

Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin
Tübingen

Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik

(Schwerpunkt: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie und
Onkologie)

**In vitro Untersuchung spenderspezifischer
Unterschiede in der antileukämischen Lysefähigkeit
von NK-Zellen gegenüber pädiatrischer
B-Zell-Leukämien mit und ohne CD19 Antikörper**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Wiedenmann, Felix Maximilian

2020

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. P. Lang

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. Dr. M. R. Müller

Tag der Disputation: 25.09.2020

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Akute lymphatische Leukämie im Kindesalter	1
1.1.1	Epidemiologie, Therapie und Prognose	1
1.1.2	Therapie durch hämatopoetische Stammzelltransplantation.....	2
1.2	Biologie der natürlichen Killerzellen.....	4
1.2.1	Oberflächenrezeptoren	5
1.2.2	NK-Alloreaktivitätsmodelle	9
1.3	Immuntherapien im haploidenten Setting	13
1.3.1	NK-Zell-basierte Immuntherapien	14
1.4	Der monoklonale chimäre CD19-4G7SDIE Antikörper.....	18
1.5	Zielsetzung der Arbeit	19
2	MATERIAL UND METHODEN	21
2.1	Allgemeine Materialien und Programme	21
2.1.1	Geräte	21
2.1.2	Verbrauchsmaterialien, Glas- und Plastikwaren	22
2.1.3	Stammlösungen und Puffer.....	23
2.1.4	Software.....	25
2.2	Zellmaterial.....	25
2.2.1	Gesunde Spender zur NK-Zell-Expansion	26
2.2.2	Isolierung peripherer mononukleärer Zellen.....	26
2.2.3	Feederzelllinie K562-mb15-41BBL	28
2.2.4	Expansion von NK-Zellen.....	28
2.2.5	BCP-ALL Zelllinien.....	30
2.2.6	Zellzahlbestimmung und Zellkulturbeobachtung	31
2.2.7	Kryokonservierung und Auftauen.....	32
2.3	Therapeutischer CD19 Antikörper	33
2.4	Assays.....	33
2.4.1	Immunphänotypisierung mittels Durchflusszytometrie	33
2.4.2	Durchflusszytometrische Zellsortierung	39
2.4.3	CD107a Assay	40

2.4.4	Luciferase-Assay	41
2.5	Ethikvotum.....	43
3	ERGEBNISSE	44
3.1	Auswahl und Charakterisierung der Spender	44
3.1.1	HLA-I, KIR und FcGR3A Analyse der NK-Zell-Spender.....	44
3.1.2	Oberflächenexpression aktivierender und inhibierender NK-Zell-Rezeptoren.....	46
3.2	Auswahl und Charakterisierung der Targetzelllinien	47
3.2.1	Genetisches HLA-I Repertoire	48
3.2.2	Quantitative HLA-I Expression	48
3.2.3	Weitere NK-Zell-Liganden auf den BCP-ALL-Zelllinien.....	50
3.3	NK-Zell-Expansion	52
3.3.1	Effizienz der NK-Expansionen	52
3.3.2	Lyseaktivität	54
3.4	HLA-I Einfluss.....	56
3.4.1	KIR-Ligand Mismatch.....	56
3.4.2	Effekt der HLA-I-Expressionsstärke	58
3.4.3	Einfluss der HLA-Education	62
3.4.4	B-Content-Score (Gen-Gen-Modell)	68
3.5	Einfluss der aktivierenden/inhibierenden Rezeptoren	71
3.5.1	Einfluss auf die Aktivität frischer NK-Zellen.....	71
3.5.2	Einfluss auf die Aktivität expandierter NK-Zellen	75
3.6	Spenderspezifische Lyse-Ergebnