TRM
25	m, 20	RMS IV, PR	+	—	—	I	+ 181 †, R
26	m, 24	RMS IV, CR1	+	+	—	I	+1112
27	m, 7	RMS IV, PR	+	—	—	I	+ 185 †, R
28	m, 16	RMS IV, PR	+	+	—	Ø	+ 336 †, R
29	w, 18	NB IV, PR	+	+	—	Ø	+ 265 †, R
30	m, 5	NB IV, CR2	+	—	—	I	+ 174 †, R
31	w, 4	HB IV, PR	+	—	—	Ø	+ 387 †, R
32	m, 27	Synovial-S., CR1	+	+	—	I	+ 889
33	m, 3	ALL, CR1	—	+	—	III/IV	+1837
34	m, 7	ALL, CR2	—	+	—	Ø	+2805
35	m, 4	pro B-ALL, CR2	—	+	—	III/IV	+ 201 †, R
36	w, 12	ALL, NR	—	+	—	Ø	+ 206 †, TRM

NB=Neuroblastom, ALL=akute lymphatische Leukämie, AML=akute myeloische Leukämie, MDS=myelodysplastisches Syndrom, RMS=Rhabdomyosarkom, HB=Hepatoblastom, Synovial-S.=Synovial Sarkom, CR=komplette Remission, PR=partielle Remission, NR=keine Remission, †=verstorben, R=Rezidiv/Progress, TRM=therapieinduzierte Mortalität, Ø=keine, c=chronische GvHD.

## 3.3 Materialien

### 3.3.1 Geräte und Software

**Tabelle 3.4: Geräte und Software.**

Auflichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
BD FACSAArray™	BD Bioscience, San Jose, USA
Brutschrank BBD 6220	Heraeus, Langenselbold, Deutschland
CliniMACS®-Gerät	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
Durchflusszytometer Epics™ XL™	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Durchflusszytometer FC500 (mit Argonlaser und 525, 575, 620, 675, 755 nm Bandpassfilter)	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Durchlichtmikroskop	Olympus, Hamburg, Deutschland
Environmental Shaker ES-20	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop mit Mercury Burner (100 Watt Hg-Lampe)	Olympus, Hamburg, Deutschland
mit Mercury Burner Power Supply Unit	Ushio, Inc., Tokyo, Japan
mit Digital Kamera	Olympus, Hamburg, Deutschland
Kühlschrank	Nikon, Tokyo, Japan
Laminar Air Flow (LAF)	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland
Multipette® plus	Heraeus Kendro, Trendelburg, Deutschland
Pipettierhilfe für Auslaufpipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten (10 µl- 1000 µl)	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Sterilbank, Hera safe	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Steriler Tubing-Konnektor TSCD-II	Heraeus, Hanau, Deutschland
Tiefkühlschrank, Hera freeze (-80 °C)	Terumo, Phoenix, USA
Tischzentrifuge, Minispin	Heraeus, Hanau, Deutschland
TQ-Prep™ Workstation	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
+ Immunoprep™ Reagent System	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Vortexer, Ika®	IKA, Staufen, Deutschland
Wasserbad (beheizbar)	Grant, Berlin, Deutschland
Hämatologisches Zählgerät Ac.T diff™	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Waage (5- 2200 g)	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Zentrifugen: Multifuge (3 S-R, 4K)	Heraeus Kendro, Osterode, Deutschland
CXP System II Software (Vs 2.2)	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
FCAP Array™ Software (Vs 1.0.1)	BD Bioscience, San Jose, USA
GraphPad Prism (Vs 4.00)	GraphPad Software, San Diego, USA



### 3.3.2 Verbrauchsmaterialien

### 3.3.3 Chemikalien, Medien, Puffer und Reagenzien

**Tabelle 3.5: Chemikalien, Medien, Puffer und Reagenzien.**

Coulter Clenz <sup>®</sup>	Beckman Coulter, Marseille, Frankreich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DNA-Farbstoff 7-AAD	Beckman Coulter, Marseille, Frankreich
DNase I (1 mg/ml)	Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
EDTA 0,5 M	BioWhittaker, Rockland, USA
FACS Clean	Becton Dickinson, San Jose, USA
FACS Flow	Becton Dickinson, San Jose, USA
FCS (fetales Kälberserum)	PAA Laboratories, Pasching, Deutschland
Ficoll/Paque	Biochrome, Berlin, Deutschland
Flow-Check <sup>™</sup> Fluorospheres	Beckman Coulter, Marseille, Frankreich
Flow-Count <sup>™</sup> Fluorespheres	Beckman Coulter, Marseille, Frankreich
Heparin-Natrium	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Human Albumin 200 g/l (100 ml)	Baxter, Unterschleißheim, Deutschland
Humanes Plasma ( <i>fresh frozen plasma</i> )	BSD Hessen, Frankfurt, Deutschland
IMDM (Iscove-Medium)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Immuno-Trol <sup>™</sup> Cells	Beckman Coulter, Marseille, Frankreich
IOtest <sup>®</sup> 3 Fixative Solution	Beckman Coulter, Marseille, Frankreich
IsoFlow <sup>™</sup> Sheat Fluid	Beckman Coulter, Marseille, Frankreich
Octeniderm <sup>®</sup>	Schülke&Mayr, Norderstedt, Deutschland
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Proleukin <sup>®</sup> S (Aldesleukin)	Novartis Pharma, Nürnberg, Deutschland
RosetteSep <sup>®</sup> Human Monocyte Enrichment Cocktail	StemCell Technologies, Vancouver, Kanada
RosetteSep <sup>®</sup> Human NK Cell Enrichment Cocktail	StemCell Technologies, Vancouver, Kanada
Reaktionspuffer (1-fach)	Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
RPMI 1640 + GlutaMAX <sup>™</sup> -I	Invitrogen, Auckland, Neuseeland
Simply Cellular <sup>®</sup> anti-Mouse IgG	Bangs Laboratories, Fishers, USA
VersaLyse <sup>™</sup> Lysing Solution	Beckman Coulter, Marseille, Frankreich
X-Vivo 10 mit Phenolrot	Cambrex, Verviers, Belgien
X-Vivo 10 ohne Phenolrot	Cambrex, Verviers, Belgien
Assay 96 Well Platte (Rundboden)	Becton Dickinson, San Jose, USA
Auslaufpipetten (2, 5, 10, 25, 50 ml)	Costar, New York, USA
VueLife <sup>™</sup> Beutel (32, 72, 197)	CellGenix, Freiburg, Deutschland
Compoflex <sup>®</sup> Transfer-Beutel	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
Drei-Wegehahn	MiroMed, Tuttlingen, Deutschland
Drei-Wegehahnbank	MiroMed, Tuttlingen, Deutschland
Falcon-Röhrchen CellStar <sup>®</sup> (15, 50 ml)	Greiner, Nürtingen, Deutschland
Heidelberger Verbindungen (Luer Lock)	MiroMed, Tuttlingen, Deutschland

### 3 Spender, Patienten, Material und Methoden

Kryo-Röhrchen	Greiner, Nürtingen, Deutschland
Luer-Lock-Spritzen (3, 5, 10, 20, 50 ml)	BD, Heidelberg, Deutschland
Pall-Vorfilter	PALL, Darmstadt, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Starlab, Ahrensburg, Deutschland
Tubes (5 ml)	Sarstedt, Deutschland
Signature™ Pipettor (12-Kanal Pipette)	VWR, Leuven, Belgien
Zellkulturflaschen Cellstar (25 cm <sup>2</sup> )	Greiner Nürtingen, Deutschland
Zellkulturflaschen Cellstar (75 cm <sup>2</sup> )	Greiner Nürtingen, Deutschland

**Tabelle 3.6: Materialien für die immunomagnetische Zellisolierung.**

CliniMACS PBS/EDTA Puffer	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CliniMACS LS Tubing Set	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CliniMACS CD3 Reagent	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CliniMACS CD56 Reagent	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Intraglobin	Biotest, Dreieich, Deutschland

## 3.3.4 Antikörper

### Durchflusszytometer

**Tabelle 3.7: Antikörper für die durchflusszytometrischen Analysen.**

Antikörper	Klon	Subtyp	Fluorochrom	Hersteller
Anti-CD3	UCHT1	IgG <sub>1</sub>	FITC, ECD	Beckman Coulter
Anti-CD3	SK7	IgG <sub>1</sub>	PE	BD Biosciences
Anti-CD4	13B8.2	IgG <sub>1</sub>	PC5	Beckman Coulter
Anti-CD8	B9.11	IgG <sub>1</sub>	PC5	Beckman Coulter
Anti-CD14	RMO52	IgG <sub>2a</sub>	PE	Beckman Coulter
Anti-CD16	3G8	IgG <sub>1</sub>	PE, PC5	Beckman Coulter
Anti-CD19	J4.119	IgG <sub>1</sub>	ECD	Beckman Coulter
Anti-CD25	B1.49.9	IgG <sub>2a</sub>	PE, PC7	Beckman Coulter
Anti-CD28	CD28.2	IgG <sub>1</sub>	PE	Beckman Coulter
Anti-CD45	J.33	IgG <sub>1</sub>	FITC, PC7	Beckman Coulter
Anti-CD45R0	UCHL1	IgG <sub>2a</sub>	FITC, PE	Beckman Coulter
Anti-CD45RA	ALB11	IgG <sub>1</sub>	FITC	Beckman Coulter
Anti-CD56	N901	IgG <sub>1</sub>	PE, PC7	Beckman Coulter
Anti-CD62L	DREG56	IgG <sub>1</sub>	FITC, PE	Beckman Coulter
Anti-CD69	TP1.55.3	IgG <sub>2b</sub>	PE	Beckman Coulter
Anti-CD85k	ZM3.8	IgG <sub>1</sub>	PC5	Beckman Coulter
Anti-CD127	R34.34	IgG <sub>1</sub>	PE	Beckman Coulter
Anti-CD158a,h	EB6B	IgG <sub>1</sub>	PE	Beckman Coulter

### 3 Spender, Patienten, Material und Methoden

Anti-CD158b1/b2,j	GL183	IgG <sub>1</sub>	PE	Beckman Coulter
Anti-CD158e1/e2	Z27.3.7	IgG <sub>1</sub>	PE	Beckman Coulter
Anti-CD158i	FES172	IgG <sub>2a</sub>	PE	Beckman Coulter
Anti-HLA-DR	Immu-357	IgG <sub>1</sub>	FITC, ECD	Beckman Coulter
Anti-NKG2D	ON72	IgG <sub>1</sub>	PE	Beckman Coulter
Anti-NKp30	Z25	IgG <sub>1</sub>	PE	Beckman Coulter
Anti-NKp44	Z231	IgG <sub>1</sub>	PE	Beckman Coulter
Anti-NKp46	BAB281	IgG <sub>1</sub>	PE	Beckman Coulter
Isotypenkontrolle	679.1Mc7	IgG <sub>1</sub>	FITC/PE/PC5	Beckman Coulter
Isotypenkontrolle	679.1Mc7	IgG <sub>1</sub>	ECD	Beckman Coulter
Isotypenkontrolle	679.1Mc7	IgG <sub>1</sub>	PC7	Beckman Coulter

Antikörper von Beckman Coulter sind aus Marseille, Frankreich. Antikörper von BD Biosciences sind aus San Jose, USA. FITC=Fluorescein Isothiocyanate, PE=Phycoerythrin, ECD=Phycoerythrin-Texas Red<sup>®</sup>X, PC5=Phycoerythrin-5, PC7=Phycoerythrin-7.

### Cytometric Bead Array

**Tabelle 3.8: Antikörper für die Cytometric Bead Array Analysen.**

Set	Bead Position	Hersteller
Human FasL Flex Set	C6	BD Biosciences
Human G-CSF Flex Set	C8	BD Biosciences
Human GM-CSF Flex Set	C9	BD Biosciences
Human IFN- $\gamma$ Flex Set	E7, B8	BD Biosciences
Human IL-1 $\beta$ Flex Set	B4	BD Biosciences
Human IL-2 Flex Set	A4	BD Biosciences
Human IL-4 Flex Set	A5	BD Biosciences
Human IL-6 Flex Set	A7	BD Biosciences
Human IL-8 Flex Set	A9	BD Biosciences
Human IL-10 Flex Set	B7	BD Biosciences
Human IL-12p70 Flex Set	E5	BD Biosciences
Human IL-13 Flex Set	E6	BD Biosciences
Human IP-10 Flex Set	B5	BD Biosciences
Human MCP-1 Flex Set	D8	BD Biosciences
Human MIP-1 $\alpha$ Flex Set	B9	BD Biosciences
Human MIP-1 $\beta$ Flex Set	E4	BD Biosciences
Human RANTES Flex Set	D4	BD Biosciences
Human TNF- $\alpha$ Flex Set	C4, D9	BD Biosciences
Human TNF- $\beta$ Flex Set	D5	BD Biosciences

Alle Antikörper von BD Biosciences sind aus San Jose, USA. Ein Flex Set besteht jeweils aus Capture Bead Reagenz, PE Detektion Reagenz und einem Standard. Für die Geräteeinstellung benötigt man ein *CBA Human Soluble Protein Master Buffer*-Kit, ebenfalls von BD Biosciences. Informationen zur Bead Position, ► Tab. 3.10 und ► Abb. 3.7.

## 3.4 Methoden

### 3.4.1 Ficoll Trennung zur Isolierung mononukleärer Zellen

Mononukleäre Zellen (MNZ) des peripheren Blutes waren das Ausgangsmaterial für die Aufreinigung von NK-Zellen bzw. Monozyten im Labormaßstab.

Die Isolierung der MNZ erfolgte aus heparinisiertem Vollblut der Spender oder aus Buffy-Coats. Buffy Coats wurden freundlicherweise vom DRK-Blutspendedienst Hessen/ Baden-Württemberg in Frankfurt zur Verfügung gestellt.

Zunächst wurde das Blut im Verhältnis 1:2 (Buffy-Coats 1:3) mit PBS verdünnt. In ein 50 ml Falcon wurde 15 ml Ficoll/Plaque-Lösung vorgelegt und 35 ml des verdünnten Blutes (bzw. des verdünnten Buffy Coat) wurde vorsichtig auf die Ficoll/Plaque-Lösung geschichtet. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (=Ficoll/Plaque-Dichtegradientenzentrifugation) für 15 min bei 25 °C und 700 g. Die MNZ wurden sichtbar als dünne, weiße Schicht zwischen der Ficoll- und der Serum-PBS-Phase. Diese wurde vorsichtig abgehoben und in ein weiteres 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die MNZ wurden abschließend zweimal in PBS mittels Zentrifugation (20 °C, 10 min, 400 g) gewaschen.

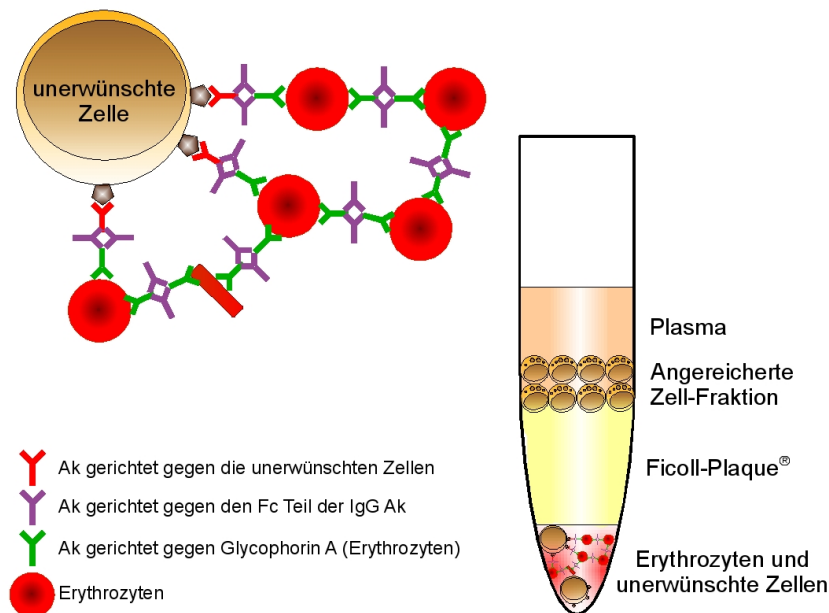
### 3.4.2 Isolierung primärer humaner NK-Zellen im Labormaßstab

Als Ausgangsmaterial zur Isolierung von primären humanen NK-Zellen mittels Rosette-Sep Verfahren im Labormaßstab dienten über- bzw. untergewichtete Vollblutkonserven, die vom BSD Hessen in Frankfurt bezogen wurden.

Das RosetteSep Verfahren basiert auf einer Depletion der unerwünschten Zellen und führt damit zur Anreicherung der gewünschten Zellen. Über einen bi-spezifischen Antikörpercocktail wird ein Tetramer-Immunkomplex gebildet, der einerseits an die Erythrozyten (durch die Markierung von Glycophorin A) und andererseits an die unerwünschten hämatopoetischen Zellen bindet. Dabei dient CD3 und CD4 zur Depletion von T-Lymphozyten, CD4 auch zur Depletion von Monozyten, CD19 gerichtet gegen B-Lymphozyten, CD36 gerichtet gegen Erythrozyten und Monozyten und CD66b zur Depletion von Granulozyten. Nach der Dichtezentrifugation befinden sich alle Zellen, die über den Tetramerkomplex an die Erythrozyten gebunden sind, in der untersten Schicht, während die gewünschten

### 3 Spender, Patienten, Material und Methoden

ungebundenen Zellen im Ficoll Ring zu finden sind (► Abb. 3.1). Es wurde das »*Human NK Cell Enrichment Cocktail*«-Kit der Firma StemCell Technologies verwendet und laut Anweisung des Herstellers verfahren. Frisches Vollblut wurde mit 50  $\mu\text{l}/\text{ml}$  Antikörper-Cocktail inkubiert (20 min bei Raumtemperatur (RT)). Anschließend wurde mit dem gleichen Volumen Puffer (PBS + 0,5% HSA, 2mM EDTA) verdünnt und eine Ficoll Trennung durchgeführt (► Kap. 3.4.1). Das RosetteSep Verfahren bietet den Vorteil, dass die gewonnenen Zellen *untouched* bleiben, d.h. es findet keine Markierung mit einem Antikörper statt wie es bei der Klinischen Aufreinigung mit dem CliniMACS Gerät der Fall ist. Das RosetteSep Kit ist weiterhin verwendbar für Leukapheresen und Buffy Coats. Allerdings dürfen die Grenzen für kernhaltige Zellen nicht  $5 \times 10^7$  Zellen/ml überschritten werden und es müssen noch ausreichend Erythrozyten vorhanden sein (Ratio 30-50 Erythrozyten pro kernhaltige Zelle), da sonst die Komplexierung zu einem Tetramer nicht mehr gewährleistet ist.



**Abbildung 3.1: Prinzip der RosetteSep Technik.** Unerwünschte Zellen und Erythrozyten bilden einen Tetramer Antikörper Komplex (oben links). Nach Zentrifugation befinden sich im Zellpellet die unerwünschten Zellen und die erwünschten Zellen werden als dünne, weiße Schicht zwischen der Ficoll- und der Plasma-Phase sichtbar und können vorsichtig abgehoben werden (rechts).

### 3.4.3 Isolierung primärer humaner Monozyten im Labormaßstab

Es wurde das »*Human Monocyte Enrichment Cocktail*«-Kit der Firma StemCell Technologies verwendet. Auch hierbei liegt das Prinzip der RosetteSep Technik zugrunde (► Kap. 3.4.2). Nur im Gegensatz zu dem NK-Zell-Enrichment Cocktail wurde hierbei ein Antikörper Cocktail gegen CD2, CD3 und CD8 für T-Zellen, CD19 für B-Lymphozyten, CD56 und CD8 für NK-Zellen, CD66b für Granulozyten und ebenfalls Glycophorin A für Erythrozyten zur Depletion verwendet.

### 3.4.4 Isolierung primärer humaner NK-Zellen im klinischen Maßstab

Als Ausgangsmaterial zur Isolierung von primären humanen NK-Zellen im klinischen Maßstab dienten unstimulierte (ohne vorherige G-CSF Gabe) Leukapheresate, die vom BSD Hessen in Frankfurt gesammelt wurden.

Mittels eines vollautomatischen CliniMACS Systems wurden die NK-Zellen unter den Bedingungen der GMP über eine CD3 Depletion mit anschließender CD56 Selektion angereichert. Das Prinzip der Depletion und der Selektion ist im Kapitel 1.2.3 beschrieben. Zunächst wurde der 500 ml Apherese Beutel zweimal gewaschen, um die Thrombozytenzahl zu reduzieren und somit Verklumpungen zu vermeiden. Die Zellen wurden auf ca. 450 ml mit CliniMACS Puffer (PBS + 0,5 % HSA, 2 mM EDTA) aufgefüllt und zentrifugiert (Beutelzentrifuge, 350 g, 15 min, 4 °C, Bremse 0, Beschleunigung 8). Dann wurde der Überstand mit einer Beutelpresse in einen leeren Beutel geleitet. Dieser Vorgang wurde wiederholt. Nach dem zweiten Waschschrift wurden die Zellen in einem Volumen von ca. 80- 90 ml Puffer resuspendiert.

Um unspezifische Bindungen zu blockieren, wurden 5 ml Intraglobin zugegeben, die Leitungen mit 10 ml Puffer gespült und dann 5 min bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die immunomagnetischen Beads zugeführt. Die Menge richtet sich nach der Ausgangszellzahl im verwendeten Material. In einem Fläschchen CliniMACS CD3 Reagenz befinden sich 7,5 ml, die zur Markierung von  $15 \times 10^9$  CD3 positiven Zellen bei einer Gesamtleukozytenzahl von maximal  $40 \times 10^9$  Zellen ausreichen. Nach Zugabe der Antikörper wurde mit Puffer auf 100 ml aufgefüllt und Luft injiziert, um die Reste

### 3 Spender, Patienten, Material und Methoden

aus den Schläuchen zu entfernen. Wenn die Zellzahlen über den angegebenen 15 bzw.  $40 \times 10^9$  lagen, wurde ein zweites Fläschchen CD3 Reagenz verwendet und das Inkubationsvolumen auf ca. 180-190 ml erhöht. Es folgte eine Inkubationszeit von 30 min bei RT auf dem Schüttler.

Im Anschluss wurde der Beutel mit Puffer auf 450 ml aufgefüllt und dann zweimal wie oben beschrieben gewaschen. Nach dem zweiten Waschschrift wurden die Zellen in 150 ml (Gesamtzahl  $< 40 \times 10^9$ ) bzw. in 300 ml (bei einer Gesamtzellzahl  $> 40 \times 10^9 < 80 \times 10^9$ ) Puffer aufgenommen. Die markierten Zellen konnten nun über die CliniMACS Depletionssäule (Depletion Tubing Set) depletiert werden. Die Depletion erfolgte über das Programm Depletion 3.1.

Die depletierten T-Zellen befanden sich nach der Depletion im sogenannten »NTCB« (*non target cell bag*=Nicht Ziel-Zell-Fraktionsbeutel) und die *erwünschten* Zellen, bestehend aus CD3<sup>-</sup> Zellen wie NK-Zellen, B-Zellen, Monozyten und wenige Granulozyten, befanden sich nach dem ersten Schritt im »CCB« (*cell collection bag*=Ziel-Zell-Fraktionsbeutel).

Aus dem CCB Beutel wurde steril eine Probe für flowzytometrische Bestimmungen entnommen, um die absolute Zellzahl von CD56<sup>+</sup> Zellen und Leukozyten zu bestimmen. Anschließend erfolgte die Zugabe der immunomagnetischen Beads (CD56 Reagenz). Die Menge richtete sich nach der ermittelten NK-Zell- und Leukozytenzahl aus dem CCB der CD3 Depletion. In einem Fläschchen CliniMACS CD56 Reagenz befinden sich 7,5 ml, die zur Markierung von  $10 \times 10^9$  CD56 positiven Zellen bei einer Gesamtleukozytenzahl von maximal  $40 \times 10^9$  Zellen ausreichen. Nach Zugabe der Antikörper wurde mit Puffer auf 100 ml aufgefüllt und Luft injiziert, um die Reste aus den Schläuchen zu entfernen. Es folgte eine Inkubationszeit von 30 min bei RT auf dem Schüttler.

Im Anschluss wurde der Beutel mit Puffer auf 450 ml aufgefüllt und dann zweimal wie oben beschrieben gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Nach dem zweiten Waschschrift wurden die Zellen in 150 ml (Gesamtzahl  $< 40 \times 10^9$ ) Puffer aufgenommen. Die markierten Zellen konnten nun über die CliniMACS Selektionssäule (Tubing LS) angereichert werden. Die Selektion erfolgte über das Programm Enrichment 1.1.

Die selektierten CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK-Zellen befanden sich nach der durchgeführten Selektion im CCB (erwünschte Zell-Fraktion) und die restlichen Zellen befanden sich im NTCB (nicht erwünschte Zell-Fraktion). Nach Entnahme einer sterilen Probe aus dem CCB-

Beutel für phänotypische und funktionale Messungen (► Kap. 3.4.7 und 3.4.8) wurden die NK-Zellen unter GMP-Bedingungen für 9 bis 14 Tage expandiert (► Kap. 3.4.5).

### 3.4.5 Kultivierung primärer humaner Spender NK-Zellen

Die aufgereinigten CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK-Zellen wurden auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6$ /ml in X-Vivo10 Medium (ohne Gentamycin, mit und ohne Phenolrot) + 5 % Humanes Plasma eingestellt. Die Aktivierung erfolgte mit 1000 U/ml rhIL-2 (Proleukin<sup>®</sup>S). In Zellkulturflaschen von Cellstar<sup>®</sup> (Labormaßstab) und in VueLife<sup>™</sup> Beuteln (klinischer Maßstab) wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 14 Tage unter GMP-Bedingungen expandiert. Der Tag der Isolierung und Inkulturnahme wurde als Tag 0 definiert. Eine Kontrolle der Zellen und eine Bestimmung der Zellzahl erfolgte alle 2-3 Tage.

### 3.4.6 Kultivierung humaner Zelllinien

Die Suspensionszelllinie (K-562) und die adhärenente Zelllinie (UKF-NB-3) wurden in RPMI 1640-Medium mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS ohne zusätzliche Antibiotika kultiviert. Alle Zelllinien und Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Die Suspensionszelllinie wurde beim Passagieren nach gutem Durchmischen mit dem Pipettor gesplittet und in ein neues Kulturgefäß mit frischem Medium überführt.

Zum Passagieren der adhärenenten Zellen wurde zunächst das Medium komplett entfernt, die Zellen einmal mit auf RT gebrachten PBS gewaschen und anschließend durch Zugabe von Trypsinlösung (0,05 % Trypsin, 0,55 mM EDTA, 137 mM NaCl in PBS) von der Wand der Kulturfläschchen abgelöst. Durch kurzes Verweilen (5 min) im Brutschrank bei 37 °C ließen sich die Zellen durch leichtes Klopfen gegen die Flasche noch besser vom Boden ablösen. Die Zellen wurden in einer geeigneten Dichte in einem neuen Kulturgefäß ausgesät.

#### Suspensions-Zelllinie K-562 (ATCC No. CCL-243)

Hierbei handelt es sich um eine humane chronisch myeloide Leukämie Zelllinie. Sie ist bcr:abl positiv und stammt aus dem Pleuraerguss einer 53 jährigen Patientin, die sich in einer Blastenkrise befand. Bei der erythroleukämischen Zelllinie handelt es sich um nicht



### 3 Spender, Patienten, Material und Methoden

adhärente, runde Zellen, die einzeln wuchsen. K-562 eignet sich als hoch sensitive Zielzelle für *in vitro* NK-Zell-Zytotoxizitäts-Assays, weil sie kein MHC auf ihrer Zelloberfläche trägt und dadurch von NK-Zellen abgetötet werden kann (Lozzio et al. 1979). Die Zellen wurden im RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS und 2 mM Glutamin kultiviert. Ihre Verdopplungszeit betrug 30- 40 Stunden. Sie wurden alle 3 bis 4 Tage gesplittet und ihre maximale Zelldichte lag bei etwa  $1.0\text{-}1.5 \times 10^6/\text{ml}$ . Immunologisch ist die K-562 durch die Anwesenheit von CD13, CD42, CD45, CD71 und die Abwesenheit von CD3, CD19, CD34 und CD56 auf der Zelloberfläche gekennzeichnet [4]. Weiterhin ist bekannt, dass K-562 MICA, MICB, ULBP1<sup>schwach</sup> und ULBP2 auf der Oberfläche exprimiert, wodurch die NK-Zelle im Zytotoxizitäts-Assay aktivierende Signale für ein Killen erhält (Carlsten et al. 2007).

#### **Adhärente Zelllinie UKF-NB-3**

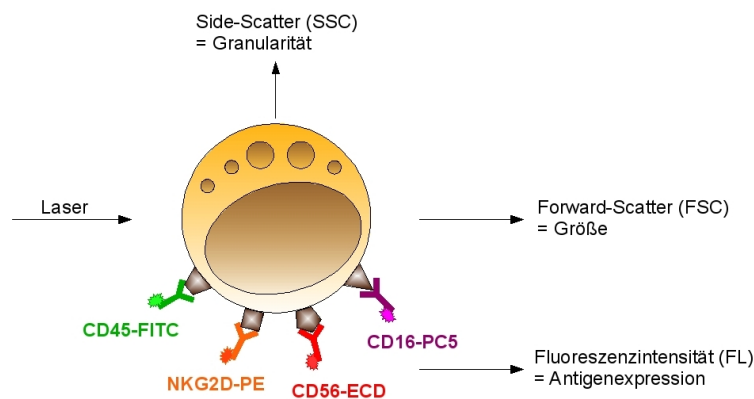
Bei der UKF-NB-3 handelt es sich um eine Zelllinie, die aus den Knochenmarkmetastasen eines Neuroblastom Patienten mit rezidivierendem Stadium 4 (eingeteilt nach Evans) im Universitätsklinikum Frankfurt (=UKF) etabliert wurde (Cinatl et al. 1992, Cinatl et al. 1993). Bei der Neuroblastom Zelllinie handelt es sich um adhärente Zellen, die Pseudoganglien sowie neuritenähnliche Ausläufer in der Kultivierung zeigen. Sie wurden im RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS und 2 mM Glutamin kultiviert. Sie wurden alle 3 bis 4 Tage passagiert. Immunologisch ist die UKF-NB-3 durch die Anwesenheit von CD9, CD56, CD57, CD81, GD2 und die Abwesenheit von CD45 auf der Zelloberfläche gekennzeichnet. Ähnlich wie K-562 ist MHC stark reduziert auf der Zelloberfläche, wodurch sie ein geeignetes Target für NK-Zellen darstellt (Klöss et al. 2007).

#### **3.4.7 Durchflusszytometrische Messung**

Die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACS-Analyse) ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen (=Antigenen) und intrazellulären Proteinen. Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern durchgeführt wird. Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße und die Binnenstruktur (Granularität des Zytoplasmas,

### 3 Spender, Patienten, Material und Methoden

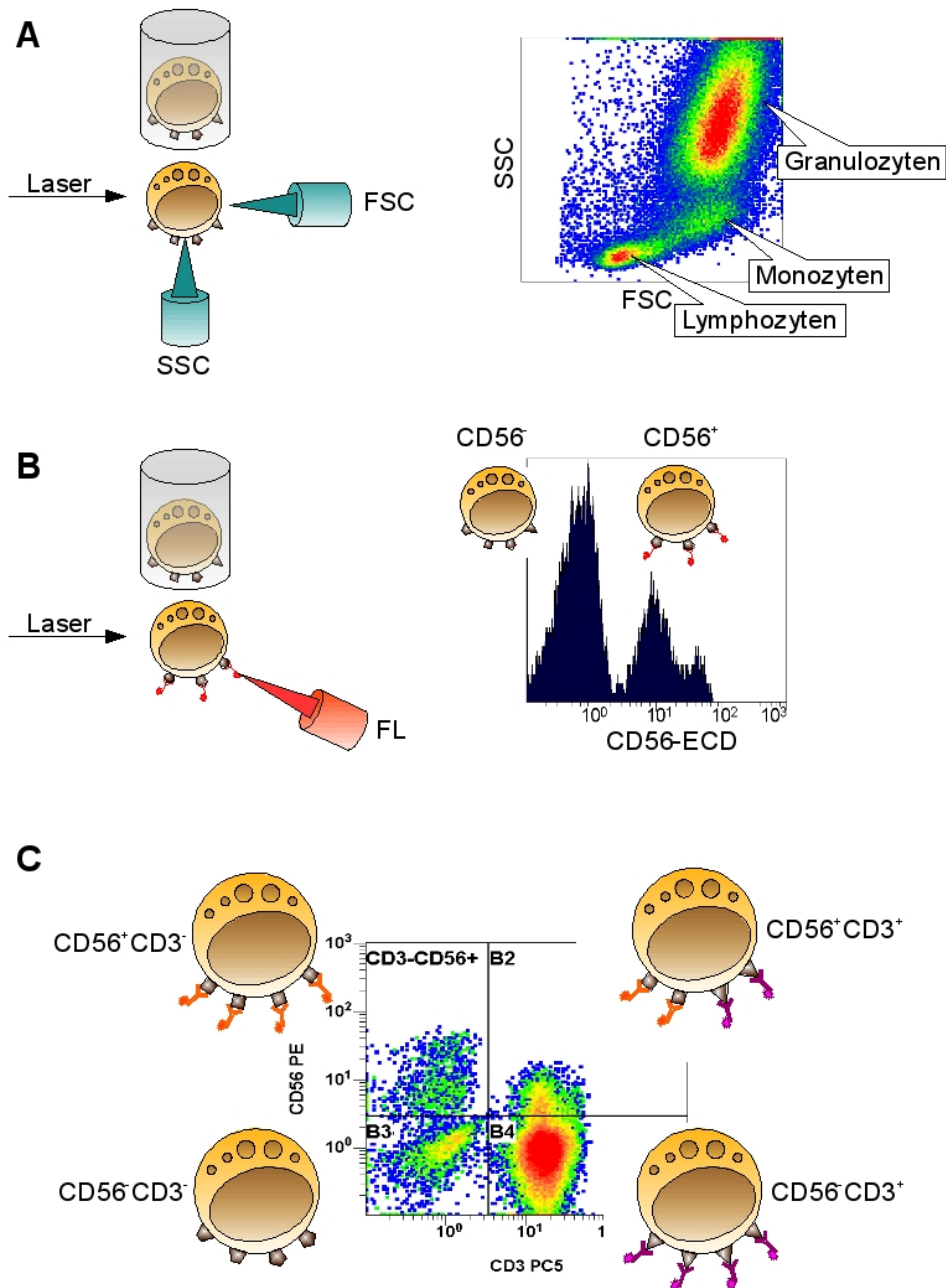
Größe des Zellkerns usw.) der Zellen gewonnen. Die möglichen Messparameter der durchflusszytometrischen Messung sind in Abbildung 3.2 dargestellt. Viele Zellpopulationen sind gekennzeichnet durch Koexpressionen verschiedener Antigene. Die Messung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe und somit verschiedener Antigene ist möglich, weil sich die eingesetzten Farbstoffe zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen, aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emissionsspektren verfügen.



**Abbildung 3.2: Messparameter der Durchflusszytometrie.** Das Durchflusszytometer ist in der Lage, morphologische Eigenschaften der Zelle (Granularität und Größe) sowie Antigene mit Hilfe der Markierung von Fluoreszenz-Farbstoffen (grünfluoreszierendes FITC, orangefluoreszierende PE und die im rotwelligen Bereich liegenden ECD und PC5 Farbstoffe) zu erfassen.

Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung wie an einer Perlenkette an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl (Argon-Ionen-Laser mit 488 nm) werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch spezifische Photodetektoren nach elektronischer Verstärkung durch Photomultiplier (PMT) registriert werden, verhalten sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle.

### 3 Spender, Patienten, Material und Methoden



**Abbildung 3.3: Erläuterung der Messparameter.** **A** FSC (Vorwärtsstreuung) gegen den SSC (Seitwärtsstreuung) Darstellung einer graphischen Häufigkeits- Dichteverteilung (*density plot*; rot=hohe Dichte, grün/gelb=mittlere Dichte, blau=geringe Dichte), gezeigt am Beispiel des peripheren Blutes. **B** Anzahl (y-Achse=*events*) gegen FL3 (x-Achse=CD56 in ECD) Darstellung eines Histogramm Plots, gezeigt am Beispiel der CD56<sup>+</sup> NK-Zellen. **C** FL2 (y-Achse=CD56 in PE) gegen FL4 (x-Achse=CD3 in PC5) Darstellung eines *density plots*, Charakterisierung von Zellpopulationen mittels Zweifarbenfluoreszenz, gezeigt am Beispiel CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK-Zellen und CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> sowie der CD56<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup> T-Zellen.

## Phänotypisierung mittels 4 und 5-Farb Flowzytometrie

### (*duale und single platform*)

Der Nachweis von Antigenmustern mit Hilfe monoklonaler fluorochrom-konjugierter Antikörper (► Abb. 3.3) wird als Immunphänotypisierung bezeichnet. Die Immunphänotypisierung erfolgt mittels Bestimmung populationspezifischer Zelloberflächenproteine (CD-Marker=*clusters of differentiation*). Eine Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten CD-Marker, deren zelluläre Expression sowie Funktion und Liganden ist im Anhang unter D.1 in tabellarischer Form zusammengefasst. Neben Fluorochromen können auch andere Farbstoffe mit Argonlasern angeregt werden, so zum Beispiel 7-AAD (7-Aminoactinomycin) und PI (Propidiumiodid). Durch die Fähigkeit zur Interkalation mit DNA verwendet man sie als Zellfarbstoffe. 7-AAD interkaliert spezifisch zwischen Cytosin und Guanin und verändert seine Fluoreszenzeigenschaften. Durch die Besonderheit, dass 7-AAD wie auch PI ausschließlich die DNA von "toten" Zellen färben und sie nur in Zellen ohne intakte Zellmembran eindringen können, eignen sie sich als Vitalfarbstoffe. Zellen, die 7-AAD aufgenommen haben, können im 4. Fluoreszenzkanal detektiert werden.

Bei der Messung von Lymphozyten Subpopulationen (Monitoring der Patienten) wurde mit der »*dual platform*«-Methode gearbeitet, d.h. der prozentuale Anteil einer bestimmten Zellpopulation in einer Probe (durchflusszytometrisch bestimmt) wird mit dem Ergebnis einer Messung derselben Probe im Hämatozytometer (Coulter Ac.T diff Counter) berechnet, um die Anzahl der bestimmten Zellpopulation pro Volumeneinheit Probe zu ermitteln. Die Angabe der Absolutzellzahl im peripheren Blut der Patienten wurde in Zellen/ $\mu\text{l}$  angegeben.

Bei der Messung von Zellprodukten (NK-Zellpräparat) wurde mit der »*single platform*«-Methode gearbeitet. Es handelt sich hierbei um eine direkte Absolutzellzählung auf dem Durchflusszytometer. Hierfür wurden als interner Standard sogenannte Flow-Count™ Fluorespheres (Beads) verwendet. Hierbei wird der Probe das gleiche Volumen an Beads exakt hinzupipettiert. Da die Anzahl der Beads pro Volumeneinheit klar definiert ist, kann die genaue Zellzahl in der Probe über Dreisatz errechnet werden.

### Bestimmung verschiedener Lymphozytensubpopulationen als »*duale-platform*«-

**Analyse** Bei der Analyse der verschiedenen Lymphozytensubpopulationen (T-Zellen,

### 3 Spender, Patienten, Material und Methoden

NK-Zellen und B-Zellen) sowie deren Untergruppen (Naïve, Gedächtniszellen) handelte es sich um ein *no-wash*-Verfahren. Pro CD Marker wurde nach Herstelleranweisung 5 bis 10  $\mu\text{l}$  Antikörper eingesetzt. Die genaue Panelübersicht der verwendeten Antikörper ist im Anhang unter E.1 in tabellarischer Form zusammengestellt. Zu dem vorgelegten Antikörpergemisch wurde 100  $\mu\text{l}$  Probe (entsprach  $1-2,5 \times 10^5$  Zellen, EDTA Vollblut) zugegeben. Die Ansätze wurden gevortext, um eine optimale Durchmischung zu erreichen, und 15 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde die Probe mit Hilfe der TQ-Prep™ Workstation in Verbindung mit dem Immunoprep™ Reagent System zur Lysierung der Erythrozyten eingesetzt. Das Immunoprep-Reagensystem besteht aus Immunoprep A (Erythrozyten-Lysereagenz;  $\text{CH}_2\text{O}_2$  Ameisensäure), Immunoprep B (Leukozyten-Stabilisierlösung;  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , NaCl,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) und aus Immunoprep C (Zellmembran-Fixierlösung; Paraformaldehyd). Zum Nachweis unspezifischer Bindungen wurde ein weiteres Röhrchen mit IgG1 in FITC, PE, ECD, PC5 und PC7 vorgelegt. Zu Beginn der Doktorarbeit erfolgte die Messung am 4-Farb Durchflusszytometer (EpicsXL) und während der Arbeit erfolgte eine Umstellung auf das 5-Farb Durchflusszytometer (FC500). Die durchflusszytometrischen Messungen der Normwertstudie erfolgten alle am EpicsXL. Folgende Lymphozyten Populationen wurden hierbei bestimmt:

- CD3<sup>+</sup> T-Zellen

- CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T<sub>Helfer</sub>-Zellen

- CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> Naïve T<sub>Helfer</sub>-Zellen

- CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> Gedächtnis-T<sub>Helfer</sub>-Zellen

- CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> Früh aktivierte T<sub>Helfer</sub>-Zellen

- CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> Spät aktivierte T<sub>Helfer</sub>-Zellen

- CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Zytotoxische T-Zellen

- CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> Naïve zytotoxische T-Zellen

- CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> Zytotoxische Effektor-T-Zellen

- CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> Zytotoxische Gedächtnis-T-Zellen

- CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> Früh aktivierte zytotoxische T-Zellen

- CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> Spät aktivierte zytotoxische T-Zellen

- CD19<sup>+</sup> B-Zellen

- CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK-Zellen

### 3 Spender, Patienten, Material und Methoden

Die Protokolle und die *Gating*-Strategien sind im Anhang unter F dargestellt.

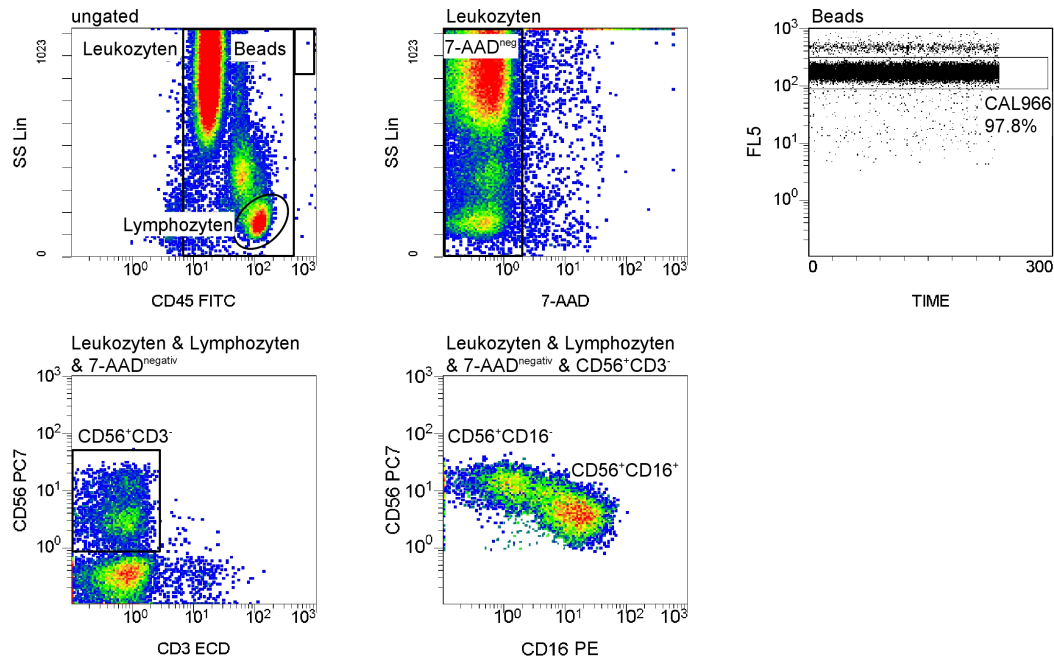
**Bestimmung der CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK-Zellen als »single-platform«-Analyse** Die Analyse der lebenden NK-Zellen wurde mit folgender Antikörperkonstellation durchgeführt: jeweils 10 µl CD45-FITC, CD16-PE, CD3-ECD, 7-AAD und CD56-PC7. In reverser Pipettieretechnik wurde zu dem Antikörpergemisch 100 µl Probe (entspricht 1- 2,5 ×10<sup>5</sup> Zellen) zugegeben. Die Ansätze wurden gevortext, um eine optimale Durchmischung zu erreichen, und 15 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde die Probe mit Hilfe der TQ-Prep<sup>™</sup> Workstation in Verbindung mit dem Immunoprep<sup>™</sup> Reagent System zur Lysierung der Erythrozyten und Fixierung eingesetzt. Flow Count Beads wurden 15 min vor Gebrauch gründlich gevortext und nach dem Lyseschritt wurde in reverser Pipettieretechnik ebenfalls 100 µl Beads der Probe zugeführt. Es erfolgte eine zeitnahe Messung am 5-Farb Durchflusszytometer (FC500). Das Protokoll der NK-Zell-Analyse und die *Gating*-Strategie ist in Abbildung 3.4 erläutert.

#### Bestimmung der Rezeptordichte auf NK-Zellen

Die Rezeptordichte konnte über die Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) abgelesen werden. Die MFI ist ein Maß für die Menge gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes pro Zelle. Antigen Expression beschreibende Begriffe sind z.B. »**bright**« für hell leuchtend. Dies steht für eine hohe Antigendichte auf den Zellen, wohingegen »**dim**« für gedämpft bei einer niedrigen Antigendichte auf der Zelloberfläche steht. Eine typische Darstellung der Antigendichte erfolgt üblicherweise mit Hilfe des Histogramm Plots (► Abb. 3.3 B). Der Histogrammplot stellt auf der x-Achse den Fluoreszenzkanal (im Beispiel FL3) gegen die Anzahl der Ereignisse (*events*) auf der Y-Achse dar. Die Ereignisse gleicher Fluoreszenzintensität werden addiert und man erkennt 2 Populationen, die positiv für CD56 sind. Der größere Anteil ist CD56<sup>dim</sup> und besitzt eine geringere MFI; der kleinere Anteil ist dementsprechend CD56<sup>bright</sup> und besitzt eine hohe Antigendichte für CD56. Der Histogramm Plot stellt visuell dar, wie hoch die Rezeptordichte auf der Zelloberfläche ist.

Zur Epitop-Quantifizierung der Rezeptordichte wurde das Simply Cellular<sup>®</sup> anti-Mouse IgG Kit (Bangs Laboratories) benutzt. Hierbei wird die Antikörper Bindungskapazität (ABC=*antibody binding capacity*) ermittelt. Die ABC ist die Anzahl von monoklonalen

### 3 Spender, Patienten, Material und Methoden



**Abbildung 3.4:** Die *Gating*-Strategie zur Bestimmung der lebenden  $CD56^{+}CD3^{-}$  NK-Zellen im Durchflusszytometer. Über jedem Diagramm (*density plot*), Dichteverteilung; rot=hohe Dichte, grün/gelb=mittlere Dichte, blau=geringe Dichte) ist angegeben, auf welche Zellpopulation sich dieses Diagramm bezieht (= *gating*). Das erste Plot ist ungated. Alle Ereignisse (= *events*) werden angezeigt. Über die Lymphozyten ( $CD45^{bright}SSC^{niedrig}$ ), über die gesamten Leukozyten ( $CD45^{+}$ ) und über die Beads ist eine Region gelegt. Das zweite Plot ist gated auf Leukozyten und es wird gezeigt, welche Leukozyten 7-AAD<sup>+</sup> (tote Zellen) und welche Zellen 7-AAD<sup>-</sup> (lebende Zellen) sind. Das dritte Plot ist gated auf die Beads und zeigt den Beadverlauf auf FL5 gegen die Zeit an. Der vierte Plot ist gated auf Leukozyten, Lymphozyten und 7-AAD<sup>-</sup> und zeigt nun die Schnittmenge dieser Populationen an. Der fünfte Plot ist gated auf Leukozyten, Lymphozyten, 7-AAD<sup>-</sup> und  $CD56^{+}CD3^{-}$  NK-Zellen. Es werden sozusagen die Zellen angezeigt, die alle Kriterien erfüllen  $CD45^{+}SSC^{niedrig}7-AAD^{-}CD56^{+}CD3^{-}$ . Diese Zellen werden in diesem Plot auf ihre CD56 sowie CD16 Expression charakterisiert und man erkennt die typische  $CD56^{bright}CD16^{-}$  immunregulatorische sowie die  $CD56^{dim}CD16^{+}$  zytotoxische NK-Zell-Fraktion.

### 3 Spender, Patienten, Material und Methoden

Antikörpern, die an einer Zelle bindet und dabei mit der Anzahl von Antigenen auf der Zelloberfläche korreliert. Jede Beadpopulation (► Abb. 3.5 A) ist einer unterschiedlichen ABC zugeteilt und reflektiert deren Menge an Antikörperbindungsfähigkeit.

**Ansetzen des Simply Cellular<sup>®</sup> anti-Mouse IgG Kit** Das zu messende Zellgemisch (aufgereinigte NK-Zellen) wurde auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Die benötigte Menge betrug  $5 \times 10^5$  Zellen in 500  $\mu$ l. Alle Ansätze wurden strengstens vor Licht geschützt und die Beads- wie auch die Zell- Ansätze wurden parallel am gleichen Tag mit den gleichen Zytometer Einstellungen vermessen. Das Pipettierschema ist in Tabelle 3.9 dargestellt. Allgemein wurden die Beads gründlich vor jedem Gebrauch gevortext. Die Blank Beads wurden nicht mit Antikörpern inkubiert. Die Bead Populationen 1 bis 4 mussten vor Antikörperinkubation zusammengeführt werden. Nachdem alle Antikörper mit den Beads und den Zellen zusammenpipettiert waren, wurden sie im Dunkeln bei RT für 30 min inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen entfernt (durch einen Zentrifugationsschritt bei 2500 g für 4 min, Überstand wurde verworfen) und die Beads bzw. die Zellen in 500  $\mu$ l PBS aufgenommen und vermessen. Es ergaben sich demnach 18 Proben, bestehend aus:

- einem Blank Beads Ansatz
- einer Iso Kontrolle
- 8 Ansätzen mit **Beads 1-4 + den jeweiligen Antikörpern**  
(NKp30, NKp44, NKp46, NKG2D, CD158a,h, CD158b1/b2,j, KIRp70, KARp50.3)
- 8 Ansätzen mit **NK-Zellen + den jeweiligen Antikörpern**  
(NKp30, NKp44, NKp46, NKG2D, CD158a,h, CD158b1/b2,j, KIRp70, KARp50.3)

Um die NK-Zellen genauer zu charakterisieren, wurde CD16 in PC5 und CD56 in PC7 der Analyse hinzugegeben. Somit wurde das Protokoll zum Messen der NK-Zellen wie folgt aufgebaut:

- FL1 (*frei*) - FL2 (Dichte PE-Ak) - FL3 (*frei*) - FL4 (CD16-PC5) - FL5 (CD56-PC7).

Das Protokoll zum Messen der Beads bestand lediglich aus:

- FL1 (*frei*) - FL2 (Dichte PE-Ak) - FL3 (*frei*) - FL4 (*frei*) - FL5 (*frei*)

Bei diesem Ansatz war nur die zweite Fluoreszenz sowie der FSC und der SSC erforderlich.



### 3 Spender, Patienten, Material und Methoden

**Tabelle 3.9: Pipettierschema Antigendichtebestimmung auf NK-Zellen.**

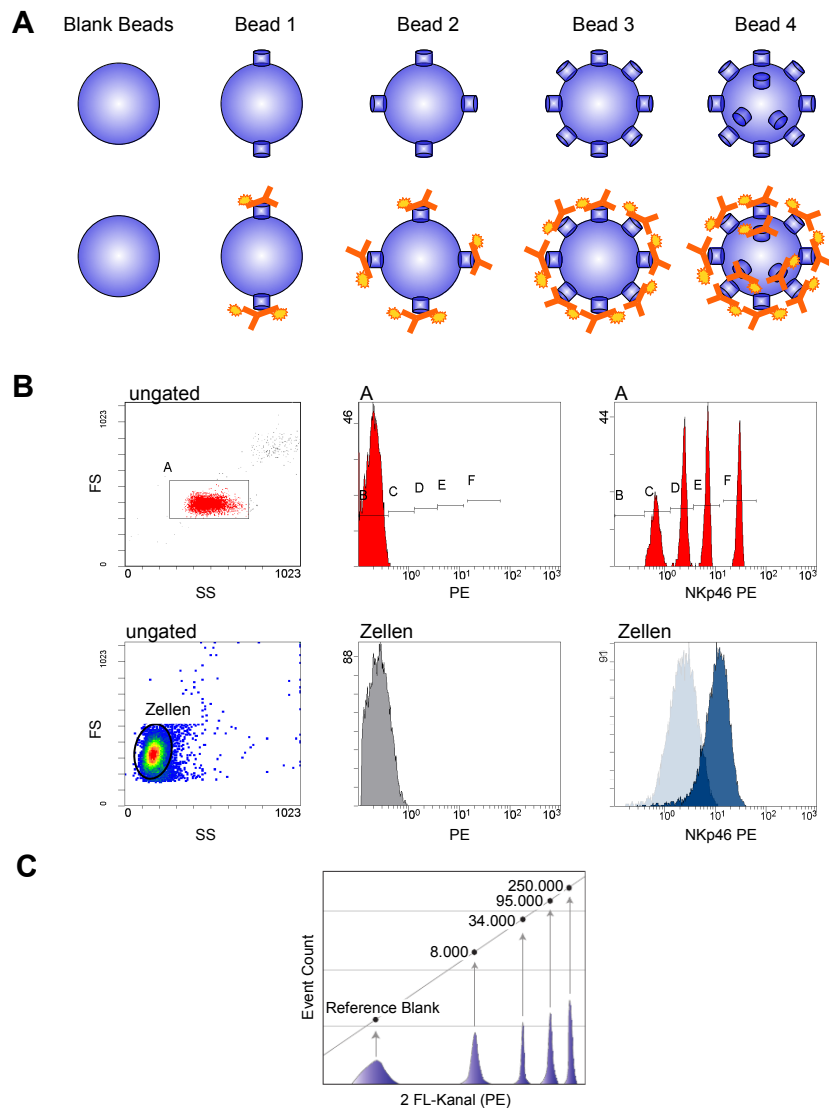
	Blank	Beads 1-4	Iso Zellen	Dichte Zellen
eingestellte Zellen in Medium	—	—	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
Beads Blank	50 $\mu$ l	—	—	—
Beads Röhrchen 1-4	—	je 25 $\mu$ l	—	—
PBS	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	—	—
jeweiliger PE-Dichte mAk	—	20 $\mu$ l	—	20 $\mu$ l
CD16 PC5, CD56 PC7	—	—	je 10 $\mu$ l	je 10 $\mu$ l
			Vortexen und 30 min dunkel bei RT inkubieren	
PBS	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
			Röhrchen bei 1100 U/min, 4 min zentrifugieren, Überstand verwerfen, vortexen	
PBS	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
			Röhrchen bei 1100 U/min, 4 min zentrifugieren, Überstand verwerfen, vortexen	
PBS	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml

Antikörper zur Dichtebestimmung waren NKp30, NKp44, NKp46, NKG2D, CD158a,h, CD158b1/b2,j, KIRp70 und KARp50.3. Ansätze mit den Bangs Beads 1-4 mussten für jeden Dichte Antikörper parallel angesetzt werden.

**Messen der Antigendichte** Es erfolgte eine zeitnahe Messung am 5-Farb Durchflusszytometer (FC500). Das Protokoll der Antigendichtemessung ist in Abbildung 3.5 dargestellt und erläutert.

Die Detektionsgrenze lag zwischen 700 und 1200 Antigenen pro Zelle. Das Maximum lag bei 250.000 Antigenen pro Zelle.

### 3 Spender, Patienten, Material und Methoden



**Abbildung 3.5: Prinzip und Messprotokoll der Rezeptordichte-Messung auf Zellen.** **A** Bei dem *Simply Cellular*<sup>®</sup> *anti-Mouse IgG*-Kit wird mit Latexpartikeln (Beads) gearbeitet, die 7-10 µm groß sind und durch Beschichtung unterschiedlich viele mAk binden können. Diese Methode dient der Epitop-Quantifizierung (Rezeptordichte; *antibody binding capacity=ABC*). Der mAk bindet spezifisch mit dem konstanten Fragment (Fc) des IgG an den Bead. Obere Reihe: 5 Beadpopulationen ohne Ak-Inkubation, untere Reihe: Beads nach Ak-Inkubation. **B** Durchflusszytometrisches Messprotokoll. 1. Plot: alle Beads (Blank, Beads 1-4), 2. Plot: Blank Beads in Bezug zum 2. Fluoreszenzkanal (PE). Blank Beads trugen kein PE Ak und gaben die minimale Detektionsgrenze (= *detection threshold*) an. 3. Plot: Beads 1-4 nach der Inkubation mit dem NKp46, Region C=Bead 1 (geringe Dichte), Region F=Bead 4 (höchste Dichte). 4. Plot: FSC/SSC Eigenschaften von aufgereinigten NK-Zellen. 5. Plot: Iso Kontrolle (NK-Zellen ohne Ak, Kontrolle unspezifischer Bindungen). 6. Plot: » *Overlay* «-Funktion, NK-Zellen, die NKp46 in hoher (transparent bläulich) und in sehr hoher Dichte (dunkelblau) auf der Oberfläche trugen. **C** Standardkurve (Fluoreszenzintensität gegen die Ak Bindungskapazität jeder Bead Population). Daher ließ sich der ABC-Wert jeder anderen gefärbten Zelle ermitteln. Hierbei wurde der gleiche Ak zum Inkubieren der Zellen verwendet und die Bead Ansätze wurden parallel zu den Zellansätzen bearbeitet. Bead 1 bindet 8.000 mAk (Bead 4=250.000 mAk).

## Zytotoxizitäts-Test

**Für Suspensionszelllinien** Die Zytotoxizitätsbestimmung erfolgte durch einen durchflusszytometrischen Assay. Aufgereinigte NK-Zellen werden in den Effektor : Target Konzentrationen (1:1, 5:1, 10:1, 20:1) in Sarstedtröhrchen gegen die Target Zelllinien (K-562, ► Kap. 3.4.6) eingesetzt und über 4 h bei 37 °C in CO<sub>2</sub>-Atmosphäre miteinander inkubiert. Sowohl für Ziel- als auch für Effektorzellen werden Kontrollen pipettiert. Die Erstellung der Kokultur-Ansätze erfolgt mit reverser Pipettieretechnik, um Volumenabweichungen geringstmöglich zu halten. Zur Markierung der Target Zelllinie K-562 wurde CD45 in PC7 eingesetzt. Die Effektorzellen konnten durch den CD56 Marker klar beurteilt werden, weil K-562 negativ für CD56 ist. Die Färbung toter Zellen erfolgt mittels Propidiumiodid. Weiterhin wurde CD14 eingesetzt, um bei einer Monozytenverunreinigung NK-Zellen von Monozyten unterscheiden zu können. Die Konzentrationsbestimmung der jeweiligen Zellpopulationen erfolgt über einen internen Zählstandard (Flow-Count<sup>®</sup> Fluorospheres). Eine Probe der Kontrollen wird vor Inkubation vermessen, um die genauen Startkonzentrationen der Zellen in den Reaktionsansätzen und die Spontanveränderungen der Kontrollen über die Inkubationszeit zu berechnen. Nach Inkubation erfolgt die Probenaufbereitung und die Messung sowohl der Kokulturen als auch der Kontrollen. Die Auswertung erfolgt unter Ausblendung aller toten Zellen. Ziel- und Effektorzellen werden anhand ihrer Streulicht- und Fluoreszenz-Eigenschaft eingegrenzt und ihre Konzentration bestimmt. Aus den Ergebnissen können die Konzentrationsänderungen der verschiedenen Populationen in den Kokulturen nach folgender Formel berechnet werden:

$$c[\%] = \frac{c \text{ Kontrolle}_{\text{nach Inkubation}}}{c \text{ Kontrolle}_{\text{vor Inkubation}}} - \frac{c \text{ Kokultur}_{\text{nach Inkubation}}}{c \text{ Kokultur}_{\text{vor Inkubation}}} \cdot 100$$

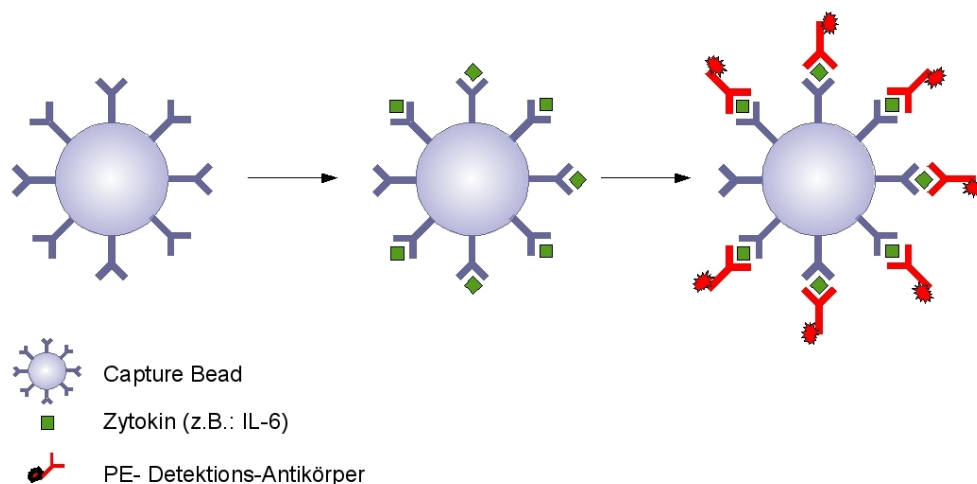
c=Konzentration, Kontrolle=K-562 allein [Zellen/ml], Kokultur=NK + K-562 [Zellen/ml].

Es handelt sich hierbei um die Messung der Abnahme lebender Zellen. Diese Netto-Abnahme der lebenden K-562 Zellen (Zielzellen) als Prozent der Ausgangspopulation abzüglich der Spontantoten entspricht der zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen (Effektorzellen) (Zimmermann et al. 2005).

**Für adhärenzte Zelllinien** Basierend auf dem Zytotoxizitätsassay für Suspensionszelllinien (► Kap. 3.4.7) wurde der Assay weiterentwickelt, um ihn ebenfalls bei soliden Tumoren speziell für Neuroblastome einsetzen zu können. Im Gegensatz zu den Suspensionszelllinien gestaltet sich der Einsatz von adhärenzten Zellen für den Zytotoxizitätsassay äußerst schwierig, da sie im flowzytometrischen Ansatz auch möglichst für den Zeitraum der Zytotoxizitätsmessung vereinzelt vorliegen müssen. Die adhärenzten Zellen werden, wie im Kapitel 3.4.6 beschrieben, mit Trypsin-Lösung von der Kulturflasche abgelöst. Durch starkes Resuspendieren mittels Pipettor und durch kontinuierliches Schütteln auf dem Schüttler (250 rpm bei 37 °C) für einige Minuten lagen die Zellen vereinzelt vor. Nach einem Zentrifugationsschritt (400 g, 10 min) wurde das Zell-Pellet mit PBS gewaschen und mit DNase I mit Reaktionspuffer (100 mM Tris-HCl, pH 7,6; 25 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM CaCl<sub>2</sub>) für 15 min bei 37 °C auf dem Schüttler (250 rpm) behandelt. Die DNase Reaktion vermeidet das Verklumpen von Zellen. Diese Reaktion wurde durch Zugabe von 50 mM EDTA (Calciumchelatbildner) abgeblockt. Die vereinzelt vorliegenden UKF-NB-3 Zellen wurden in X-Vivo10-Medium (+ 5% hitzeinaktiviertes humanes Plasma, 50 mM EDTA) überführt und auf eine Zellkonzentration von  $2,5-5 \times 10^5$ /ml eingestellt. Auch in diesem Assay werden NK-Zellen in den Effektor:Target Konzentrationen (1:1, 5:1, 10:1, 20:1) in Sarstedtröhrchen gegen die Target Zelllinie UKF-NB-3 (► Kap. 3.4.6) eingesetzt und über 4 h bis 8 h bei 37 °C in CO<sub>2</sub>-Atmosphäre miteinander inkubiert. Anders als bei dem Zytotoxizitätsassay mit Suspensionszellen erfolgte die Inkubationszeit unter konstantem Schütteln (250 rpm), um die Zellen in Suspension zu halten. Nach 4 bzw. 8 h Inkubationszeit wurden die Zellen erneut für 15 min mit DNase I behandelt, um die durch die zytotoxische Reaktion freigewordene DNA und die durch Adhäsion von Zellbruchstücken entstandene Reaktion zu lösen. Zur Markierung der Target Zelllinie UKF-NB-3 wurde CD9 in FITC verwendet. Die Effektorzellen konnten in diesem Assay nicht mit CD56 markiert werden, da UKF-NB-3 ebenfalls den NK-Zell-typischen Marker auf der Oberfläche trägt. Die Trennung erfolgte über die CD45 Eigenschaft, da NK-Zellen den Panleukozytenmarker stark und UKF-NB-3 negativ für CD45 ist (Klöss et al. 2007).

### 3.4.8 Untersuchung der zellulären Zytokinausschüttung mittels Cytometric Bead Array und ELISA

Bei dem Cytometric Bead Array (CBA) handelt es sich um einen flowzytometrisch-basierten Assay, der ähnlich eines ELISAs (*enzyme linked immunosorbent assay*) einen Sandwich-Komplex bildet. Die zu bestimmenden Zytokine binden an sogenannte Capture Beads. Diese Capture Beads können aufgrund ihrer Fluoreszenz-Intensität flowzytometrisch unterschieden werden und besitzen auf ihrer Oberfläche spezifische Antikörper für das jeweilige Zytokin. Nach Bindung des Zytokins an den spezifischen Capture Bead wird durch einen spezifischen PE-markierten Detektions-Antikörper ein Intensitätssignal messbar und anhand einer Eichgerade kann quantitativ die Konzentration errechnet werden (► Abb. 3.6).



**Abbildung 3.6: CBA Immunoassay.** Capture Bead + zu messendes Zytokin + spezifischer Antikörper in PE-Markierung ergibt einen Sandwich-Komplex.

Dieses Verfahren ermöglicht das Messen von bis zu 20 Zytokinen gleichzeitig und ist weiterhin geeignet in der Pädiatrie, da es nur 50 µl Probenvolumen benötigt.

Zytokine und Chemokine werden aus gewonnenen Zellkulturüberständen der unstimulierten NK-Zellen, der IL-2 stimulierten NK-Zellen sowie aus EDTA-Plasmen und Seren der Studienpatienten vermessen. Es wurde das Flex Set verwendet, welches FasL, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IP-10, MCP-1,

### 3 Spender, Patienten, Material und Methoden

MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, TNF- $\alpha$  und TNF- $\beta$  beinhaltet. Genauere Informationen zur Wirkweise, Funktion und Literatur über bekannte Konzentrationen im peripheren Blut beim Menschen sind im Anhang G.1 in tabellarischer Form zusammengefasst.

#### Probensammlung und Aufbewahrung

Durch Zentrifugation (bei 400 g, 5 min) gewonnene Zellkulturüberstände der unstimulierten sowie der IL-2 stimulierten NK-Zellen wurden in Kryo-Röhrchen pipettiert und bei -80 °C eingefroren. Die Zellen waren eingestellt auf  $1 \times 10^6$ /ml. Sie wurden am Tag der CBA Messung aufgetaut und der übriggebliebene Rest wurde verworfen.

Die EDTA-Proben der Studienpatienten wurden nach Blutabnahme zeitnah zentrifugiert (bei 1650 g, 5 min). Das gewonnene EDTA-Plasma wurde ebenfalls in Kryo-Röhrchen pipettiert und bei -80 °C eingefroren. Serumproben benötigten keinen Zentrifugationsschritt und wurden direkt in Kryo-Röhrchen pipettiert und bei -80 °C eingefroren.

#### Ansetzen des Flex Sets

Zuerst wurden die Standards jedes Zytokins im *Assay Diluent* gelöst und es wurde eine sogenannte Top Standard-Lösung hergestellt. Sie beinhaltete von jedem Zytokin 5000 pg/ml. Aus diesem Top Standard wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt, bestehend aus 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 und 1:256.

Es folgte das Ansetzen der *Capture Beads*. Capture Beads mussten vor Gebrauch gut gevortext werden, damit die Beads homogen in der Lösung verteilt vorlagen. Danach wurde je nach zu vermessender Probenanzahl 1  $\mu$ l pro Test entnommen und auf 50  $\mu$ l pro Test mit *Capture Bead Diluent* verdünnt. Bei dem Vorhaben, eine 96-well Platte zu vermessen, wurden demnach 96  $\mu$ l aus jedem der 19 spezifischen Capture Beads Gefäße entnommen und eine sogenannte »*mixed Capture Bead*«-Lösung hergestellt. Das errechnete Probenvolumen würde sich errechnen:  $96 \times 50 \mu\text{l} = 4800 \mu\text{l}$ . Da es allerdings zu Pipettierverlusten kommt und man noch Reserve Beads für die tägliche Geräteeinstellung benötigt, wurde anstatt auf 4800  $\mu$ l auf 5200  $\mu$ l mixed Capture Beads mit Capture Bead Diluent aufgefüllt. Capture Beads wurden bis zum Ansetzen der 96-well Platte im Kühlschrank und im Dunkeln aufbewahrt.

Als letztes wurde das PE-Detektionsreagenz (= *PE-Detection Reagent*) hergestellt. Dies

### 3 Spender, Patienten, Material und Methoden

erfolgt in gleicher Weise wie die Capture Beads. Je nach zu vermessender Probenanzahl wurde 1 µl pro Test entnommen und auf 50 µl pro Test mit *PE-Detection Reagent Diluent* verdünnt. Bei einer 96-well Platte wurden 96 µl aus jedem der 19 spezifischen PE Detection Reagent Gefäße entnommen und eine sogenannte »*mixed PE Detection Reagent*«-Lösung hergestellt. Auch die PE Detection Reagent Lösung wurde bis zum Ansetzen der 96-well Platte im Kühlschrank und im Dunkeln aufbewahrt.

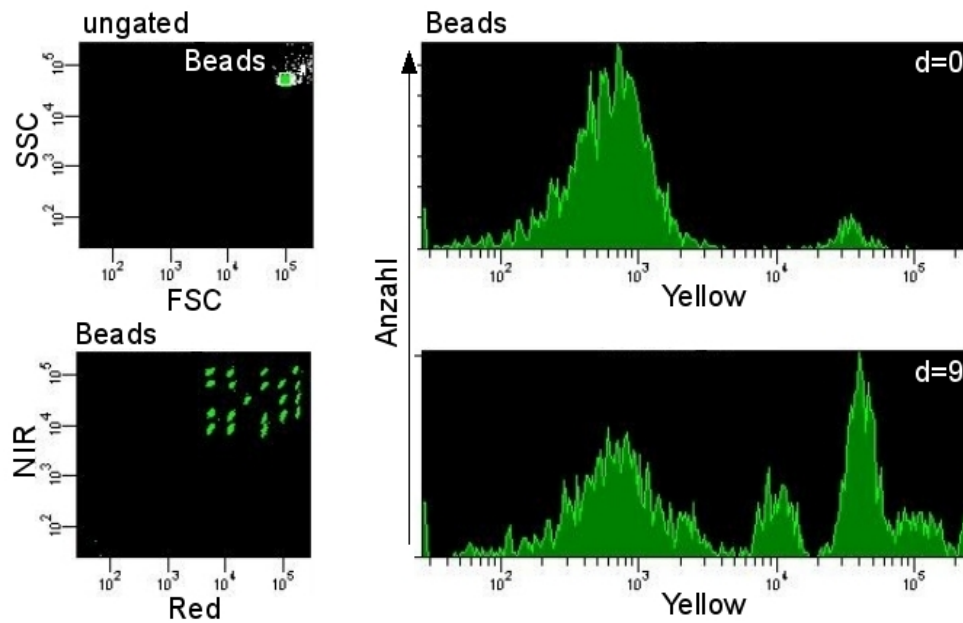
Es folgte das Zusammenfügen von je 50 µl der Standardverdünnungen (mit 0, 20, 40, 80, 156, 312, 625, 1250, 2500 und 5000 pg/ml) und der Proben (je 50 µl pro Well) mit den hergestellten *mixed Capture Beads* (ebenfalls je 50 µl/Well) in einer 96-Well Platte. Die Platte wurde 5 min auf den Schüttler gestellt und danach erfolgte eine Inkubation im Dunkeln, ruhend für 1 h bei RT. Danach wurden je 50 µl *mixed PE Detection Reagent*-Lösung in jedes Well pipettiert. Die Platte wurde 5 min auf den Schüttler gestellt und danach erfolgte eine Inkubation im Dunkeln, ruhend für 2 h bei RT. Darauf folgte ein Waschschritt, um überschüssige PE-Antikörper zu entfernen. Hierbei wurden 100 µl Wasch Puffer in jedes Well pipettiert, zentrifugiert (200 g, 5 min), Überstand verworfen und anschließend die entstandenen Sandwich-Komplexe (*Capture Bead* + Zytokin + PE-Detektion Antikörper, ► Abb. 3.6, rechts) in 150 µl resuspendiert. Die 96-Well Platte war nun bereit zum Messen und wurde bis dahin im Dunkeln bei RT aufbewahrt.

#### Messen des Flex Sets

Die Messung der Zytokine erfolgte mit dem BD FACSArray™ der Firma Beckton Dickinson. Die hierfür verwendete Messsoftware war BD™ FACSArray System Software. Beispielfhaft ist in Abbildung 3.7 das flowzytometrische Protokoll dargestellt.

#### Auswerten

Das Auswerten der Zytokindaten erfolgte mit der BD FCAP Array™ (Vs 1.0.1) Software. In dieser Software wurde den Bead IDs eine Bezeichnung zugeordnet. Diese ergab sich wie in Tabelle 3.10 gezeigt.



**Abbildung 3.7:** Die *Gating*-Strategie zur quantitativen Bestimmung der Zytokine/Chemokinen mit Hilfe des CBA Flex Sets im Durchflusszytometer. Im Cytometric Bead Array (CBA) werden Zytokine/Chemokine quantitativ im Serum bestimmt, indem sie an sogenannte Capture Beads binden und mit PE-Antikörpern einen sogenannten Sandwich Komplex bilden. Alle Capture Beads bilden eine Einzel Bead Population, wenn man sie im FSC (*forward scatter*=Größe) gegen den SSC (*side scatter*=Seitwärtsstreulicht) betrachtet (links oben). Über sie ist eine Region *Beads* gesetzt und diese Region *Beads* wird genauer im Plot links unten betrachtet (=gated). Aufgrund der unterschiedlichen Fluoreszenzintensität der 20 Bead Populationen können diese beim Auftragen der Fluoreszenz *Near InfraRed* (NIR) gegen die Fluoreszenz *Red* unterschieden werden (links unten). Durch die PE-Markierung konnte durch den Fluoreszenzkanal *Yellow*, welcher den sogenannten Reporter Parameter darstellt, über die Intensität die Konzentration jedes einzelnen Beads berechnet werden. Die Plots rechts stellen exemplarisch die Ergebnisse des Reporter Parameters von unstimulierten (rechts oben) und stimulierten (rechts unten) NK-Zell-Überständen dar. Sie zeigen die Summation aller Bead-Intensitäten. Die Auswertsoftware ist in der Lage, für jede einzelne der 20 Bead Populationen die Intensität und daraus resultierende Konzentration der jeweiligen Zytokine/Chemokine zu errechnen.

**Tabelle 3.10:** Bead Verteilung CBA Flex Set

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	-	-	-	IL-2	IL-4	-	IL-6	-	IL-8
B	-	-	-	IL-1 $\beta$	IP-10	-	IL-10	IFN- $\gamma$	MIP-1 $\alpha$
C	-	-	-	-	-	FasL	-	G-CSF	GM-CSF
D	-	-	-	RANTES	IL-3	-	TNF- $\beta$	MCP-1	TNF- $\alpha$
E	-	-	-	MIP-1 $\beta$	IL-12p70	-	IL-13	-	-

A-E und 1-9 geben die Positionen des Capture Bead-Zytokin/Chemokin Sandwich Komplex im Flowzytometer an, die sich aus der Fluoreszenzintensität des jeweiligen Capture Beads ergibt (► Abb. 3.7 links unten).



### 3 Spender, Patienten, Material und Methoden

Mit Hilfe der sigmoid verlaufenden 4 parametrischen Funktion errechnete die Software für jedes Zytokin eine Standardkurve anhand der Fluoreszenzintensität.

$$y = D + \frac{A - D}{1 + \left(\frac{\log x}{C}\right)^B}$$

$y$ =Intensität,  $x$ =Konzentration in pg/ml,  $A$ =minimal erreichbarer Effekt (untere Asymptote der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung,  $B$ =Steigung der sigmoiden Kurve,  $C$ =Wendepunkt und  $D$ =maximal erreichbarer Effekt (obere Asymptote der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung).

Die Standardkurve reichte von 0 bis 5000 pg/ml, Werte über 5000 pg/ml wurden von der Auswertsoftware automatisch extrapoliert. Die Messsensitivität reichte von 0,2 bis 14,7 pg/ml.

#### 3.4.9 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen bei Effektor:Target Interaktionen

Die visuelle Kontrolle von Effektor (NK-Zellen) : Target (UKF-NB-3 Zellen) Interaktionen erfolgte zum einen mit einem Auflichtmikroskop (Carl Zeiss) und zum anderen mit einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus). Zur Aufnahme wurde eine Digital Kamera (Nikon) verwendet.

#### 3.4.10 KIR- und HLA-Typisierung

Die HLA- und KIR Typisierung der verschiedenen klinisch eingesetzten NK-Zell-Spender wurde von hierfür autorisierten Mitarbeitern im DRK-Blutspendedienst Hessen / Baden-Württemberg in Frankfurt durchgeführt. Bei der KIR Typisierung wurde eine PCR-basierte Sequenz spezifische Primer Methode verwendet, um die An- bzw Abwesenheit von 17 KIR Genen (KIR2DL1-5, KIR3DL1-3, KIR2DS1-5, KIR2DS1, KIR2DP1, und KIR3DP1) zu detektieren. Die HLA-Typisierung wurde mit Hilfe einer Sequenz spezifischer Primer und einem Sequenz-basierten Typing durchgeführt.

### 3.4.11 Statistische Methoden

Für den statistischen Vergleich der Rezeptordichte und den Vergleich der Zytokinproduktion von »**unstimulierten**« versus »**stimulierten**« NK-Zellen wurde GraphPad Prism (Version 4.0) (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) verwendet. Abhängig von der Normalverteilung wurde der Mann-Whitney Rangtest oder der Student *t*-Test für paarweise angeordnete Messwerte verwendet. Unterschiede wurden als signifikant betrachtet, wenn  $p < 0.05$  und dies wurde mit einem \* kenntlich gemacht.

Bei der beschreibenden Statistik der Lymphozytensubpopulationen von Kindern und jungen Erwachsenen wurde ein kontinuierliches Regressionsmodell etabliert. Das 3-parametrische Exponential-Modell wurde gewählt, um die Abhängigkeit der Absolutzellzahl in Bezug zum Alter darzustellen:

$$f(t) = c + b0 \cdot (1 - e^{b1 \cdot t})$$

$f(t)$ =Funktion in Abhängigkeit von der Zeit (Alter),  $c$ =Schnittpunkt mit der y-Achse,  $e$ =eulersche Zahl  $\approx 2,718$  und  $t$ =Zeit (Alter).

Die Entwicklung des stetigen Exponentialmodells ist genauer in Kapitel 4.3.2 dargestellt und erläutert. Für das Datenmanagement und die Datenanalyse wurde SAS System Software (Version 9.1) verwendet. Die Referenz Intervalle wurden mit Hilfe der BiAS für Windows Anwendungssoftware (Version 8.2) errechnet. Zum Generieren der Grafiken wurde GraphPad Prism (Version 4.0) und GIMP (Version 2.2) verwendet.

Die retrospektiven statistischen Untersuchungen der Überlebenswahrscheinlichkeit wurden mittels Kaplan-Meier Schätzung vorgenommen. Hierfür wurde ebenfalls das Statistikprogramm GraphPad Prism verwendet.

# 4 Ergebnisse

## 4.1 In vitro Untersuchungen der NK-Zellen

NK-Zellen, die im Labormaßstab aufgereinigt wurden, dienten regelmäßig der Qualitätskontrolle zur Einstellung und Überprüfung aller Methoden.

NK-Zellen, die im klinischen Maßstab aufgereinigt wurden, stammten aus Validierungsläufen (Spender A, B) sowie von den allogenen Spendern (Spender C, D, E) der klinischen NK-Zell-Amendment-Studie und wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit als »Begleitmonitoring« zur Studie charakterisiert und funktionell untersucht.

### 4.1.1 Isolierung primärer humaner NK-Zellen

#### **Aufreinigung mit dem RosetteSep im Labormaßstab**

Zur Anreicherung von NK-Zellen im kleineren Maßstab wurde die RosetteSep Technik angewendet, bei der die unerwünschten Zellen depletiert wurden und die gewünschten NK-Zellen *untouched* vorlagen. Im Vollblut gesunder erwachsener Spender befinden sich im Median  $0,3 \times 10^6$ /ml NK-Zellen (Normwertbereich von  $0,09$  bis  $0,6 \times 10^6$ /ml). Mittels RosetteSep Technik konnte eine mittlere Ausbeute von  $44 \pm 19$  % erreicht werden. Die Reinheit der  $CD56^+CD3^-$  NK-Zellen betrug nur  $74 \pm 10$  %. Für Funktionalitätsassays (Zytotoxizitätsassay, Zytokinausschüttung) und Phänotypisierung wurde ein Minimum von absolut  $5 \times 10^6$  NK-Zellen benötigt. Um diese Zellzahlen zu erreichen, benötigte man je Spender unterschiedlich viel peripheres Blut (von 25 bis zu 125 ml). Wenn man von einer mittleren Ausbeute von 40 % ausgeht, lag das benötigte periphere Blut (PB) im Median bei 40 ml.

#### **Aufreinigung mit dem CliniMACS im klinischen Maßstab**

Zur Anreicherung von NK-Zellen im klinischen Maßstab wurde das CliniMACS System verwendet. Bei dem Ausgangsmaterial handelte es sich um unstimulierte Leukapheresate.

## 4 Ergebnisse

Bei den für den klinischen Einsatz bestimmten Leukapheresaten von Spender C, D und E wurden 2 Leukapheresen mit einem medianen Blutvolumen von 18,2 l pro Leukapherese an zwei aufeinander folgenden Tagen mit einer durchschnittlichen Pheresedauer von 4 h 35 min durchgeführt. In direktem Anschluss erfolgte am Abend die jeweilige CD3 Depletion und am Tag 3 wurden die CCBs der zwei CD3 Depletionen vereinigt und eine CD56-Selektion durchgeführt. Mittels CliniMACS Technologie konnte eine mittlere Ausbeute von 58,8 % (42,0 - 75,6 %) CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK-Zellen erzielt werden. Die Reinheit der CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK-Zellen betrug 77 bis 96 % (n=5). Bestehende Verunreinigungen waren auf restliche Antigen-präsentierende Zellen ( $\leq 25$  % Monozyten,  $\leq 3$  % myeloide DZ (mDZ) und  $\leq 0,3$  % plasmazytoide DZ (pDZ)) zurückzuführen. Der verbliebene T-Zell-Anteil war kleiner als 0,12 %. Die mediane Vitalität der NK-Zellen nach dem Aufreinigungsprozess gemessen mit dem 7-AAD Vitalfarbstoff war  $> 85$  %. Insgesamt dauerte die Herstellung eines NK-Zellpräparates mit 2 CD3 Depletionen und einer CD56-Selektion unter GMP-Bedingungen 17-22 h. Die Ergebnisse der einzelnen Aufreinigungsschritte ausgehend vom Leukapheresat bis zur NK-Zell-Selektion der klinischen Läufe ist in Tabelle 4.1 dargestellt.

**Tabelle 4.1: Ergebnisse der klinischen NK-Zell-Aufarbeitung für die Neuroblastom Patienten 1 bis 3.**

	WBC [10 <sup>9</sup> ]	CD56 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> [%] [10 <sup>6</sup> ]		CD56 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> [%] [10 <sup>6</sup> ]		CD3 <sup>+</sup> [%] [10 <sup>6</sup> ]		CD14 <sup>+</sup> [%]	mDZ [%]	pDZ [%]
<b>Spender C</b>										
Leukapheresat	50,8	7,1	3589	2,36	1195	57,4	29151	17,1	n.a.	n.a.
nach CD3 Depl.	19,4	16,4	3163	0,018	3,4	0,027	5,3	41,8	n.a.	n.a.
nach CD56 Sel.	2,9	91,0	2538	0,073	2,2	0,077	2,3	9,5	2,53	0,21
<b>Spender D</b>										
Leukapheresat	52,8	2,8	1459	0,45	240	54,0	28500	18,5	0,51	0,26
nach CD3 Depl.	19,9	6,4	1266	0,023	4,7	0,060	12	45,1	1,08	0,62
nach CD56 Sel.	0,8	73,5	610	0,097	0,8	0,110	0,9	22,9	2,57	0,29
<b>Spender E</b>										
Leukapheresat	22,8	12,9	2929	2,54	578	40,9	9300	29,3	n.a.	n.a.
nach CD3 Depl.	10,1	24,2	2442	0,04	3,9	0,13	13	51,2	n.a.	n.a.
nach CD56 Sel.	1,6	96,1	1567	0,13	2,2	0,03	0,5	2,9	1,0	0,11

WBC=*white blood cells* (Leukozyten), Depl.=Depletion, Sel.=Selektion, mDZ=myeloide dendritische Zellen, pDZ=plasmazytoide dendritische Zellen.

### 4.1.2 Expansion primärer humaner NK-Zellen

Nach der Isolierung wurden die NK-Zellen in Kultur genommen und stimuliert. Zur Aktivierung und Expansion der NK-Zellen wurde Interleukin-2 (Proleukin<sup>®</sup>S, Aldesleukin, gentechnisch aus *E. coli* K12 hergestellt) verwendet. IL-2 wurde in einer Konzentration von 1000 U/ml eingesetzt. Die absolute Ausgangszellzahl der CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK-Zellen lag im Bereich  $0,6 - 2,5 \times 10^9$  Zellen. Die größte Verunreinigung wurde durch Monozyten verursacht, wobei diese unter der Expansion verloren gingen. Die Kultivierung wurde in sogenannten VueLife<sup>™</sup> Zell-Kultur-Beuteln (von CellGenix) vorgenommen, die für die klinische Zell-Kultivierung unter GMP zugelassen sind.

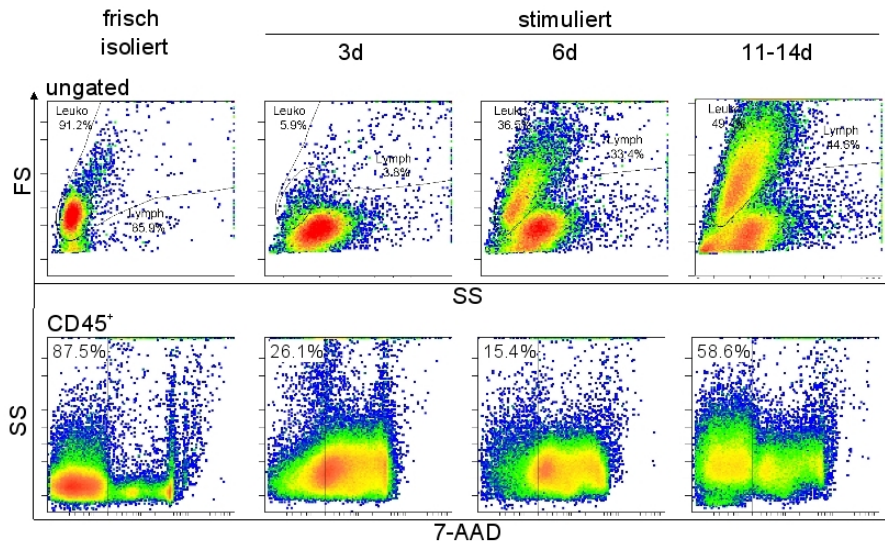
#### Expansionsrate und Vitalität

Die aufgereinigten NK-Zellen wurden bis zu 14 Tage expandiert. Es war deutlich zu beobachten, dass das Umsetzen der frisch isolierten NK-Zellen in IL-2 Medium zuerst einmal mit einem großen Vitalitätsverlust einherging. Dies ist graphisch anhand der 7-AAD Färbung in Abbildung 4.1 exemplarisch dargestellt.

Dass viele der NK-Zellen in Apoptose gingen, war weiterhin gekennzeichnet durch eine große Population, die ab Tag 3 deutlich im FS<sup>klein</sup>SS<sup>gering</sup> nach FS<sup>sehr klein</sup>SS<sup>zunehmend</sup> wanderte. Dieses Zellschrumpfen des Zytoplasmas ist ein morphologisches Charakteristikum der Apoptose. Weiterhin weisen früh apoptotische Zellen eine erhöhte Intensität des *side scatter* Signals auf, das wahrscheinlich die Chromatin und Zytoplasma Kondensation sowie die Kernfragmentierung widerspiegelte (Ormerod et al. 1995, Swat et al. 1991). Bei spät apoptotischen Zellen sah man wiederum eine Verringerung der Lichtstreuung (deutlich erkennbar am Plot Tag 11-14, Population ganz links unten). Weiterhin wurde beobachtet, dass apoptotische Zellen ihre Rezeptoren von der Oberfläche herunterregulierten. Das fiel z.B. beim CD56 Molekül auf (► Kap. 4.1.3). Dieses Phänomen wurde gerade in den ersten Tagen nach Inkulturnahme deutlich und erschwerte die Auswertung. Ab Tag 6 stabilisierte sich die Vitalität und die Zellen zeigten eine gute Expansion, welche sich in Form von großen NK-Zell-Clustern im Mikroskop widerspiegelte. Da bei der Kultivierung unter GMP-Bedingungen immer Medium hinzugegeben wurde, aber kein Waschschrift erfolgte, fanden sich an den Tagen 11-14 immer noch tote Zellen im Medium. Die expan-

## 4 Ergebnisse

dierten Zellen, die ihre Marker stabil auf der Oberfläche trugen, zeigten jedoch eine hohe Vitalität ( $> 55\%$ ).



**Abbildung 4.1: Durchflusszytometrische Vitalitätsmessungen von NK-Zellen im Verlauf der IL-2 Expansion.** Die linke Spalte zeigt die frisch isolierten NK-Zellen, 2. bis 4. Spalte zeigt die NK-Zellen nach 3, 6 bzw. nach 11-14 Tagen in Kultur. Der obere Verlauf zeigt die FS gegen SS Eigenschaft der NK-Zellen. Es ist deutlich zu erkennen, dass die NK-Zellen granulärer unter Kultivierung werden. Der untere Verlauf stellt die Vitalität der NK-Zellen dar. Die Aufnahme der NK-Zellen in IL-2 Medium führte zunächst zu einem großen Vitalitätsverlust (hoher Anteil 7-AAD<sup>+</sup> Zellen (=tote Zellen)) mit einem Maximum nach 3 Tagen. Die Vitalität stabilisiert sich zunehmend nach 6 Tagen, an Tag 11-14 ist ein geringerer Anteil 7-AAD<sup>+</sup> Zellen zu sehen, während der Anteil 7-AAD<sup>-</sup> Zellen (lebende Zellen) deutlich zugenommen hat.

Nach 14 Tagen erreichten die NK-Zellen eine im Median 5-fache Expansionsrate, die über flowzytometrische *single platform*-Analyse ermittelt wurde. Es gab spenderabhängige Schwankungen der Expansionsrate von 1,5- bis 9-fach. Da expandierende NK-Zellen eine typische Clusterstruktur aufwiesen und diese Clusterstrukturen schwer zu vereinzeln waren, ist die Expansionsrate in der durchflusszytometrischen Analyse unterschätzt, da diese Technik keine genaue Berechnung von Zellclustern erlaubte.

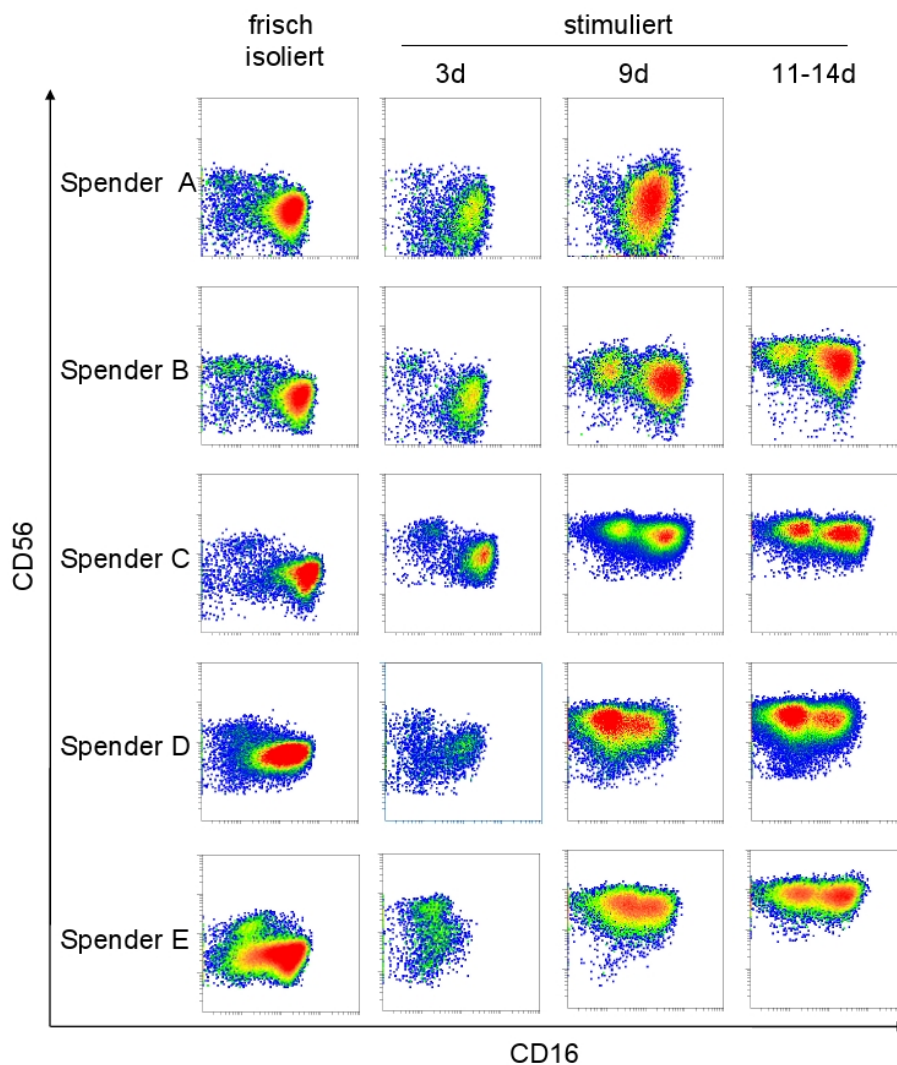
### 4.1.3 Untersuchung der Rezeptorveränderungen unter IL-2

#### Stimulierung

##### Verhältnis der CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> zu CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> NK-Zell-Subpopulation

Die flowzytometrische Analyse der CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK-Zell-Subpopulationen nach Aufreinigung und während der 14-tägigen Kultivierung ist in Abbildung 4.2 dargestellt. Die frisch isolierten, unstimulierten NK-Zellen setzen sich wie in der Literatur beschrieben aus < 10 % CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> von 2,3 bis 7,1 % immunregulatorischen und > 90 % CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> von 92,9 bis 97,7 % zytotoxischen NK-Zellen zusammen. Da die Expression von CD56 unter Expansion anstieg, war keine Unterscheidung in »CD56<sup>dim</sup>« und »CD56<sup>bright</sup>« mehr möglich. Bei der *Gating*-Strategie bezogen auf CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> erfolgte die Unterscheidung allein durch den CD16 Marker. Die Nomenklatur wurde hierbei für die CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> NK-Zellen zu CD16<sup>negativ</sup> und CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> NK-Zellen zu CD16<sup>positiv</sup> angepasst. Die Verteilung veränderte sich signifikant unter IL-2 Kultivierung. Am Tag 9 variierte die Verteilung für die CD16<sup>-</sup> Population von 1,2 % bis 63,5 % und für die CD16<sup>+</sup> von 36,5 % bis 98,8 %. Sehr deutlich erkennbar war weiterhin der Vitalitätsverlust an Tag 3, der mit dem Herunterregulieren von Rezeptoren, in diesem Fall CD56 und CD16, einherging. Zusammenfassend kann man sagen, dass die anfänglich homogene Verteilung der NK-Zell-Subpopulationen in Bezug zu CD16 und CD56 Expression sich spenderabhängig unterschiedlich unter Expansion entwickelte. Während die Spender B bis E deutlich eine CD16<sup>negativ</sup> Population zeigten, fehlte diese fast völlig bei Spender A. Während die Spender B, C und E eine größere CD16<sup>+</sup> NK-Zell-Population nach 14 Tagen zeigten, war dieses Verhältnis genau umgekehrt bei Spender D. Die kultivierten NK-Zellen von Spender A zeigten weitere Auffälligkeiten: keine Expressionserhöhung von CD56 unter Kultivierung und im Vergleich zu den anderen Spendern geminderte Vitalität der NK-Zellen einhergehend mit diffuser Morphologie (Verlust der kompakten Cluster-Aggregatform).

## 4 Ergebnisse



**Abbildung 4.2: Durchflusszytometrisches Monitoring der NK-Zellen in Bezug auf ihre CD56 und CD16 Expression unter IL-2 Expansion.** Die dargestellten *density plots* sind auf CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK-Zellen gated und stellen die große Varianz der Spender NK-Zellen in Bezug zu ihrer CD16 Expression dar. Während die NK-Zellen von Spender A fast ausschließlich CD16<sup>+</sup> NK-Zellen unter der Expansion zeigten, findet man bei allen anderen Spendern CD16<sup>+</sup> und CD16<sup>-</sup> NK-Zell-Subpopulationen, allerdings in verschiedener Zusammensetzung. Weiterhin wird erkennbar, dass die typische Einteilung der NK-Zellen in CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> Population unter IL-2 Einfluss verlorenght, da die CD56 Expression auf beiden Populationen ansteigt und schließlich dasselbe Niveau erreicht.



### Veränderung der Rezeptordichte des NKG2D

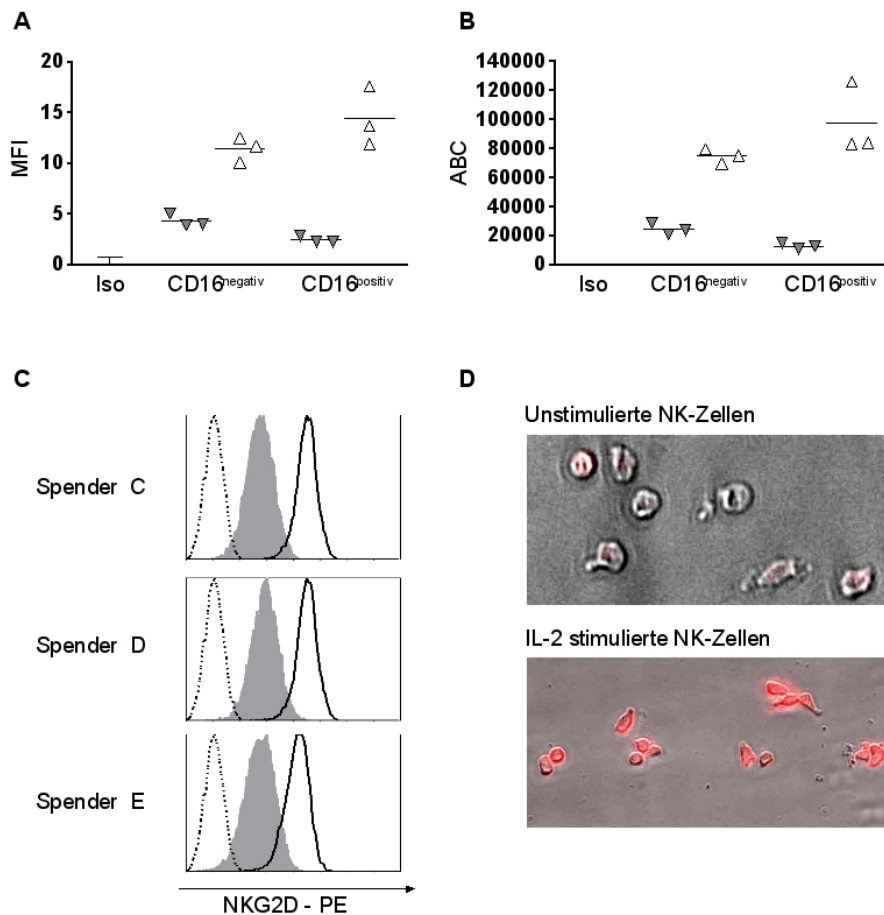
Die nun folgende Auswertung der Rezeptordichte wurde separat für die CD16<sup>negativ</sup> und die CD16<sup>positiv</sup> NK-Zell-Population vorgenommen. Mit Hilfe des Durchflusszytometers konnte die NKG2D Rezeptordichte von unstimulierten NK-Zellen mit der von IL-2 stimulierten NK-Zellen verglichen werden. Der Vergleich zeigte, dass unstimulierte NK-Zellen den NKG2D auf der Oberfläche trugen, ihn aber ausnahmslos unter IL-2 Stimulierung signifikant höher regulierten (► Abb. 4.3 A-C). Die CD16<sup>negativ</sup> NK-Zellen regulierten im Median den NKG2D Rezeptor um das 4-fache hoch, wohingegen die CD16<sup>positiv</sup> NK-Zellen eine 10-fache Hochregulierung erreichten. Die Zunahme des NKG2D wurde visuell mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes bestätigt (► Abb. 4.3 D). Zusammenfassend zeigten alle Spender NK-Zellen eine deutliche Hochregulierung des NKG2D unter IL-2 Stimulierung, wobei die CD16<sup>positiv</sup> NK-Subpopulation die höchste NKG2D Hochregulierung aufwies.

### Veränderung der Rezeptordichte der Natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren

Die Expression der aktivierenden Zytotoxizitätsrezeptoren (NCR) direkt nach NK-Zellaufreinigung sowie nach 9 Tagen IL-2 Stimulierung ist separat für die CD16<sup>negativ</sup> und für die CD16<sup>positiv</sup> NK-Zell-Subpopulation in Abbildung 4.4 A und B gezeigt. Die NK-Zellen von Spender A und B zeigten schon nach NK-Zellaufreinigung eine deutliche Expression von NKp30, NKp44 und NKp46. Bei Spender B konnte die Expressionsdichte von NKp30 und NK44 durch den Stimulus IL-2 noch erhöht werden. Dagegen erreichte man auf den NK-Zellen von Spender A nur eine geringe Hochregulierung der NCRs nach 9 Tagen IL-2 Aktivierung. Die unstimulierten NK-Zellen von Spender C, D und E zeigten dagegen keine NKp44 Expression. Für NKp30 und NKp46 konnte bei den unstimulierten NK-Zellen von Spender C und D ebenfalls keine oder nur eine geringe Expression nachgewiesen werden, während Spender E für beide NCRs eine deutlich höhere Expression zeigte. Diese waren aber niedriger im Vergleich zu den unstimulierten NK-Zellen von Spender A und B. Unter IL-2 Stimulierung zeigten die NK-Zellen von Spender C, D und E am Tag 9 eine deutliche Hochregulierung aller NCRs.

Zusammenfassend war eine deutliche Zunahme der NCRs nach 9 Tagen IL-2 Stimulierung messbar, wobei die CD16<sup>negativ</sup> NK-Zell-Population eine geringfügig höhere Dichte

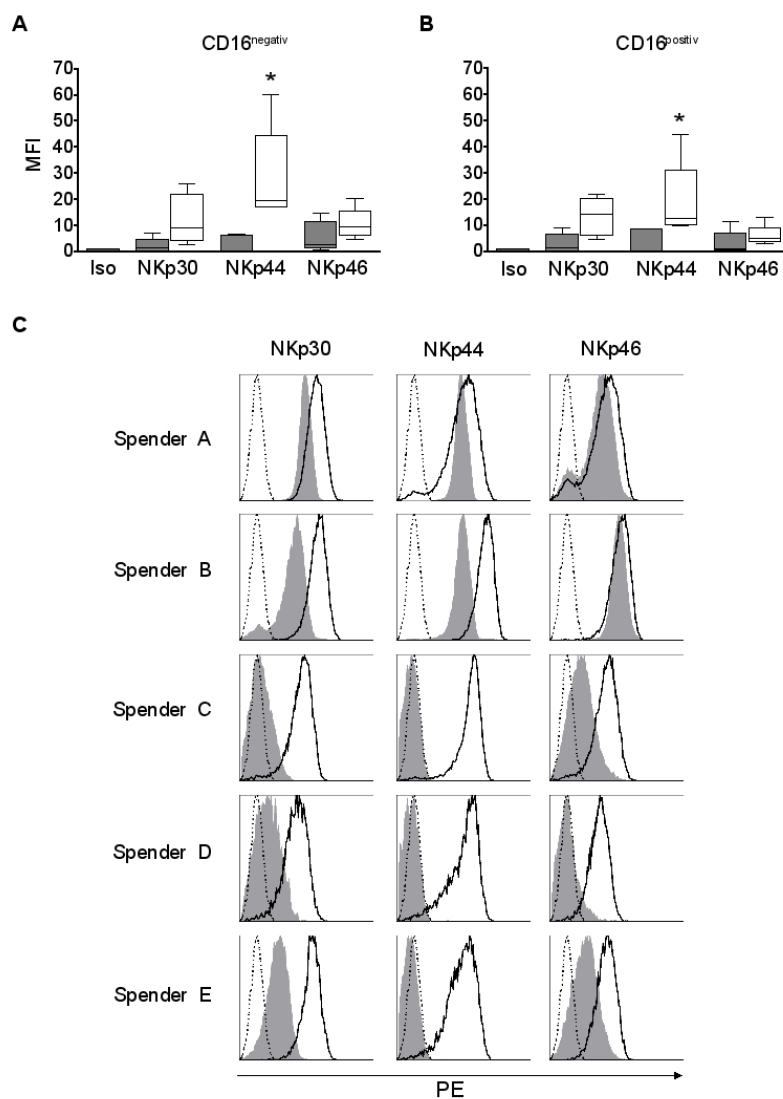
## 4 Ergebnisse



**Abbildung 4.3: Durchflusszytometrischer und immunhistologischer Vergleich der NKG2D Rezeptordichte von unstimulierten versus IL-2 stimulierten NK-Zellen.** Das Symbol der (▼) steht für die unstimulierten, wohingegen die (△) für die IL-2 stimulierten NK-Zellen steht. **A** veranschaulicht die Zunahme der NKG2D Rezeptordichte gemessen anhand der MFI (*mean fluorescence intensity*) und **B** zeigt dies mit Angabe der ABC (*antibody binding capacity*) gleichbedeutend mit der Epitopdichte. Die CD16<sup>positiv</sup> NK-Zell-Subpopulation reguliert den NKG2D im Vergleich zur CD16<sup>negativ</sup> Subpopulation um durchschnittlich 20.000 Epitope höher. Dies ist in **C** anhand der Histogramm-Plots verdeutlicht. Das Hochregulieren des Rezeptors NKG2D auf NK-Zellen ist visuell in **D** bestätigt. Die gepunktete Linie (···) in **C** entspricht der negativen Isotype Kontrolle. Die grau schattierte Kurve (■) entspricht den frisch isolierten NK-Zellen, wohingegen die schwarze Linie (—) den IL-2 stimulierten NK-Zellen am Tag 9 entspricht. In allen Versuchen (flowzytometrisch und immunhistologisch) wurde mit dem NKG2D in PE (rotfluoreszierend) gefärbt.

## 4 Ergebnisse

an NCRs im Vergleich zur CD16<sup>positiv</sup> NK-Zell-Population präsentierte. Die größte Hochregulierung unter IL-2 zeigte der Rezeptor NKp44 auf den NK-Zellen.



**Abbildung 4.4: Durchflusszytometrischer Vergleich der NCR Rezeptordichten von unstimulierten versus IL-2 stimulierten NK-Zellen.** Anhand der MFI (*mean fluorescence intensity*) wird die Zunahme der NCR (NKp30, NKp44, NKp46) Rezeptordichte mit Hilfe der grauen Box-Whisker-Plots für unstimulierte und der weißen Box-Whisker-Plots für IL-2 stimulierte NK-Zellen dargestellt (n=5). In **A** ist dies für die CD16<sup>negativ</sup> NK-Zell-Subpopulation und **B** für die CD16<sup>positiv</sup> NK-Zell-Subpopulation gezeigt. Histogramm-Plots in **C** sind gated auf CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> und stellen die Zunahme der NCR Dichte auf den NK-Zellen von 5 gesunden Spendern (A-E) dar. Die gepunktete Linie (···) entspricht der negativen Isotype Kontrolle. Die grau schattierte Kurve (■) entspricht den frisch isolierten NK-Zellen, wohingegen die schwarze Linie (—) den IL-2 stimulierten NK-Zellen am Tag 9 entspricht. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) sind durch \* gekennzeichnet und sind gezeigt für NKp44.

### Veränderung der Rezeptordichte und der Proportion der Killer Immunoglobulin-like Rezeptoren

Aussagen über die KIRs auf NK-Zellen wurden über KIR-Genotypisierung und über durchflusszytometrische Messungen zur Bestimmung des KIR Repertoires getroffen, da jeder Spender ein unterschiedliches KIR Repertoire aufwies.

**Tabelle 4.2: KIR und HLA Typisierung der Spender und Empfänger.**

		KIR															HLA						
		2	2	2	2	2	2	3	3	3	2	2	2	2	2	3	2	3	A*	B*	Bw	C*	Cw
		D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D						
		L	L	L	L	L	L	L	S	S	S	S	S	S	S	P	P						
		1	2	3	4	5	5	1	2	3	1	2	3	4	5	1	1	1					
		a b																					
A	▲	△	△					▲				△		—				0101,0201	1402,5101	B4/B6	0802,1402	C1/C1	
B		△						▲				△		▲				0227,0301	5001,5801	B4/B6	0602,0701	C1/C2	
C	△			▲				—			△			—				0201,0201	1402,4001	B6/B6	0304,0802	C1/C1	
D	△			▲				△			△			—		△		0101,3101	0801,0801	B4/B4	0701,0701	C1/C1	
E	▲	△	△					▲				△		—				0201,0201	0702,4403	B4/B4	0702,1601	C1/C1	
1																		0201,0201	2705,4001	B6/B6	0304,0102	C1/C1	
2																		2402,3101	0801,4501	B4/B6	0701,1601	C1/C1	
3																		0201,0201	0702,4427	B4/B4	0702,0704	C1/C1	

Die Tabelle zeigt die genotypische Existenz der *killer cell immunoglobulin-like receptors* (KIRs) der einzelnen Spender (A bis E) sowie der Patienten (1-3) durch die graue Hintergrundfläche (linke Spalten) und die Ergebnisse der HLA Typisierung (rechte Spalten). Die ausgefüllten und die nicht ausgefüllten Dreiecke stehen für die KIRs, die durch flowzytometrische Messungen auf ihre Dichte hin untersucht worden sind. Nicht ausgefüllte Dreiecke stehen für eine Gruppe von KIRs, wohingegen das ausgefüllte Dreieck für einen eindeutig zuordnenbaren KIR steht. Da mAk zur Detektion der KIRs nur die Oberflächenstruktur der Rezeptoren erfassen und es KIRs gibt, die sich nur durch ihre intrazellulären Strukturen unterscheiden, konnte nur im Zusammenspiel mit der Genotypisierung eine eindeutige Zunahme der Dichte bestimmter KIRs unter IL-2 Stimulierung (gekennzeichnet durch ▲) festgestellt werden. Ein (—) symbolisiert, dass dieser KIR zwar genotypisch vorhanden war, aber nicht auf der Zelloberfläche exprimiert wurde.

Flowzytometrisch können dabei nur KIR Gruppen detektiert werden. Weiterhin ist bekannt, dass nicht alle KIRs, die im Genom vorhanden sind, letztendlich auch auf der Zelloberfläche exprimiert werden.

Da aktivierende und inhibitorische KIRs sich nur im Zellinneren anhand ihrer ITIMs

## 4 Ergebnisse

(»*long tails*«) und ITAMs (»*short tails*«) unterscheiden, war es mit einer Zelloberflächenmarkierung mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper nicht möglich, aktivierende und inhibierende KIRs zu unterscheiden. Mit einer KIR-Genotypisierung (► Tab. 4.2) ließ sich dies jedoch konkretisieren.

Detektiert man mit einem mAk wie z.B. CD158a,h den **KIR2DL1** und den **KIR2DS1**, war es zusammen mit der Typisierung möglich, z.B. bei Spender A festzustellen, dass nur der KIR2DL1 hochreguliert wurde, da er den KIR2DS1 per Genom nicht besaß. Bei allen 5 Spendern konnte gezeigt werden, dass unter IL-2 Stimulierung mindestens 1 inhibierender KIR hochreguliert wurde (► Tab. 4.2).

Bei Spender B kam es zusätzlich zum Hochregulieren eines aktivierenden KIRs. Weiterhin wurde sichtbar, dass es KIRs per Genom gab, die gar nicht auf der Zelloberfläche detektiert wurden. Dies trat im Falle des KIR2DS4 (Spender A, C und D) und des KIR3DL1 (Spender C) auf.

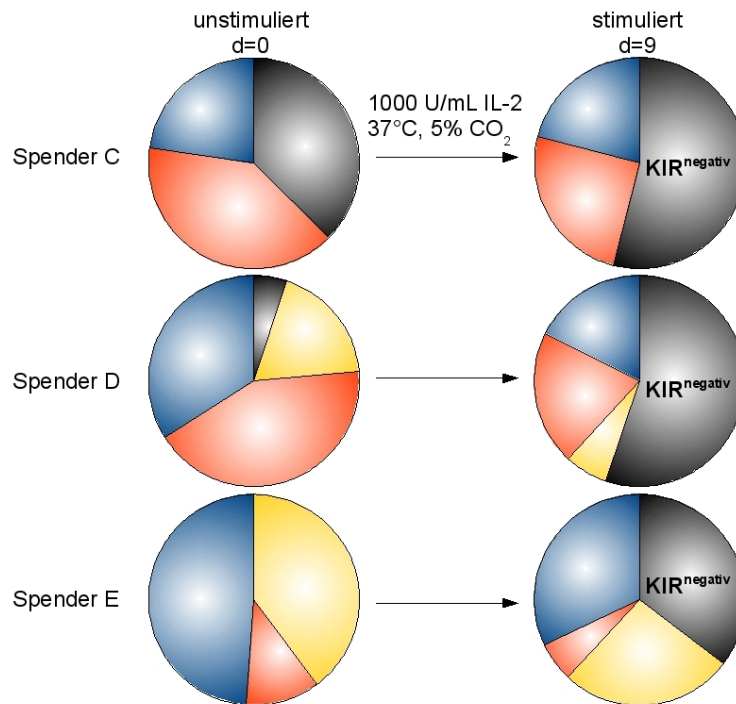
Auf unstimulierten NK-Zellen tragen 86 % (63-100 %) der CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK-Zellen KIRs (► Abb. 4.5), allerdings mit großen Unterschieden zwischen Spender C, D und E.

Unter IL-2 Stimulierung konnte beobachtet werden, dass ein größer werdender Anteil der NK-Zellen nach 9 Tagen überhaupt keine KIRs mehr auf der Oberfläche trug. Bei Spender C und D sogar über 50 % der NK-Zellen. Der Anteil an KIR<sup>+</sup> NK-Zellen lag nun bei 44 % (44-65 %).

Interessanterweise zeigte sich dieses Phänomen in den Untergruppen CD16<sup>negativ</sup> und CD16<sup>positiv</sup> gegenläufig. Die CD16<sup>negativ</sup> NK-Zellen vergrößerten ihre Anteile an KIR<sup>positiv</sup> NK-Zellen, ganz im Gegensatz zur CD16<sup>positiv</sup> Fraktion.

Zusammenfassend wächst demnach durch die 9-tägige IL-2 Stimulierung die KIR<sup>negativ</sup> Proportion signifikant an, wohingegen die Epitopdichte der NK-Zellen, die KIRs auf der Zelloberfläche trugen, höher wurde.

## 4 Ergebnisse

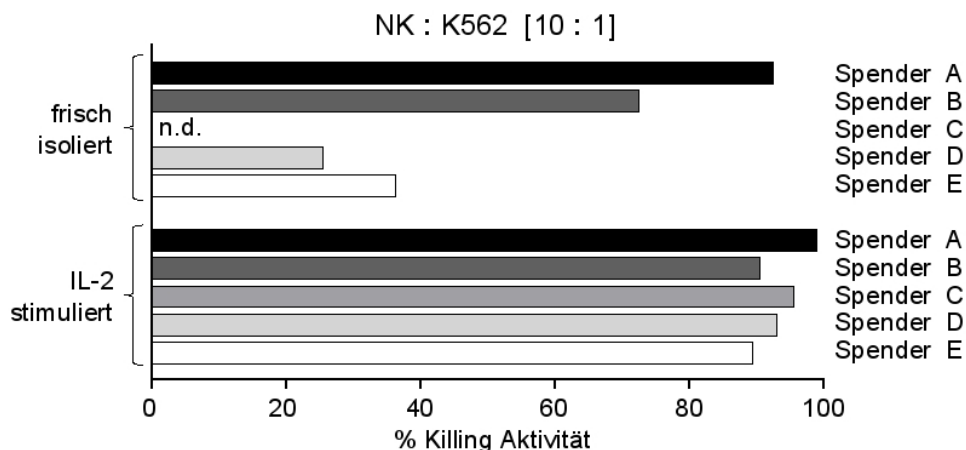


**Abbildung 4.5: Veränderungen der KIR Proportionen unter IL-2 Kultivierung.** Auf unstimulierten NK-Zellen trägt die überwiegende Mehrheit an  $CD56^+CD3^-$  NK-Zellen KIRs auf der Zelloberfläche, allerdings mit deutlichen Unterschieden zwischen den Spendern C, D und E. Nach IL-2 Stimulierung steigt bei allen Spendern der Anteil an NK-Zellen, die keine KIRs tragen, deutlich an. Da mit mAk nur die Oberflächenstruktur von KIRs erfasst werden, detektiert man KIR Gruppen, wie CD158a,h (■; bestehend aus KIR2DL1, KIR2DS1), CD158b1/b2,j (■; bestehend aus KIR2DL2, KIR2DL3 und KIR2DS2) oder CD158e1/e2 (■; bestehend aus KIR3DL1, KIR3DS1). Die 100 % stehen für die gesamte  $CD56^+CD3^-$  NK-Zell-Population. Es ist deutlich erkennbar, dass eine sogenannte  $KIR^{negativ}$  Subpopulation (■) entsteht bzw. sich vergrößert.

#### 4.1.4 Untersuchung der Funktionalität

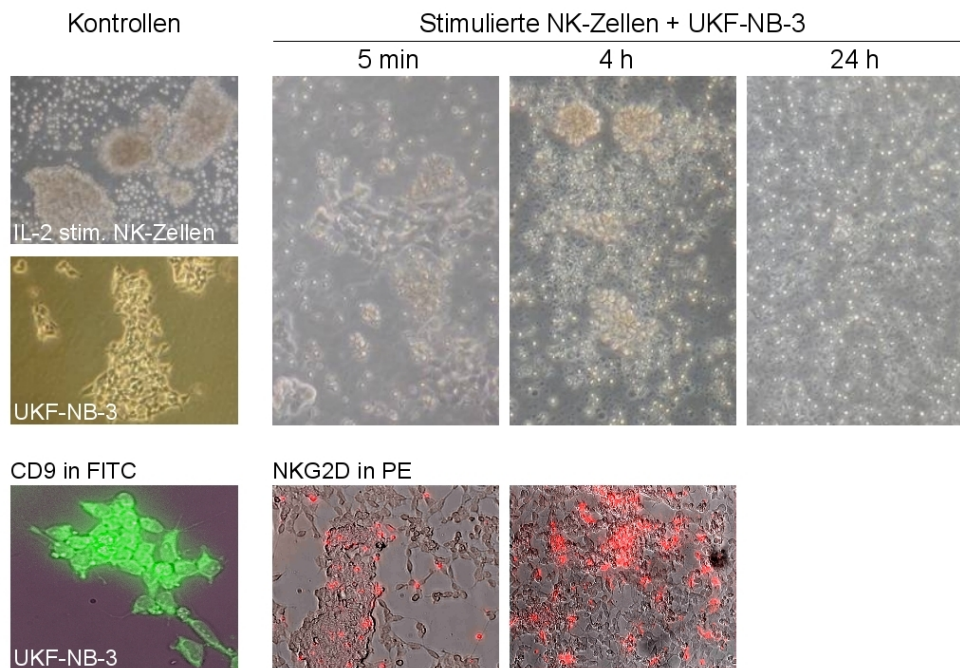
##### Zytotoxische Aktivität

Die zytotoxische Aktivität gegenüber der MHC<sup>negativ</sup> Zelllinie K-562 von frisch isolierten NK-Zellen im Vergleich zu IL-2 stimulierten NK-Zellen ist für alle Spender in Abbildung 4.6 gezeigt. Durch die IL-2 Stimulierung erreichten die NK-Zellen eine hohe Lyseaktivität. Interessanterweise zeigte auch hier Spender A eine Sonderrolle, da seine unstimulierten NK-Zellen bereits nach der Aufreinigung eine hohe zytotoxische Aktivität aufwiesen. Die zytotoxische Aktivität der IL-2 stimulierten NK-Zellen wurde ebenfalls gegen die Neuroblastom Zelllinie UKF-NB-3 getestet (mediane zytotoxische Aktivität 45 % bei einer 10:1 Ratio). Auch hier zeigte Spender A bereits nach Aufreinigung ein hohes zytotoxisches Potential, ganz im Gegensatz zu den anderen Spendern, die eine wesentlich geringere Aktivität aufwiesen. Neben dem flowzytometrischen Zytotoxizitätsassay wurde die zytotoxische Aktivität auch visuell am Mikroskop kontrolliert (► Abb. 4.7). Durch eine Fluoreszenzmarkierung mit CD9 zur Detektion von Neuroblastom Zellen und NKG2D zur Detektion von NK-Zellen konnte beobachtet werden, dass die NK-Zellen bereits schnell an ihre Target Zellen adhärirten und diese innerhalb weniger Stunden (4 bis 8 h) vollständig lysierten.



**Abbildung 4.6: Zytotoxische Aktivität von unstimulierten versus IL-2 stimulierten NK-Zellen gegenüber K-562.** Frisch isolierte NK-Zellen zeigten eine große Spannbreite in der zytotoxischen Aktivität gegenüber K-562 Zellen (25 bis über 95 %). Durch die IL-2 Stimulierung konnte die Killing Aktivität gleichmäßig auf über 90 % gesteigert werden.

## 4 Ergebnisse



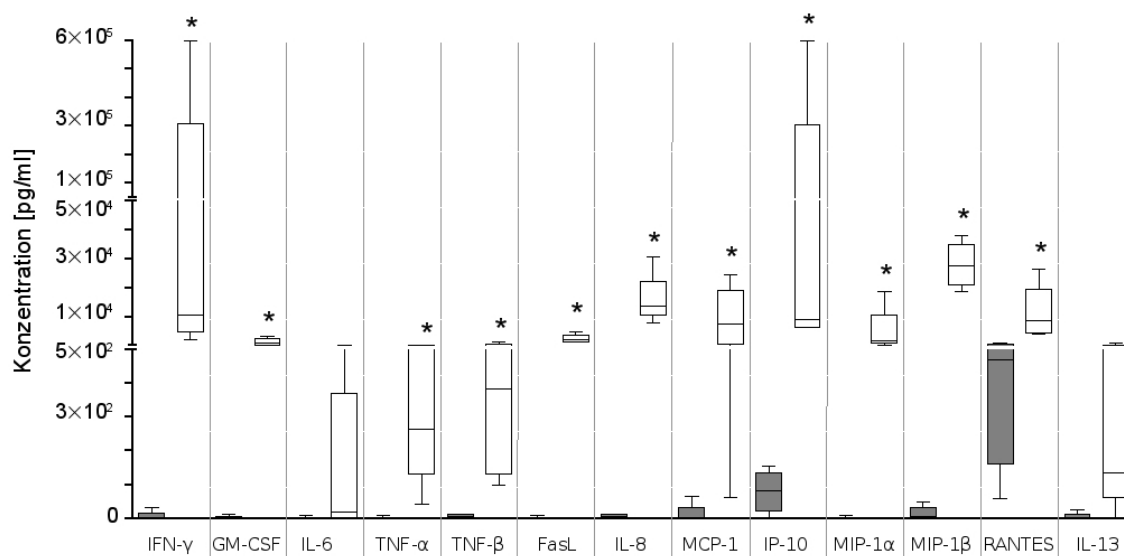
**Abbildung 4.7: Visuelle Kontrolle der zytotoxischen Aktivität von IL-2 stimulierten NK-Zellen gegen UKF-NB-3.** Unter “Kontrollen” sind die IL-2 stimulierten NK-Zellen und die UKF-NB-3 als Monokulturen dargestellt. Die UKF-NB-3 ist zusätzlich mit CD9 in FITC (grünfluoreszierend) dargestellt. In den Kokulturansätzen (Effektor zu Target Ratio 10:1) sind die NK-Zellen mit NKG2D in PE gegengefärbt (rotfluoreszierend, untere Zeile). Ein frühes Adhärenzverhalten (bereits nach 5 min) von NK-Zellen an die Neuroblastomzellen wurde festgestellt (obere Zeile). Nach 24 Stunden waren kaum noch lebensfähige UKF-NB-3 Zellen morphologisch sichtbar. Aber auch die NK-Zellen veränderten ihr typisches Clusterverhalten nach dem zytotoxischen Angriff und zeigten danach morphologisch nur noch Einzelverbände, was auf eine Erschöpfung ihrerseits hindeutete.

### Zytokinproduktion unter Stimulierung

Es wurden neben proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  (z.T. auch IFN- $\gamma$ ), chemotaktische Peptide wie MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES und Wachstumsfaktoren wie G-CSF und GM-CSF gemessen. Um die Zytokinausschüttung von unstimulierten zu IL-2 stimulierten NK-Zellen vergleichen zu können, wurde die Zellzahl auf  $1 \times 10^6$ /ml eingestellt. Die Interpretation der gemessenen Werte für IL-2 wurde nicht vorgenommen, da IL-2 selbst schon Bestandteil der Aktivierung war. Die Zytokinausschüttung wurde am Tag 0 (unstimulierte NK-Zelle) und am Tag 9 (IL-2 stimulierte NK-Zellen) bestimmt.



## 4 Ergebnisse

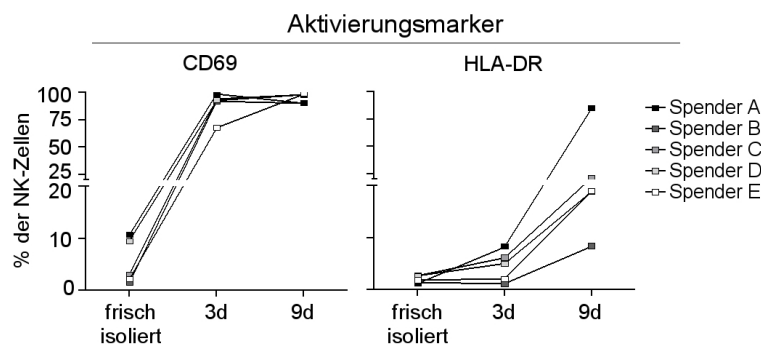


**Abbildung 4.8: Vergleich der Zytokinausschüttung von unstimulierten versus IL-2 stimulierten NK-Zellen.** Graue Box-Whisker-Plots stehen für die unstimulierten NK-Zell-Überstände der Spender A bis E. Die weißen Box-Whisker-Plots stellen die IL-2 stimulierten NK-Zellen am Tag 9 zusammenfassend dar. Um auch untere Konzentrationsbereiche aufzuzeigen, ist die y-Achse dreigeteilt und unterschiedlich skaliert (0-500, 501-50.000, 50.001-600.000 pg/ml). Signifikante Unterschiede ( $p < 0.05$ ) sind durch \* gekennzeichnet. Es war keine Zytokinsekretion für IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-12p70 und G-CSF messbar.

Nach der NK-Zell-Selektion lag außer für RANTES, IP-10, MCP-1 und IFN- $\gamma$  keine spontane Zytokinausschüttung vor. Durch die IL-2 Stimulierung kam es zu einer sehr hohen Zytokinausschüttung von IFN- $\gamma$ , IP-10 und MIP-1 $\beta$ , gefolgt von IL-8, GM-CSF, MIP-1 $\alpha$ , RANTES und FasL (► Abb. 4.8). Bei der Dominanz der CD16<sup>negativ</sup> NK-Zell-Population von 64 % bei Spender D wurden hohe Werte für IL-6, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IP-10, IFN- $\gamma$ , GM-CSF, RANTES und IL-13 gemessen. Im Gegensatz zeigte Spender A, der so gut wie keine CD16<sup>negativ</sup> NK-Zell-Population (1,2 %) durch die IL-2 Stimulierung entwickelte, die absolut höchsten IFN- $\gamma$  und FasL Spiegel im Überstand der IL-2 stimulierten NK-Zellen. Zusammenfassend zeigte die Zytokinsekretion keinerlei Anzeichen eines Funktionalitätsverlustes. Sie bestärkte durch die Sekretion von zytotoxiziätsassoziierten Zytokinen wie IFN- $\gamma$ , FasL, TNF- $\alpha$  und TNF- $\beta$  den potentiellen Wert von IL-2 stimulierten NK-Zellen.

### Regulierung von Aktivierungs- und “Qualifikations“-Oberflächenmarkern

Um eine Aussage über den Aktivierungszustand von NK-Zellen zu erhalten, wurden die Oberflächenmarker CD69 (frühe Aktivierung), HLA-DR (späte Aktivierung) und CD25 auf NK-Zellen bestimmt. Der frühe Aktivierungsmarker CD69 war initial nur bei Spender A und B vertreten. Unter der IL-2 Stimulierung wurde CD69 maximal auf allen NK-Zellen hochreguliert (► Abb. 4.9). Auch hier zeigten die NK-Zellen von Spender A eine Sonderrolle. Diese zeigten eine Art »Voraktivierung« mit mehr als 10 % CD69 auf NK-Zellen ohne Stimulierung sowie nach 9 Tagen die höchste HLA-DR Expression mit über 80 % auf CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK-Zellen, wohingegen die anderen Spender eine wesentlich geringere HLA-DR Hochregulierung zeigten.



**Abbildung 4.9: Aktivierungsmarker auf der NK-Zelloberfläche im Verlauf der IL-2 Stimulierung.** Der Aktivierungsstatus ist gezeigt durch CD69 als frühen Aktivierungsmarker (links) und durch HLA-DR als verzögerter Aktivierungsmarker (rechts). Für alle Spender NK-Zellen ist dies an frisch isolierten NK-Zellen sowie im Verlauf der Kultivierung an Tag 3 und Tag 9 gezeigt. Um die unteren Aktivierungsbereiche aufzuzeigen, ist die y-Achse zweigeteilt und unterschiedlich skaliert (0-20, 21-100%).

CD25 war bei den NK-Zellen aller Spender nach der Aufreinigung minimal exprimiert, aber da CD25 den IL-2 Rezeptor der  $\alpha$ -Kette darstellt, war nach 9 Tagen IL-2 Stimulierung dieses Antigens zu über 90 % auf der NK-Zell-Oberfläche vertreten. Desweiteren wurden die Adhäsionsrezeptoren CD62L (=L-Selektin) und CCR7 bestimmt. Beides sind »*Homing*«-Rezeptoren, die verantwortlich für das Eintreten in den Lymphknoten sind. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass stimulierte NK-Zellen die Expression für CD62L und CCR7 verloren und somit auch die Fähigkeit den Lymphknoten zu durchdringen.

## 4.2 In vivo Untersuchungen nach allogener NK-Zell-Applikation

IL-2 stimulierte, hochaufgereinigte NK-Zellen der allogenen Spender C, D und E (Charakterisierung und Funktionalität dieser NK-Zellen, ► Kap. 4.1) wurden im Rahmen einer klinischen Phase I/II Studie zur Immuntherapie von 3 Patienten mit Neuroblastom IV (► Tab. 3.2, Nr. 1 bis 3) nach haploidenter SZT transfundiert. Alle 3 Patienten wurden zunächst nach NB-2004-HR-Protokoll therapiert. Es folgte das NB-Rezidiv Protokoll mit autologer SZT und nach erneutem Rezidiv wurde die Indikation zur allogenen haploidenten SZT und die Aufnahme in das unter Kapitel 1.6.2 erläuterte Studienprotokoll mit NK-Zellen gestellt.

Alle Patienten tolerierten die SZT gut. Die primäre Regeneration der Leukozyten ( $> 1000/\mu\text{l}$ ), der Granulozyten ( $> 500/\mu\text{l}$ ) und der Thrombozyten ( $> 50.000/\mu\text{l}$ ) erfolgte zwischen den Tagen 11 bis 13 nach der SZT. Einen Monat nach SZT wurde ein zu 100 % vollständiger Chimärismus in allen drei Patienten im peripheren Blut sowie im Knochenmark festgestellt. Nach SZT erhielten die Patienten die *ex vivo* IL-2 stimulierten NK-Zellen zu zwei Zeitpunkten (► Tab. 4.3).

**Tabelle 4.3: Applizierte Zelldosen vom Stammzelltransplantat und den NK-Zell-Produkten bei 3 Patienten mit Neuroblastom.**

	SZT			1. NK-Gabe			2. NK-Gabe		
	d=0			d=35-40			d=100-130		
	CD34 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup>	CD56 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup>	CD56 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup>	CD56 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup>	CD56 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup>	CD56 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup>
	[10 <sup>6</sup> /KG]	[10 <sup>3</sup> /KG]	[10 <sup>6</sup> /KG]	[10 <sup>6</sup> /KG]	[10 <sup>3</sup> /KG]	[10 <sup>3</sup> /KG]	[10 <sup>6</sup> /KG]	[10 <sup>3</sup> /KG]	[10 <sup>3</sup> /KG]
1	16,8	50,0	61,7	45,1	7,0	7,5	41,4	6,4	6,8
2	13,8	29,4	13,8	7,8	6,0	7,3	13,5	9,6	13,0
3	9,7	24,9	12,6	19,1	39,5	47,6	7,3	25,9	43,8

Tag 0 war der Tag der SZT, um den Tag 40 war der Tag der ersten NK-Zell-Gabe (*frisch*) und um den Tag 100 war der Tag der zweiten NK-Zell-Gabe (*kryokonserviert*). Alle Zellgaben wurden in Kilogramm Körpergewicht (KG) berechnet.

Es wurden  $\leq 13 \times 10^3$  CD3<sup>+</sup>/KG pro NK-Zell-Infusion verabreicht. Es trat eine milde GvHD Grad I/II bei Patient 1 und 2 auf. Patient 3 zeigte keine Zeichen einer GvHD.

Weiterhin wurden keine schwerwiegenden Begleiterscheinungen nach der NK-Zell-Infusion beobachtet. Transiente Nebenwirkungen der NK-Zelltherapie waren in 2/3 Fällen eine kurzzeitig erhöhte Temperatur und Schüttelfrost.

Die vom Studienprotokoll leicht abweichenden NK-Zell-Gabe-Zeitpunkte entstanden durch Therapieänderungen (Radiatio) und therapiebedingte Terminverschiebungen der Leukapheresen.

### 4.2.1 Klinisches Monitoring der Lymphozyten sowie Antigen-präsentierender Zellen nach NK-Zell-Gabe

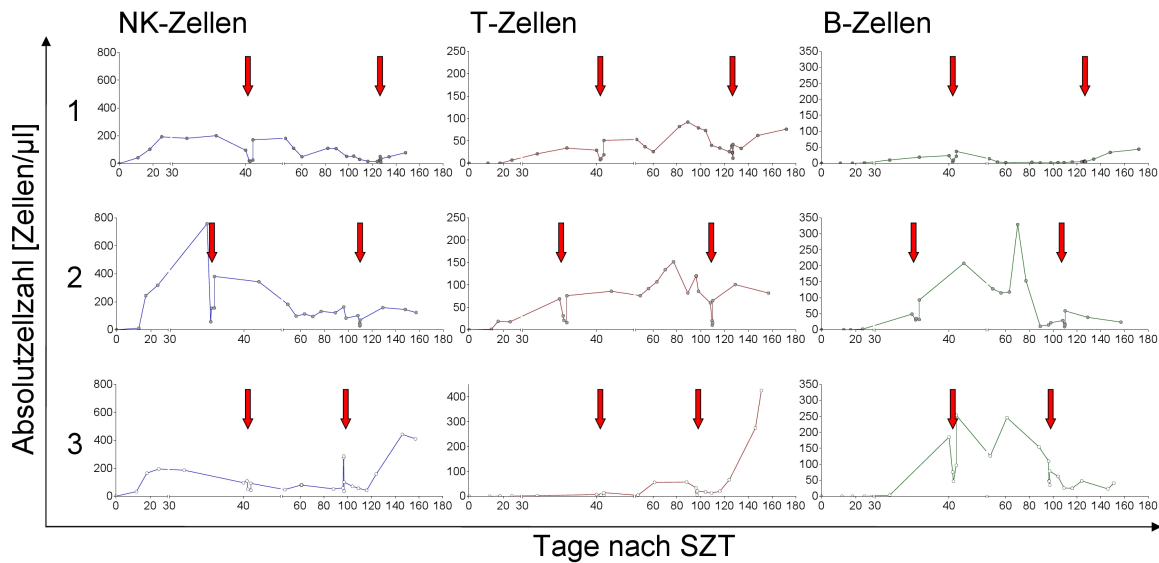
#### Immunmonitoring der Lymphozyten

Die wesentlichen Lymphozytensubpopulationen (T-Zellen, NK-Zellen und B-Zellen) wurden in den ersten drei Monaten wöchentlich, danach 14-tägig vermessen. Die Regeneration dieser Populationen ist in Abbildung 4.10 für das erste halbe Jahr nach SZT dargestellt. Direkt nach Infusion wurde in 5/6 Applikationen eine unerwartete Abnahme der NK-Zellen, aber auch der T- und B-Zellen im PB festgestellt. Die eigentliche NK-Zell-Gabe wurde zusätzlich engmaschig überwacht, direkt vor, 10 min, 1 h, 4 h sowie 24 h nach Gabe. Interessanterweise wurde bei der genaueren Untersuchung der NK-Zellen bezüglich ihrer Verteilung im PB von CD56<sup>bright</sup> zu CD56<sup>dim</sup> deutlich, dass sich vor allem die immunregulatorische CD56<sup>bright</sup> Population kurzzeitig verminderte. Dieser Effekt reversierte nach 24 h und die CD56<sup>bright</sup> NK-Zell-Population stieg über den Ausgangswert vor NK-Zell-Applikation an. Bei Patient 1 betrug die Absolutzellzahl der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen das 3,7-fache gegenüber dem Ausgangswert (► Abb. 4.11).

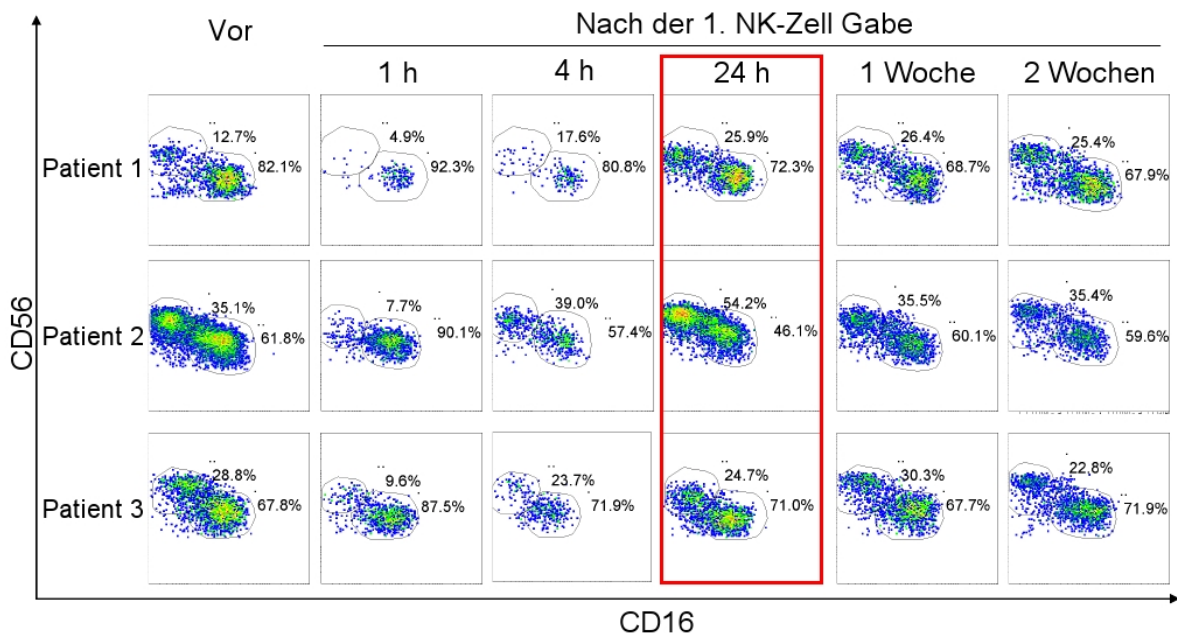
#### Immunmonitoring der Antigen-präsentierenden Zellen

Kurz nach der NK-Zell-Infusion war ein deutliches »Abwandern« der Antigen-präsentierenden Zellen zu messen. Dies zeigte sich bei den unreifen, sich im PB zirkulierenden plasmazytoiden und myeloiden dendritischen Zellen. Da DZ im PB eine kleine Population darstellen, wurde die Absolutzellzahl mittels »*single platform*« bestimmt (► Kap. 3.4.7). In 5 von 6 NK-Zell-Applikationen kam es zu einer Verminderung der DZ (► Abb. 4.12).

## 4 Ergebnisse

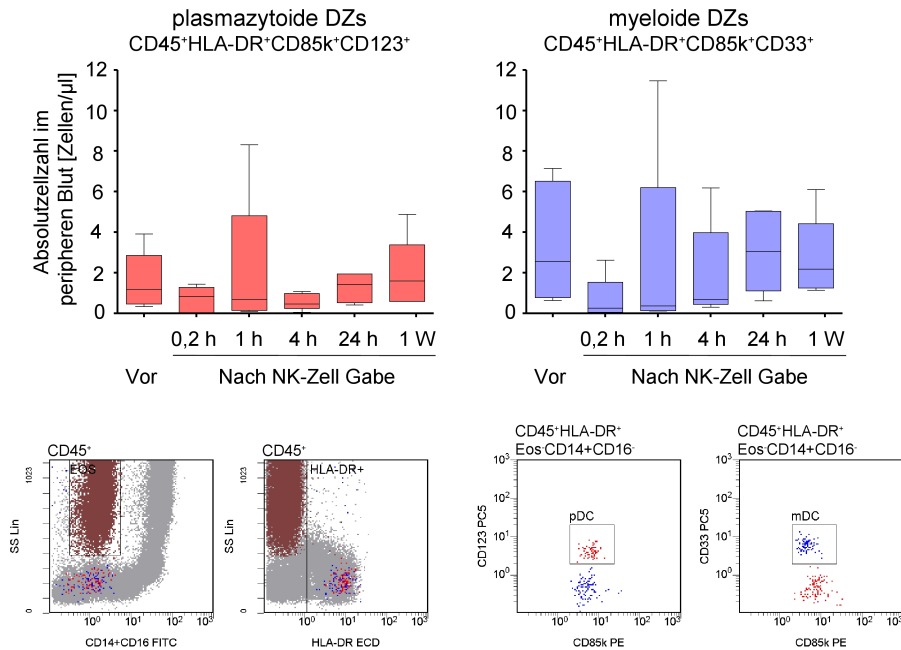


**Abbildung 4.10: Einfluss der IL-2 stimulierten NK-Zellen auf die Lymphozyten im PB nach NK-Zell-Applikation.** Die roten Pfeile ( $\Downarrow$ ) stehen für die Zeitpunkte der NK-Zell-Gaben. Die linke Spalte zeigt den Verlauf der NK-Zell-Regeneration, die mittlere Spalte den T-Zell-Verlauf und die rechte Spalte den B-Zell-Verlauf von Tag 0 bis Tag 180 nach SZT. Die Nummerierung 1-3 steht für die drei Studienpatienten.

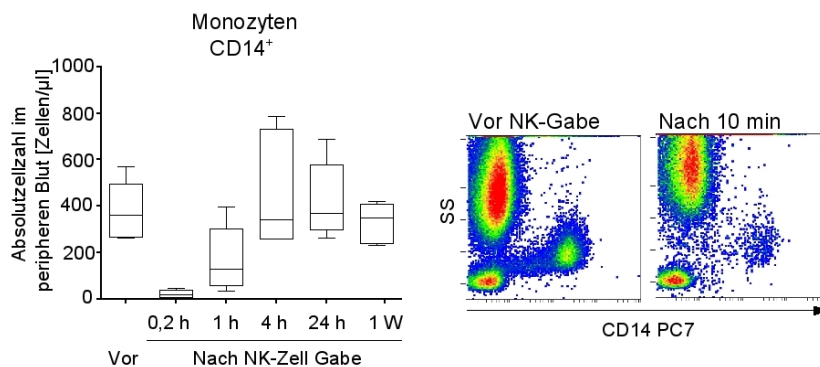


**Abbildung 4.11: Engmaschiges Monitoring der NK-Zell-Subpopulationen nach NK-Zell-Infusion.** Darstellung der CD56<sup>bright</sup> zu CD56<sup>dim</sup> Verteilung vor der 1.NK-Gabe, 1 h, 4 h, 24 h, 1 Woche und 2 Wochen nach der NK-Gabe. Es war deutlich zu erkennen, dass die immunregulatorische NK-Zell-Subpopulation CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> kurz nach Infusion aus dem PB abwanderte, aber nach 24 h wie bei einem Rebound-Phänomen verstärkt wieder auftrat.

## 4 Ergebnisse



**Abbildung 4.12: Engmaschiges Monitoring der plasmazytoiden und der myeloiden dendritischen Zellen in der peripheren Blutbahn vor und nach der NK-Zell-Infusion.** Es kommt durch die NK-Zell-Infusion kurzzeitig zu einem Abwandern der 'unreifen' plasmazytoiden (pDZ, ■) sowie der myeloiden dendritischen Zellen (mDZ, ■). Nur bei Patient 1 tritt nach der zweiten NK-Zell-Infusion ein kurzzeitig erhöhter pDZ sowie mDZ Spiegel von 8 und 11 / $\mu$ l auf. Die Plots (untere Reihe) stellen im Wesentlichen das durchflusszytometrische Protokoll der DZ Messung dar.

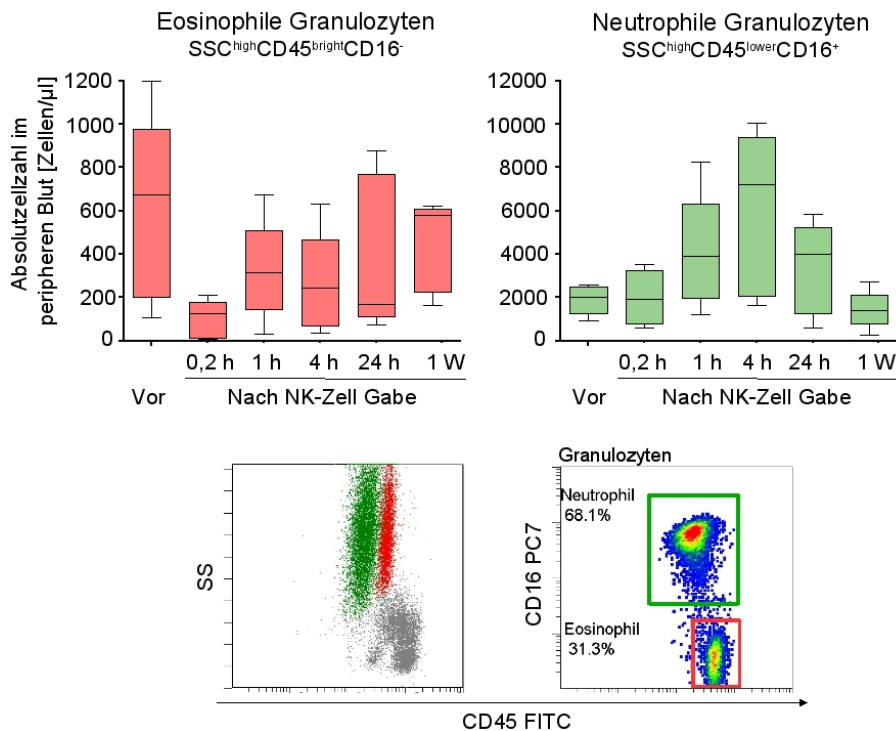


**Abbildung 4.13: Engmaschiges Monitoring der Monozyten nach NK-Zell-Infusion.** Bei allen drei Patienten wurde eine kurzzeitige Monozytopenie mit darauffolgender Leukozytose festgestellt. Nach 1 Woche waren alle Monozytenwerte wieder im Normbereich. Monozyten sind  $CD14^+$  Zellen und sind in beiden *density plots* im oberen Bereich der x-Achse dargestellt.

## 4 Ergebnisse

In gleicher Weise kam es zu einem signifikanten »Abwandern« der CD14<sup>+</sup> Monozyten. Dieses Phänomen trat bei allen 6 Applikationen auf und ist in Abbildung 4.13 graphisch dargestellt. Die Monozyten kehrten nach 4 h vollständig in die Blutbahn zurück.

Gegensätzlich verhielten sich die eosinophilen und neutrophilen Granulozyten. Der Normbereich für neutrophile Granulozyten ist bei ca.  $2,5- 7,5 \times 10^3/\mu\text{l}$  (40- 75 % der CD45<sup>+</sup> Leukozyten) und für eosinophile Granulozyten bei ca.  $0,04- 0,4 \times 10^3/\mu\text{l}$  (1- 6 % der CD45<sup>+</sup> Leukozyten) anzusehen. In Abbildung 4.14 ist zu sehen, dass die Patienten 1 bis 3 bereits vor der NK-Zell-Gabe erhöhte eosinophile Granulozytenwerte aufwiesen. Nach der NK-Zell-Applikation zeigte sich eine "Normalisierung" der Eosinophilen und ein deutlicher Anstieg der Neutrophilen im Blut.



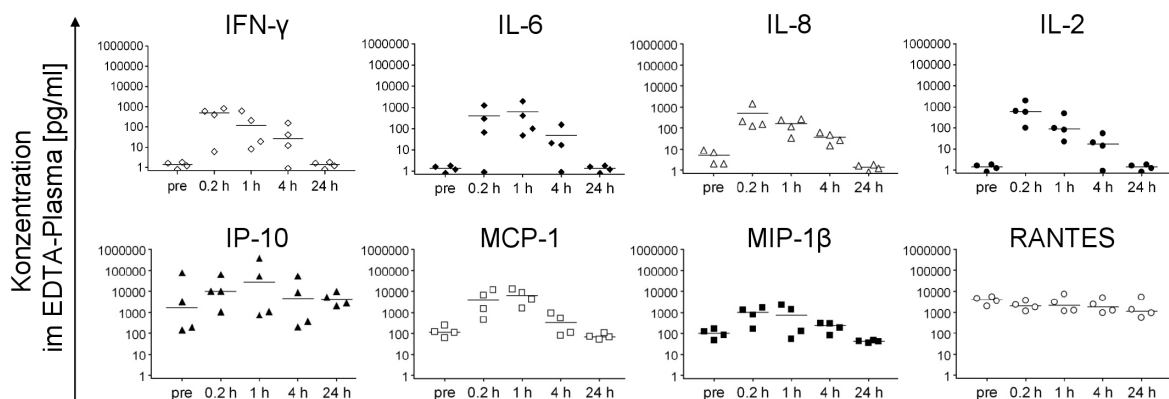
**Abbildung 4.14: Monitoring der eosinophilen und neutrophilen Granulozyten nach NK-Zell-Gabe.** Die Eosinophilen (■) zeigten ein ähnliches »Abwandern« wie die DZ und die Monozyten (linke Grafik), wohingegen die Neutrophilen (■) ein entgegengesetztes Bild aufzeigten (rechte Grafik). In allen Patienten trat mehr oder weniger stark eine kurzzeitige Neutrophilie auf. Die beiden Plots (untere Reihe) veranschaulichen die durchflusszytometrische Bestimmung.

## 4 Ergebnisse

### Messung des Zytokinmilieus im Plasma der Patienten

Um einen Einblick zu gewinnen, ob IL-2 stimulierte NK-Zellen das humorale Immunsystem beeinflussen, wurde das EDTA-Plasma der Patienten nach erhöhten Chemokinen und Zytokinen hin untersucht. Es wurde direkt vor, 10 min, 1 h, 4 h sowie 24 h nach NK-Zell-Gabe überprüft, ob erhöhte Zytokinspiegel messbar waren.

Einer der wichtigsten Mediatoren für die »**Akute Phase**« und das Fieber ist IL-6, welches bei Patient 1 bis zu einem maximalen Wert von 2000 pg/ml kurz nach Infusion messbar wurde. Bei allen Patienten lag es nach 24 h wieder unter der Nachweisgrenze. Neben der Fähigkeit der Makrophagenaktivierung wird dem Interferon- $\gamma$  neben antiviralen, auch immunregulatorische und anti-tumorale Fähigkeit zugeschrieben. Die erreichten Konzentrationen lagen zwischen 600 und 800 pg/ml, aber auch hier handelt es sich um einen Spiegel, der nach 24 h unter die Nachweisgrenze fiel. Die chemotaktisch wirkenden Proteine wie IL-8, IP-10, MCP-1 und MIP-1 $\beta$  zeigten vor der NK-Zell-Applikation eine Art Basiswert und stiegen jedoch durch die NK-Zell-Applikation innerhalb der ersten 4 h. Die Volumina, in der sich die IL-2 stimulierten NK-Zellen befanden, besaßen ein medianes Volumen von 307 ml (197- 1000 ml). Da die NK-Zellen vor der Applikation nicht noch einmal gewaschen wurden, muss davon ausgegangen werden, dass die Zytokine, die unter Abbildung 4.8 aufgeführt sind, plus IL-2 im Medium, den Patienten verabreicht wurden.



**Abbildung 4.15: Engmaschiges Monitoring der Zytokinspiegel im EDTA-Plasma vor und nach NK-Zell-Infusion.** Die Darstellungen für das jeweilige Zytokin zeigen jeweils den Zytokinspiegel vor NK-Zell-Gabe, 10 min, 1 h, 4 h sowie 24 h nach der NK-Zell-Gabe (von links nach rechts).



Demnach sollten die Spiegel für IL-2 sowie der in Abbildung 4.8 aufgeführten Zytokine im EDTA Plasma des Patienten wahrscheinlich vom Applikationsvolumen abhängig sein. Es waren aber nicht alle Zytokine, die von den stimulierten NK-Zellen produziert wurden, danach auch im Patienten messbar. Beispielsweise war IL-6 im Plasma der Patienten deutlich messbar, wurde aber nicht in so hohen Konzentrationen im Überstand der NK-Zellen detektiert.

Zusammenfassend zeigte die Zytokinmessung im PB der Patienten Anzeichen eines proinflammatorischen (IL-2, IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$  und IP-10) sowie chemotaktischen (MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , IL-8) Einflusses auf das Immunsystem ausgehend vom NK-Zellpräparat. Durch das Hinzufügen der Zytokine durch das NK-Zellpräparat selbst war mit erhöhten Zytokinpiegeln zu rechnen, aber die Daten deuteten ebenfalls auf eine Immunantwort des Patienten selbst hin (IL-6).

### 4.2.2 Zusammenhang zwischen NK- und T-Zell-Dosis mit dem Auftreten einer GvHD

Das Auftreten einer GvHD bei der haploidenten SZT steht im Zusammenhang mit der verabreichten T-Zell-Menge aus dem Stammzelltransplantat. Es gibt keine klinischen Daten, ob und ab welcher Dosis IL-2 stimulierte NK-Zellen eine GvHD auslösen können. In Abbildung 4.16 wurde daher für die 6 stimulierten NK-Zellprodukte (n=3 Patienten), aber auch für die 12 Transfusionen mit frisch isolierten NK-Zellen (n=7 Patienten, 1. Teil der NK-Zell-Studie), eine T-/ NK-Zell-Korrelation aufgestellt.

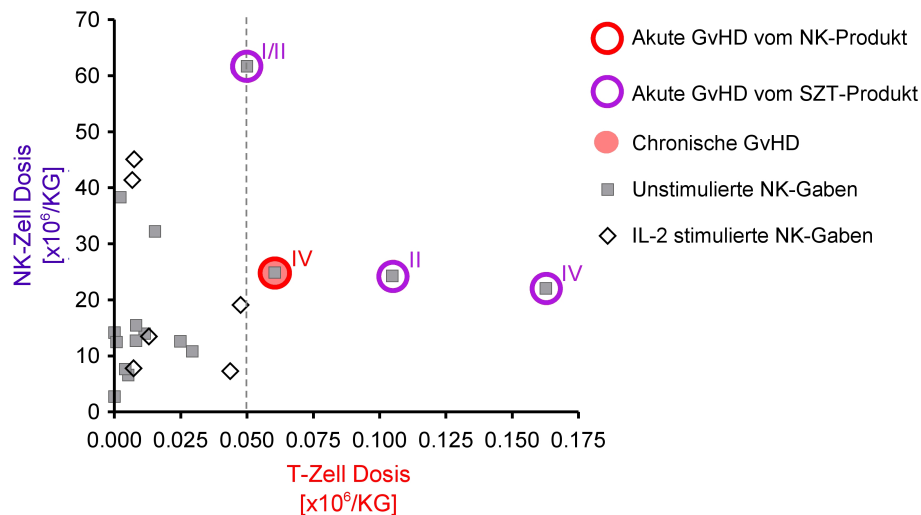
4/10 Patienten (Tab. 3.2, Nr.: 1, 5, 6 und 8), die  $\geq 50.000$  T-Zellen/KG erhielten, entwickelten alle eine GvHD. In einem Fall (Tab. 3.2, Nr.: 8) stammten diese T-Zellen aus dem frisch aufgereinigten NK-Zellprodukt, in den anderen drei Fällen aus dem Stammzellprodukt nach CD3/CD19-Depletion. Diese Zuordnung kann getroffen werden, da die SZT an Tag 0 und die erste NK-Zell-Applikation mit den frisch aufgereinigten NK-Zellen am Tag 3 bzw. bei IL-2 stimulierten am Tag 40 erfolgte.

Drei Patienten, die  $< 50.000$  T-Zellen/KG erhielten, zeigten nur eine milde GvHD Grad I/II (Tab. 3.2, Nr.: 2, 4 und 7) und Patienten mit  $< 30.000$  T-Zellen/KG zeigten keinerlei Anzeichen einer GvHD.

## 4 Ergebnisse

2/3 Patienten (► Tab. 3.2, Nr.: 1 und 2), die mit IL-2 stimulierten NK-Zellpräparaten behandelt wurden, die  $< 15.000$  T-Zellen/KG enthielten, entwickelten für einige Tage ein feinfleckiges, nicht typisches Hautexanthem. Patient 2 entwickelte eine milde GvHD Grad I/II. Die anderen Applikationen mit IL-2 stimulierten NK-Zellen wurden ohne Anzeichen einer GvHD vertragen.

Die maximale applizierte NK-Zell-Dosis lag bei  $60 \times 10^6$  NK-Zellen/KG mit  $50.000$  T-Zellen/KG. Dieser Patient zeigte eine GvHD zweiten Grades, die aber nach ein paar Tagen rückläufig war.



**Abbildung 4.16: Zusammenhang zwischen NK- und T-Zell-Dosis mit dem Auftreten einer GvHD.** In diesem Diagramm ist die NK-Zell-Dosis gegen die T-Zell-Dosis jedes applizierten Zellproduktes gegeneinander aufgetragen. Die (■) stehen für unstimulierte NK-Zellpräparate, wohingegen die (◇) für die IL-2 stimulierten NK-Zellpräparate stehen. Die Präparate, die zum Auftreten einer GvHD geführt haben, sind mit einem roten bzw. violetten Kreis markiert, je nachdem, ob die T-Zellen aus dem Stammzellpräparat oder dem NK-Zellpräparat stammen.

Die klinische Dokumentation über das Auftreten der GvHD wurde von den Ärzten und Schwestern der SZT-Station zur Verfügung gestellt.

## 4.3 Einfluss der NK-Zellen auf die Immunrekonstitution nach SZT

Um den Einfluss von NK-Zelltherapien auf die Immunregeneration zu bewerten, war es notwendig, Normalwerte von Lymphozytenpopulationen gesunder Kinder zu erheben. Während für erwachsene Probanden allgemein akzeptierte Referenzwerte publiziert worden sind, finden sich in der Literatur meist nur für eine Altersgruppe ausgewählte Daten, die unter verschiedenen technischen Voraussetzungen erhoben wurden. Zudem zeigte sich bei pädiatrischen Studien, dass meist Kinder verschiedener Entwicklungsphasen in größeren Gruppen zusammengefasst wurden. Ein weiteres Ziel war es daher, die generierten Normwerte in einem Modell darzustellen, welches die Altersabhängigkeit widerspiegelt, ohne Altersgruppen zu bilden.

### 4.3.1 Messung von Lymphozytenpopulationen zur Erhebung von Normwerten gesunder Kinder

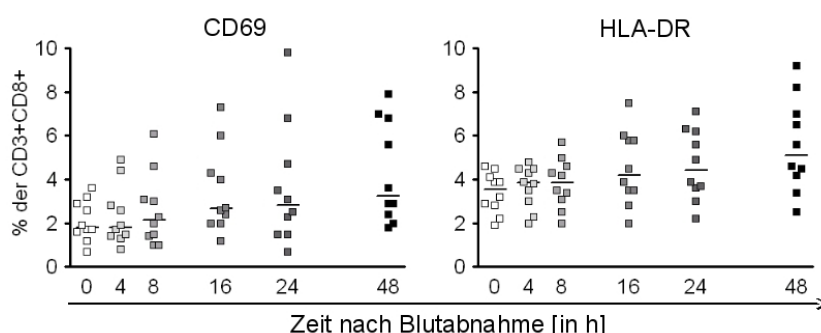
Es wurden Normwerte von Lymphozytensubpopulationen, wie im Kapitel 3.4.7 beschrieben, von gesunden Kindern und Erwachsenen erhoben. Bei den verwendeten Blutproben gab es keine klinischen oder labortechnischen Anzeichen von Infektionen (wie z.B. erhöhtes CRP > 1mg/l).

#### **Parameter, die Einfluss auf die Messung von Lymphozytenpopulationen haben können**

Um zu gewährleisten, dass durchflusszytometrische Messungen innerhalb der vorgegebenen 48 h auch zu reproduzierbaren Ergebnissen führen, wurden Stabilitätsuntersuchungen (n=10) sowie der Vergleich von Citrat und EDTA Blut (n=5) durchgeführt. Die Proben wurden bis zur Messung bei RT (18- 22 °C) gelagert. Zu hohe Temperaturen zerstören fragile Zellen und niedrige Temperaturen können mit einem selektiven Zellverlust und mit einem Verlust von Antigenen (beispielsweise CD4) einhergehen. Proben, die vorzeitige Gerinnsel zeigten, was häufig bei Proben von Säuglingen auftrat, wurden nicht verwertet.

## 4 Ergebnisse

**Einfluss der Zeit auf die Messergebnisse** Die Messzeitpunkte der Stabilitätsuntersuchung waren eine 1/2 h, 4 h, 8 h, 16 h, 24 h und 48h nach Blutabnahme. Die Stabilitätsuntersuchung der wesentlichen Lymphozytenpopulationen (T-, B-, NK-Zellen, sowie der T<sub>Helfer</sub>- und der zytotoxischen T-Zellen) erzielten innerhalb von 48 h übereinstimmende Ergebnisse. Bei den Aktivierungsmarkern CD69 und HLA-DR zeigte sich ein stetiger Anstieg der Aktivierungsmarker in Bezug zur Zeit (► Abb. 4.17). Der Median stieg minimal von 1,7 zu 2,5 % für CD69 und von 3,5 zu 5,0 % für HLA-DR, aber die Spannweite erhöhte sich beispielsweise für CD69 von 0,5- 3,8 % auf 1,8- 10 %. Hieraus lautet die Empfehlung, dass Messungen der Aktivierungsmarker zeitnah verarbeitet werden sollten. Die Begründung hierfür lag vermutlich in der Sedimentation der Zellen bei längerer Lagerung und durch sterische Enge kam es wahrscheinlich zu einer Aktivierung. Bei Proben, die nach Blutabnahme zentrifugiert und nach 24 h vermessen wurden, zeigte sich ein Anstieg für CD69 bis zu 16 %.



**Abbildung 4.17: Einfluss der Zeit auf die Aktivierungsmarker.** Gezeigt ist der Anstieg der Aktivierungsmarker CD69 (frühe Aktivierung) und HLA-DR (verzögerte Aktivierung) bei längerem Stehenlassen der Vollblutproben.

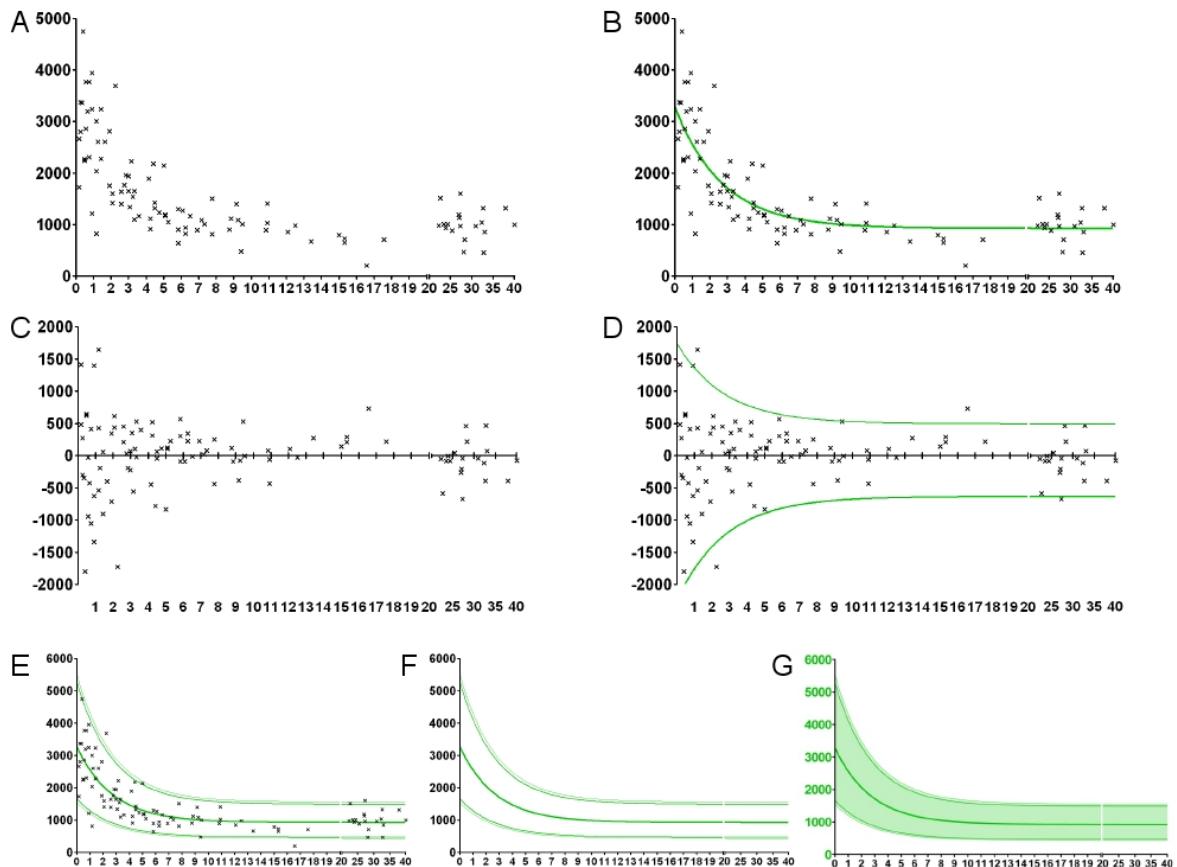
**Einfluss des Antikoagulanzen auf die Messwerte** Da die “Rest”-Proben für die Normwertstudie aus einer gemeinsamen Studie mit der Pädiatrischen Hämostaseologie erfolgte, war das Antikoagulanzen Citrat und die Überstände (Plasma) wurden für Normalwerte von Blutgerinnungsparameter genutzt. In der Flowzytometrie wird normalerweise nur mit EDTA oder Heparin Blut gearbeitet. Es folgte daher ein direkter Vergleich von EDTA- und Citrat-Blut. Es waren keinerlei Unterschiede zwischen EDTA und Citrat Blut hin-

## 4 Ergebnisse

sichtlich aller untersuchten Lymphozytensubpopulationen innerhalb der 48 h nachweisbar (n=5).

### 4.3.2 Entwicklung eines stetigen Exponential-Modells

Bekannterweise haben Säuglinge und Kleinkinder höhere Lymphozytenwerte (3.500-13.000/  $\mu$ l) als Erwachsene (1.000- 2.800/  $\mu$ l). Ziel war es, eine hoch aufgelöste altersgerechte Einschätzung der durchflusszytometrischen Daten verschiedener Leukozytensubpopulationen zu erhalten. Die Entwicklung der Lymphozytenpopulationen wurde als kontinuierlicher Prozess betrachtet.



**Abbildung 4.18: Entwicklung des exponentiellen Regressionsmodells am Beispiel der  $CD3^+CD4^+$  T<sub>Helfer</sub>-Zellen.** In allen Graphen stellt die y-Achse die  $CD3^+CD4^+$  T<sub>Helfer</sub> Absolutzellzahlen im PB dar und die x-Achse das Alter in Jahren. **A** Einzelwerte der 80 gesunden Kinder und 20 Erwachsenen. **B** Einzelwerte mit Regressionskurve. **C + D** parametrische Bestimmung der Konfidenzbereiche auf Basis von Residuen. **E** Einzelwerte mit 90 %- und 95 %- Konfidenzintervall. **F** Darstellung der Regressionskurve, dem 90 %- und dem 95 %- Konfidenzintervall. **G** Modelldarstellung.

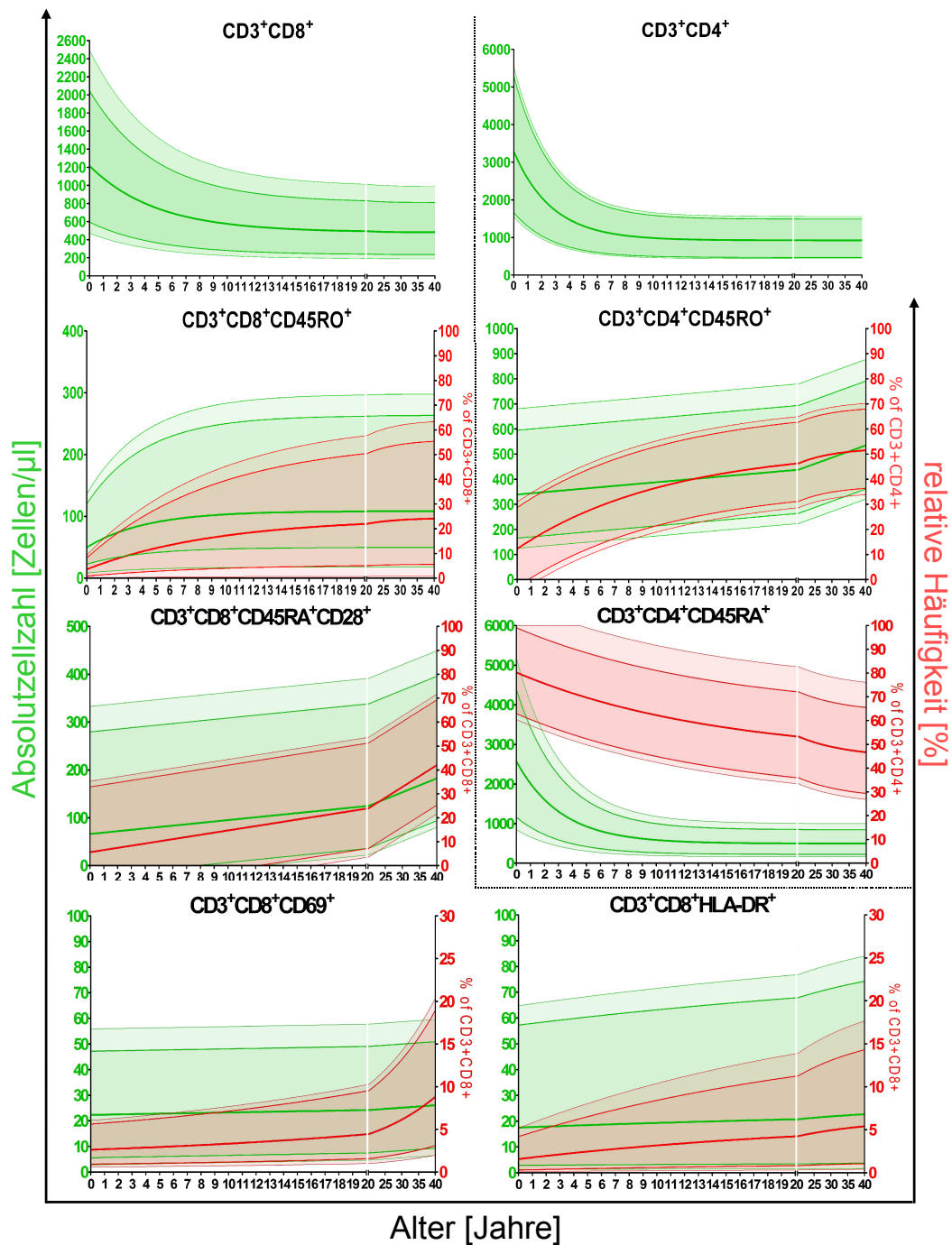
## 4 Ergebnisse

Häufig waren graphische Darstellungen Ausgangspunkt für eine Modellformulierung. Und so wurde bei der Darstellung der Zellzahl/ $\mu\text{l}$  der wesentlichen Lymphozytenpopulationen gegen das Alter eine exponentielle Funktion deutlich. Die Schätzung der Regressionsfunktion beruhte auf der Minimierung der Residuen. Das heißt, die Summe der Abweichungen der Datenpunkte von den jeweils zugehörigen Funktionswerten der Regressionsfunktion wurde minimiert (► Abb. 4.18 B).

Zur Generierung der Konfidenzintervalle (0,90 und 0,95) wurde die Methode nach Tukey verwendet. Dabei wurde eine homogene Varianz angenommen. Die Tukey Methode macht dabei keine Annahme über die Variablen Verteilung. Die Konfidenzintervalle wurden zu dem Vorhersagewert altersbezogen erweitert (► Abb. 4.18 E). Die ermittelten Funktionen der einzelnen Zellpopulationen wurden in Abbildung 4.19 graphisch dargestellt und darüber hinaus auch in Form einer Excel Datei als Kalkulator entwickelt (► Abb. E.1). Bei diesem Kalkulator muss lediglich das Alter des Patienten eingegeben werden und dieser errechnet dann für alle Lymphozytenpopulationen den unteren bzw. oberen Konfidenzbereich für das gewünschte Alter.

Das kalkulierte Regressionsmodell ist für die  $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$   $\text{T}_{\text{Helfer}}$ -Zellen und die  $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$  zytotoxischen T-Zellen und deren Untergruppen wie Naïve und Gedächtniszellen in Abbildung 4.19 gezeigt. Auffällig war, dass die Zellzahlen der beiden T-Zell-Untergruppen insbesondere innerhalb der ersten Jahre stark schwanken können. Im Erwachsenenalter sind die Intervalle wesentlich schmaler. Deutlich war zu erkennen, dass die Zellzahlen mit dem Alter abnehmen. Bedingt durch die frühe und vollständige Involution (natürliche Rückbildung) des Thymus sollte die Population der naïven T-Zellen abnehmen. Die Gedächtnis-T-Zellen tragen das Oberflächenmolekül CD45R0 und die Abbildung 4.19 zeigt, dass die Gedächtniszellen der  $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$   $\text{T}_{\text{Helfer}}$ -Zellen und der  $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$  zytotoxische T-Zellen mit dem Alter relativ und absolut zunahmen. Die naïven  $\text{T}_{\text{Helfer}}$ -Zellen zeigten typischerweise ein deutliches Absinken mit dem Alter, wohingegen dies bei den zytotoxischen T-Zellen nicht zutraf. Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich mit der sich im Reifeprozess des Immunsystems veränderten CD28 Expression zusammen. Das CD28 Antigen ist ein wichtiger Marker für die Phänotyp Differenzierung bei Virusinfektionen (Appay et al. 2002). Er war nicht geeignet für die Einteilung von naïven zytotoxischen T-Zellen in der Veranschaulichung der Reifung des lymphozytären Systems.

## 4 Ergebnisse



**Abbildung 4.19: Kontinuierliches Regressionsmodell zur Beschreibung der Normalwerte von T-Zell-Subpopulationen.** In allen Graphen stellt die y-Achse die Zellzahl/ $\mu\text{l}$  im PB dar und die x-Achse das Alter in Jahren (Huenecke et al. 2008). Die x-Achse ist zweigeteilt und unterschiedlich skaliert (0-20, 21-40 Jahre).  $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ =zytotoxische T-Zellen,  $\text{CD3}^+\text{CD8}^+\text{CD45RO}^+$ ,  $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD45RO}^+$ =Gedächtnis-T-Zellen,  $\text{CD3}^+\text{CD8}^+\text{CD45RA}^+\text{CD28}^+$ ,  $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD45RA}^+$ =Naïve T-Zellen,  $\text{CD3}^+\text{CD8}^+\text{CD69}^+$ =früh aktivierte zytotoxische T-Zellen  $\text{CD3}^+\text{CD8}^+\text{HLA-DR}^+$ =spät aktivierte zytotoxische T-Zellen

Der Verlauf der NK-Zellzahlen verlief nicht exponentiell wie bei den B- und T-Lymphozyten. Hier sank zwar die Konzentration von Geburt an (siehe Diskussion, ► Abb. 5.4), aber es war fast ein linearer Zusammenhang ersichtlich.

Um die erhobenen Daten einer Art Plausibilitätsprüfung zu unterziehen, wurden Kontrollrechnungen durchgeführt. Da Lymphozyten aus T-, B- und NK-Zellen bestehen, sollten diese Anteile nahezu 100 % ergeben. Der Median aller 100 Spender lag bei 97,0 % (5<sup>te</sup> Perzentil=93,1 %, 95<sup>ste</sup> Perzentil=99,5 %). Genauso wurde eine Summation der T-Zell-Untergruppen vorgenommen. Bei den T<sub>Helfer</sub>-Zellen ergab dies im Median 95,8 % (86,9- 108,9 %). Bei den zytotoxischen T-Zellen ergab dies im Median 92,7 % (80,1- 105,4 %). Durch diese Plausibilitätsprüfung wurde das falsche Setzen (z.B. durch Schneiden von Populationen) von Regionen ausgeschlossen.

### 4.3.3 Einfluss von Zellaufarbeitung auf die zelluläre Immunrekonstitution nach haploidenter SZT

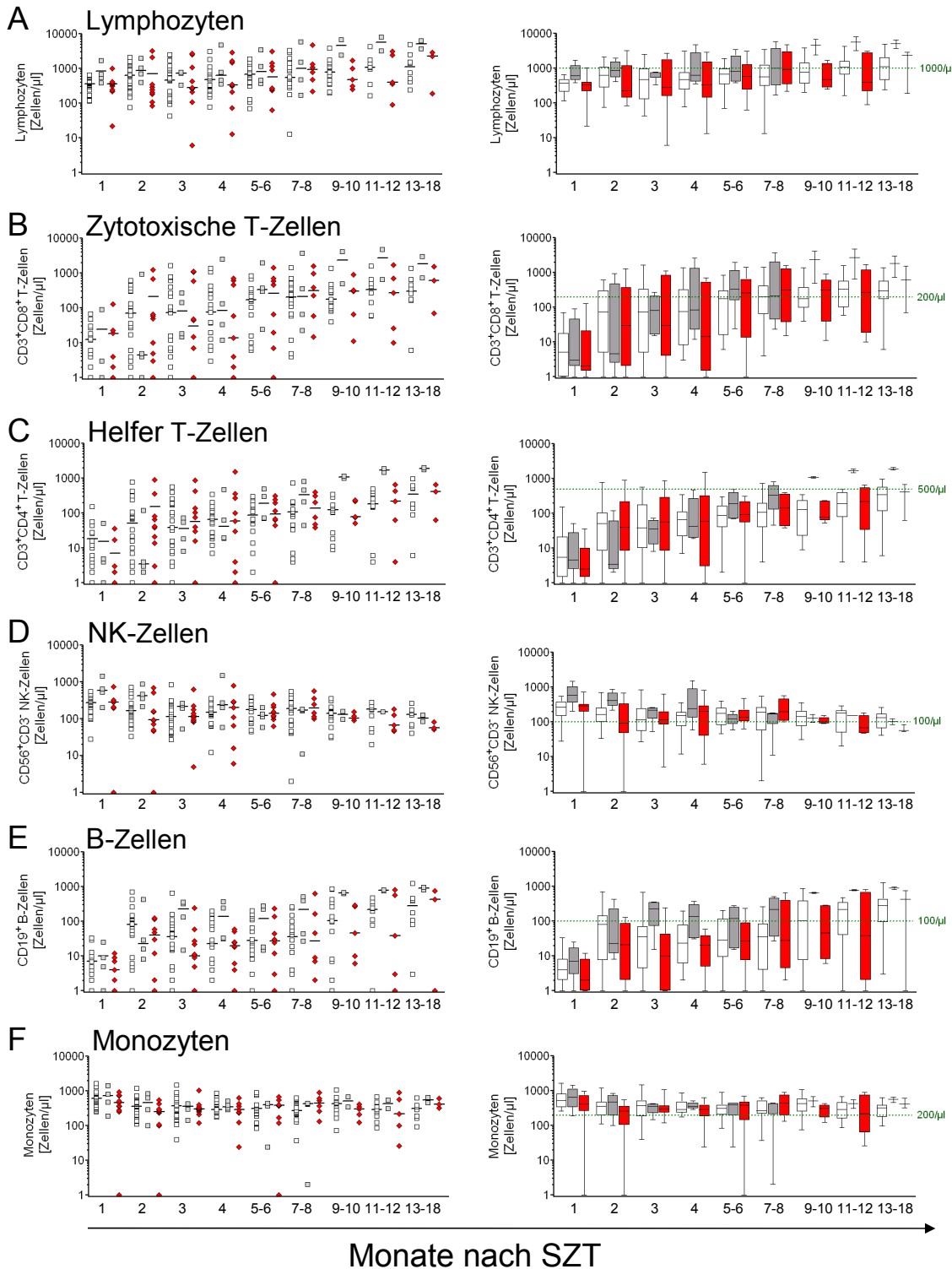
#### Vergleich der unterschiedlichen Zellaufarbeitungen in Bezug zur Immunrekonstitution in der haploidenten SZT

Es wurde die Immunrekonstitution von Patienten nach haploidenter SZT, die ein CD3/-CD19-depletiertes Stammzelltransplantat (n=22) mit Patienten, die ein CD34-selektiertes Stammzelltransplantat (n=4) erhielten, verglichen. Die Erholung des neuen Immunsystems beider Gruppen wurde wiederum mit der Immunrekonstitution von Patienten verglichen, die nach haploidenter SZT zusätzlich eine NK-Zelltherapie erhielten. Da die Gruppe der Patienten, die unstimulierte (n=7) und IL-2 stimulierte (n=3) NK-Zellen erhielten zu klein war, wurden diese als eine NK-Zelltherapie Gruppe (n=10) zusammengefasst.

Die Patientengruppe, die eine zusätzliche NK-Zelltherapie an Tag (+3), +40 und +100 nach haploidenter SZT erhielt, zeigte keine verbesserte Immunrekonstitution der verschiedenen Leukozytensubpopulationen im Vergleich zu den anderen haploident transplantierten Patientengruppen. Deutlich wurde in allen drei Gruppen, dass es sich um eine langsame T-Zell-Regenerierung handelte (► Abb. 4.20). Hierbei war die Regeneration der zytotoxischen T-Zellen schneller als die der T<sub>Helfer</sub> Zellen.



## 4 Ergebnisse



**Abbildung 4.20: Immunrekonstitution nach haploidenter SZT von drei verschiedenen Patientengruppen, die eine CD3/CD19-depletiertes oder CD34-selektiertes Stammzellpräparat oder eine zusätzlich NK-Zelltherapie erhielten.** In weiß dargestellt: Patienten, die ein CD3/CD19-depletiertes Stammzelltransplantat (□) erhielten (n=22). In grau dargestellt: Patienten, die ein CD34-selektiertes Präparat (■) bekamen (n=4) und in rot sind die Patienten gezeigt, die zusätzlich eine NK-Zelltherapie (■) erhielten (n=10, davon 7 Patienten mit unstimulierten und 3 Patienten mit IL-2 stimulierten NK-Zell-Transfusionen). Die grün gepunktet dargestellten Linien stellen die untersten Zellgrenzen laut Normwertstudie dar.

## 4 Ergebnisse

Bei der NK-Zell-Regeneration zeigten sich ebenfalls keine größeren Unterschiede zwischen den drei Patientengruppen. Regelhaft erscheint die zunächst überschießende NK-Zell-Regeneration innerhalb der ersten zwei Monate nach SZT. In dieser Zeit war die NK-Zell-Population die zahlenmäßig größte Lymphozytenpopulation im PB. Dies war 1 Jahr nach SZT nicht mehr der Fall und es zeigten sich Zellzahlen, die sich im unteren Normbereich befanden.

Der Aufbau des B-Zell-Kompartments war ebenfalls verzögert, aber klinisch weniger problematisch, da die B-Zell-Funktion durch die Substitution von Immunglobulinen ausgeglichen werden konnte.

Statistische Tests konnten nicht durchgeführt werden, da es sich bei allen drei Gruppen um ein heterogenes Patientenkontinuum (mit verschiedenen Erkrankungen) handelte.

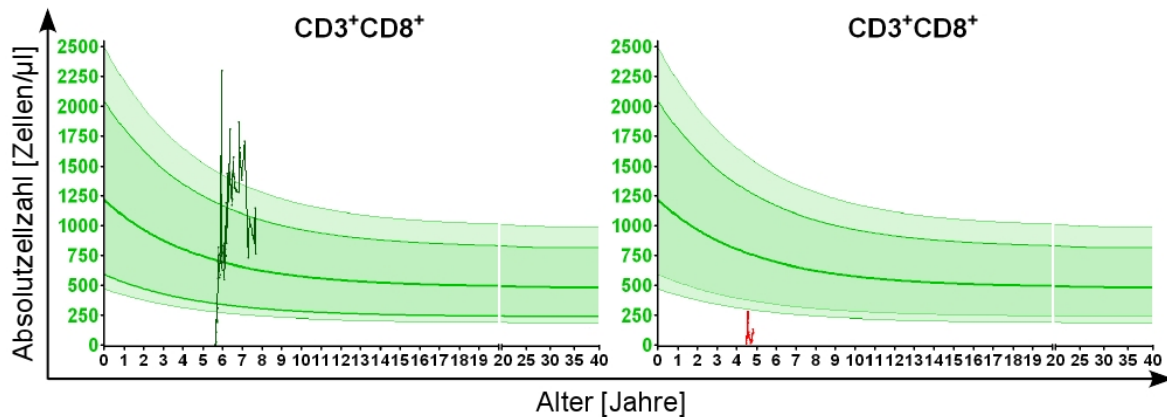
In der größten Patientengruppe mit CD3/CD19-depletierten Stammzellpräparaten (n=22) wurden daher im Rahmen dieser Arbeit zwei Untergruppen gebildet: Patienten mit Leukämien (n=19) und Patienten mit Tumoren (n=15). Die Immunrekonstitution von Patienten mit soliden Tumoren verlief deutlich schlechter als bei Patienten mit Leukämien (Daten wurden nicht graphisch dargestellt).

### **Einfluss der Immunrekonstitution und der unterschiedlichen Aufarbeitungen von Zellprodukten auf das Überleben nach haploidenter SZT**

Um die erworbenen Regenerationsdaten zu bewerten, wurde das neu entwickelte Exponentialmodell genutzt. Hierbei wurden die Immunrekonstitutionsdaten der Lymphozytenpopulationen in die generierten Funktionen der Normwertstudie geladen, um zu berechnen, ob und wann der Patient seine altersabhängige Norm erreichte. Da viele Patienten innerhalb des ersten Jahres nach SZT verstarben und die Regeneration der T<sub>Helfer</sub>-Zellen und der B-Zellen wesentlich verzögert nach SZT eintrat (6-9 Monate nach SZT), eigneten sich diese Populationen nicht als Parameter für das Auswerten einer schnellen Immunregeneration in Bezug zur Überlebenswahrscheinlichkeit.

## 4 Ergebnisse

In Abbildung 4.21 sind zwei Beispiele für die altersbezogene Regeneration der  $CD3^+CD8^+$  zytotoxischen T-Zellen aufgeführt. Links sieht man einen optimalen Verlauf eines Patienten, der den altersgerechten Normwertbereich erreichte, wohingegen der rechte Verlauf deutlich machen soll, dass es Patienten gab, die nach SZT nie die Norm erreichten und innerhalb eines Jahres nach SZT verstarben.



**Abbildung 4.21: Nutzung des entwickelten Exponentialmodells zur Auswertung der altersbezogenen Immunrestitution.** Beispielhaft sind die altersabhängigen Regenerationsdaten der  $CD3^+CD8^+$  zytotoxischen T-Zellen zweier Patienten im Exponentialmodell dargestellt. In dunkelgrün (—) ist ein positiver Verlauf von Patient 18 mit optimaler Immunrestitution dargestellt (links). In rot (—) ist Patient 31 gezeigt, der eine schwache Regeneration zeigte und wie rechts zu sehen, den Normalbereich für die zytotoxischen T-Zellen nie erreichte.

Es wurde demnach eine Einteilung vorgenommen, um die Patienten, die rasch das 95<sup>te</sup> Konfidenzintervall der  $CD3^+CD8^+$  zytotoxischen T-Zellen erreichten, in die Gruppe der »*low risk*« und die Patienten, die eine langsame Regeneration dieser Zellen zeigte, in die Gruppe der »*high risk*« einzuteilen (► Tab. 4.4).

## 4 Ergebnisse

**Tabelle 4.4: Charakteristika von den »high« und »low«-Risiko Gruppen.**

	<i>low risk</i> -Gruppe Patienten, die das 95 <sup>te</sup> Konfidenzintervall der CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> erreichten (—)	<i>high risk</i> -Gruppe Patienten, die das 95 <sup>te</sup> Konfidenzintervall der CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> <b>nicht</b> erreichten (···)
<b>lebend/Gesamtpatientenanzahl</b>	9/16	4/20
<b>Todesursache</b>		
Rückfall/Progress	5/7	11/16
TRM	2/7	5/16
<b>Lebende in Bezug zur Stammzellaufarbeitung</b>		
CD3/CD19-Depletion	6/11	4/17
CD34-Selektion	3/5	0/3
<b>Lebende in Bezug zur NK-Zelltherapie</b>		
NK-Zelltherapie	2/4	2/6
unstimulierte NK-Zelltherapie	2/4	0/3
stimulierte NK-Zelltherapie	0/0	2/3
<b>Lebende in Bezug zur Diagnose</b>		
ALL (CR3 und NR)	2/3	0/2
ALL (CR1 und CR2)	4/6	0/2
AML, MDS	2/2	1/4
NB IV	0/0	2/5
RMS IV	0/3	1/6
<b>Anzahl der Patienten, die</b>		
DLI (T-Lymphozyten) oder	7/16	4/20
SZ-Boost oder	3/16	9/20
GvHD I/II oder	8/16	10/20
GvHD III/IV entwickelten	3/16	4/20

Alle 36 Patienten wurden haploident transplantiert und wurden bei nicht Erreichen der altersabhängigen CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellzahl in die *high-risk* und bei Erreichen der Norm in die *low-risk* Gruppe eingeteilt. 28/36 Patienten erhielten ein CD3/CD19-depl.-SZ-Produkt. 6/28 Patienten erhielten zu dem CD3/CD19-depl.-SZ-Produkt eine NK-Zelltherapie. 8/36 Patienten erhielten ein CD34 sel. SZ-Präparat. 4/8 Patienten erhielten zusätzlich zu dem CD34 sel. SZ-Produkt eine NK-Zelltherapie. TRM (*treatment related mortality*= therapieinduzierte Mortalität)

Die Tabelle 4.4 geht hierbei auf Todesursache, die unterschiedlichen Stammzelltransplantataufreinigungen und den Bezug zur Initial-Erkrankung ein. Es zeigte sich, dass Patienten mit einer langsamen Regeneration der CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen ein höheres Risiko für ein Re-

## 4 Ergebnisse

zidiv oder eine lebensgefährliche Infektion zeigten. Die Auswertung der unterschiedlichen Zellaufarbeitungen von Zellprodukten in diesem Kapitel lag einer kleinen Patientenkohorte mit verschiedenen Erkrankungen zu Grunde und erlaubt daher nur eine vorsichtige Interpretation.

Die in den Tabellen 3.2 und 3.3 aufgeführten Patienten wurden in zwei große Gruppen, die Gruppe der Leukämien (ALL, AML, MDS; n=19) sowie in die Gruppe der soliden Tumoren (NB IV, RMS IV, HB IV, n=15) unterteilt. Die Gruppe der Leukämien beinhaltet  $13 \times$  ALL inkl.  $1 \times$  T-ALL,  $3 \times$  AML und  $3 \times$  MDS. Die Gruppe der soliden Tumoren beinhaltet  $9 \times$  RMS IV,  $5 \times$  NB IV und  $1 \times$  HB IV.

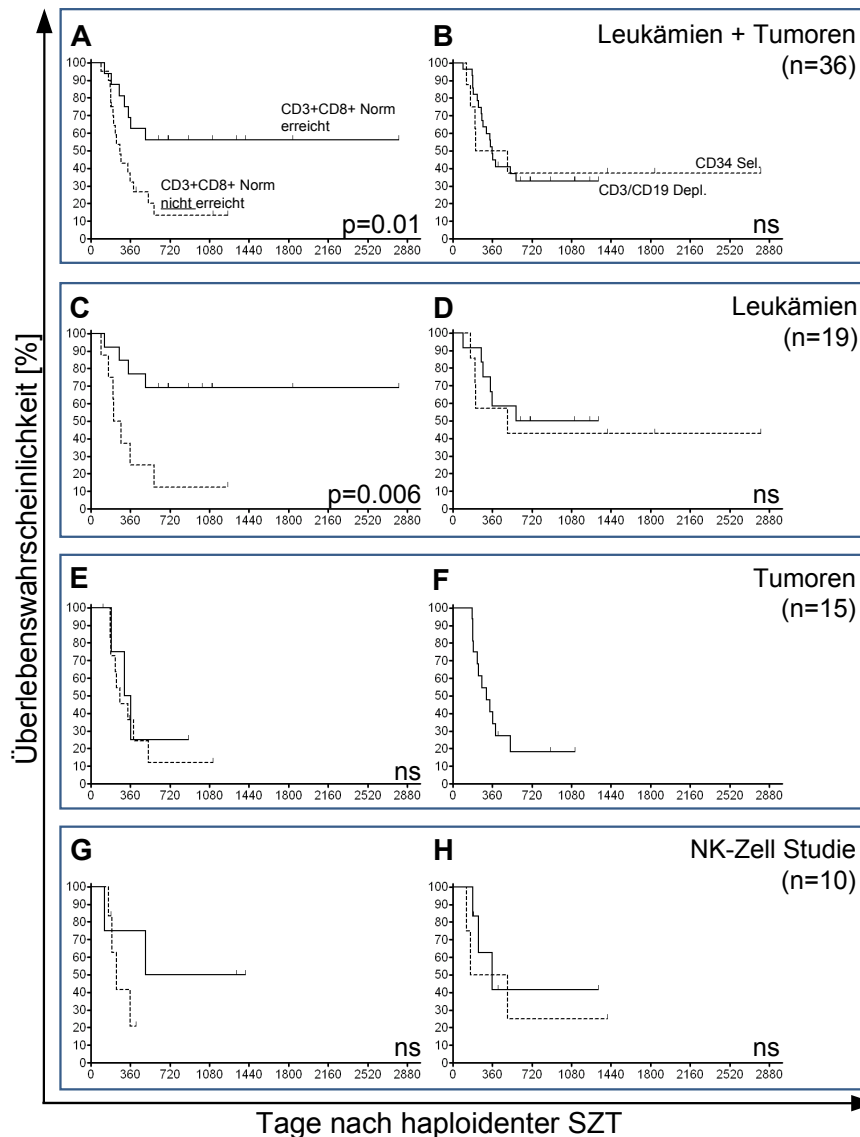
Es konnte eine signifikante Korrelation (log-rank Test) zwischen der Immunrestitution der  $CD3^+CD8^+$  T-Zellen und dem Überleben in der Gruppe der Leukämien gezeigt werden (► Abb. 4.22 C), wobei dies nicht bei Patienten mit Tumoren ersichtlich wurde (► Abb. 4.22 E). Allerdings liegt hier eine ungleiche Gruppenstärke in einer insgesamt kleinen Gesamtpopulation vor.

Die Population der zytotoxischen T-Zellen erwies sich nur als geeigneter Parameter zum Deklarieren einer Überlebensvorhersage bei Patienten mit leukämischer Grunderkrankung.

Es konnte kein signifikanter Einfluss der Stammzelltransplantataufarbeitung (CD3/CD19-Depletion versus CD34-Selektion) in Bezug zum Überleben gezeigt werden (► Abb. 4.22 B). Da die soliden Tumoren in unserem Zentrum ausschließlich mit CD3/CD19-aufgereinigten Stammzellpräparaten therapiert wurden, war hier kein Vergleich mit CD34-selektierten Präparaten möglich (► Abb. 4.22 F). Die Patienten, der relativ großen Gruppe der Rhabdomyosarkome mit Stadium IV, verstarben fast alle innerhalb des ersten Jahres nach haploidenter SZT. Bei der Gruppe der Neuroblastome in Stadium IV verstarben 3 der 5 innerhalb des ersten 3/4 Jahres. Ein Patient mit NB Stadium IV ist nun 1 Jahr nach SZT und der zweite ist zu kurz in der Beobachtungszeit. Bei ihm kann noch keine Aussage getroffen werden.

Bei den Leukämien konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied in Bezug zur Stammzelltransplantataufarbeitung gezeigt werden.

## 4 Ergebnisse



**Abbildung 4.22: Die Immunrekonstitution der CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen und Art der Zellaufarbeitung zur haploidenten SZT bezogen auf die Überlebenswahrscheinlichkeit.**

Die linke Spalte (A, C, E, G) zeigt den Zusammenhang zwischen der Regeneration der CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen und dem Überleben. Die Patienten, die innerhalb der ersten 6 Monate den Normbereich erreichten und ihn für mindestens 6 Wochen nicht wieder unterschritten (—), hatten ein besseres Überleben gegenüber Patienten, die diese Bedingungen nicht erfüllten (···). Es ist deutlich zu erkennen, dass eine schnelle Regeneration der zytotoxischen T-Zellen nur in der Patientengruppe mit Leukämieerkrankungen mit einem signifikant erhöhten Überlebensvorteil einhergeht.

Die rechte Spalte (B, D, F, H) zeigt die Kaplan-Meier Kurven mit dem Einfluss der Transplantatbearbeitung, CD3/CD19-depletiertes (—) oder CD34-selektiertes (···) Stammzellprodukt. Da die Patientenkohorte, die haploident transplantiert wurden, verschiedene Erkrankungen miteinbezieht (n=36), sind in C+D die Gruppe der Patienten mit Leukämien (n=19), in E+F die Gruppe der Patienten mit Tumoren (n=15) und in G+H die Gruppe der NK-Zell-Studienpatienten (n=10) separat dargestellt. In der Gruppe der Tumoren wurde ausschließlich die CD3/CD19-Depletion als Aufarbeitungsmethode verwendet. Daher ist kein Vergleich mit der CD34-Selektion möglich.

#### 4 Ergebnisse

Von den 7 Patienten, die mit unstimulierten NK-Zellpräparaten behandelt worden, sind 2 Patienten am Leben (ALL CR3, ALL CR4). Von den 3 Patienten, die mit IL-2 stimulierten NK-Zellen behandelt wurden, leben ebenfalls zwei Patienten. Allerdings ist die Beobachtungszeit sehr kurz.

Unter den 4/10 Patienten, die nach NK-Zell-Infusion noch am Leben sind, finden sich 2 Patienten unter der *low-risk* Gruppe mit schneller Rekonstitution der zytotoxischen T-Zellen und 2 in der *high-risk* Gruppe.

# 5 Diskussion

## 5.1 In vitro Aktivierung der NK-Zellen

### 5.1.1 Aufreinigung und Expansion der NK-Zellen

Die Aktivierung von NK-Zellen mit IL-2 dient einerseits der Expansion der NK-Zellen, um eine ausreichende Zellzahl für eine Therapie zu erhalten, andererseits der Steigerung der Zytotoxizität gegenüber malignen Zellen. Die Zytokinstimulierung mit IL-2 führt zu einer gesteigerten NK-Zell-Funktion und einer verbesserten Anti-Tumor Antwort (Trinchieri et al. 1984, Fehniger et al. 2002). Bisher liegen in der Literatur kaum Daten über die Charakterisierung von NK-Zellen unter IL-2 Expansion im klinischen Maßstab vor. Daher wurden in dieser Arbeit im Rahmen einer klinischen Phase I/II Studie die NK-Zellen von 5 gesunden Spendern (A-E) nach Aufreinigung im klinischen Maßstab und der Expansion unter GMP-Bedingungen funktionell und phänotypisch genau charakterisiert.

Die therapeutische Wirkung von IL-2 und Lymphokin-aktivierten Killerzellen (LAK) wurde 1988 pioniermäßig bei 652 Patienten von Rosenberg et al. im autologen Ansatz bei Nierenzellkarzinom- und Melanom-Patienten untersucht. Eine verbesserte Remission von bis zu 15 % wurde erreicht, allerdings ohne erkennbare Verlängerung der Überlebenszeit (Rosenberg & Mulé, 1985, Rosenberg et al. 1987 und Rosenberg 1988). Ebenso arbeitete Rosenberg an der Entwicklung von geschlossenen sterilen Zellkultur-Systemen, die bei der Generierung der LAKs notwendig waren (Muul et al. 1987).

Da es sich bei LAKs um aktivierte Lymphozyten (NK- und T-Zellen) handelt, kann man hier noch nicht von einem alleinigen NK-Zell-Effekt sprechen. Um selektiv NK-Zellen im klinischen Maßstab aufzureinigen und zu expandieren, gab es unterschiedliche Ansatzpunkte, die in Tabelle 5.1 zusammengefasst sind.



## 5 Diskussion

**Tabelle 5.1: Aufreinigung und Aktivierung im klinischen Maßstab.**

Autor	Ausgangs- material	Aufreinigung	Zytokine	Stim.- dauer	n	Proli- feration
Luhm <i>et al.</i> 2002	Leuk	CD3,4,19,33Depl	IL-2,-15+FZ	14 d	37	80-200-fach
Klingemann <i>et al.</i> 2004	PB	CD56Sel	IL-2,-15	14 d	5	5-20-fach
Köhl <i>et al.</i> 2005	Leuk	CD3Depl+CD56Sel	IL-2	10-14 d	4	5-fach
McKenna <i>et al.</i> 2007	Leuk	CD3Depl+CD56Sel	IL-2	ü.Nacht	70	k.A.

PB=peripheres Blut, Leuk=Leukapheresate, Depl=Depletion, Sel=Selektion, FZ=Feeder Zellen, ü=über, d=Tage.

Das beschriebene Protokoll von Luhm et al. 2002 erreichte eine hohe NK-Zell-Proliferation. Nachteil dieses Protokolls war das Verwenden von Feeder Zellen (bestrahlte allogene periphere MNZ), die nicht einer GMP-konformen Herstellung entsprechen. Klingemann & Martinson, 2004 verwendete peripheres Blut zur Aufreinigung. Ein Leukapheresat ist deutlich ergiebiger, da man wesentlich höhere NK Absolutzellzahlen gewinnen kann. Der größte Nachteil bei diesem Protokoll besteht jedoch in dem Fehlen der CD3 Depletion. Da Klingemann nur eine CD56-Selektion vornahm, bestand das Zellgemisch nach Selektion neben CD56<sup>+</sup> NK-Zellen auch aus CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> NK-T-Zellen. Die NK-Zell-Aufreinigung unserer Gruppe um Köhl und der Gruppe um Miller erfolgte unter Verwendung eines unstimulierten Leukapheresates durch eine CD3 Depletion und im Anschluss folgend einer CD56-Selektion (Koehl et al. 2005, McKenna et al. 2007). Der Hauptunterschied des Protokolls von McKenna et al. zu unserem verwendeten Protokoll bestand darin, dass die NK-Zellen für die Immuntherapie mit IL-2 nicht *in vitro* expandiert, sondern über Nacht mit IL-2 “anstimuliert”, dem Patienten infundiert und dann durch zusätzliche IL-2 Applikation *in vivo* expandiert wurden (Miller et al. 2005). Deshalb konnte McKenna et al. keine Angabe zur Proliferation machen.

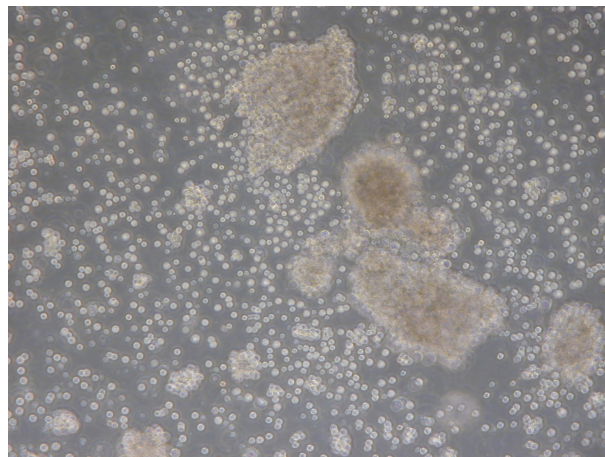
In der vorliegenden Arbeit gestaltete sich die Bestimmung der Proliferationsrate der NK-Zellen im klinischen Maßstab schwierig. Wie unter Kapitel 4.1.2 erläutert, wiesen expandierende NK-Zellen eine Clusterstruktur auf, die sich nur schwer vereinzeln ließ. Dies soll im Bild (► Abb. 5.1) veranschaulicht werden. Die Expansionsrate ist im Ergebnisteil mit einem Median von 5-fach angegeben. Es muss davon ausgegangen werden, dass dieser Wert zu niedrig ist, da auf ein kräftiges Durchmischen von NK-Zellen verzichtet wurde, da dies wiederum zu einer schlechteren Vitalität führt und eine hohe Vitalität der

## 5 Diskussion

Zellen essentiell für die klinische Anwendung von NK-Zellen war. Deshalb ging man den Kompromiss einer besseren Vitalität mit einer ungenaueren tieferliegenden Angabe der Absolutzellzahl ein.

Alle funktionellen Untersuchungen und Charakterisierungen der NK-Zellen in der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen eines Begleitmonitorings durchgeführt.

Die NK-Zellen aller Spender zeigten bei Aufnahme ins IL-2 Medium zunächst keine Proliferation, im Gegenteil, es gingen bis zu 80 % aller NK-Zellen in den ersten 3 Tagen in Apoptose. Ab Tag 5 der IL-2 Stimulierung war der Beginn der Zellproliferation zu verzeichnen. Die NK-Zellen verblieben in der exponentiellen Wachstumsphase bis auf eine Ausnahme (Spender A), der ab Tag 10 eine geminderte Vitalität einhergehend mit nachlassender Expansion zeigte.



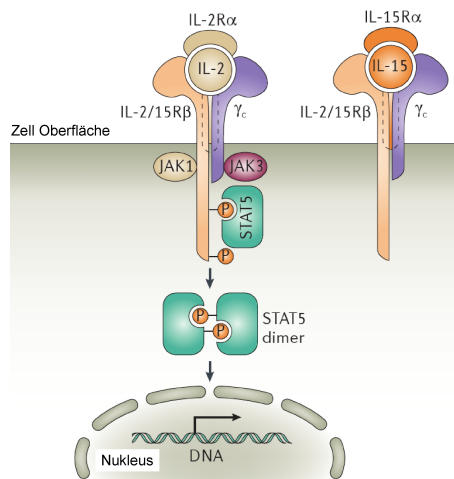
**Abbildung 5.1: Mikroskopische Aufnahme von IL-2 stimulierten NK-Zellen.** IL-2 stimulierte NK-Zellen am Tag 9 sollen die Eigenschaft der schwer vereinzelbaren Clusterstrukturen verdeutlichen.

Bei der Phänotypisierung der unstimulierten, frisch aufgereinigten NK-Zell-Population verschiedener Spender ergab sich eine Zusammensetzung der NK-Zellen aus  $\leq 10$  % immunregulatorischen  $CD56^{\text{bright}}CD16^{-}$  und aus  $\geq 90$  % zytotoxischen  $CD56^{\text{dim}}CD16^{+}$  NK-Zellen. Diese Ergebnisse stimmen mit Daten von Romagnani et al. überein. Frisch isolierte  $CD56^{\text{bright}}$  NK-Zellen aller Spender exprimierten CD62L, wie auch bei Frey et al. 1998 gezeigt. Sie exprimierten kein CD16 und nur minimal KIRs, wohingegen  $CD56^{\text{dim}}$  NK-Zellen CD16 und KIRs koexprimierten. Diese Beobachtungen decken sich mit Beschreibungen

## 5 Diskussion

von Cooper et al. 2001.

Das CD56-Molekül (*neural cell adhesion molecule*=NCAM) ist ein Oberflächen-Glykoprotein, das ursprünglich wegen seiner Rolle bei der Adhäsion von Nervenzellen Beachtung fand (Lanier et al. 1989). Es wurde in der vorliegenden Arbeit auf den NK-Zellen aller Spender durch die IL-2 Stimulierung hochreguliert. Daher konnte anhand der CD56 Expression nicht mehr in »bright« und »dim« unterschieden werden. Aber unter IL-2 Stimulierung stieg die CD16 Expression auf den NK-Zellen nicht an, was durch eine Studie von Nagler et al. 1989 ebenfalls belegt wird. Daher war eine Unterscheidung der NK-Zell-Subpopulationen anhand des CD16 Antigens nach IL-2 Stimulierung möglich. Nagler et al. 1989 und Caligiuri et al. 1990 zeigten, dass durch IL-2 Stimulierung die CD16<sup>-</sup> NK-Zellen eine höhere Proliferationskapazität aufwiesen als die CD16<sup>+</sup> NK-Zellen. Und dies begründete Caligiuri et al. 1990 mit der Koexpression des hochaffinen IL-2 Rezeptors, bestehend aus der p55 und der p75 Untereinheit. Auf den CD16<sup>+</sup> NK-Zellen fand man lediglich den niedrig affinen IL-2 Rezeptor, der "nur" die Untereinheit p75 besaß. Heute weiß man, dass der IL-2 Rezeptor aus drei Untereinheiten besteht und große Ähnlichkeit mit dem für IL-15 aufweist (► Abb. 5.2).



**Abbildung 5.2: Schematischer Aufbau des IL-2 und des IL-15 Rezeptors.** Der IL-2 Rezeptor besteht aus CD25 (IL-2R $\alpha$ , p55), CD122 (IL-2R $\beta$ , p75) und CD132 (IL-2R $\gamma$ , p64) und alle zusammen ergeben den hoch affinen IL-2 Rezeptor Komplex. Die Abbildung ist der Publikation von Waldmann et al. (2006) *Nat Rev Immunol* entnommen und übersetzt.

Luhm et al. 2002 zeigte an Tag 12 der NK-Zell-Stimulierung  $82 \pm 4\%$  CD16<sup>-</sup> NK-

Zellen. Auch Klingemann & Martinson, 2004 erhielten hauptsächlich CD16<sup>-</sup> NK-Zellen. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass die Verteilung der CD16<sup>-</sup> zu CD16<sup>+</sup> NK-Zell-Populationen stark zwischen den NK-Zell-Spendern variierte und man nicht einheitlich sagen kann, dass nur CD16<sup>-</sup> NK-Zellen durch die IL-2 Stimulierung generiert werden. Am Tag 9 variierte die Verteilung für die CD16<sup>-</sup> Population mit 1,2 % bis 63,5 % und für die CD16<sup>+</sup> Population mit 36,5 % bis 98,8 %. CD25 (IL-2R $\alpha$ ) war mit weniger als 10 % auf unstimulierten NK-Zellen nachweisbar und steigerte sich nach 9 bis 12 Tagen IL-2 Stimulierung auf über 90 % Expression aller NK-Zellen. Diese Beobachtung deckt sich nicht mit den Ergebnissen von Luhm et al. 2002, der nach 12 Tagen IL-2 Stimulierung nur bei  $40 \pm 8$  % eine CD25 Expression nachweisen konnte.

Im Labormaßstab wurden bisher neben IL-2 auch IL-12, IL-15, IL-21 und IFN- $\gamma$  sowie Zytokin-Kombinationen eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass dies zum Teil zu einer erhöhten NK-Zell-Aktivierung mit gesteigerter Proliferation führte (Takahashi et al. 2007, Dunne et al. 2001, Choi et al. 2004, Ferlazzo et al. 2004 und Parrish-Novak et al. 2000). Da IFN- $\gamma$  auch von NK-Zellen selbst produziert werden kann, deutet dies auf eine auto-krine Aktivierung von NK-Zellen über IFN- $\gamma$  hin (Chiorean & Miller, 2001 und Matera et al. 1999). Takahashi et al. 2007 zeigte, dass IL-2 als Stimulus für eine Steigerung der zytotoxischen Aktivität ausreichte. Er sah keinen synergistischen Effekt von IL-2, IL-12 und IL-15. Dunne et al. 2001 präsentierte vergleichbare zytotoxische Aktivitäten mit IL-2 oder IL-15. Bei der Proliferationskapazität zeigte IL-15 eine 4-fache und IL-2 eine 3-fache Expansionsrate. Die Präsenz von IL-15 soll für eine effektive Expansion und eine gute Vitalität erforderlich sein (Carson et al. 1997). Choi et al. 2004 zeigte durch IL-15 ebenfalls eine Steigerung der zytotoxischen Aktivität, verglich dies aber nicht mit IL-2.

### 5.1.2 Der immunologische Phänotyp der expandierten NK-Zellen

Zytokine beeinflussen das Rezeptorrepertoire der NK-Zellen (de Rham et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit sollten Veränderungen in der komplexen Zusammensetzung des immunologischen Rezeptorrepertoires bzw. Phänotypes der NK-Zellen unter IL-2 Stimulierung untersucht werden.

Der Rezeptor NKG2D war bei unstimulierten NK-Zellen zu 100 % auf der Zelloberflä-

## 5 Diskussion

che aller NK-Zellen exprimiert. Die Anzahl der NKG2D Rezeptoren pro NK-Zelle konnte jedoch unter IL-2 Stimulierung gesteigert werden und führte zu einem NKG2D<sup>bright</sup> Phänotyp. In einem Artikel von Cosman et al. 2001 wurde gezeigt, dass die Expression von ULPBs und MICA Molekülen auf der Zielzelle trotz vorhandener MHC-Klasse-I Expression zu einer Aktivierung der NK-Zelle führte. Das bedeutet, dass NK-Zellen auch MHC-Klasse-I exprimierende Zielzellen bei gleichzeitiger hoher Expression von aktivierenden Liganden zu lysieren vermögen.

Zu der Familie der NCRs gehören: NKp30, NKp44 und NKp46. Die Expression der NCRs korrelieren mit der zytotoxischen NK-Zell-Aktivität (Sivori et al. 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte auf den NK-Zellen aller Spender unter IL-2 Stimulierung eine Hochregulierung der drei NCRs nachgewiesen werden. Dabei wurde durch die IL-2 Stimulierung ein NCR<sup>bright</sup> Phänotyp generiert. Da dieser Effekt erst nach ein paar Tagen voll ausgeprägt war, spricht dies für eine Kultivierungszeit von mindestens 6 Tagen. Eine weitere Erhöhung der lytischen Aktivität von NK-Zellen wird durch ein Zusammenwirken von NCRs und NKG2D erreicht, wie von Moretta et al. 2001 beschrieben.

Um eine Aussage über den Aktivierungszustand von NK-Zellen zu erhalten, können weiterhin phänotypische Oberflächenmarker wie CD25, CD69 und HLA-DR bestimmt werden. Stimulierte NK-Zellen zeigten einen aktivierten Zustand gemessen an der CD25, CD69 und HLA-DR Expression. Die Expressionszeitkurve der mRNA (*messenger ribonucleic acid*=Boten-RNA) von CD69 ist transient. Sie hat ihren Höhepunkt 3 h nach Induktion einer Aktivierung und kann nach 8 h wieder bis auf den Ausgangsruhezustand zurückgehen (Mechanismus in T-Zellen gezeigt, Santis et al. 1995). In der vorliegenden Arbeit wurde unter Stimulierung mit IL-2 nach 3 Tagen eine vollständige Expression von CD69 auf nahezu 100 % der NK-Zellen nachgewiesen, die nicht rückläufig, sondern stabil messbar über die folgenden 10-14 Tage war. Dies lässt sich mit dem »dauerhaften« IL-2 Stimulus erklären. Ebenso stieg der verzögerte Aktivierungsmarker HLA-DR ab Tag 3 auf den NK-Zellen aller 5 Spender an, der jedoch nur bei Spender A einen Wert von 100 % auf allen NK-Zellen erreichte. HLA-DR zeigte im Gegensatz zu CD69 spenderabhängige Unterschiede in der Expression.

Die expandierten NK-Zellen trugen nach 9 Tagen Stimulierung keine *Homing*-Rezeptoren mehr auf ihrer Zelloberfläche. Während unstimulierte CD16<sup>-</sup> NK-Zellen CD62L expri-

## 5 Diskussion

mierten, kann vermutet werden, dass sie durch ein »*shedding*« (=Abbau) des Adhäsionsmoleküls dieses unter IL-2 Stimulierung verloren. Dieser Abbau des L-Selektins ist bisher nur bei der Aktivierung von T-Zellen beschrieben. Dabei verloren diese ihre Fähigkeit, in den Lymphknoten zu migrieren (Hamann et al. 2000). Man kann daher davon ausgehen, dass auch stimulierte NK-Zellen nicht mehr in der Lage sind, lymphatisches Gewebe zu durchdringen.

Desweiteren wurden in dieser Arbeit Veränderungen der KIRs, bestehend aus aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren, auf den NK-Zellen unter dem Einfluss der IL-2 Stimulierung untersucht. Bei unstimulierten NK-Zellen gab es einen kleinen Prozentsatz an NK-Zellen ( $\varnothing$  14 %), die keine KIRs auf der Zelloberfläche zeigten (KIR<sup>-</sup> NK-Zellen). Diese Zellpopulation vergrößerte sich deutlich unter IL-2 Stimulierung ( $\varnothing$  56 %). Bezogen auf die CD16<sup>-</sup> und CD16<sup>+</sup> NK-Zell-Population fingen erstere an unter IL-2 Stimulierung KIRs auf der Oberfläche hochzuregulieren, während zweitere die KIR Expression im größeren Umfang verloren. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits bei Romagnani et al. 2007 und Keskin et al. 2007 veröffentlicht. Romagnani et al. beschrieb hierbei, dass die CD56<sup>bright</sup> NK-Zell-Population eine unreifere NK-Zelle darstellt und bewies dies mit der Messung der Telomerlänge. Durch jede Zellteilung werden die Telomere verkürzt, da die DNA-Polymerase am Folgestrang nicht mehr ansetzen kann. Unterschreitet die Telomerlänge ein kritisches Minimum, kann sich die Zelle nicht mehr weiter teilen. Oft tritt dann die Apoptose oder ein dauerhafter Wachstumsstopp ein (McClintock 1941). Romagnani et al. betrachtete die IL-2 Stimulierung als eine Art »Reifung« der NK-Zelle. Weiterhin beschrieb sie, dass die KIR<sup>-</sup> NK-Zell-Population unter IL-2 Stimulierung größer wurde und erklärte dies als Folge einer niedrigen Proliferationskapazität der KIR<sup>+</sup> NK-Zellen. Wang et al. 2007 fand auch eine größer werdende KIR<sup>-</sup> Population unter der Stimulierung mit IL-2, IL-15 und CsA.

Zusammenfassend kann man sagen, dass durch die IL-2 Stimulierung NK-Zellen mit folgendem Phänotyp auftraten: CD56<sup>bright</sup>, CD16<sup>-</sup> *und/oder* CD16<sup>+</sup> mit großen Unterschieden dieser beiden Subpopulationen zwischen den Spendern. Alle NK-Zellen trugen NCR<sup>bright</sup>, NKG2D<sup>bright</sup> und CD69<sup>+</sup>. Es gab einen großen Anteil KIR<sup>-</sup> NK-Zellen, aber auch einen Anteil von NK-Zellen, der stetig KIRs auf der Zelloberfläche exprimierte.

### 5.1.3 Gewichtung der veränderten Rezeptorzusammensetzung auf die Wirkhypothesen der NK-Zellen

Die Bewertung der NCRs und des NKG2D ist eindeutig. Es sind aktivierende NK-Zell-Rezeptoren, wobei die NCR-Rezeptordichte direkt mit der zytotoxischen Aktivität korreliert (Sivori et al. 1999 und Pende et al. 2001). So zeigte eine insuffiziente NCR Expression (NCR<sup>dull</sup>=für schwach exprimiert) bei 71 AML Patienten, dass eine geringe NCR Rezeptorexpression mit einem schlechteren Überlebensvorteil einherging (Fauriat et al. 2007). Die in der Einleitung im Kapitel 1.5.3 beschriebenen Wirkhypothesen der NK-Zellen sollen nun im folgenden Abschnitt in Bezug zu den erhobenen Daten der klinischen NK-Zell-Studie diskutiert werden.

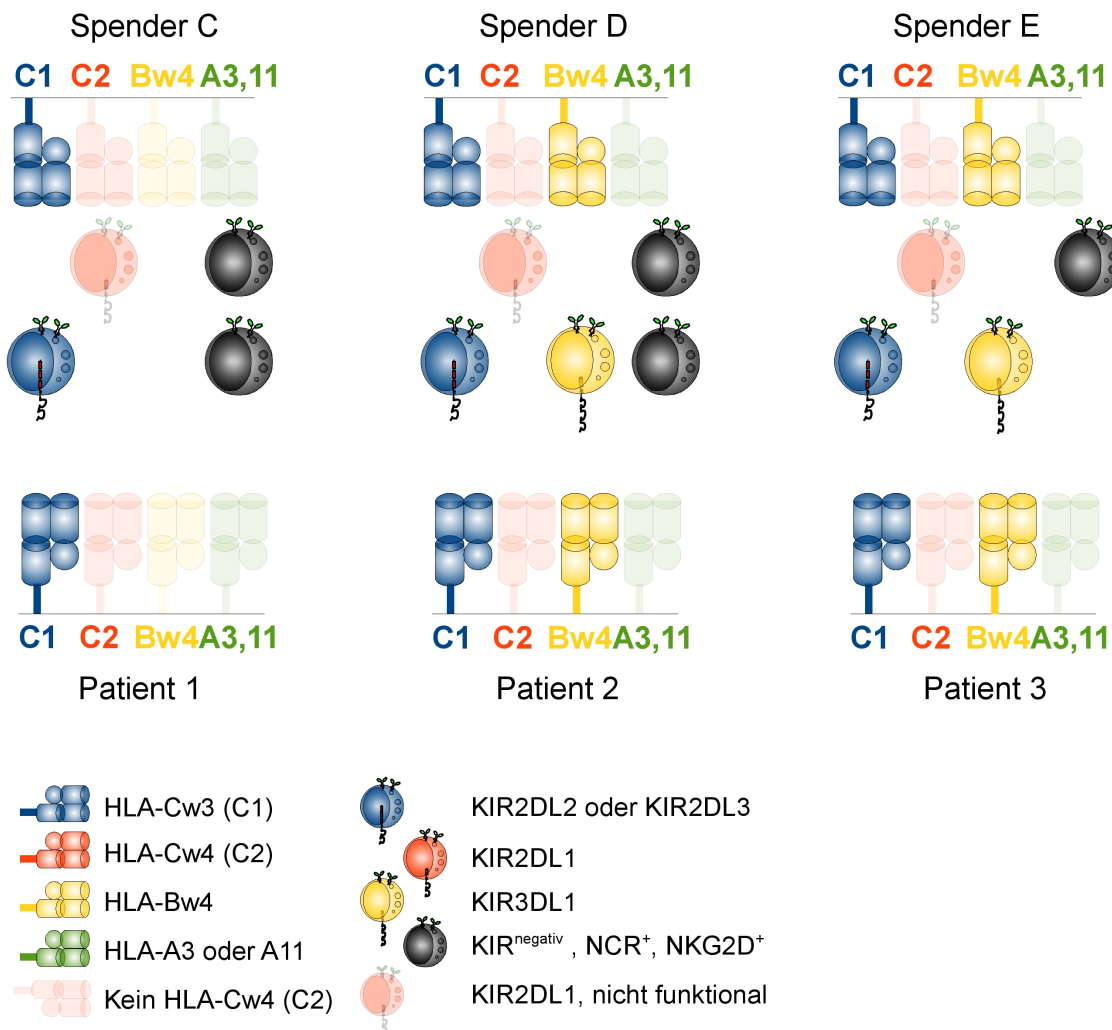
#### **Von Kärre *et al.* aufgestellte und von Farag *et al.* überprüfte: »Missing-self«-Hypothese:**

In der vorliegenden Arbeit zur klinischen Studie mit IL-2 stimulierten NK-Zellen wies keiner der 3 Spender einen KIR-Mismatch auf. Deshalb existiert auch keine alloreaktive NK-Zell-Population. Da die Patientenzahl mit  $n=3$  zu gering ist, kann hierbei zwar keine statistische Aussage getroffen werden, wohl aber der Versuch einer Veranschaulichung der bis heute existierenden NK-Zell-Wirkhypothesen gestartet werden. In Abbildung 5.3 soll veranschaulicht werden, dass kein KIR Ligand Mismatch vorhanden war. Alle drei Patienten waren homozygot für C1/C1 und wurden mit einem homozygoten C1/C1 (HLA-C Locus) Spender transplantiert. Für einen KIR-Mismatch hätten die Spender C bis E entweder HLA der Gruppe C2 (■, HLA-Cw4) und/oder HLA-A3 oder 11 (■) besitzen müssen.

#### **Von Kim *et al.* aufgestellte und an humanen NK-Zellen von Yu *et al.* bestätigte: »Licensing«-Hypothese:**

Hierbei muss noch einmal ausführlicher beschrieben werden, was es bedeutet, eine »lizenzierte« NK-Zelle zu sein. Es gibt nach Yu et al. 2007 NK-Zellen, die einen inhibitorischen KIR für das eigene MHC-Klasse-I besitzen (S-KIR=*self*-KIR) und NK-Zellen, die einen inhibitorischen KIR für nicht eigene MHC-Klasse-I Moleküle auf der Oberfläche tragen (NS-KIR=*nonsel*f-KIR). Lizenzierte NK-Zellen sind somit NK-Zellen, die KIRs auf der Oberfläche tragen und das dazu passende MHC-Klasse-I Molekül.

## 5 Diskussion



**Abbildung 5.3: KIR Proportionsänderung nach IL-2 Stimulierung auf den NK-Zellen und Eingruppierung nach der »Licensing«-Hypothese von Kim *et al.*** Im Rahmen einer klinischen Phase I/II Studie wurden von 3 Patienten mit NB und ihren haploidenten NK-Zell-Spendern eine HLA- und KIR- Genotypisierung auf Spender und Empfänger NK-Zell-Seite durchgeführt. Zusätzlich wurde mittels Flowzytometrie Veränderungen in der KIR Proportion unter IL-2 Stimulierung gemessen.

Die Obere Reihe stellt die NK-Zell-Spender C bis E mit ihrer HLA Typisierung und ihrem Repertoire an NK-Zell-Klonen dar. Alle Spender besitzen NK-Zellen, die CD158a,h (■) auf ihrer Zelloberfläche tragen. Diese NK-Zell-Fraktionen besitzen jedoch alle nicht die Lizenz der genetischen Funktionalität. Deshalb sind diese NK-Zellen nur blass dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass es keinen KIR Liganden *mismatch* in den drei klinischen Läufen gab. Hervorzuheben ist, dass ein großer Teil der infundierten NK-Zellen zwar keinen KIR, wohl aber aktivierende Zytotoxizitätsrezeptoren (NCR, NKG2D) auf der Zelloberfläche trugen und damit eine hohe zytotoxische Aktivität besaßen.

In Abbildung 5.3 sind demnach die (■) KIR2DL2/KIR2DL3 NK-Zellen beispielsweise lizenziert und sind deshalb in kräftigen Farben dargestellt. Wohingegen die (■) KIR2DL1



NK-Zellen in allen 3 Spendern nicht lizenziert waren und deshalb bloss dargestellt wurden. Die Rezeptordichte der S-KIR und NS-KIRs wurde unter dem Einfluss von IL-2 hochreguliert. Ein Phänomen, das diese Arbeit bestätigen kann. Die zytotoxische Aktivität der S-KIR war hoch und war durch mehrere S-KIRs steigerbar, wohingegen die zytotoxische Aktivität der NS-KIR niedrig war und durch IL-2 auch nicht gesteigert werden konnte (Yu et al. 2007).

### **Von Raulet *et al.* aufgestellte: »Hyporesponsiveness«-Hypothese:**

Während Yu et al. 2007 ebenfalls von einer großen KIR<sup>-</sup> NK-Zell-Population von 40 bis zu 70 % berichtete (Kultivierungszeit bis zu 5 Wochen), erklärt er diese für wenig reaktionsfähig. Nach der Hypothese von Raulet & Vance, 2006 über die *Hyporesponsiveness* spricht er von einer Überwindung der »*hyporesponse*« mit Hilfe von Zytokinen. Da die KIR<sup>-</sup> NK-Zellen in unserer Studie auf jeden Fall aktivierende Rezeptoren trugen, kann spekuliert werden, dass dies auch möglich ist.

Ljunggren et al. nimmt ebenfalls Mechanismen hinter den KIR und HLA Rezeptoren an. Viele der NK-Zell-Experimente beruhen auf der Generierung von NK-Zell-Klonen, die nur einen Rezeptor exprimierten. *In vivo* ist das Rezeptorgeflecht wesentlich komplexer, denn hier können NK-Zellen mehrere inhibitorische wie aktivierende Rezeptoren gleichzeitig tragen. Das erschwert es, diese Mechanismen auf den *in vivo* Zustand zu übertragen.

### **5.1.4 Bewertung der Funktionalität von NK-Zellen**

CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen können eine gleich hohe zytotoxische Aktivität wie die CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen durch *in vitro* Kultivierung erlangen, wie von Nagler et al. bereits 1989 gezeigt. Dies wurde ebenso *in vivo* durch die Stimulierung mit IL-2 erreicht (Ellis & Fisher, 1989). In der vorliegenden Arbeit wurden NK-Zellen im klinischen Maßstab aufgereinigt und für eine Immuntherapie *in vitro* mit IL-2 stimuliert und expandiert. Dass eine Expansion von Zellen mit einem Funktionsverlust einhergehen kann, ist von T-Zellen beschrieben (Hollatz et al. 2008). Es besteht weiterhin die Gefahr, dass durch die Kultivierungsphase Veränderungen in den Zellen hervorgerufen werden, beispielsweise Verlust der polyklonalen Zusammensetzung der NK-Zellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die zytotoxische Funktion der stimulierten NK-Zellen

## 5 Diskussion

einmal mit Hilfe eines durchflusszytometrischen Assays gegen K-562 und gegen die Neuroblastomzelllinie UKF-NB-3 untersucht und weiterhin mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes visuell überprüft. Mit beiden Methoden wurde festgestellt, dass IL-2 stimulierte NK-Zellen gegen die Target-Zelllinien ein gesteigertes Killing aufwiesen. Vielfach wurde belegt (Ortaldo et al. 1977 und Klingemann & Martinson, 2004), dass unstimulierte wie auch IL-2 stimulierte NK-Zellen eine hohe zytotoxische Aktivität gegen K-562 aufweisen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es bei unstimulierten NK-Zellen große Unterschiede in der Lyseaktivität zwischen verschiedenen Spendern gab. Zum Bewerten der Funktionalität ist die Vitalität und die Expansionsdauer der NK-Zellen ebenfalls ein wichtiger Punkt. Insbesondere die NK-Zellen von Spender A, die zum Teil eine Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 aufwiesen, zeigten eine Zytotoxizität von über 90 % gegenüber K-562 Zellen. Normalerweise spricht man bei frisch aufgereinigten NK-Zellen von *resting* (=ruhenden) NK-Zellen. Doch die NK-Zellen waren wahrscheinlich "voraktiviert". Das zeigten neben den Messungen des CD69 auch die Messungen des späten Aktivierungsmarkers HLA-DR, der durch die IL-2 Stimulierung die höchste Expression auf den NK-Zellen von Spender A im Vergleich zu den anderen Spendern erreichte. Die lytische Aktivität der NK-Zellen von Spender A ließ sich durch die IL-2 Stimulierung nur unwesentlich steigern, während die NK-Zellen der anderen Spender unter IL-2 Stimulierung eine deutlich höhere Zytotoxizität erreichten.

Eine weitere funktionale Kompetenz stellt die Produktion von Zytokinen dar und auch hier konnte gezeigt werden, dass IL-2 stimulierte NK-Zellen in der Lage sind, eine Reihe von Zytokinen auszuschütten. Mit Hilfe der CBA Technologie konnte die Freisetzung mehrerer Zytokine/Chemokine vor und nach IL-2 Stimulierung bestimmt werden. Luhm et al. berichtete von einer verschlechterten Zytokinproduktion durch die Stimulierung (Luhm et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit fand man bei allen NK-Zell-Spendern nach der IL-2 Stimulierung das gleiche Zytokinmuster. Die Unterschiede lagen hauptsächlich in der Konzentration der gefundenen Zytokine. IFN- $\gamma$  wurde in erhöhtem Maß von IL-2 stimulierten NK-Zellen ausgeschüttet. Bei unstimulierten NK-Zellen sind die CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen die Hauptquelle für Zytokine. Sie sollen auch nach Stimulierung mit PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) und Ionomycin die stärker zytokinproduzierende NK-Zell-Population sein (Cooper et al. 2001, Fehniger et al. 1999). Interessanterweise

## 5 Diskussion

zeigte Spender A nach IL-2 Stimulierung nur minimal eine CD16<sup>-</sup> NK-Zell-Population und zeigte die absolut höchste IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und FasL Ausschüttung. Spender D, der die größte CD16<sup>+</sup> NK-Zell-Population mit 63,5 % aufwies, zeigte dafür erhöhte Zytokinpiegel von IP-10, IL-6, MCP-1, IL-13. Zytokine wie TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  und FasL, die in direktem Zusammenhang zur zytotoxischen Aktivität stehen, waren messbar und können die gesteigerte NK-Zell-Zytotoxizität unterstützend begründen.

Das Ausschütten von inflammatorischen Zytokinen wie IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  kann das adaptive Immunsystem aktivieren (Dranoff 2004). Zytokine wie MCP-1, IP-10, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  können das monozytäre System und Zytokine wie IL-8, RANTES, GM-CSF können das granuläre System stimulieren. Aktivierte NK-Zellen fördern die Ausreifung der dendritischen Zellen. Dabei scheint der Rezeptor NKp30 eine zentrale Rolle zu spielen (Vitale et al. 2005). Verhältnisabhängig von der NK-DC Ratio können unreife DZ dabei in Apoptose geführt werden (Walzer et al. 2005). Dieses Phänomen wird begründet durch das Hochregulieren von MHC-Klasse-I während des Reifungsprozesses von dendritischen Zellen, im speziellen HLA-E (Della Chiesa et al. 2003). Viele der experimentellen NK und DZ Interaktionsansätze sind bisher nur in Mäusen und mit recht unphysiologischen Verhältnissen gezeigt. Daher ist es schwer, dies auf das humane System zu übertragen. Es wird vermutet, dass der »*cross-talk*« zwischen NK-Zellen und DZ notwendig ist, um eine Brücke zwischen angeborener und erworbener Immunabwehr zu formen.

Laut Fauriat et al. 2007 wiesen 80 % seiner gesunden Probanden einen NKp30<sup>+</sup> und NKp46<sup>+</sup> Phänotyp auf (n=23). Interessanterweise soll der NKp44 nur auf IL-2 stimulierten NK-Zellen zu finden sein (Vitale et al. 1998, Moretta et al. 2001). Das würde im Zusammenhang mit CD69 darauf hindeuten, dass Spender A "voraktiviert" war. Dies war aber nicht durch Krankheitsanzeichen sichtbar. Im Gegensatz dazu waren die NK-Zellen von Spender A nach 9 Tagen IL-2 Stimulierung gerade noch zytotoxisch funktionstüchtig. Nach 10 Tagen wären die NK-Zellen von Spender A nicht mehr für einen klinischen Einsatz verwendbar gewesen, da es zu einem Vitalitätseinbruch kam. Eine Vermutung für den Einbruch der Vitalität könnten die hohen FasL-Werte im gemessenen Zellüberstand sein. Normalerweise sind NK-Zellen den eigenen apoptoseinduzierenden Proteinen inert (Catalfamo & Henkart, 2003). Aber vielleicht gibt es Grenzbereiche und die hohen FasL Konzentrationen waren die Ursache, dass die NK-Zellen von Spender A nach 9 Tagen

## 5 Diskussion

IL-2 Stimulierung neben der hohen zytotoxischen Aktivität auch ungewollt die eigene Fas-vermittelte Apoptose induzierten.

Für den routinemäßigen Einsatz von NK-Zell-Immuntherapien bedeutet dies ein Überprüfen der Aktivierungsmarker (CD69, NKp44) bereits bei den unstimulierten NK-Zellen, um bei Bedarf eine verkürzte Expansionszeit in Betracht zu ziehen. Weiterhin bedeutet es ein engmaschiges Monitoring der expandierten Zellen in Bezug zur Vitalität. Durch die existierenden spenderabhängigen Unterschiede ist es ratsam, die individuellen Einflussgrößen im Rahmen von 9 bis 16 Tagen in der Expansionsdauer zu berücksichtigen.

Zusammenfassend konnte erfolgreich gezeigt werden, dass aufgereinigte IL-2 stimulierte NK-Zellen die Fähigkeit der zytotoxischen Lyse von Zielzellen mit einer synergistischen Zytokinausschüttung besitzen.

## 5.2 In vivo Einfluss der NK-Zelltherapie nach allogener SZT

### 5.2.1 NK-Zellen in der allogenen SZT

Durch die bereits erläuterte »*Missing Self*«-Hypothese (► Kap. 1.5.3) und den »*Graft versus Tumor/Leukemia*«-Effekt (► Kap. 1.4.2) sollte deutlich gemacht werden, dass bei allogenen NK-Zell-Immuntherapien ein wesentlich stärkerer zytotoxischer Effekt angenommen wird als bei Applikation autologer NK-Zellen. Bisher gibt es keine nachgewiesenen signifikanten klinischen Effekte, die auf Studienprotokollen mit autologer NK-Zelltherapie basieren (Rosenberg & Mulé, 1985, Law et al. 1995 und Burns et al. 2003).

Die allogene SZT ist eine etablierte Behandlungsstrategie bei verschiedenen malignen, hämatologischen Erkrankungen. Die allogene SZT an sich kann auch als eine Art Immuntherapie angesehen werden. Patienten werden nicht nur aufgrund der intensiven Chemotherapie vor der SZT, sondern auch durch die immunkompetenten Zellen des Stammzelltransplantates, die einen GvL/GvT-Effekt erzielen können, geheilt. Um einen möglichen Benefit von NK-Zellen nach SZT zu beurteilen, wurden klinische Studien retrospektiv ausgewertet.

Ruggeri et al. 2002 zeigte einen positiven Effekt bei Vorliegen eines KIR-Liganden Mismatch in GvL-Richtung in der haploidenten SZT bei erwachsenen AML Patienten (n=58). Dabei waren Rückfallrate und Abstoßungsrate deutlich niedriger gegenüber Patienten ohne KIR-Liganden Mismatch. Sie fand weiterhin eine verringerte Häufigkeit der GvHD bei Patienten mit einem KIR-Liganden Mismatch in GvL-Richtung. Der KIR-Liganden Mismatch beruhte hierbei auf dem Fehlen des HLA-Klasse I Allels beim Empfänger. Ruggeri et al. untersuchte dabei ein Fehlen von HLA-Cw3, HLA-Cw4, HLA-B und HLA-A3 oder 11 und schloss dabei auf das vorhandene KIR Repertoire.

Giebel et al. 2003 fand ebenfalls einen positiven Effekt bei Vorliegen eines KIR-Liganden Mismatches bei AML Patienten. Er untersuchte dabei unmanipulierte Stammzelltransplantate von unverwandten Spendern, die entweder vollständig passend oder mismatched waren. Von den 130 in die Studie eingeschlossenen Patienten fand er 20 Patienten mit einem KIR-Liganden Mismatch und diese zeigten eine wesentlich höhere Überlebens-

## 5 Diskussion

wahrscheinlichkeit ( $p=0,006$ ), verglichen mit denen, die keinen KIR-Liganden Mismatch aufwiesen.

Beelen et al. 2005 untersuchte bei unmanipulierten Stammzelltransplantaten von Fremdspendern den Einfluss von KIR-Liganden Mismatch und fand einen überdurchschnittlichen positiven Langzeiteffekt bei 374 Patienten, die entweder an einer AML, einer CML oder einem MDS litten.

Es gibt weiterhin Hinweise, dass auch bei pädiatrischen ALL Patienten ( $n=36$ ) ein KIR Liganden Mismatch den GvL- Effekt steigert (Leung et al. 2004). Die Tabelle 5.2 gibt eine Übersicht über die Studien, die sich mit dem KIR-Liganden Mismatch beschäftigt haben. Hierbei soll deutlich werden, dass es eine Reihe von Studien gibt, die einen positiven KIR Mismatch Effekt widerlegen oder sogar einen negativen Effekt zeigen konnten.

**Tabelle 5.2: KIR und KIR Liganden in der SZT.**

Autor	Variable	haplo-ident	Erkrankung	n	Überleben	GvHD
Ruggeri <i>et al.</i> 2002	KIR-L Mismatch	ja	ALL,AML	58	↑	↓
Davies <i>et al.</i> 2002	KIR-L Mismatch	nein	ALL,AML,CML	175	↓	↑
Giebel <i>et al.</i> 2003	KIR-L Mismatch	nein	ALL,AML,CML	130	↑	↔
Bishara <i>et al.</i> 2004	KIR-L Mismatch	ja	ALL,AML,CML	62	↓	↑
Bornhäuser <i>et al.</i> 2004	KIR-L Mismatch	nein	AML,CML,MDS	118	↔	↑
Schaffer <i>et al.</i> 2004	KIR-L Mismatch	nein	ALL,AML,CML	167	↓	↔
Leung <i>et al.</i> 2004	KIR/KIR-L Mismatch	ja	ALL,AML (päd.)	36	↑	k.A.
Beelen <i>et al.</i> 2005	KIR-L Mismatch	nein	AML	374	↑	↔
Farag <i>et al.</i> 2006	KIR-L Mismatch	nein	AML,CML,MDS	1571	↔	↔
Miller <i>et al.</i> 2007	KIR-L Mismatch	nein	AML,CML,MDS	2062	↑	↑

Empf=Empfänger, päd.=pädiatrisch, GvHD=Graft versus Host Disease, k.A.=keine Angabe.

Bei einer retrospektiven Studie mit 175 ALL, AML und CML Patienten wurde kein positiver Effekt bei Vorliegen eines KIR-Liganden Mismatches in Bezug auf Transplantatversagen, GvHD, Rezidivrate oder Überlebenswahrscheinlichkeit deutlich (Davies et al. 2002). Bishara et al. 2004 fand in haploident Transplantierten ( $n=62$ ), dass erhöhte NK-Zell-Alloreaktivität mit erhöhter GvHD Inzidenz bei KIR-Liganden Mismatch auftrat. Weiterhin belegte sie den Zusammenhang mit aktivierenden KIRs und der Prävalenz einer GvHD. Bornhäuser et al. 2004 fand weder einen positiven noch einen negativen Einfluss auf das Überleben der Patienten (118), die einen KIR-Liganden Mismatch aufwiesen. Es

## 5 Diskussion

gibt bisher keine Hinweise, wie sich ein KIR-Liganden Mismatch bei Patienten mit soliden Tumoren auswirkt.

Die Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse liegen in der gemischten Auswahl der Spender (MSD, MUD, MMUD, haploidente Spender). Bei der haploidenten SZT wird eine extensive T-Zell-Depletion unumgänglich, um eine lebensgefährliche GvHD zu vermeiden. Deshalb unterscheiden sich die Studien stark in dem Grad der T-Zell-Depletion. Weiterhin gibt es Unterschiede in der Stammzelldosis, im Konditionierungsregime und in der Immunsuppression nach SZT, die beispielsweise bei der haploidenten SZT wesentlich stärker durchgeführt werden muss. Weiterhin liegen den einzelnen Studien Patienten mit verschiedenen Erkrankungen zugrunde (ALL, AMC, CML, MDS). Dazu kommt, dass kindliche Leukämien nicht mit denen Erwachsener verglichen werden können. Der Nachteil bei diesen Studien, die sich retrospektiv mit dem KIR-Liganden Mismatch auseinandergesetzt haben, besteht in der einseitigen Sicht auf den “nur” genotypisch vorhandenen HLA Mismatch. Es wurde nicht genotypisch die Existenz der KIRs im Genom untersucht und nicht, ob diese am Ende auf der NK-Zell-Oberfläche exprimiert wurden. Daher ist bei diesen Auswertungen eine Aussage über die wirkliche alloreaktive NK-Zell-Population nicht möglich (► Abb. 1.19).

Deshalb wurden die Spender NK-Zellen in der vorliegenden Arbeit genotypisch wie auch phänotypisch untersucht. Bei der Beleuchtung der Existenz von KIRs auf genotypischer und phänotypischer Ebene kann die Existenz variieren. In 25 % der 73 Individuen, die Leung et al. 2005 untersuchte, fand er keine Übereinstimmung des KIR-Genotypes mit dem KIR-Phänotyp. Weiterhin existiert bei KIR2DS4 in 84 % der europäischen und amerikanischen Bevölkerung ein Null Allel. Das bedeutet das Fehlen eines Genproduktes auf molekularer Ebene und dadurch die Abwesenheit einer Funktion auf der Phänotypebene (Maxwell et al. 2002). Auch in dieser Arbeit wurden KIRs genotypisch ermittelt, die phänotypisch nicht detektiert werden konnten (► Tab. 4.2, KIR3DL1, KIR2DS4 und KIR3DS1). Mit der Kombination aus KIR-Typisierung und flowzytometrischer Analyse war es bei der Hälfte der KIRs möglich, den genauen KIR zu bestimmen. Da mAk nur die Oberflächenstruktur der KIRs erfassen können, sich manche KIRs aber wie unter Kapitel 1.5.1 beschrieben nur durch ihre intrazelluläre Struktur unterscheiden, ist es nicht möglich, jeden KIR mit einem monoklonalen Antikörper zu detektieren. Aber es konnten

die Anteile dieser KIR Gruppen an der Gesamt NK-Zell-Population gezeigt werden. Das Auffinden von KIR<sup>-</sup> NK-Zellen in Maus (Fernandez et al. 2005, Kim et al. 2005) und Mensch (Anfossi et al. 2006) und der Versuch einer Erklärung dieser NK-Zell-Toleranz mündete in der Hypothesenformulierung von Yokoyama & Kim, 2006 und Raulet & Vance, 2006. Dies indiziert, dass es weitere Parameter hinter KIR- und HLA-Merkmalen gibt (Litwin et al. 1993, Ljunggren & Malmberg, 2007).

### 5.2.2 Allo gene NK-Zell-Immuntherapie

Der klinische Einsatz von hochaufgereinigten NK-Zellen ist aufgrund des technischen Aufwandes bisher nur bei einer eher geringen Patientenzahl zu verzeichnen. Die bisher durchgeführten NK-Zell-Studien sind in Tabelle 5.3 zusammengetragen. Allen Studien-Protokollen gemeinsam ist die Ausrichtung auf den Einsatz der haploidenten NK-Zell-Applikation. Passweg et al. 2004 und Uharek et al. 2003 zeigten, dass eine Aufreinigung von NK-Zellen aus unstimulierten Leukapheresen mit minimaler T-Zell-Kontamination unter GMP-Bedingungen praktikabel war. Durch die extensive T-Zell-Depletion gelang es, eine T-Zell- (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>) Gabe-Dosis unter  $1,0 \times 10^5/\text{KG}$  zu erreichen (Passweg et al. 2006). In dieser Arbeit wurde diese Grenze für T-Zellen nicht überschritten.

Durch die Herstellung von 2 Präparaten mit je einer CD3 Depletion und der anschließenden CD56-Selektion bewegte sich die mittlere Ausbeute an NK-Zellen zwischen 30 und 70 % (Passweg et al. 2005). In der hier vorliegenden Arbeit war das Ergebnis mit einer mittlere Ausbeute von 58,8 % (42,0 - 75,6 %) etwas besser. Dies könnte an der schnellen und direkten CD3 Depletion ohne Übernachtlagerung des Leukapheresats gelegen haben. Passweg et al. 2004 und Köhl et al. zeigten aber auch, dass die gewonnenen NK-Zellen im unstimulierten Zustand eine geringe bis mittlere zytotoxische Aktivität aufwiesen. Um die zytotoxische Aktivität zu steigern, wurde in klinischen Studien bisher IL-2 eingesetzt. Dabei verfolgte man unterschiedliche Strategien. Koehl et al. 2004 stimulierte hoch aufgereinigte NK-Zellen 14 Tage mit IL-2, verabreichte diese zu 3 Zeitpunkten nach haploidenter SZT. Slavin et al. 2004 stimulierte Lymphozyten über 4 Tage mit IL-2 und reicherte dann CD56<sup>+</sup> Zellen an und verabreichte diese nach haploidenter SZT (n=3), nach Geschwister SZT (n=4) und nach SZT mit einem passenden Fremdspender (n=1). Miller et al. 2005



## 5 Diskussion

hingegen reinigte NK-Zellen auf, inkubierte diese über Nacht mit IL-2 und verabreichte diese mit IL-2 s.c. bei 43 Patienten ohne eine vorherige Stammzelltransplantation. Ein Teil dieser Patienten wurde mit einem »*low-intensity*«-Regime (Cyclophosphamid, Methylprednisolon oder Fludarabin), die andere Kohorte mit einem »*high-intensity*«-Regime (Cyclophosphamid und Fludarabin) vorbehandelt.

**Tabelle 5.3: NK-Zell-Studien.**

Autor	nach SZT	Protokoll	n	Diagnose	GvHD	CR
Passweg <i>et al.</i> 2004	ja	mehrfach unstim. NK-Gaben	5	AML, CML	↓	3
Uharek <i>et al.</i> 2003	ja	mehrfach unstim. NK-Gaben	7	ALL, AML, MH, RMS	↑	4
Köhl <i>et al.</i> 2004	ja	NK 14 d mit IL-2 + IL-2 s.c.	3	ALL, AML	↓	3
Slavin <i>et al.</i> 2004	ja	Ly 4 d IL-2 danach CD56 Sel.	8	ALL, MDS, NHL, HD	↓	3
Miller <i>et al.</i> 2005	nein	NK ü.N. mit IL-2 + IL-2 s.c.	43	AML, M, NZK	↓	5

GvHD=*graft versus host disease*, CR=*complete remission* (Komplette Remission), unstim.=unstimuliert, NK=NK-Zelle, d=Tage, Ly=Lymphozyten, Sel.=Selektion, ü.N.=über Nacht, s.c.=subcutan, AML=Akute myeloische Leukämie, CML=Chronische myeloische Leukämie, ALL=Akute Lymphatische Leukämie, MH=Morbus Hodgkin, RMS=Rhabdomyosarkom, MDS=Myelodysplastisches Syndrom, NHL=Non Hodgkin Lymphom, M=Melanom, NZK=Nierenzellkarzinom.

Bisher traten in den ersten NK-Zell-Studien keine schwerwiegenden Ereignisse auf. Die meisten NK-Zell-Gaben wurden gut toleriert und NK-Zellen scheinen bisher keine GvHD akut auszulösen (► Tab. 5.3). Insgesamt wurden im Review von Passweg *et al.* 2005 4 Patienten mit GvHD geschildert. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Beantwortung der Frage, ob NK-Zellen eine GvHD auslösen können, eine NK-T-Zell-Dosis-Korrelation aufgestellt (► Abb. 4.16). Bei 4/10 Patienten, die nach haploidenter SZT + NK-Zelltherapie eine GvHD entwickelten, wurde die Grenze der T-Zellen  $> 50 \times 10^3/\text{KG}$  deutlich, einmal sogar bis  $160 \times 10^3$  T-Zellen/KG, stark überschritten. In 3 Fällen stand das Auftreten dieser akuten GvHDs mit dem T-Zell-Gehalt des Stammzelltransplantates, bei einem Patienten mit dem applizierten NK-Zellpräparat im Zusammenhang.

Klinische Daten, die eine eindeutige Wirksamkeit der allogenen NK-Zell-Applikation im humanen System *in vivo* belegen, gibt es bisher nicht. Dazu sind größere Studien mit größeren Fallzahlen erforderlich. Ob man später jedoch eindeutig zwischen dem T- bzw. NK-Zell-Effekt unterscheiden kann, ist fraglich. Es scheint jedoch belegt, dass aktivierte

Spender NK-Zellen in Form der NK-Zell-Immuntherapie deutlich zytotoxischer sind als sich rekonstituierende NK-Zellen im Patienten (Nguyen et al. 2005).

Zusammenfassend kann man sagen, dass erste klinische Studien mit aufgereinigten NK-Zellen gezeigt haben, dass die NK-Zell-Applikation gut toleriert wurde, sich kaum GvHDs in direktem Zusammenhang mit der NK-Zell-Applikation gezeigt haben und dass einige Patienten, die im Rezidiv oder nicht in vollständiger Remission waren, durch die kombinierte Therapie in Remission gelangt sind.

### 5.2.3 Beurteilung des Monitoring und der Immunrekonstitution

Das engmaschige Monitoring des peripheren Blutes nach der NK-Zell-Applikation zeigte, dass neben den NK-Zellen auch Monozyten, dendritische Zellen, T-Zellen sowie eosinophiler Granulozyten kurzzeitig aus der peripheren Blutbahn abwandern. Da es sich bei den gemessenen DZ um unreife, sich in der Peripherie befindliche DZ, handelte, könnte es sein, dass diese von aktivierten NK-Zellen beseitigt wurden. Dies wurde *in vitro* für autologe NK-Zellen bereits mehrfach gezeigt (Walzer et al. 2005, Piccioli et al. 2002 und Spaggiari et al. 2001). In verschiedenen Mausmodellen wurde die NK-Zell-vermittelte DZ Elimination über TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) gezeigt (Hayakawa et al. 2004). Ruggeri et al. 2002 erklärte, dass alloreaktive NK-Zellen durch die NK-Zell-vermittelte Elimination der Empfänger DZ eine durch T-Zellen ausgelöste GvHD unterdrücken.

Die Eosinophilie, die bereits vor der NK-Zell-Gabe bei den Neuroblastom Patienten vorlag, findet man in mehr als 40 % der Patienten nach SZT (Sato et al. 2005). Eine vermehrte Zahl von Eosinophilen ist Anzeichen beginnender Regenerierung und wird auch als »Eosinophile Morgenröte« bezeichnet. Desweiteren wird vermutet, dass sie im Zusammenhang mit der Entstehung einer GvHD steht (Jacobsohn et al. 2004, Basara et al. 2002). Capobianco et al. 2008 untersuchte im Mausmodell den Einfluss von NK-Zellen und DZ bei Melanom und Lymphom, indem er diese in die Tumoren spritzte und fand eine positive Immunantwort nur bei einer gleichzeitigen Infiltration von Eosinophilen.

Da die expandierten NK-Zellen der vorliegenden Arbeit vor der Transfusion aufgrund zu hoher Zellverluste nicht noch einmal gewaschen wurden, muss davon ausgegangen werden, dass neben IL-2 auch die in Abbildung 4.8 gezeigten Zytokine dem Patienten verabreicht

wurden. Da es sich bei den im Serum des Patienten gefundenen Zytokinen wie IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-8, MCP-1 und MIP-1 $\beta$  um inflammatorische Zytokine aber auch Chemokine, die bei Zellen eine Wanderungsbewegung (Chemotaxis) auslösen können, handelte, könnte das Phänomen des »Abwanderns« der Lymphozyten wie auch der Monozyten durch den verursachten »**Zytokin-Sturm**« ausgelöst worden sein. Ein weiterer Grund wäre die Adhäsion an die Gefäße, welche beispielsweise für IL-13 und TNF- $\alpha$  beschrieben ist (Mina-Osorio et al. 2008, Matsuda et al. 2008). Neben dem Verschwinden der NK-Zellen, der Monozyten, der dendritische Zellen und der T-Zellen aus der peripheren Blutbahn kam es nach der NK-Zell-Applikation zu einem Anstieg der Leukozyten, bedingt durch verstärktes Einwandern von neutrophilen Granulozyten. Dies ist eine beschriebene Nebenwirkung des IL-2 - Präparates Proleukin<sup>®</sup>S (Fachinformation). Nicht alle Zytokine, die im Serum der Patienten gefunden wurden, waren durch die NK-Zell-Applikation erklärbar. So schien der erhöhte IL-6 Spiegel und der erhöhte IFN- $\gamma$  Spiegel auch eine Antwort des Patienten auf die Immuntherapie zu sein. IL-6 und IL-8 werden normalerweise im Serum bei systemischen Infektionen in erhöhter Konzentration nachgewiesen und sind ein Hinweis für die Aktivierung der Leukozyten.

Interessanterweise scheinen aktivierte applizierte NK-Zellen wirklich die periphere Blutbahn zu verlassen. Darauf deuten Versuche bei Patienten mit Nierenzellkarzinom hin, bei denen radioaktive <sup>111</sup>Indium-markierte IL-2 stimulierte NK-Zellen ein ähnliches Abwandern zeigten. <sup>111</sup>Indium hat eine Halbwertszeit von einigen Tagen. Und so konnte verfolgt werden, dass die applizierten NK-Zellen nach Lunge, Leber und Milz auch im Knochenmark auffindbar waren (Meller et al. 2004). Die Daten deuteten auf eine Lebensdauer der NK-Zellen von mehreren Tagen hin.

Ob die additive NK-Zell-Immuntherapie auch einen langfristigen Einfluss auf die Immunrekonstitution bei Patienten nach haploidenter SZT hat, kann pauschal bisher nicht beantwortet werden. Da die haploidente SZT nicht mit einer HLA-übereinstimmenden Familienspende verglichen werden kann, wurde versucht, eine entsprechende Vergleichskohorte gegenüber zu stellen. Die erste Gruppe bestand aus Patienten, die eine haploidente SZT mit einem CD3/CD19-depletierten Produkt erhielten, während die zweite Patientengruppe mit einem CD34-selektionierten Stammzellprodukt behandelt wurde. Diese beiden Gruppen wurden der NK-Zell-Studie (haploidenten SZT und additive NK-Zell-Immuntherapie)

gegenübergestellt. Eine signifikante Verbesserung durch die Gabe von NK-Zellen konnte nicht beobachtet werden. Die NK-Zell-Studienpatienten zeigten tendenziell eine schlechtere B-Zell-Rekonstitution. Da die Funktion der B- bzw. Plasmazelle medikamentös durch die Gabe von Immunglobulinen (i.v. IgG) substituiert werden kann, ist dieses Defizit ausgleichbar und dadurch weniger schwerwiegend. Die zytotoxischen T-Zellen waren ebenfalls nicht optimal in ihrer Regeneration, waren aber im Median vergleichbar mit der Gruppe der CD3/CD19-Transplantierten. Die Norm der NK-Zellzahl, verglichen mit der gesunder Kinder und Erwachsener, wurde schnell nach SZT erreicht. Die Frage nach Funktionalität der rekonstituierten NK-Zellen ist in Arbeiten von Vago et al. 2008 und Dulphy et al. 2008 als eingeschränkt beschrieben worden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die NK-Zellzahl innerhalb des ersten Monats nach SZT die Norm erreichte, gefolgt von den zytotoxischen  $CD3^+CD8^+$  T-Zellen 5-6 Monate nach haploidenter SZT, den  $T_{\text{Helfer}}$  Zellen und den B-Zellen nach über einem Jahr nach haploidenter SZT. Die sehr langsame Regeneration der  $T_{\text{Helfer}}$ -Zellen wurde ebenfalls von de Vries et al. 2000, Koehl et al. 2007 und Kalwak et al. 2002 beschrieben. Aufgrund der verringerten Thymusfunktion zeigen beispielsweise Erwachsene im Vergleich zu pädiatrischen Patienten nach SZT eine wesentlich langsamere Immunrekonstitution. Bei ihnen wird erst nach 2 bis 5 Jahren ein normal funktionierendes Immunsystem beschrieben (Storek et al. 1995, Storek 2008).

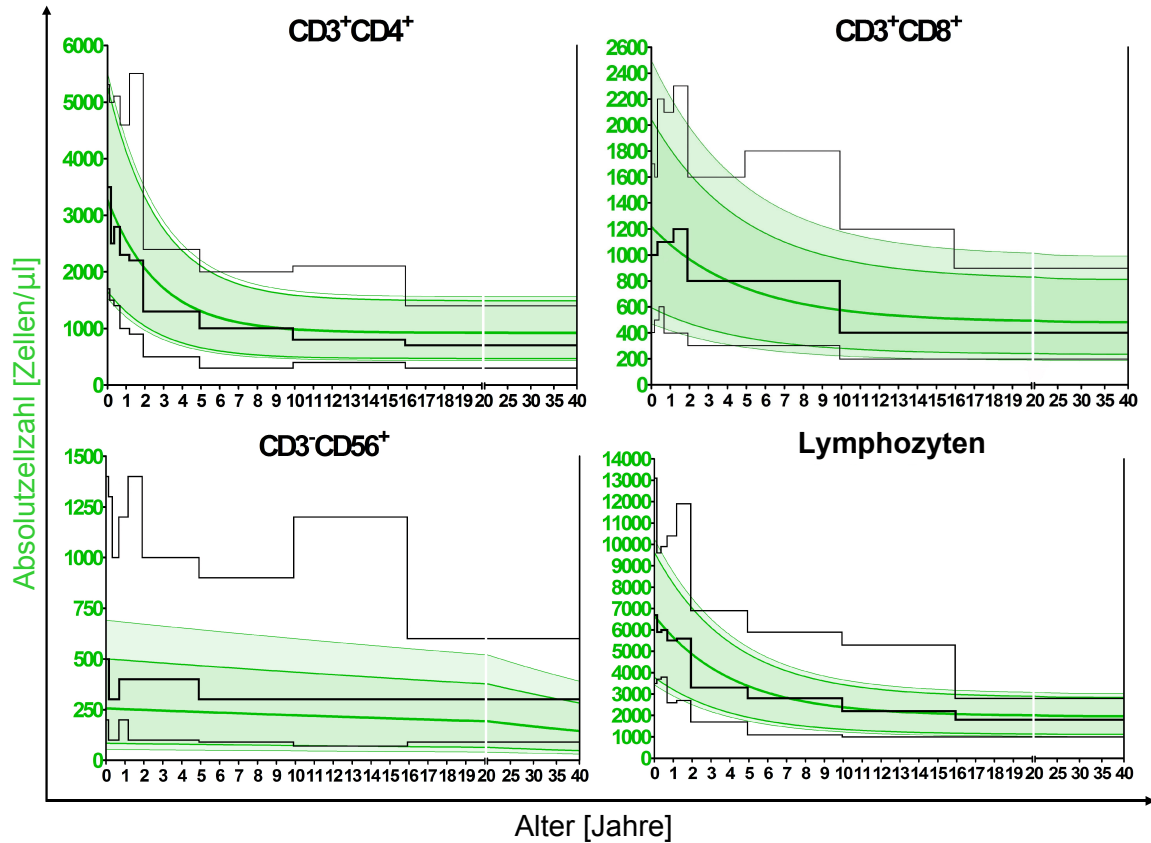
### **Vergleich des stetigen Exponentialmodells zur Gruppeneinteilung**

Zur Überprüfung des aufgestellten stetigen Exponentialmodells wurde es mit den in Altersgruppen formulierten Daten von Comans-Bitter et al. 1997 verglichen. Comans-Bitter et al. wertete ihre erhobenen Normwerte von 429 gesunden Kindern und jungen Erwachsenen in 10 Altersgruppen mit Hilfe der 5<sup>ten</sup> Perzentile, dem Median und der 95<sup>ten</sup> Perzentile aus. Die Daten von Comans-Bitter wurden in Abbildung 5.4 optisch über das entwickelte Modell dargelegt.

Die Überlagerung der Altersgruppen mit der Modellfunktion ergab eine gute Übereinstimmung für die  $CD3^+CD4^+$   $T_{\text{Helfer}}$ -Zellen, die zytotoxischen  $CD3^+CD8^+$  T-Zellen und die Lymphozyten. Bei den NK-Zell-Werten waren die Comans-Bitter Daten höher. Dies lag vermutlich im Verwenden eines anderen Antikörpers. Während in meiner Studie nur mit

## 5 Diskussion

dem CD56 Antikörper gearbeitet wurde, färbte Comans-Bitter ihre NK-Zellen mit einem Kombinationsantikörper, bestehend aus CD56 und CD16. Dadurch wurde die  $CD56^{dim}$



**Abbildung 5.4: Vergleich des entwickelten Exponentialmodells mit Comans-Bitter *et al.*** Basierend auf Normwerten von 100 gesunden Kindern und Erwachsenen für Lymphozytensubpopulationen wurde in der vorliegenden Arbeit ein nicht-lineares Regressionmodell entwickelt. Um das Modell für die Lymphozytenhauptgruppen zu überprüfen, wurde meine Arbeit mit der von Comans-Bitter *et al.* verglichen, die in ihrer Studie 429 Kinder und junge Erwachsene aufnahm. In grün ist das entwickelte Exponentialmodell und in schwarzer Stufenoptik sind die in Altersgruppen dargestellten Normwertdaten von Comans-Bitter im Vergleich dargestellt.

NK-Zell-Population, die eine hohe CD16 Expression besitzt (► Tab. 1.2) in ihrer Fluoreszenzintensität angehoben und es erfolgte ein vereinfachtes Setzen der NK-Zell-Region. Da bei Comans-Bitter *et al.* beide Antigene auf eine Fluoreszenzfarbe gelegt wurden, konnten die NK-Zellen nicht mehr in  $CD56^{bright}$  und  $CD56^{dim}$  unterschieden werden. Da diese Unterscheidung in der vorliegenden Arbeit aber wichtig war, führten wir statt des Kombinationsantikörpers eine Qualitätskontroll Überprüfungsrechnung ein. Da Lymphozyten

aus 3 Gruppen (T-, B- und NK-Zellen) bestehen, sollte die Summe der prozentualen Anteile (T + B + NK-Werte) bestimmt werden und sollte möglichst  $100 \pm 10$  % ergeben. Erreicht wurde im Median eine Summe von 97 % (93,1- 99,3 %). Dadurch wurde kontrolliert, dass man nicht zuviel CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen beim Setzen der Regionen verlor oder fälschlicherweise dazu gewann.

Die größten Unterschiede zwischen der Arbeit von Comans-Bitter und meinen Ergebnissen wurden innerhalb der ersten 2 Jahre beobachtet. Während Comans-Bitter et al. ihre Ergebnisse bei der Altersgruppe bis 15 Monate auf der Grundlage von 254 gesunden Kindern erhob, wies meine Studie in diesem Alter "nur" 14 gesunde Kinder auf. Das erklärt, dass sie durch ihre größere Probandenanzahl auch eine größere Spannweite in ihren Ergebnissen verzeichnete.

### Optimierung des Monitorings nach SZT

Bei der Analyse der Lymphozytenuntergruppen (Naïve, Gedächtnis-Zellen, usw.) wurde durch die Normwertstudie deutlich, dass die Einteilung der T-Zellen (wie unter Kap. 4.3.1 aufgelistet) nicht optimal für das Beurteilen der Immunrestitution ist. Es fiel auf, dass die als naiv definierten zytotoxischen T-Zellen ( $CD8^+CD45RA^+CD28^+$ ) mit dem Alter anstiegen. Dies schien unlogisch, da aufgrund der abnehmenden Leukozytenzahl im Alter normalerweise die naiven Zellen abnehmen und nur die Gedächtniszellen im Laufe des Lebens zunehmen sollten. Der CD28 Marker ist bei der Differenzierung der zytotoxischen T-Zellen in Bezug zur Virusinfektion sehr wertvoll (Appay et al. 2002). Er hatte seine Limitation bei der postnatalen T-Zell-Klassifizierung. In unserer Studie stellte sich heraus, dass die Expression bei Kleinkindern wesentlich niedriger als bei Erwachsenen war und es deshalb zu dieser Verschiebung kam (Huenecke et al. 2008).

Durch das methodische Umstellen des Patientenmonitorings von Transplantierten von 4-Farb- auf 5-Farb Durchflusszytomtrie und durch die Ergebnisse der Normwertstudie wurde infolgedessen die Klassifizierung im Monitoring der T-Zellen wie folgt umgestellt:

- $CD3^+CD4^+$  T<sub>Helfer</sub>-Zellen
  - $CD3^+CD4^+CD45RA^+CD62L^+$  Naïve T<sub>Helfer</sub>-Zellen
  - $CD3^+CD4^+CD45RO^+CD62L^-$  Effektorische Gedächtnis-T<sub>Helfer</sub>-Zellen (T<sub>EM</sub>)
  - $CD3^+CD4^+CD45RO^+CD62L^+$  Zentrale Gedächtnis-T<sub>Helfer</sub>-Zellen (T<sub>CM</sub>)

## 5 Diskussion

- $CD3^+CD8^+$  Zytotoxische T-Zellen

$CD3^+CD8^+CD45RA^+CD62L^+$  Naïve zytotoxische T-Zellen

$CD3^+CD8^+CD45RO^+CD62L^-$  Effektorische zytotoxische Gedächtnis-T-Zellen ( $T_{EM}$ )

$CD3^+CD8^+CD45RO^+CD62L^+$  Zentrale zytotoxische Gedächtnis-T-Zellen ( $T_{CM}$ )

Ebenfalls Grundlage dieser Entscheidung war die Veröffentlichung von Lefrançois & Marzo, 2006. Dieser unterteilte die Gedächtnis-Zellen aufgrund der CD62L (L-Selektin) Expression in zwei Untergruppen: in die »*central memory*«  $T_{CM}$ - und in die »*effector memory*«  $T_{EM}$ -Zellen. CD62L ist Voraussetzung für die Migration in den Lymphknoten (Lefrançois 2006). Die  $T_{CM}$  wandern vorzugsweise in lymphatische Organe und proliferieren stark nach Stimulation durch Antigenkontakt.  $T_{EM}$  proliferieren nach Antigenstimulation nur schwach, können dafür aber unmittelbar Effektorfunktionen (Zytotoxizität) ausüben und können sich aufgrund der nicht vorhandenen Expression von CD62L oder CCR7 nicht in lymphatischen Organen aufhalten.

### 5.3 Schlussfolgerung für die Klinische Anwendung von IL-2 stimulierten NK-Zellen

In der vorliegenden Arbeit konnte die Machbarkeit der NK-Zell-Herstellung und anschließende IL-2 Stimulierung unter GMP-Bedingungen gezeigt werden. Dieses Verfahren steht nun zukünftigen Studien mit größerer Probandenanzahl zur Verfügung. Insbesondere konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass die Stimulierung und Expansion mit IL-2 zur Hochregulierung Natürlicher Zytotoxizitätsrezeptoren (NCR, NKG2D) führte und eine funktionelle Steigerung mit Hinblick auf Zytotoxizität und Zytokinausschüttung bewiesen wurde. Weitere Studien sollten untersuchen, ob es synergistische Effekte durch weitere Zytokine wie beispielsweise IL-2 in Kombination mit IL-15 gibt. Dabei sollte die Konzentration und die Stimulierungsdauer angepasst werden. Weiterhin ist eine NK-Zell-Dosiseskalation wünschenswert. Die Frage der Terminierung kann durch die vorliegende Arbeit aufgrund der geringen n-Zahl nicht beantwortet werden. Aber eine frühe NK-Zell-Applikation nach SZT scheint gerade bei der Beseitigung minimaler Restleukämiezellen bzw -tumorzellen erstrebenswert. Demgegenüber konnte in anderen Studien gezeigt werden, dass die ganz früh rekonstituierenden NK-Zellen im Patienten nach haploidenter SZT relativ unreif sind und nur eine beeinträchtigte Zytotoxizität aufweisen (Nguyen et al. 2005, Schulze et al. 2008). Das die NK-Zell-Regeneration nach haploidenter SZT ein Indikator für ein verbessertes Überleben sein kann (Chang et al. 2008), bestärkt gerade das frühe Einsetzen der NK-Zell-Immuntherapie nach SZT.

Das Neuroblastom entkommt der spezifischen T-Zell-Erkennung, indem es die MHC Expression herunterreguliert (Corrias et al. 2001, Lampson & George, 1986 und Ponzoni et al. 1993). Aber genau dadurch stellt es ein geeignetes Target für die NK-Zell-Immuntherapie dar.

Ein offene Frage ist, ob unstimulierte oder stimulierte Leukapheresen geeigneter als Ausgangsmaterial für eine NK-Zell-Immuntherapie sind. Überlegungen hierzu werden auch im Zusammenhang mit CD3/CD19-depletierten Stammzelltransplantaten getroffen, da man sich bei diesen Präparaten durch die vorhandenen NK-Zellen und Antigen-präsentierender Zellen einen verstärkten GvL/GvT-Effekt erhofft. Es gibt allerdings Hinweise, dass NK-Zellen, die G-CSF stimuliert sind, eine schlechtere Zytotoxizität aufweisen (Miller et al.



## 5 Diskussion

1997, Taguchi et al. 1992 und Joshi et al. 2001). Andere Studien berichten über keinen Einfluss durch die G-CSF Stimulierung und finden auch keine phänotypische Veränderung der NK-Zellen (Lassailly et al. 2005, Silva & Ascensão, 1995). Darüber hinaus scheinen NK-Zellen keine G-CSF Rezeptoren zu exprimieren (Durek et al. 1997). Aber ein G-CSF stimuliertes Leukapheresat besitzt gegenüber einem nicht stimulierten eine höhere pDZ zu mDZ Ratio.

Zusammenfassend kann man sagen, dass hochaufgereinigte NK-Zellen mit und ohne weitere Zytokinstimulierung gut nach haploidenter SZT toleriert wurden. Wenn die verabreichte T-Zell-Dosis unter  $50 \times 10^3/\text{KG}$  lag, traten nur milde GvHDs (Grad I/II) auf. Es konnten bis zu  $60 \times 10^6$  NK-Zellen/KG ohne schwerwiegende Nebenwirkungen appliziert werden. Weitere Studien sind notwendig, um optimale NK-Zell-Dosen zu finden, die Terminierung der NK-Zell-Gabe der Grunderkrankung anzupassen und methodisch ein verbessertes Monitoring der Restleukämie bzw. Tumorzellen zu ermöglichen, mit dem Fernziel *in vivo* Effekte (GvL/GvT) erfassen und bewerten zu können.

## 6 Ausblick

Experimentelle Studien haben gezeigt, dass durch Stimulierung mit Zytokinen zytotoxisch aktivere NK-Zellen generiert werden können und dass dies auch auf den klinischen Maßstab übertragbar ist, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt. Weitere Studien sollten untersuchen, ob eine Kombination von Zytokinen synergistische Effekte auch im klinischen Maßstab belegen.

Neue Studien müssen mit Hilfe größerer Patientenzahl zeigen, ob NK-Zellen auch einen messbaren *in vivo* Effekt in Richtung GvL/GvT-Effekt beweisen können. Dafür ist es wichtig, in die Studien Patienten mit einheitlichen Grunderkrankungen aufzunehmen, wenn möglich in multizentrischen Studien.

Ebenso liegen bisher kaum Daten über die Auswirkungen der immunsuppressiven Therapie nach NK-Zell-Applikation (beispielsweise: MMF, CsA, Steroide) vor. Es kann angenommen werden, dass NK-Zellen, die Patienten unter immunsuppressiver Therapie erhalten, in ihrer Funktion eingeschränkt werden. Es gibt bisher nur wenig Arbeiten (Wang et al. 2007) die systematisch versucht haben, diesen Einfluss bei der NK-Zell-Immuntherapie zu berücksichtigen oder ihn genauer zu beleuchten. Ein zweiter wichtiger Punkt sollte sich den »*tumor-escape*«-Mechanismen widmen, die vielfach bereits in der Literatur beschrieben sind (Zwirner et al. 2007, Waldhauer & Steinle, 2008 und Waldhauer et al. 2008). Gerade beim Neuroblastom sind Mechanismen beschrieben, dass Neuroblastom Tumor Zellen die Liganden für NKG2D, MICA/B aus den Tumorzellen ausschleusen. Diese sMICA/B (löslichen MICA/B) sind daher frei im Körper verteilt. Sie binden an den NKG2D von NK-Zellen und weichen so dem zytotoxischen NK-Zell-Angriff aus (Raffaghello et al. 2004). Eine Blockierung dieser löslichen MICA/B evtl. durch eine Antikörpertherapie wäre denkbar. Eine Kombinationstherapie von NK-Zellen mit Histone-deacetylase Inhibitoren (HDACI) oder mit Bortezomib (Proteasom Inhibitor) bietet weitere Möglichkeiten, die NK-Zell-Zytotoxizität *in vivo* durchzusetzen, da die Expression von TNF-abhängigen apoptose-induzierenden Liganden auf der Zielzelle wieder verstärkt herbeigeführt wird (Skov et al. 2005).

## 6 Ausblick

Ebenso denkbar sind Kombinationstherapien mit bi-spezifischen Tumor-Antikörpern gegen Tumoren, die dann in Kombination mit der NK-Zell-Immuntherapie über den Wirkmechanismus des ADCC diese Tumoren zerstören. Weitere denkbare Ansätze wie der Einsatz von siRNA-basierten Methoden, um beispielsweise die Expression bestimmter KIRs herunterzuregulieren und gleichzeitig die Expression von aktivierenden Rezeptoren zu ermöglichen, sind von Ljunggren & Malmberg, 2007 zusammengefasst.

## 7 Zusammenfassung

Die adoptive Immuntherapie mit hochaufgereinigten NK-Zellen bei pädiatrischen Patienten mit malignen Erkrankungen nach haploidenter SZT ist eine mögliche Therapieoption, um einen verstärkten GvL/GvT-Effekt zu bewirken und möglicherweise die Immunregeneration zu fördern. Als schwerwiegende Nebenwirkung ist bisher noch nicht eindeutig belegt, ob neben T-Zellen auch NK-Zellen in der Lage sind, eine GvHD auszulösen.

In der Frankfurter Universitätskinderklinik wurden 7 Patienten (4×ALL, 1×AML, 1×RMS IV und 1×M. Hodgkin) mit hochaufgereinigten unstimulierten NK-Zellen und 3 Patienten (3×NB IV) mit IL-2 stimulierten NK-Zellen nach haploidenter SZT behandelt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde *in vitro* untersucht, ob NK-Zellen durch die Stimulierung mit IL-2 einen gesteigerten GvL/T-Effekt aufweisen. Es wurden NK-Zellen von 5 verschiedenen gesunden Spendern (2 im Rahmen von Validierungsläufen und 3 zur Behandlung der 3 Patienten mit NB) zunächst immunomagnetisch im klinischen Maßstab mittels CD3-Depletion und darauffolgender CD56-Selektion aufgereinigt. Danach erfolgte die Aktivierung mit IL-2 (Proleukin<sup>®</sup>S) über 14 Tage unter GMP. Während sich die NK-Zellen aller Spender nach Aufreinigung in eine kleine Population CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> immunregulatorischer NK-Zellen (2,3 bis 7,1 %) und eine große Population zytotoxischer CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> NK-Zellen (92,9 bis 97,7 %) unterteilen ließen, zeigte sich nach IL-2 Stimulierung ein heterogenes Bild von CD16<sup>+</sup> zu CD16<sup>-</sup> NK-Zellen. Durch die 9-tägige IL-2 Stimulierung vergrößerte sich der Anteil KIR<sup>negativer</sup> NK-Zellen. Es konnte auf den NK-Zellen aller Spender gezeigt werden, dass durch die IL-2 Stimulierung wichtige Rezeptoren (NKG2D, NCR), die für ein hohes zytotoxisches Potential stehen, verstärkt auf der NK-Zelloberfläche exprimiert wurden. Die gesteigerte Zytokinproduktion der IL-2 stimulierten NK-Zellen untermauerte die Funktionalität der *ex vivo* stimulierten NK-Zellen und dies konnte in funktionalen Assays, die die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen belegen, bewiesen werden. Durch die IL-2 Stimulierung der NK-Zellen konnte die Killing Aktivität gleichmäßig auf über 90 % gesteigert werden. Interessanterweise wies Spender A bei den funktionellen und phänotypischen Analysen eine Sonderrolle auf. Die NK-Zellen

## 7 Zusammenfassung

dieses Spenders zeigten bereits vor IL-2 Stimulierung eine hohe Zytotoxizität gegenüber malignen Zellen, welches auf eine Voraktivierung, gemessen an der Expression von Aktivierungsmarker CD69, schließen lässt.

Die *in vivo* Untersuchungen zeigten, dass bei einer verabreichten T-Zell-Dosis unter  $50 \times 10^3/\text{KG}$ , nur milde GvHDs (Grad I/II) auftraten. Bis zu  $60 \times 10^6$  NK-Zellen/KG wurden gut toleriert. Nebenwirkungen wie Fieber und Schüttelfrost waren transient und gingen einher mit erhöhten Zytokinspiegeln von inflammatorischen Zytokinen (IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$ ) im Serum der Patienten. Ein engmaschiges Monitoring nach der NK-Zell-Applikation der IL-2 stimulierten NK-Zellen zeigte, dass die NK-Zellen in 5/6 Applikationen aus der peripheren Blutbahn abwanderten, einhergehend mit der Migration von Antigen-präsentierenden Zellen.

Bei der Untersuchung des langfristigen Einflusses von adoptiver NK-Zell-Immuntherapie auf die Immunrestitution bei Patienten nach haploidenter SZT wurde vorausgehend eine Normwertstudie zu verschiedenen Leukozytensubpopulationen von 100 gesunden Kinder und Erwachsenen vorgenommen. Nach der Entwicklung eines stufenlosen, nicht-linearen Regressionsmodells konnte der Einfluss auf die Immunrestitution der Patienten nach SZT altersgerecht beurteilt werden. Weiterhin wurden Patientengruppen, die ebenfalls haploident transplantiert wurden, den NK-Zell-Studienpatienten gegenübergestellt. Eine signifikante Verbesserung durch die Gabe von NK-Zellen konnte nicht beobachtet werden. Zusammenfassend kann man sagen, dass die NK-Zellzahl innerhalb des ersten Monats nach SZT Normwerte erreichte, gefolgt von den zytotoxischen CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen 5-6 Monate nach haploidenter SZT, den T<sub>Helfer</sub> Zellen und den B-Zellen nach über einem Jahr nach haploidenter SZT.

Die allogene additive NK-Zell-Immuntherapie ist eine vielversprechende Therapieoption bei Patienten mit malignen Erkrankungen wie bspw. dem NB. Die NK-Zell-Aktivierung mit IL-2 bewies den Erhalt der Immunkompetenz. Dies war erkennbar an der gesteigerten zytotoxischen Funktionalität, der Zytokinproduktion und der Hochregulierung von zytotoxisch aktiven Rezeptoren. Eine verbesserte Immunrestitution kann durch das neue altersgerechte Lymphozyten-Norm-Modell besser beurteilt werden. Allerdings ist die Patientenanzahl und die Beobachtungszeit bisher zu gering, um *in vivo* ein verbessertes Überleben mit additiver NK-Zell-Immuntherapie wirklich abschätzen zu können.

## 8 Literaturverzeichnis

[1]. <http://www.kinderkrebsregister.de/>.

[2]. <http://www.uni-duesseldorf.de/awmf/11/025-008.htm>.

[3]. [www.medizinische-genetik.de](http://www.medizinische-genetik.de).

[4]. [www.dsmz.de](http://www.dsmz.de).

Anfossi, N., P. André, S. Guia, C. S. Falk, S. Roetynck, C. A. Stewart, V. Bresó, C. Frassati, D. Reviron, D. Middleton, F. Romagné, S. Ugolini, and E. Vivier (2006). Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* 25(2), 331–42.

Appay, V., P. R. Dunbar, M. Callan, P. Klenerman, G. M. A. Gillespie, L. Papagno, G. S. Ogg, A. King, F. Lechner, C. A. Spina, S. Little, D. V. Havlir, D. D. Richman, N. Gruener, G. Pape, A. Waters, P. Easterbrook, M. Salio, V. Cerundolo, A. J. McMichael, and S. L. Rowland-Jones (2002). Memory CD8<sup>+</sup> T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med* 8(4), 379–85.

Basara, N., M. G. Kiehl, and A. A. Fauser (2002). Eosinophilia indicates the evolution to acute graft-versus-host disease. *Blood* 100(8), 3055.

Bauer, S., V. Groh, J. Wu, A. Steinle, J. H. Phillips, L. L. Lanier, and T. Spies (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285(5428), 727–9.

Becker, S., R. Kiessling, N. Lee, and G. Klein (1978). Modulation of sensitivity to natural killer cell lysis after *in vitro* explantation of a mouse lymphoma. *J Natl Cancer Inst* 61(6), 1495–8.

Beelen, D. W., H. D. Ottinger, S. Ferencik, A. H. Elmaagacli, R. Peceny, R. Trenchel, and H. Grosse-Wilde (2005). Genotypic inhibitory killer immunoglobulin-like receptor ligand incompatibility enhances the long-term antileukemic effect of unmodified allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with myeloid leukemias. *Blood* 105(6), 2594–600.

Berthold, F., B. Hero, B. Kremens, R. Handgretinger, G. Henze, F. H. Schilling, M. Schrappe, T. Simon, and C. Spix (2003). Long-term results and risk profiles of patients in five consecutive trials (1979-1997) with stage 4 neuroblastoma over 1 year of age. *Cancer Lett* 197(1-2), 11–7.

Biron, C. A., K. B. Nguyen, G. C. Pien, L. P. Cousens, and T. P. Salazar-Mather (1999). Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 17, 189–220.

## 8 Literaturverzeichnis

- Bishara, A., D. De Santis, C. C. Witt, C. Brautbar, F. T. Christiansen, R. Or, A. Nagler, and S. Slavin (2004). The beneficial role of inhibitory KIR genes of HLA class I NK epitopes in haploidentically mismatched stem cell allografts may be masked by residual donor-alloreactive T cells causing GVHD. *Tissue Antigens* 63(3), 204–11.
- Bleakley, M. and S. R. Riddell (2004). Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat Rev Cancer* 4(5), 371–80.
- Bornhäuser, M., R. Schwerdtfeger, H. Martin, K.-H. Frank, C. Theuser, and G. Ehninger (2004). Role of KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation using unrelated donors. *Blood* 103(7), 2860–1; author reply 2862.
- Bossi, G. and G. M. Griffiths (2005). CTL secretory lysosomes: biogenesis and secretion of a harmful organelle. *Semin Immunol* 17(1), 87–94.
- Bottino, C., R. Castriconi, L. Moretta, and A. Moretta (2005). Cellular ligands of activating NK receptors. *Trends Immunol* 26(4), 221–6.
- Bottino, C., L. Moretta, D. Pende, M. Vitale, and A. Moretta (2004). Learning how to discriminate between friends and enemies, a lesson from Natural Killer cells. *Mol Immunol* 41(6-7), 569–75.
- Brodeur, G. M., J. Pritchard, F. Berthold, N. L. Carlsen, V. Castel, R. P. Castelberry, B. De Bernardi, A. E. Evans, M. Favrot, F. Hedborg, and e. al. (1993). Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol* 11(8), 1466–77.
- Bryceson, Y. T., M. E. March, H.-G. Ljunggren, and E. O. Long (2006). Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev* 214, 73–91.
- Burns, L. J., D. J. Weisdorf, T. E. DeFor, D. H. Vesole, T. L. Repka, B. R. Blazar, S. R. Burger, A. Panoskaltsis-Mortari, C. A. Keever-Taylor, M.-J. Zhang, and J. S. Miller (2003). 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* 32(2), 177–86.
- Caligiuri, M. A., A. Zmuidzinas, T. J. Manley, H. Levine, K. A. Smith, and J. Ritz (1990). Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors. *J Exp Med* 171(5), 1509–26.
- Cantoni, C., C. Bottino, M. Vitale, A. Pessino, R. Augugliaro, A. Malaspina, S. Parolini, L. Moretta, A. Moretta, and R. Biassoni (1999). NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. *J Exp Med* 189(5), 787–96.

## 8 Literaturverzeichnis

- Capobianco, A., A. A. Manfredi, A. Monno, P. Rovere-Querini, and C. Rugarli (2008). Melanoma and lymphoma rejection associated with eosinophil infiltration upon intratumoral injection of dendritic and NK/LAK cells. *J Immunother* 31(5), 458–65.
- Carlsten, M., N. K. Björkström, H. Norell, Y. Bryceson, T. van Hall, B. C. Baumann, M. Hanson, K. Schedvins, R. Kiessling, H.-G. Ljunggren, and K.-J. Malmberg (2007). DNAX accessory molecule-1 mediated recognition of freshly isolated ovarian carcinoma by resting natural killer cells. *Cancer Res* 67(3), 1317–25.
- Carson, W. E., T. A. Fehniger, S. Haldar, K. Eckhert, M. J. Lindemann, C. F. Lai, C. M. Croce, H. Baumann, and M. A. Caligiuri (1997). A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival. *J Clin Invest* 99(5), 937–43.
- Castriconi, R., A. Dondero, M. V. Corrias, E. Lanino, D. Pende, L. Moretta, C. Bottino, and A. Moretta (2004). Natural killer cell-mediated killing of freshly isolated neuroblastoma cells: critical role of DNAX accessory molecule-1-poliovirus receptor interaction. *Cancer Res* 64(24), 9180–4.
- Catalfamo, M. and P. A. Henkart (2003). Perforin and the granule exocytosis cytotoxicity pathway. *Curr Opin Immunol* 15(5), 522–7.
- Cerwenka, A. and L. L. Lanier (2003). NKG2D ligands: unconventional MHC class I-like molecules exploited by viruses and cancer. *Tissue Antigens* 61(5), 335–43.
- Chang, Y.-J., X.-Y. Zhao, and X.-J. Huang (2008). Effects of the NK cell recovery on outcomes of unmanipulated haploidentical blood and marrow transplantation for patients with hematologic malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant* 14(3), 323–34.
- Chiorean, E. G. and J. S. Miller (2001). The biology of natural killer cells and implications for therapy of human disease. *J Hematother Stem Cell Res* 10(4), 451–63.
- Choi, S. S., V. S. Chhabra, Q. H. Nguyen, B. J. Ank, E. R. Stiehm, and R. L. Roberts (2004). Interleukin-15 enhances cytotoxicity, receptor expression, and expansion of neonatal natural killer cells in long-term culture. *Clin Diagn Lab Immunol* 11(5), 879–88.
- Cinatl, J., J. Cinatl, M. Mainke, A. Weissflog, H. Rabenau, B. Kornhuber, and H. W. Doerr (1993). *In vitro* differentiation of human neuroblastoma cells induced by sodium phenylacetate. *Cancer Lett* 70(1-2), 15–24.
- Cinatl, J., J. Cinatl, M. Mainke, A. Weissflog, G. Steigmann, H. Rabenau, H. W. Doerr, and B. Kornhuber (1992). Aphidicolin selectively kills neuroblastoma cells *in vitro*. *Cancer Lett* 67(2-3), 199–206.



## 8 Literaturverzeichnis

- Comans-Bitter, W. M., R. de Groot, R. van den Beemd, H. J. Neijens, W. C. Hop, K. Groeneveld, H. Hooijkaas, and J. J. van Dongen (1997). Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations. *J Pediatr* 130(3), 388–93.
- Cooper, M. A., T. A. Fehniger, and M. A. Caligiuri (2001). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 22(11), 633–40.
- Corrias, M. V., M. Occhino, M. Croce, A. De Ambrosis, M. P. Pistillo, P. Bocca, V. Pistoia, and S. Ferrini (2001). Lack of HLA-class I antigens in human neuroblastoma cells: analysis of its relationship to TAP and tapasin expression. *Tissue Antigens* 57(2), 110–7.
- Cosman, D., J. Müllberg, C. L. Sutherland, W. Chin, R. Armitage, W. Fanslow, M. Kubin, and N. J. Chalupny (2001). ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 14(2), 123–33.
- Davies, S. M., L. Ruggieri, T. DeFor, J. E. Wagner, D. J. Weisdorf, J. S. Miller, A. Velardi, and B. R. Blazar (2002). Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatched unrelated donor hematopoietic transplants. Killer immunoglobulin-like receptor. *Blood* 100(10), 3825–7.
- Davison, G. M., N. Novitzky, A. Kline, V. Thomas, L. Abrahams, G. Hale, and H. Waldmann (2000). Immune reconstitution after allogeneic bone marrow transplantation depleted of T cells. *Transplantation* 69(7), 1341–7.
- de Rham, C., S. Ferrari-Lacraz, S. Jendly, G. Schneiter, J.-M. Dayer, and J. Villard (2007). The proinflammatory cytokines IL-2, IL-15 and IL-21 modulate the repertoire of mature human natural killer cell receptors. *Arthritis Res Ther* 9(6), R125.
- de Vries, E., M. J. van Tol, R. L. van den Bergh, J. L. Waaijer, M. M. ten Dam, J. Hermans, and J. M. Vossen (2000). Reconstitution of lymphocyte subpopulations after paediatric bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 25(3), 267–75.
- Della Chiesa, M., M. Vitale, S. Carlomagno, G. Ferlazzo, L. Moretta, and A. Moretta (2003). The natural killer cell-mediated killing of autologous dendritic cells is confined to a cell subset expressing CD94/NKG2A, but lacking inhibitory killer Ig-like receptors. *Eur J Immunol* 33(6), 1657–66.
- Dorman, S. E., C. Picard, D. Lammas, K. Heyne, J. T. van Dissel, R. Baretto, S. D. Rosenzweig, M. Newport, M. Levin, J. Roesler, D. Kumararatne, J.-L. Casanova, and S. M. Holland (2004). Clinical features of dominant and recessive interferon gamma receptor 1 deficiencies. *Lancet* 364(9451), 2113–21.
- Dranoff, G. (2004). Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 4(1), 11–22.

## 8 Literaturverzeichnis

- Dulphy, N., P. Haas, M. Busson, S. Belhadj, R. Peffault de Latour, M. Robin, M. Carmagnat, P. Loiseau, R. Tamouza, C. Scieux, C. Rabian, J. P. Di Santo, D. Charron, A. Janin, G. Socié, and A. Toubert (2008). An unusual CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>low</sup> NK cell subset dominates the early posttransplant period following HLA-matched hematopoietic stem cell transplantation. *J Immunol* 181(3), 2227–37.
- Dunne, J., S. Lynch, C. O’Farrelly, S. Todryk, J. E. Hegarty, C. Feighery, and D. G. Doherty (2001). Selective expansion and partial activation of human NK cells and NK receptor-positive T cells by IL-2 and IL-15. *J Immunol* 167(6), 3129–38.
- Durek, C., I. Schäfer, H. Braasch, A. J. Ulmer, M. Ernst, H. D. Flad, D. Jochem, and A. Böhle (1997). Effects of colony-stimulating factors on cellular cytotoxicity. *Cancer Immunol Immunother* 44(1), 35–40.
- Dykewicz, C. A. (2001). Summary of the Guidelines for Preventing Opportunistic Infections among Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Clin Infect Dis* 33(2), 139–44.
- Ellis, T. M. and R. I. Fisher (1989). Functional heterogeneity of Leu 19<sup>bright</sup> + and Leu 19<sup>dim</sup> + lymphokine-activated killer cells. *J Immunol* 142(8), 2949–54.
- Falkenburg, J. H. F., L. van de Corput, E. W. A. Marijt, and R. Willemze (2003). Minor histocompatibility antigens in human stem cell transplantation. *Exp Hematol* 31(9), 743–51.
- Farag, S. S., T. A. Fehniger, L. Ruggeri, A. Velardi, and M. A. Caligiuri (2002). Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood* 100(6), 1935–47.
- Fauriat, C., S. Just-Landi, F. Mallet, C. Arnoulet, D. Sainty, D. Olive, and R. T. Costello (2007). Deficient expression of NCR in NK cells from acute myeloid leukemia: Evolution during leukemia treatment and impact of leukemia cells in NCR<sup>dull</sup> phenotype induction. *Blood* 109(1), 323–30.
- Fehniger, T. A., M. A. Cooper, and M. A. Caligiuri (2002). Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 13(2), 169–83.
- Fehniger, T. A., M. H. Shah, M. J. Turner, J. B. VanDeusen, S. P. Whitman, M. A. Cooper, K. Suzuki, M. Wechser, F. Goodsaid, and M. A. Caligiuri (1999). Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. *J Immunol* 162(8), 4511–20.
- Ferlazzo, G., M. Pack, D. Thomas, C. Paludan, D. Schmid, T. Strowig, G. Bougras, W. A. Muller, L. Moretta, and C. Münz (2004). Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(47), 16606–11.

## 8 Literaturverzeichnis

- Fernandez, N. C., E. Treiner, R. E. Vance, A. M. Jamieson, S. Lemieux, and D. H. Raulet (2005). A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules. *Blood* 105(11), 4416–23.
- Frey, M., N. Packianathan, T. Fehniger, M. Ross, W. Wang, C. Stewart, M. Caligiuri, and S. Evans (1998). Differential expression and function of L-selectin on CD56<sup>bright</sup> and CD56<sup>dim</sup> natural killer cell subsets. *J Immunol* 161(1), 400–8.
- Giebel, S., F. Locatelli, T. Lamparelli, A. Velardi, S. Davies, G. Frumento, R. Maccario, F. Bonetti, J. Wojnar, M. Martinetti, F. Frassoni, G. Giorgiani, A. Bacigalupo, and J. Holowiecki (2003). Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood* 102(3), 814–9.
- Groh, V., R. Rhinehart, J. Randolph-Habecker, M. S. Topp, S. R. Riddell, and T. Spies (2001). Costimulation of CD8 $\alpha\beta$  T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* 2(3), 255–60.
- Groh, V., R. Rhinehart, H. Secrist, S. Bauer, K. H. Grabstein, and T. Spies (1999). Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived  $\gamma\delta$  T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(12), 6879–84.
- Hallett, W. H. D. and W. J. Murphy (2004). Natural killer cells: biology and clinical use in cancer therapy. *Cell Mol Immunol* 1(1), 12–21.
- Hamann, A., K. Klugewitz, F. Austrup, and D. Jablonski-Westrich (2000). Activation induces rapid and profound alterations in the trafficking of T cells. *Eur J Immunol* 30(11), 3207–18.
- Handgretinger, R., P. Lang, K. Ihm, M. Schumm, A. Geiselhart, E. Koscielniak, B. Hero, T. Klingebiel, and D. Niethammer (2002). Isolation and transplantation of highly purified autologous peripheral CD34<sup>+</sup> progenitor cells: purging efficacy, hematopoietic reconstitution and long-term outcome in children with high-risk neuroblastoma. *Bone Marrow Transplant* 29(9), 731–6.
- Hasenkamp, J., A. Borgerding, M. Uhrberg, C. Falk, B. Chapuy, G. Wulf, W. Jung, L. Trümper, and B. Glass (2008). Self-tolerance of human natural killer cells lacking self-HLA-specific inhibitory receptors. *Scand J Immunol* 67(3), 218–29.
- Hayakawa, Y., V. Screpanti, H. Yagita, A. Grandien, H.-G. Ljunggren, M. J. Smyth, and B. J. Chambers (2004). NK cell TRAIL eliminates immature dendritic cells *in vivo* and limits dendritic cell vaccination efficacy. *J Immunol* 172(1), 123–9.
- Hollatz, G., M. Grez, S. Mastaglio, R. Quaritsch, S. Huenecke, F. Ciceri, C. Bonini, R. Esser, T. Klingebiel, J. Kreuter, and U. Koehl (2008). T cells for suicide gene therapy: activation, functionality and clinical relevance. *J Immunol Methods* 331(1-2), 69–81.

## 8 Literaturverzeichnis

- Horowitz, M. M., R. P. Gale, P. M. Sondel, J. M. Goldman, J. Kersey, H. J. Kolb, A. A. Rimm, O. Ringdén, C. Rozman, B. Speck, and et al. (1990). Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 75(3), 555–62.
- Huenecke, S., M. Behl, C. Fadler, S. Y. Zimmermann, K. Bochennek, L. Tramsen, R. Esser, D. Klarmann, M. Kamper, A. Sattler, D. von Laer, T. Klingebiel, T. Lehrnbecher, and U. Koehl (2008). Age-matched lymphocyte subpopulation reference values in childhood and adolescence: application of exponential regression analysis. *European Journal of Haematology* 80(6), 532–39.
- Jacobsohn, D. A., T. Schechter, R. Seshadri, K. Thormann, R. Duerst, and M. Kletzel (2004). Eosinophilia correlates with the presence or development of chronic graft-versus-host disease in children. *Transplantation* 77(7), 1096–100.
- Joshi, S. S., J. C. Lynch, S. Z. Pavletic, S. R. Tarantolo, S. J. Pirruccello, A. Kessinger, and M. R. Bishop (2001). Decreased immune functions of blood cells following mobilization with granulocyte colony-stimulating factor: association with donor characteristics. *Blood* 98(6), 1963–70.
- Kalwak, K., E. Gorczyńska, J. Toporski, D. Turkiewicz, M. Słociak, M. Ussowicz, E. Latos-Grazyńska, M. Król, J. Boguslawska-Jaworska, and A. Chybicka (2002). Immune reconstitution after haematopoietic cell transplantation in children: immunophenotype analysis with regard to factors affecting the speed of recovery. *Br J Haematol* 118(1), 74–89.
- Kalwak, K., I. Mosoń, J. Cwian, E. Gorczyńska, J. Toporski, D. Turkiewicz, E. Latos-Grazyńska, and A. Chybicka (2003). A prospective analysis of immune recovery in children following allogeneic transplantation of T-cell-depleted or non-T-cell-depleted hematopoietic cells from HLA-disparate family donors. *Transplant Proc* 35(4), 1551–5.
- Kalwak, K., D. Turkiewicz, M. Ussowicz, E. Gorczyńska, J. Toporski, R. Ryczan, B. Rybka, D. Noworolska-Sauren, and A. Chybicka (2003). Clinical value of the flow cytometric method for measuring lymphocyte subset activation: spontaneous activation of T-cell subpopulations is associated with acute GvHD. *Transplant Proc* 35(4), 1559–62.
- Keskin, D. B., D. S. J. Allan, B. Rybalov, M. M. Andzelm, J. N. H. Stern, H. D. Kopcow, L. A. Koopman, and J. L. Strominger (2007). TGF $\beta$  promotes conversion of CD16<sup>+</sup> peripheral blood NK cells into CD16<sup>-</sup> NK cells with similarities to decidual NK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(9), 3378–83.
- Kim, S., J. Poursine-Laurent, S. M. Truscott, L. Lybarger, Y.-J. Song, L. Yang, A. R. French, J. B. Sunwoo, S. Lemieux, T. H. Hansen, and W. M. Yokoyama (2005). Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* 436(7051), 709–13.
- Klingemann, H. G. and J. Martinson (2004). *Ex vivo* expansion of natural killer cells for clinical applications. *Cytotherapy* 6(1), 15–22.

## 8 Literaturverzeichnis

- Klöss, S., K. Bochennek, S. Huenecke, S.-Y. Zimmermann, S. Kuçi, T. Müller, W. S. Wels, T. Klingebiel, R. Esser, and U. Koehl (2007). A novel five-colour flow cytometric assay to determine NK cell cytotoxicity against neuroblastoma and other adherent tumour cells. *J Immunol Methods* 325(1-2), 140–7.
- Koehl, U., K. Bochennek, S. Y. Zimmermann, T. Lehrnbecher, J. Sörensen, R. Esser, C. Andreas, C. Kramm, H. P. Grüttner, E. Falkenberg, A. Orth, P. Bader, D. Schwabe, and T. Klingebiel (2007). Immune recovery in children undergoing allogeneic stem cell transplantation: absolute CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> count reconstitution is associated with survival. *Bone Marrow Transplant* 39(5), 269–78.
- Koehl, U., R. Esser, S. Zimmermann, T. Tonn, R. Kotchetkov, T. Bartling, J. Sörensen, H.-P. Grüttner, P. Bader, E. Seifried, H. Martin, P. Lang, J. R. Passweg, T. Klingebiel, and D. Schwabe (2005). *Ex vivo* expansion of highly purified NK cells for immunotherapy after haploidentical stem cell transplantation in children. *Klin Padiatr* 217(6), 345–50.
- Koehl, U., J. Sörensen, R. Esser, S. Zimmermann, H. P. Grüttner, T. Tonn, C. Seidl, E. Seifried, T. Klingebiel, and D. Schwabe (2004). IL-2 activated NK cell immunotherapy of three children after haploidentical stem cell transplantation. *Blood Cells Mol Dis* 33(3), 261–6.
- Krähenbühl, O. and J. Tschopp (1991). Debate: the mechanism of lymphocyte-mediated killing. Perforin-induced pore formation. *Immunol Today* 12(11), 399–402; discussion 403.
- Kägi, D., B. Ledermann, K. Bürki, P. Seiler, B. Odermatt, K. J. Olsen, E. R. Podack, R. M. Zinkernagel, and H. Hengartner (1994). Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 369(6475), 31–7.
- Kärre, K., H. G. Ljunggren, G. Piontek, and R. Kiessling (1986). Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319(6055), 675–8.
- Lampson, L. A. and D. L. George (1986). Interferon-mediated induction of class I MHC products in human neuronal cell lines: analysis of HLA and beta 2-m RNA, and HLA-A and HLA-B proteins and polymorphic specificities. *J Interferon Res* 6(3), 257–65.
- Lang, P., M. Schumm, J. Greil, P. Bader, T. Klingebiel, I. Müller, T. Feuchtinger, M. Pfeiffer, P.-G. Schlegel, D. Niethammer, and R. Handgretinger (2005). A comparison between three graft manipulation methods for haploidentical stem cell transplantation in pediatric patients: preliminary results of a pilot study. *Klin Padiatr* 217(6), 334–8.
- Lanier, L. L. (1998). Activating and inhibitory NK cell receptors. *Adv Exp Med Biol* 452, 13–8.
- Lanier, L. L. (2005). NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 23, 225–74.

## 8 Literaturverzeichnis

- Lanier, L. L., H. Spits, and J. H. Phillips (1992). The developmental relationship between NK cells and T cells. *Immunol Today* 13(10), 392–5.
- Lanier, L. L., R. Testi, J. Bindl, and J. H. Phillips (1989). Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J Exp Med* 169(6), 2233–8.
- Lassailly, F., I. Sielleur, D. Blaise, and C. Chabannon (2005). rhG-CSF does not affect the phenotype of adult donor peripheral blood NK cells. *Bone Marrow Transplant* 35(1), 25–32.
- Law, T. M., R. J. Motzer, M. Mazumdar, K. W. Sell, P. J. Walther, M. O’Connell, A. Khan, V. Vlamis, N. J. Vogelzang, and D. F. Bajorin (1995). Phase III randomized trial of interleukin-2 with or without lymphokine-activated killer cells in the treatment of patients with advanced renal cell carcinoma. *Cancer* 76(5), 824–32.
- Lefrançois, L. (2006). Development, trafficking, and function of memory T-cell subsets. *Immunol Rev* 211, 93–103.
- Lefrançois, L. and A. L. Marzo (2006). The descent of memory T-cell subsets. *Nat Rev Immunol* 6(8), 618–23.
- Leiden, J. M., B. A. Karpinski, L. Gottschalk, and J. Kornbluth (1989). Susceptibility to natural killer cell-mediated cytotoxicity is independent of the level of target cell class I HLA expression. *J Immunol* 142(6), 2140–7.
- Leung, W., R. Iyengar, B. Triplett, V. Turner, F. G. Behm, M. S. Holladay, J. Houston, and R. Handgretinger (2005). Comparison of killer Ig-like receptor genotyping and phenotyping for selection of allogeneic blood stem cell donors. *J Immunol* 174(10), 6540–5.
- Leung, W., R. Iyengar, V. Turner, P. Lang, P. Bader, P. Conn, D. Niethammer, and R. Handgretinger (2004). Determinants of antileukemia effects of allogeneic NK cells. *J Immunol* 172(1), 644–50.
- Litwin, V., J. Gumperz, P. Parham, J. H. Phillips, and L. L. Lanier (1993). Specificity of HLA class I antigen recognition by human NK clones: evidence for clonal heterogeneity, protection by self and non-self alleles, and influence of the target cell type. *J Exp Med* 178(4), 1321–36.
- Ljunggren, H.-G. and K.-J. Malmberg (2007). Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat Rev Immunol* 7(5), 329–39.
- Lozzio, C. B., B. B. Lozzio, E. A. Machado, J. E. Fuhr, S. V. Lair, and E. G. Bamberger (1979). Effects of sodium butyrate on human chronic myelogenous leukaemia cell line K562. *Nature* 281(5733), 709–10.
- Luhm, J., J.-M. Brand, P. Koritke, M. Höppner, H. Kirchner, and C. Frohn (2002). Large-scale generation of natural killer lymphocytes for clinical application. *J Hematother Stem Cell Res* 11(4), 651–7.

## 8 Literaturverzeichnis

- Matera, L., M. Contarini, G. Bellone, B. Forno, and A. Biglino (1999). Up-modulation of interferon-gamma mediates the enhancement of spontaneous cytotoxicity in prolactin-activated natural killer cells. *Immunology* 98(3), 386–92.
- Matsuda, A., K. Orihara, S. Fukuda, H. Fujinaga, K. Matsumoto, and H. Saito (2008). Corticosteroid enhances TNF- $\alpha$ -mediated leukocyte adhesion to pulmonary microvascular endothelial cells. *Allergy* 63(12), 1610–6.
- Matthay, K., J. Villablanca, R. Seeger, D. Stram, R. Harris, N. Ramsay, P. Swift, H. Shimada, C. Black, G. Brodeur, R. Gerbing, and C. Reynolds (1999). Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children’s Cancer Group. *N Engl J Med* 341(16), 1165–73.
- Maxwell, L. D., A. Wallace, D. Middleton, and M. D. Curran (2002). A common KIR2DS4 deletion variant in the human that predicts a soluble KIR molecule analogous to the KIR1D molecule observed in the rhesus monkey. *Tissue Antigens* 60(3), 254–8.
- McClintock, B. (1941). The Stability of Broken Ends of Chromosomes in *Zea Mays*. *Genetics* 26(2), 234–82.
- McKenna, D. H. J., D. Sumstad, N. Bostrom, D. M. Kadidlo, S. Fautsch, S. McNearney, R. Dewaard, P. B. McGlave, D. J. Weisdorf, J. E. Wagner, J. McCullough, and J. S. Miller (2007). Good manufacturing practices production of natural killer cells for immunotherapy: a six-year single-institution experience. *Transfusion* 47(3), 520–8.
- Meller, B., C. Frohn, J.-M. Brand, I. Lauer, L. F. Schelper, K. von Hof, H. Kirchner, E. Richter, and M. Baehre (2004). Monitoring of a new approach of immunotherapy with allogenic  $^{111}\text{In}$ -labelled NK cells in patients with renal cell carcinoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 31(3), 403–7.
- Menier, C., B. Riteau, E. D. Carosella, and N. Rouas-Freiss (2002). MICA triggering signal for NK cell tumor lysis is counteracted by HLA-G1-mediated inhibitory signal. *Int J Cancer* 100(1), 63–70.
- Miller, J. S., F. Prosper, and V. McCullar (1997). Natural killer (NK) cells are functionally abnormal and NK cell progenitors are diminished in granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cell collections. *Blood* 90(8), 3098–105.
- Miller, J. S., Y. Soignier, A. Panoskaltis-Mortari, S. A. McNearney, G. H. Yun, S. K. Fautsch, D. McKenna, C. Le, T. E. Defor, L. J. Burns, P. J. Orchard, B. R. Blazar, J. E. Wagner, A. Slungaard, D. J. Weisdorf, I. J. Okazaki, and P. B. McGlave (2005). Successful adoptive transfer and *in vivo* expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood* 105(8), 3051–7.

## 8 Literaturverzeichnis

- Mina-Osorio, P., B. Winnicka, C. O'Connor, C. L. Grant, L. K. Vogel, D. Rodriguez-Pinto, K. V. Holmes, E. Ortega, and L. H. Shapiro (2008). CD13 is a novel mediator of monocytic/endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol* 84(2), 448–59.
- Moretta, A., C. Bottino, M. Vitale, D. Pende, C. Cantoni, M. C. Mingari, R. Biassoni, and L. Moretta (2001). Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 19, 197–223.
- Moretta, L., C. Bottino, D. Pende, R. Castriconi, M. C. Mingari, and A. Moretta (2006). Surface NK receptors and their ligands on tumor cells. *Semin Immunol* 18(3), 151–8.
- Muul, L. M., K. Nason-Burchenal, C. Hyatt, S. Schwarz, D. Slavin, E. P. Director, and S. A. Rosenberg (1987). Studies of serum-free culture medium in the generation of lymphokine activated killer cells. *J Immunol Methods* 105(2), 183–92.
- Nagler, A., L. L. Lanier, S. Cwirla, and J. H. Phillips (1989). Comparative studies of human FcR3-positive and negative natural killer cells. *J Immunol* 143(10), 3183–91.
- Nguyen, S., N. Dhedin, J.-P. Vernant, M. Kuentz, A. Al Jijakli, N. Rouas-Freiss, E. D. Carosella, A. Bou-difa, P. Debré, and V. Vieillard (2005). NK-cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantations: immaturity of NK cells and inhibitory effect of NKG2A override GvL effect. *Blood* 105(10), 4135–42.
- Novelli, F. and J.-L. Casanova (2004). The role of IL-12, IL-23 and IFN- $\gamma$  in immunity to viruses. *Cytokine Growth Factor Rev* 15(5), 367–77.
- Ormerod, M. G., J. C. Titley, and P. R. Imrie (1995). Use of light scatter when recording a DNA histogram from paraffin-embedded tissue. *Cytometry* 21(3), 294–9.
- Ortaldo, J. R., R. K. Oldham, G. C. Cannon, and R. B. Herberman (1977). Specificity of natural cytotoxic reactivity of normal human lymphocytes against a myeloid leukemia cell line. *J Natl Cancer Inst* 59(1), 77–82.
- O'Shea, J. J., A. Ma, and P. Lipsky (2002). Cytokines and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2(1), 37–45.
- Parrish-Novak, J., S. R. Dillon, A. Nelson, A. Hammond, C. Sprecher, J. A. Gross, J. Johnston, K. Madden, W. Xu, J. West, S. Schrader, S. Burkhead, M. Heipel, C. Brandt, J. L. Kuijper, J. Kramer, D. Conklin, S. R. Presnell, J. Berry, F. Shiota, S. Bort, K. Hambly, S. Mudri, C. Clegg, M. Moore, F. J. Grant, C. Lofton-Day, T. Gilbert, F. Rayond, A. Ching, L. Yao, D. Smith, P. Webster, T. Whitmore, M. Maurer, K. Kaushansky, R. D. Holly, and D. Foster (2000). Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* 408(6808), 57–63.



## 8 Literaturverzeichnis

- Passweg, J. R., U. Koehl, L. Uharek, S. Meyer-Monard, and A. Tichelli (2006). Natural-killer-cell-based treatment in haematopoietic stem-cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol* 19(4), 811–24.
- Passweg, J. R., M. Stern, U. Koehl, L. Uharek, and A. Tichelli (2005). Use of natural killer cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 35(7), 637–43.
- Passweg, J. R., A. Tichelli, S. Meyer-Monard, D. Heim, M. Stern, T. Kühne, G. Favre, and A. Gratwohl (2004). Purified donor NK-lymphocyte infusion to consolidate engraftment after haploidentical stem cell transplantation. *Leukemia* 18(11), 1835–8.
- Pende, D., C. Cantoni, P. Rivera, M. Vitale, R. Castriconi, S. Marcenaro, M. Nanni, R. Biassoni, C. Bottino, A. Moretta, and L. Moretta (2001). Role of NKG2D in tumor cell lysis mediated by human NK cells: cooperation with natural cytotoxicity receptors and capability of recognizing tumors of nonepithelial origin. *Eur J Immunol* 31(4), 1076–86.
- Perussia, B. (1998). Fc receptors on natural killer cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 230, 63–88.
- Pessino, A., S. Sivori, C. Bottino, A. Malaspina, L. Morelli, L. Moretta, R. Biassoni, and A. Moretta (1998). Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J Exp Med* 188(5), 953–60.
- Pezzutto, A., T. Ulrichs, and G. R. Burmester (2006). Taschenatlas der Immunologie. *Thieme Verlag, Stuttgart*.
- Peña, J., C. Alonso, R. Solana, R. Serrano, J. Carracedo, and R. Ramirez (1990). Natural killer susceptibility is independent of HLA class I antigen expression on cell lines obtained from human solid tumors. *Eur J Immunol* 20(11), 2445–8.
- Piccioli, D., S. Sbrana, E. Melandri, and N. M. Valiante (2002). Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med* 195(3), 335–41.
- Ponzoni, M., F. Guarnaccia, M. V. Corrias, and P. Cornaglia-Ferraris (1993). Uncoordinate induction and differential regulation of HLA class-I and class-II expression by  $\gamma$ -interferon in differentiating human neuroblastoma cells. *Int J Cancer* 55(5), 817–23.
- Prigione, I., M. V. Corrias, I. Airoidi, L. Raffaghello, F. Morandi, P. Bocca, C. Cocco, S. Ferrone, and V. Pistoia (2004). Immunogenicity of human neuroblastoma. *Ann N Y Acad Sci* 1028, 69–80.
- Raffaghello, L., I. Prigione, I. Airoidi, M. Camoriano, I. Levreri, C. Gambini, D. Pende, A. Steinle, S. Ferrone, and V. Pistoia (2004). Downregulation and/or release of NKG2D ligands as immune evasion strategy of human neuroblastoma. *Neoplasia* 6(5), 558–68.

## 8 Literaturverzeichnis

- Raulet, D. H. and R. E. Vance (2006). Self-tolerance of natural killer cells. *Nat Rev Immunol* 6(7), 520–31.
- Robertson, M. J. (2002). Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J Leukoc Biol* 71(2), 173–83.
- Robertson, M. J. and J. Ritz (1990). Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 76(12), 2421–38.
- Rock, K. L., I. A. York, T. Saric, and A. L. Goldberg (2002). Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides. *Adv Immunol* 80, 1–70.
- Romagnani, C., K. Juelke, M. Falco, B. Morandi, A. D’Agostino, R. Costa, G. Ratto, G. Forte, P. Carrega, G. Lui, R. Conte, T. Strowig, A. Moretta, C. Münz, A. Thiel, L. Moretta, and G. Ferlazzo (2007). CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56<sup>dim</sup> NK cells upon activation. *J Immunol* 178(8), 4947–55.
- Rosenberg, S. A. (1988). The development of new immunotherapies for the treatment of cancer using interleukin-2. A review. *Ann Surg* 208(2), 121–35.
- Rosenberg, S. A., M. T. Lotze, L. M. Muul, A. E. Chang, F. P. Avis, S. Leitman, W. M. Linehan, C. N. Robertson, R. E. Lee, J. T. Rubin, and et al. (1987). A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N Engl J Med* 316(15), 889–97.
- Rosenberg, S. A. and J. J. Mulé (1985). Immunotherapy of cancer with lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2. *Surgery* 98(3), 437–44.
- Ruggeri, L., M. Capanni, E. Urbani, K. Perruccio, W. D. Shlomchik, A. Tosti, S. Posati, D. Rogaia, F. Frassoni, F. Aversa, M. F. Martelli, and A. Velardi (2002). Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 295(5562), 2097–100.
- Santis, A. G., M. López-Cabrera, F. Sánchez-Madrid, and N. Proudfoot (1995). Expression of the early lymphocyte activation antigen CD69, a C-type lectin, is regulated by mRNA degradation associated with AU-rich sequence motifs. *Eur J Immunol* 25(8), 2142–6.
- Sato, T., R. Kobayashi, M. Nakajima, A. Iguchi, and T. Ariga (2005). Significance of eosinophilia after stem cell transplantation as a possible prognostic marker for favorable outcome. *Bone Marrow Transplant* 36(11), 985–91.
- Schulze, A., H. Schirutschke, U. Oelschlägel, M. Schmitz, M. Füssel, R. Wassmuth, G. Ehninger, M. Bornhäuser, and U. Platzbecker (2008). Altered phenotype of natural killer cell subsets after haploidentical stem cell transplantation. *Exp Hematol* 36(4), 378–89.

## 8 Literaturverzeichnis

- Schumm, M., R. Handgretinger, M. Pfeiffer, T. Feuchtinger, S. Kuci, C. Faul, W. Vogel, W. Bethge, and P. Lang (2006). Determination of residual T- and B-cell content after immunomagnetic depletion: proposal for flow cytometric analysis and results from 103 separations. *Cytotherapy* 8(5), 465–72.
- Shlomchik, W. D. (2007). Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol* 7(5), 340–52.
- Silva, M R, P. A. and J. L. Ascensão (1995). Natural killer cell numbers and activity in mobilized peripheral blood stem cell grafts: conditions for *in vitro* expansion. *Exp Hematol* 23(14), 1676–81.
- Simhadri, V. R., K. S. Reiners, H. P. Hansen, D. Topolar, V. L. Simhadri, K. Nohroudi, T. A. Kufer, A. Engert, and E. Pogge von Strandmann (2008). Dendritic cells release HLA-B-associated transcript-3 positive exosomes to regulate natural killer function. *PLoS ONE* 3(10), e3377.
- Sivori, S., S. Parolini, E. Marcenaro, R. Castriconi, D. Pende, R. Millo, and A. Moretta (2000). Involvement of natural cytotoxicity receptors in human natural killer cell-mediated lysis of neuroblastoma and glioblastoma cell lines. *J Neuroimmunol* 107(2), 220–5.
- Sivori, S., D. Pende, C. Bottino, E. Marcenaro, A. Pessino, R. Biassoni, L. Moretta, and A. Moretta (1999). NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. *Eur J Immunol* 29(5), 1656–66.
- Skov, S., M. T. Pedersen, L. Andresen, P. T. Straten, A. Woetmann, and N. Odum (2005). Cancer cells become susceptible to natural killer cell killing after exposure to histone deacetylase inhibitors due to glycogen synthase kinase-3-dependent expression of MHC class I-related chain A and B. *Cancer Res* 65(23), 11136–45.
- Slavin, S., S. Morecki, and M. Shapira (2004). Immunotherapy using rIL-2 activated mismatched donor lymphocytes positively selected for CD56<sup>+</sup> for the treatment of resistant haematologic malignancies after stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant Suppl.1*(33), S174.
- Smyth, M. J., D. I. Godfrey, and J. A. Trapani (2001). A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol* 2(4), 293–9.
- Spaggiari, G. M., R. Carosio, D. Pende, S. Marcenaro, P. Rivera, M. R. Zocchi, L. Moretta, and A. Poggi (2001). NK cell-mediated lysis of autologous antigen-presenting cells is triggered by the engagement of the phosphatidylinositol 3-kinase upon ligation of the natural cytotoxicity receptors NKp30 and NKp46. *Eur J Immunol* 31(6), 1656–65.
- Storek, J. (2008). Immunological reconstitution after hematopoietic cell transplantation - its relation to the contents of the graft. *Expert Opin Biol Ther* 8(5), 583–97.

## 8 Literaturverzeichnis

- Storek, J., R. P. Witherspoon, and R. Storb (1995). T cell reconstitution after bone marrow transplantation into adult patients does not resemble T cell development in early life. *Bone Marrow Transplant* 16(3), 413–25.
- Sutherland, D R und Keating, A. (1992). The CD34 antigen: structure, biology, and potential clinical applications. *J Hematother* 1(2), 115–29.
- Swat, W., L. Ignatowicz, and P. Kisielow (1991). Detection of apoptosis of immature CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> thymocytes by flow cytometry. *J Immunol Methods* 137(1), 79–87.
- Taguchi, K., A. Shibuya, Y. Inazawa, and T. Abe (1992). Suppressive effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on the generation of natural killer cells *in vitro*. *Blood* 79(12), 3227–32.
- Takahashi, E., N. Kuranaga, K. Satoh, Y. Habu, N. Shinomiya, T. Asano, S. Seki, and M. Hayakawa (2007). Induction of CD16<sup>+</sup>CD56<sup>bright</sup> NK cells with antitumour cytotoxicity not only from CD16<sup>-</sup>CD56<sup>bright</sup> NK Cells but also from CD16<sup>-</sup>CD56<sup>dim</sup> NK cells. *Scand J Immunol* 65(2), 126–38.
- Thomas, E. D., R. Storb, R. A. Clift, A. Fefer, L. Johnson, P. E. Neiman, K. G. Lerner, H. Glucksberg, and C. D. Buckner (1975). Bone-marrow transplantation (second of two parts). *N Engl J Med* 292(17), 895–902.
- Trapani, J. A. and M. J. Smyth (2002). Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2(10), 735–47.
- Trenchel, R., R. Peceny, V. Runde, A. Elmaagacli, H. Dermoumi, E. Heintschel von Heinegg, K. D. Müller, U. W. Schaefer, and D. W. Beelen (2000). Fungal colonization and invasive fungal infections following allogeneic BMT using metronidazole, ciprofloxacin and fluconazole or ciprofloxacin and fluconazole as intestinal decontamination. *Bone Marrow Transplant* 26(9), 993–7.
- Trinchieri, G. (1989). Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 47, 187–376.
- Trinchieri, G., M. Matsumoto-Kobayashi, S. C. Clark, J. Seehra, L. London, and B. Perussia (1984). Response of resting human peripheral blood natural killer cells to interleukin 2. *J Exp Med* 160(4), 1147–69.
- Vago, L., B. Forno, M. P. Sormani, R. Crocchiolo, E. Zino, S. Di Terlizzi, M. T. Lupo Stanghellini, B. Mazzi, S. K. Perna, A. Bondanza, D. Middleton, A. Palini, M. Bernardi, R. Bacchetta, J. Peccatori, S. Rossini, M. G. Roncarolo, C. Bordignon, C. Bonini, F. Ciceri, and K. Fleischhauer (2008). Temporal, quantitative, and functional characteristics of single-KIR-positive alloreactive natural killer cell recovery account for impaired graft-versus-leukemia activity after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 112(8), 3488–99.

## 8 Literaturverzeichnis

- van den Brink, M. R. M. and S. J. Burakoff (2002). Cytolytic pathways in haematopoietic stem-cell transplantation. *Nat Rev Immunol* 2(4), 273–81.
- Vitale, M., C. Bottino, S. Sivori, L. Sanseverino, R. Castriconi, E. Marcenaro, R. Augugliaro, L. Moretta, and A. Moretta (1998). NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J Exp Med* 187(12), 2065–72.
- Vitale, M., M. Della Chiesa, S. Carlomagno, D. Pende, M. Aricò, L. Moretta, and A. Moretta (2005). NK-dependent DC maturation is mediated by TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  released upon engagement of the NKp30 triggering receptor. *Blood* 106(2), 566–71.
- Waldhauer, I., D. Goehlsdorf, F. Gieseke, T. Weinschenk, M. Wittenbrink, A. Ludwig, S. Stevanovic, H.-G. Rammensee, and A. Steinle (2008). Tumor-associated MICA is shed by ADAM proteases. *Cancer Res* 68(15), 6368–76.
- Waldhauer, I. and A. Steinle (2008). NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene* 27(45), 5932–43.
- Waldmann, T. A. (2006). The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat Rev Immunol* 6(8), 595–601.
- Walzer, T., M. Dalod, S. H. Robbins, L. Zitvogel, and E. Vivier (2005). Natural-killer cells and dendritic cells: l’union fait la force. *Blood* 106(7), 2252–8.
- Wang, H., B. Grzywacz, D. Sukovich, V. McCullar, Q. Cao, A. B. Lee, B. R. Blazar, D. N. Cornfield, J. S. Miller, and M. R. Verneris (2007). The unexpected effect of cyclosporin A on CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> and CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> natural killer cell subpopulations. *Blood* 110(5), 1530–9.
- Wu, J., Y. Song, A. B. Bakker, S. Bauer, T. Spies, L. L. Lanier, and J. H. Phillips (1999). An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 285(5428), 730–2.
- Yokoyama, W. M. and S. Kim (2006). Licensing of natural killer cells by self-major histocompatibility complex class I. *Immunol Rev* 214, 143–54.
- Yokoyama, W. M. and B. F. M. Plougastel (2003). Immune functions encoded by the natural killer gene complex. *Nat Rev Immunol* 3(4), 304–16.
- Yu, J., G. Heller, J. Chewning, S. Kim, W. M. Yokoyama, and K. C. Hsu (2007). Hierarchy of the human natural killer cell response is determined by class and quantity of inhibitory receptors for self-HLA-B and HLA-C ligands. *J Immunol* 179(9), 5977–89.

## 8 Literaturverzeichnis

- Zamai, L., M. Ahmad, I. M. Bennett, L. Azzoni, E. S. Alnemri, and B. Perussia (1998). Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J Exp Med* 188(12), 2375–80.
- Zimmermann, S.-Y., R. Esser, E. Rohrbach, T. Klingebiel, and U. Koehl (2005). A novel four-colour flow cytometric assay to determine natural killer cell or T-cell-mediated cellular cytotoxicity against leukaemic cells in peripheral or bone marrow specimens containing greater than 20 cells. *J Immunol Methods* 296(1-2), 63–76.
- Zwirner, N. W., M. B. Fuertes, M. V. Girart, C. I. Domaica, and L. E. Rossi (2007). Cytokine-driven regulation of NK cell functions in tumor immunity: role of the MICA-NKG2D system. *Cytokine Growth Factor Rev* 18(1-2), 159–70.

# Anhang

# A Abbildungsverzeichnis

1.1	Die Differenzierungsmöglichkeiten der hämatopoetischen Stammzelle . . . . .	3
1.2	Das humane Leukozytenantigen-System (HLA-System) . . . . .	5
1.3	Hämatopoetische SZT . . . . .	7
1.4	Stammzellquellen . . . . .	9
1.5	Prinzip der magnetischen Zellisolierung . . . . .	10
1.6	Vereinfachte Darstellung der CD34-Selektion und CD3/CD19-Depletion . .	11
1.7	Aufbau eines CliniMACS-Gerätes . . . . .	12
1.8	Allgemeine Darstellung der Immunregeneration . . . . .	13
1.9	Zusammenhang der Immunrekonstitution mit dem Überleben . . . . .	15
1.10	GvHD . . . . .	16
1.11	GvL/GvT-Effekt . . . . .	18
1.12	Komplikationen nach SZT . . . . .	19
1.13	NK-Zell-Rezeptoren und ihre Signalstoffe . . . . .	23
1.14	KIR . . . . .	24
1.15	NCR . . . . .	26
1.16	ADCC . . . . .	27
1.17	Apoptose-induzierende Signalwege . . . . .	28
1.18	Hypothese nach Farag <i>et al.</i> . . . . .	29
1.19	Alloreaktive NK-Zellen nach Ljunggren <i>et al.</i> . . . . .	30
1.20	NK-Zell-Studienprotokolle . . . . .	32
2.1	Potentielle Effekte der haploidenten NK-Zell-Immuntherapie . . . . .	36
3.1	Prinzip der RosetteSep Technik . . . . .	46
3.2	Messparameter der Durchflusszytometrie . . . . .	51
3.3	Erläuterung der Messparameter . . . . .	52
3.4	Bestimmung von NK-Zellen im Durchflusszytometer. . . . .	56
3.5	Prinzip der Dichte-Messung . . . . .	59
3.6	CBA Immunoassay . . . . .	62
3.7	Bestimmung von Zytokinen im Durchflusszytometer. . . . .	65
4.1	Durchflusszytometrische Vitalitätsmessungen im Verlauf der Expansion . .	71
4.2	Expansionsmonitoring der NK-Zellen . . . . .	73
4.3	Veränderung der NKG2D Rezeptordichte unter IL-2 Stimulierung . . . . .	75
4.4	Veränderung der NCR Rezeptordichte unter IL-2 Stimulierung . . . . .	76



## A Abbildungsverzeichnis

4.5	Veränderungen der KIR Proportionen unter IL-2 Kultivierung . . . . .	79
4.6	Zytotoxische Aktivität gegenüber K-562 . . . . .	80
4.7	Visuelle Kontrolle der zytotoxische Aktivität gegen UKF-NB-3 . . . . .	81
4.8	Zytokinausschüttung von unstimulierten und stimulierten NK-Zellen . . . . .	82
4.9	Aktivierungsmarker von unstimulierten und stimulierten NK-Zellen . . . . .	83
4.10	Einfluss der IL-2 stimulierten NK-Zellen auf den zellulären Immunstatus . . . . .	86
4.11	Engmaschiges Monitoring der NK-Zell-Subpopulationen nach NK-Zell-Infusion . . . . .	86
4.12	Engmaschiges Monitoring der dendritischen Zellen nach NK-Zell-Infusion . . . . .	87
4.13	Engmaschiges Monitoring der Monozyten nach NK-Zell-Infusion . . . . .	87
4.14	Engmaschiges Monitoring der Granulozyten nach NK-Zell-Infusion . . . . .	88
4.15	Engmaschiges Monitoring der Zytokinspiegel nach NK-Zell-Infusion . . . . .	89
4.16	NK-/ T-Zell-Dosiskorrelation . . . . .	91
4.17	Stabilitätsmessungen . . . . .	93
4.18	Entwicklung des Exponentialmodells . . . . .	94
4.19	Kontinuierliches Regressionsmodell zur Beschreibung von Normalwerten . . . . .	96
4.20	Vergleich der Immunrestitution bei unterschiedlicher Zellaufarbeitung . . . . .	98
4.21	Nutzung des entwickelten Exponentialmodells . . . . .	100
4.22	Einfluss der CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Regeneration sowie der Stammzelltrans- plantataufreinigung auf das Überleben . . . . .	103
5.1	Mikroskopische Aufnahme von IL-2 stimulierten NK-Zellen . . . . .	107
5.2	Schematischer Aufbau des IL-2 und des IL-15 Rezeptors . . . . .	108
5.3	KIR Proportionsänderung nach IL-2 Stimulierung auf den NK-Zellen und Eingruppierung nach der <i>Licensing</i> - Hypothese . . . . .	113
5.4	Vergleich des entwickelten Exponentialmodells . . . . .	126
E.1	Normwertkalkulator . . . . .	IX
F.1	Bestimmung des Immunstatus im Durchflusszytometer . . . . .	X

# B Tabellenverzeichnis

1.1	Einteilung der akuten GvHD . . . . .	17
1.2	NK-Zell-Subpopulationen . . . . .	22
1.3	Modelle der Selbsttoleranz . . . . .	31
3.1	Spendercharakteristik . . . . .	37
3.2	Patientencharakteristik der NK-Zell-Studie . . . . .	39
3.3	Patientencharakteristik der Vergleichskohorte . . . . .	40
3.4	Geräte und Software . . . . .	41
3.5	Chemikalien, Medien, Puffer und Reagenzien . . . . .	42
3.6	Materialien für die immunomagnetische Zellisolierung . . . . .	43
3.7	Antikörper für die durchflusszytometrischen Analysen . . . . .	43
3.8	Antikörper für die Cytometric Bead Array Analysen . . . . .	44
3.9	Pipettierschema Antigendichtebestimmung auf NK-Zellen . . . . .	58
3.10	Bead Verteilung CBA Flex Set . . . . .	65
4.1	Ergebnisse der klinischen NK-Zell-Aufarbeitung . . . . .	69
4.2	KIR und HLA Typisierung der Spender und Empfänger . . . . .	77
4.3	Applizierte Zelldosen bei der NK-Zelltherapie Studie . . . . .	84
4.4	Charakteristika von den » <i>high</i> « und » <i>low</i> «-Risiko Gruppen . . . . .	101
5.1	Aufreinigung und Aktivierung im klinischen Maßstab . . . . .	106
5.2	KIR und KIR Liganden in der SZT . . . . .	119
5.3	NK-Zell-Studien . . . . .	122
D.1	CD-Nomenklatur . . . . .	VII
E.1	Pipettierschema des Immunstatus . . . . .	IX
G.1	Zytokine/ Chemokine und ihre Wirkweise . . . . .	XI

# C Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin (DNA interkalierender Vitalfarbstoff)
ABC	<i>antibody binding capacity</i> = Antikörperbindungskapazität
ADCC	<i>antibody dependent cell cytotoxicity</i> = antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität
Ak	Antikörper
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
ATG	Antithymozytenglobin
BFM	Berlin-Frankfurt-Münster - Studiengruppe von Kinderonkologischen Kliniken
BSD	Blutspendedienst
CBA	Cytometric Bead Array
CCB	<i>cell collection bag</i> = erwünschte Zellfraktion (Transplantat)
CD	<i>cluster of differentiation</i> = Nomenklatur für Oberflächenantigene
CMV	<i>cytomegalievirus</i> = Zytomegalie-Virus
CsA	Cyclosporin A
CR	<i>complete remission</i> = komplette Remission
CRP	C-reaktives Protein
Depl.	Depletion
DNA	<i>desoxyribonucleinacid</i> = Desoxyribonukleinsäure
DZ	dendritische Zelle
ECD	Phycoerythrin-Texas Red
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, eingesetzt als Calciumpuffer und dient der Antikoagulation von Blutproben
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i> = enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
FCS	<i>fetal calf serum</i> = fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	Fluoreszenz
FSC (=FS)	<i>forward scatter</i> = Vorwärtsstreuung
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
G-CSF	<i>granulocyte colony stimulating factor</i> = Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i> = Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor

## C Abkürzungsverzeichnis

GMP	<i>good manufacturing practise</i> = Gute Herstellungspraxis
GvHD	<i>graft versus host disease</i> = Spender-gegen-Empfänger-Erkrankung
GvL,-T	<i>graft versus leukemia,- tumor</i> = Spender-gegen-Leukämie,-Tumor Reaktion
HB	Hepatoblastom
HLA	<i>human leukocyte antigen</i> = Humanes Leukozytenantigen
HSA	<i>human serum albumin</i> = Humanes Serum Albumin
IgG	Immunglobulin G
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i> = Aktivierungsmotive
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i> = Inhibitions motive
i.v.	<i>intravenös</i> = in eine Vene hinein
KG	kilogramm Körpergewicht
KIR	<i>killer cell immunoglobuline-like receptor</i> = NK-Zellrezeptor
KM	Knochenmark
LAK	<i>lymphokine activated killer cells</i> = Lymphokin-aktivierte Killer Zellen
mAk	monoklonaler Antikörper
MD	<i>matched donor</i> = passender Spender
MDS	myelodysplastisches Syndrom
mDZ	myeloide dendritische Zelle
mHA	<i>minor histocompatibility antigen</i> = minor Histokompatibilitätsantigen
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> = Haupthistokompatibilitätskomplex
MFD	<i>matched family donor</i> = HLA-identer Familienspender
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i> = Mittlere Fluoreszenzintensität
MIBG	<sup>131</sup> Jod-markiertes Metajodobenzylguanidin
MICA/B	<i>MHC class I chain-related gene A protein</i> = MHC Klasse I-verwandtes Gene A Protein
MMF	Methyl-Mycophenolat
MMFD	<i>mismatched family donor</i> = nicht-identer Familienspender
MMUD	<i>mismatched unrelated donor</i> = nicht-identer Fremdspender
MNZ	Mononukleäre Zellen (Lymphozyten und Monozyten)
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> = Boten-Ribonukleinsäure
MRD	<i>minimal residual disease</i> = minimale Resterkrankung
MSD	<i>matched sibling donor</i> = HLA-identer Geschwisterspender
MTX	Methothrexat
MUD	<i>matched unrelated donor</i> = HLA-identer Fremdspender
NB	Neuroblastom
NCR	<i>natural cytotoxicity receptor</i> = Natürliche Zytotoxizitätsrezeptoren
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NS-KIR	<i>non-self-KIR</i> = KIR für nicht eigene MHC-Klasse I

## C Abkürzungsverzeichnis

NTCB	<i>non target cell bag</i> = unerwünschte Zellfraktion
OKT-3	Muromonab-CD3 (therapeutischer monoklonaler Antikörper gegen CD3 gerichtet)
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i> = Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PB	peripheres Blut
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> = Phosphat gepufferte Salzlösung
PBSC	<i>peripheral blood stem cells</i> = periphere Blutstammzellen
PC-5	Phycoerythrin-Cyanine 5
PC-7	Phycoerythrin-Cyanine 7
pDZ	plasmazytoide dendritische Zellen
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
RMS	Rhabdomyosarkom
rpm	<i>revolutions per minute</i> = Umdrehungen pro Minute
RPMI	Zellkulturmedium von Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
s.c.	<i>subcutan</i> = unter die Haut verabreicht
SCID	<i>severe combined immunodeficiency disorders</i> = schwerer kombinierter Immundefekt
Sel.	Selektion
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i> = kurze Moleküle der Ribonukleinsäure
S-KIR	<i>self-KIR</i> = KIR für das eigene MHC-Klasse I
SSC (=SS)	<i>side scatter</i> = Seitwärtsstreulicht
SZT	Stammzelltransplantation
TBI	<i>total body irradiation</i> = Ganzkörperbestrahlung
TLR	<i>toll-like receptor</i> = Toll-like-Rezeptor
TRAIL	<i>tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand</i> = Tumornekrosefaktor zugehöriger Apoptose Induzierender Ligand
TRM	<i>treatment related mortality</i> = therapieinduzierte Mortalität
U	<i>unit</i> = Einheit
UKF-NB-3	humane Neuroblastomzellen des Universitätsklinikum Frankfurt
ULPB	<i>UL16-binding protein</i> = Protein des Zytomegalie-Virus
vs.	versus
VSAA	<i>very severe aplastic anaemia</i> = schwere aplastische Anämie
ZNS	Zentrales Nervensystem

# D CD-Nomenklatur

**Tabelle D.1: CD-Nomenklatur.**

CD-Antigen	alternativer Name	zelluläre Expression	Funktion	Liganden
CD3	T3	T, Thy	assoziiert mit dem T-Zell-Antigenrezeptor, Signaltransduktion	—
CD4	T4, L3T4	T <sub>Helfer</sub> Thy, Mo, Ma	Korezeptor für MHC-Klasse-II Molekül, Signaltransduktion	MHC II
CD8	T8, Lyt2,3	T <sub>Zytox</sub> NK	Korezeptor für MHC-Klasse-I Moleküle	MHC I
CD14	LPS-Rezeptor	Mo, Gra	Rezeptor für Lipopolysaccharide	LBP, LPS
CD16	Fc $\gamma$ RIII	NK, Neu, Ma	ADCC	IgG
CD19	B4	B	Korezeptormolekül für die Aktivierung von B-Zellen	—
CD25	IL-2R $\alpha$	akt. Ly, Mo	IL-2 Rezeptor, $\alpha$ -Kette	IL-2
CD28	Tp44	T-Zellen akt. B	Rezeptor für kostimulierendes Signal	CD80 CD86
CD36	Blättchen-GPIV GPIIIb	Thr, Mo, Ma	Glykoprotein IV, Collagen/ Thrombospondinrezeptor	—
CD45	LCA	alle hämatopoetischen Zellen	Tyrosin-Phosphatase	—
CD45R0	Fibronectin II	Gedächtnis T Mo, Ma, B Subpop	Isoform von CD45, enthält keine A-, B-, C- Exone	—
CD45RA	Fibronectin II	Naïve T, B Mo	Isoform von CD45, enthalten das A-Exon	—
CD56	N-CAM	T, NK	Adhäsionsmolekül	—
CD62L	L-Selektin	B, T, NK, Mo	Adhäsionsmolekül (Lymphknoten)	HEV
CD66b	CGM6	Gra	Glykosylphosphatidylinositol-Anker-Protein	—
CD69	AIM	akt. T, NK, Eos	zelluläres Aktivierungsantigen	—
CD85k	ILT-3	DZ	ILT/LIR Familie	—
CD95	Fas, APO1	Ly	bindet TNF-ähnliche Fas Liganden induziert Apoptose	CD95L (FasL) CD178
CD127	IL-7R $\alpha$	reife T, pro-B, Mo	IL-7 Rezeptor, $\alpha$ -Kette	IL-7
CD158a,h	KIR2DL1, 2DS1	NK Subpop	erkennt HLA-Cw4 (2,4,5,6,15, 17,18,*0307,*0310,*0315,*0707,*0709,*1205*12041/2,*1404,*1602)	MHC I
CD158b1/b2,j	KIR2DL2, 2DL3 2DS2	NK Subpop	erkennt HLA-Cw3 (1,3,7,8,12, 13,14,16,*1507)	MHC I
CD158e1/e2	KIR3DL1, 3DS1	NK Subpop	erkennt HLA-Bw4 (8,13,27,44, 51,52,53,57,58)	MHC I
CD158i	KIR2DS4	NK Subpop		MHC I

## D CD-Nomenklatur

HLA-DR		akt. Ly, Mo	HLA-Klasse II-Rezeptor	—
CD314	NKG2D	NK, T Subpop	Zellyse durch NKG2D-Liganden tra- gende Target-Zellen	MIC-A,B ULPBs
CD335	NKp46, Ly94	NK	NK-Zell-vermittelte Zellyse	—
CD336	NKp44, Ly95	NK	NK-Zell-vermittelte Zellyse	—
CD337	NKp30, Ly117	NK	NK-Zell-vermittelte Zellyse	BAT 3

---

LCA=*leukocyte common antigen*, AIM=*activation induction molecule*, Thy=Thymozyten, Mo=Monozyten, Ma=Makrophagen, Neu=Neutrophile Granulozyten, Eos=Eosinophile Granulozyten, Gra=Granulozyten, Thr=Thrombozyten, Ly=Lymphozyten, T=T-Lymphozyten, NK=Natürliche Killer Zellen, B=B-Lymphozyten, DZ=dendritische Zellen, KM=Knochenmark, Subpop=Subpopulation, akt=aktivierte, LBP=lipopolysaccaridbindendem Protein, HEV=*high endothelial venules*.

# E Pipettierschema und neu entwickelter Normwert-Kalkulator

**Tabelle E.1: Pipettierschema des Immunstatus.**

	FL 1 FITC	FL 2 PE	FL 3 ECD	FL 4 PC-5
1	CD45 (B3821F4A) <sup>1</sup>	CD4 (SFCI12T4D11)	CD8 (SFCI21Thy2D3)	CD3 (UCHT1)
2	CD45 (B3821F4A) <sup>1</sup>	CD56 (N901)	CD19 (J4.119)	CD3 (UCHT1)
3	CD45 (J.33)	CD14 (RMO52) <sup>2</sup>	—	—
4	HLA-DR (Immu-357)	CD69 (TP1.55.3) <sup>1</sup>	CD3 (UCHT1)	CD4 (13B8.2)
5	HLA-DR (Immu-357)	CD69 (TP1.55.3) <sup>1</sup>	CD3 (UCHT1)	CD8 (B9.11)
6	CD45RA (ALB11)	CD45RO (UCHL1) <sup>2</sup>	CD3 (UCHT1)	CD4 (13B8.2)
7	CD45RA (ALB11)	CD45RO (UCHL1) <sup>2</sup>	CD3 (UCHT1)	CD8 (B9.11)
8	CD45RA (ALB11)	CD28 (CD28.2)	CD3 (UCHT1)	CD8 (B9.11)

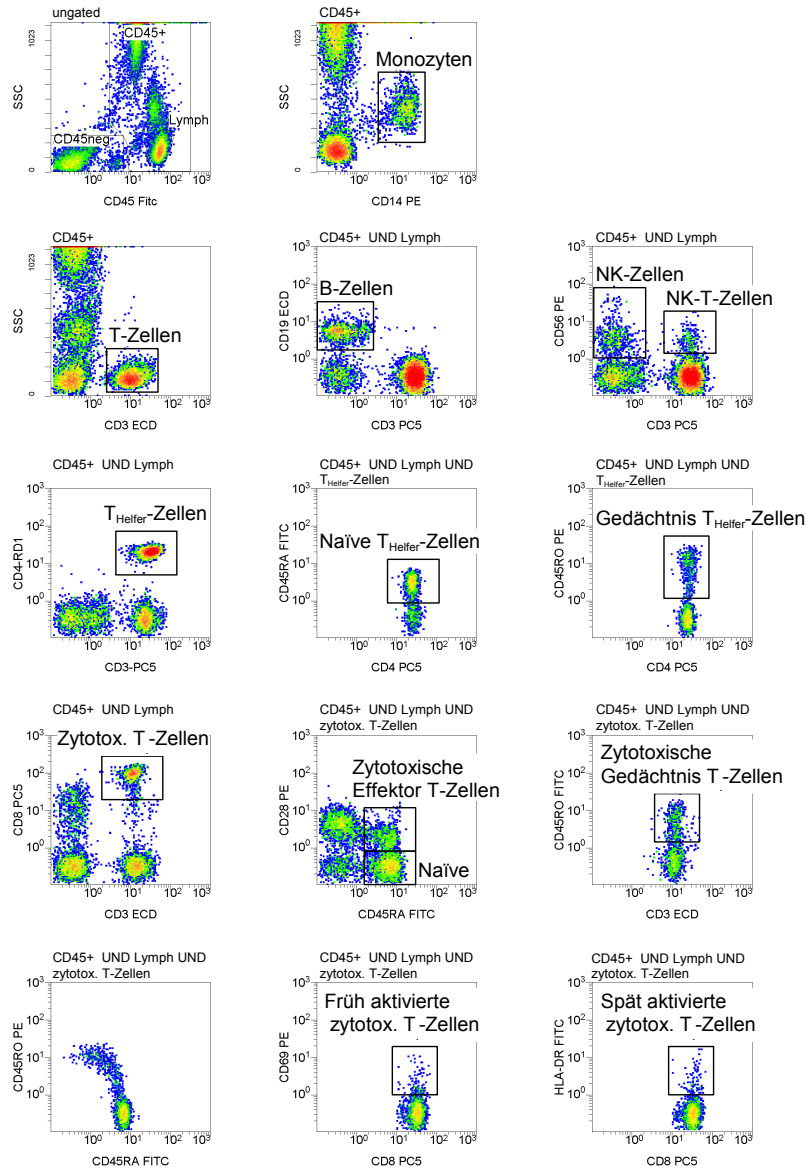
Klone: <sup>1</sup>IgG2b, <sup>2</sup>IgG2a und alle anderen Klone waren IgG1 Isotypen. Eingesetzt wurden 5- 10 µl Antikörpermenge auf 100 µl Probenmenge (EDTA Blut).

	A	B	C	D	E	F
1	<b>Age-matched Reference Values</b>					
2	the valid input range is between 0 - 480 months (or 0 - 40 years)					
3						
4	Age:	<input type="text"/>	months			
5		or:				
6		<input type="text"/>	years plus	<input type="text"/>	months	
7						
8		Lower Bound 95%	Lower Bound 90%	Predicted Value	Upper Bound 90%	Upper Bound 95%
9	Lymphos abs.	1154	1283	2389	3426	3528
10	CD3+ T-Zellen	770	910	1679	2451	2723
11	CD3+CD8+	203	264	560	903	1049
12	CD3+CD4+	461	497	982	1582	1657
13	CD3-CD56+ NK-Zellen	46	73	222	434	599
14	CD19+ B-Zellen	170	197	424	686	768
15	CD14+ Monozyten	164	187	389	611	840

**Abbildung E.1: Normwert-Kalkulator für Lymphozytensubpopulationen.** Der Kalkulator wurde in Form einer Excel Datei angelegt und beinhaltet die entwickelten Normwertfunktionen für die verschiedenen Lymphozytensubpopulationen. Durch die Eingabe des Alters in Monaten oder in Jahren + Monate werden die Normbereiche der Absolutzellzahlen für das entsprechende Alter sowie das 90<sup>te</sup> und 95<sup>te</sup> Konfidenzintervall für die verschiedenen Lymphozytensubpopulationen angezeigt.



# F Protokolle des Immunstatus



**Abbildung F.1: Bestimmung des Immunstatus im Durchflusszytometer.** Über jedem Diagramm (*density plot*=graphische Häufigkeits - Dichteverteilung; rot=hohe Dichte, grün/gelb=mittlere Dichte, blau=geringe Dichte) ist angegeben, auf welche Zellpopulation sich dieses Diagramm bezieht (=gating).

# G Zytokine/ Chemokine und ihre Wirkweise

Tabelle G.1: Zytokine/ Chemokine und ihre Wirkweise

Zytokin	produzierende Zellen	Zielzelle	Wirkung	Literatur Mensch
IL-1 $\beta$	Ma, Epi	T, B, Ma, Endo	Lymphozyten-Aktivierung, Ly-Adhäsion $\uparrow$ , Makrophagenaktivierung, Akute Phase Protein	Stabler, 2004
IL-2	T	T, NK	Proliferation von T, NK	Mazzone, 1999
IL-4	T, Mast-Z	B, T	Aktivierung zytotoxischer Ly B-Zell-Aktivierung IgE Wechsel, Isotypenselektion Hemmung T <sub>H</sub> 1-Zellen	Stabler, 2004 Stabler, 2004
IL-6	T, Ma, Endo	B, T, Hep	Wachstum/Differenzierung B und T, Induktion von akute Phase Proteinen Fieber	Mazzone, 1999 Martin, 2001
IL-8	Mo	Neu, Bas, T	Chemotaxis, Angiogenese, Ausschüttung v. Superoxiden	Martin, 2001
IL-10	T <sub>reg</sub>	T, Ma	wirksamer Inhibitor von Makrophagenaktivierung (Zytokinsynthese)	Mazzone, 1999
IL-12p70	Mo, Ma, B, Neu	NK, T, B	Aktivierung von NK induziert Differenzierung von CD4 <sup>+</sup> T zu T <sub>H</sub> 1-Zellen	
IL-13	T, NK	Mo, B	Wachstum/Differenzierung B, Hemmung T <sub>H</sub> 1-Zellen Hemmung pro-inflammatorischer Zytokinproduktion	Joseph, 2005 Stabler, 2004
IFN- $\gamma$	T, NK		Aktivierung Ma, Erhöhung d. MHC-Expression Hemmung T <sub>H</sub> 2-Zellen	Wanac., 1999
IP-10		akt. T		Shimada, 2001
TNF- $\alpha$	Ma, T, NK	Ma, Gra, Ge-Z	lokale Entzündung, Ma-aktivierung, Endothelaktivierung, Induzierung der akuten Phase, Fieber	Martin, 2001

*G Zytokine/ Chemokine und ihre Wirkweise*

TNF- $\beta$	T, B	Leu, Gewebe-Z	Ma-Aktivierung, Ly-Adhäsion $\uparrow$ Endothelaktivierung, antiviral	Endotheliale	Atici, 1997
MCP-1	Leu, Fibro	Mo, T, NK, Gra	Chemotaxis Zytolyse/Degranulation d. NK		Arakelyan, 2005
MIP-1 $\alpha$	akt. T/NK, Mo	Mo, Ma, T, NK unreife DZ, Bas	bei Mo Chemotaxis bei Ly auch Adhäsion und Degranulation		
MIP-1 $\beta$	akt. T/NK, Mo	Mo, Ma, T, NK unreife DZ, Bas	bei Mo Chemotaxis bei Ly auch Adhäsion und Degranulation		Stabler, 2004
RANTES	Mo, DZ, NK	Mo, Ma, T, NK Bas, Eos, DZ	bei Mo, Eos, Bas, T induziert Ausschüttung von Histamin/ ECP	Chemotaxis	Niwa, 2001
FasL	T, NK		induziert Apoptose Ca <sup>2+</sup> unabhängige Zytotoxizität		
G-CSF	Mo, Fibro	SZ	Stimuliert Entwicklung Differenzierung v. Neu		Stabler, 2004
GM-CSF	T, Ma		Stimuliert Wachstum Differenzierung v. Myelo besonders DZ		Hellmich, 2004 Torre, 2003

---

Mo=Monozyten, Ma=Makrophagen, Neu=Neutrophile Granulozyten, Eos=Eosinophile Granulozyten, Gra=Granulozyten, Thr=Thrombozyten, Ly=Lymphozyten, T=T-Lymphozyten, NK=Natürliche Killer Zellen, B=B-Lymphozyten, DZ=dendritische Zellen, akt=aktivierte, ECP=eosinophiles-kationisches Protein, Endo=Endothelzellen, Hep=Hepatozyten, Mast-Z=Mast-Zellen, Epi=Epithelzellen, Fibro=Fibroblasten, Ge-Z=Gewebe-Zellen

# H Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung pädiatrische Hämatologie, Onkologie und Hämostaseologie des Zentrums für Kinder- und Jugendmedizin - Klinik III der Johann Wolfgang Goethe Universität unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Klingebiel in Frankfurt am Main angefertigt. Viele Menschen trugen erheblich zum Gelingen dieser Arbeit bei. Namentlich möchte ich dabei besonders bedanken bei:

Prof. Dr. Thomas Klingebiel für die freundliche Betreuung und die Möglichkeit unter ihm am Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Frankfurt am Main promovieren zu dürfen.

Prof. Dr. Walter E. Müller für sein Interesse an diesem Projekt und für die Bereitschaft diese Arbeit am Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zu betreuen.

PD Dr. Ulrike Köhl für die außergewöhnliche Unterstützung in jeder Phase dieser Arbeit, ihre Motivation in jeder erdenklichen Situation, die stetig fachlichen Diskussionen, aber auch für das hervorragende Arbeitsklima in ihrem Team.

Prof. Dr. Thomas Lehrnbecher und Dr. Stefanie Yvonne Zimmermann für ihre Diskussionsbereitschaft und Korrekturvorschläge, die mich maßgeblich bei der Darstellung der Forschungsergebnisse für meine Veröffentlichungen unterstützt haben.

Prof. Dr. Michael Behl für die strukturierte und systematische Zusammenarbeit sowie die gemeinsame Erarbeitung des stetigen nicht-linearen Exponentialmodells.

Prof. Dr. Dorothee von Laer und Prof. Dr. Dieter Steinhilber für die Betreuung im Graduiertenkolleg (GK-1172), ihr Interesse an dieser Arbeit, ihre anregende Diskussionsbereitschaft und ihre Denkanstöße.

Andrea Brinkmann für ihren Einsatz und die Weitergabe ihrer beeindruckenden Kenntnisse und Fähigkeiten im Umgang mit NK-Zellen und das Heranführen an die Methodik der Durchflusszytometrie, haben diese Arbeit deutlich erleichtert bzw. erst ermöglicht.

Carla Fadler für die Einführung und die Unterstützung bei der Aufarbeitung von Datensätzen, sowie den ersten Versuchsdurchführungen mit schneller und akkurater Hand.

Lars Tramsen für die wissenschaftlichen Diskussionen und den Gedankenaustausch sowie die privaten Aufmunterungen mit seinem stets trockenen nordischen Humor.

## *H Danksagung*

Dr. Ruth Esser und Stephanie Erben für das Beantworten zahlreicher Fragen, das Einführen in die Zellkulturtechnik und insbesondere dem Anlernen von sterilen und präzisen Arbeiten mit humanen Zellen.

Dr. Stephan Klöß für das Detailwissen von immunologischen Mechanismen und anregenden Diskussionen und Sibylle Wehner für ihre Hilfsbereitschaft zu jeder erdenklichen Uhrzeit.

Danken möchte ich auch den Doktoranden Melanie König und Claudia Brehm im Arbeitskreis von Ulrike Köhl, die ein harmonisches Arbeiten im Labor für Stammzelltransplantation und Immuntherapie ermöglichen und mit denen wissenschaftliches Arbeiten richtig Spaß macht.

Regine Quaritsch, Rabiä El Kalaäoui und Roswitha Lehne für die gute Zusammenarbeit und die ausgesprochen freundliche Arbeitsatmosphäre.

Allen Schwestern und Ärzten, allen voran Jan Sörensen für die gute Kooperation und dem ständigen Einsatz bei der pünktlichen Abnahme von Blutproben.

Mein Dank gilt selbstverständlich auch der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG, GK-1172), der Stiftung “Hilfe für krebskranke Kinder Frankfurt e.V.” sowie der Paul und Ursula Klein Stiftung, ohne deren finanzielle Unterstützung die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

David Solbach meinem ganz persönlichen Computerfachmann, der mir bei der technischen Umsetzung meiner Ideen (Schreiben der Dissertation in LaTeX) und Umstellung auf Open Source Software eine große Hilfe war, mich aber vor allem ertragen und aufgemuntert hat, in den Höhen und Tiefen der Doktorarbeit.

Ohne meine Eltern, ihre Engagement und ihre Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ihr habt mir in allen Momenten einen unbeschreiblichen Rückhalt gegeben und mir immer hilfreich und tatkräftig zur Seite gestanden. Erst durch euch bin ich da, wo ich heute bin.

# I Eigene Publikationsliste

Koenig Melanie, **Huenecke Sabine**, Salzmann Emilia, Esser Ruth, Quaritsch Regine, Steinhilber Dieter, Radeke Heinfried H., Martin Hans, Bader Peter, Klingebiel Thomas, Schwabe Dirk, Schneider Gisbert, Lehrnbecher Thomas, Orth Andreas, Koehl Ulrike. Multivariate analysis of immune reconstitution in children following allogeneic stem cell transplantation: Risk-estimation based on age-matched leukocyte subpopulations. *Bone Marrow Transplant* (in press)

**Huenecke Sabine**, Zimmermann Stefanie-Yvonne, Kloess Stephan, Esser Ruth, Brinkmann Andrea, Tramsen Lars, Erben Stephanie, Seidl Christian, Tonn Torsten, Eggert Angelika, Schramm Alexander, Bader Peter, Klingebiel Thomas, Lehrnbecher Thomas, Passweg Jakob R, Soerensen Jan, Schwabe Dirk, Koehl Ulrike. IL-2-driven regulation of activating and inhibitory NK-cell receptors with regard to the distribution of CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> and CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> subpopulations *ex vivo* and the *in vivo* influence after haploidentical NK-cell infusion *J Immunotherapy* (in press)

**Huenecke Sabine**, Behl Michael, Fadler Carla, Zimmermann Stefanie-Yvonne, Bochennek Konrad, Tramsen Lars, Esser Ruth, Klarmann Dieter, Kamper Martina, Sattler Alexandra, von Laer Dorothee, Klingebiel Thomas, Lehrnbecher Thomas, Koehl Ulrike. Age-matched lymphocyte subpopulation reference values in childhood and adolescence: application of exponential regression analysis. *European Journal of Haematology* 2008; **80**(6):532-9.

Hollatz Gabriele, Grez Manuel, Mastaglio Sara, Quaritsch Regine, **Huenecke Sabine**, Ciceri Fabio, Bonini Chiara, Esser Ruth, Klingebiel Thomas, Kreuter Joerg, Koehl Ulrike. T cells for suicide gene therapy: activation, functionality and clinical relevance. *J Immunol Methods* 2008; **331**(1-2):69-81.

Kloess Stephan, Bochennek Konrad, **Huenecke Sabine**, Zimmermann Stefanie Yvonne Zimmermann, Kuçi Selim, Mueller Tina, Wels Winfried, Klingebiel Thomas, Esser Ruth, Koehl Ulrike. A novel five-colour flow cytometric assay to determine NK cell cytotoxicity against neuroblastoma and other adherent tumour cells. *J Immunol Methods* 2007; **325**(1-2):140-7.

# J Kongressbeiträge

Schuster I, **Huenecke Sabine**, Brinkmann Andrea, Wehner Sibylle, Kloess Stephan, Tramsen Lars, Seidl Christian, Eggert Angelika, Schramm Alexander, Bader Peter, Klingebiel Thomas, Passweg Jakob, Schwabe Dirk, Koehl Ulrike. Functional Properties of IL-2 Stimulated Human Natural Killer Cells Related to Up-Regulation of Natural Cytotoxicity Receptors and Degranulation.

*Kind-Philipp Tagung*, Juni 2008, Wilsede

**Huenecke Sabine**, Brinkmann Andrea, Kloess Stephan, Tramsen Lars, Seidl Christian, Eggert Angelika, Schramm Alexander, Klingebiel Thomas, Passweg Jakob, Schwabe Dirk, Koehl Ulrike. Functional Properties of IL-2 Stimulated Human Natural Killer Cells Related to Up-Regulation of Natural Cytotoxicity and Inhibitory Receptors.

*Keystone Symposia (NK and NKT Cell Biology)*, Februar 2008, Keystone, Colorado, USA

**Huenecke Sabine**, Bochennek Konrad, Zimmermann Stefanie-Yvonne, Lehrnbecher Thomas, Soerensen Jan, Esser Ruth, Kramm Carla, Wehner Sibylle, Falkenberg Egbert, Behl Michael, Orth Andreas, Bader Peter, Schwabe Dirk, Klingebiel Thomas, Koehl Ulrike. Immune recovery in children undergoing allogeneic stem cell transplantation: Absolute CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> count reconstitution is associated with survival.

*International Society for Cellular Therapy (ISCT)*, Juni 2007, Sydney, Australia

# K Eidesstattlicher Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe und mich keiner anderen Hilfsmittel als der angegebenen bedient habe. Entlehnung aus anderen Schriften sind als solche kenntlich gemacht.

Frankfurt, den .....

.....

Sabine Hünecke



# L Lebenslauf

## PERSÖNLICHE DATEN

Vor-, Nachname Sabine Hünecke  
Geburtsdatum 25. Februar 1981  
Geburtsort Nordhausen  
Familienstand ledig



## PROMOTION

seit 10/2005 an der J.W. Goethe Universität Frankfurt, Pharmakologisches Institut für Naturwissenschaftler bei **Prof. Dr. Walter E. Müller** und im Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin Klinik III bei **Prof. Dr. Thomas Klingebiel** im Labor für Stammzelltransplantation und Immuntherapie bei **PD Dr. Ulrike Köhl**

## HOCHSCHULAUSBILDUNG

06/2005 Approbation als Apothekerin  
05/2005 3. Staatsexamen  
11/04 – 04/2005 Pharmaziepraktikum bei GlaxoSmithKline GmbH in der klinischen Forschung, Hamburg  
05/04 – 10/2004 Pharmaziepraktikum in der öffentlichen Apotheke (Schiller Apotheke, Hamburg)  
04/2004 2. Staatsexamen  
03/2002 1. Staatsexamen  
03/00 – 04/2004 Studium der Pharmazie an der Philipps-Universität Marburg

*L Lebenslauf*

**SCHULAUSBILDUNG**

06/1999	Allgemeine Hochschulreife
1997 – 1999	Gymnasiale Oberstufe im H.H. von Fallersleben Gymnasium
1991 – 1997	Gymnasium H.H. von Fallersleben Gymnasium in Weimar
1987 – 1991	Grundschule in Weimar

Frankfurt am Main, den 10.04.2009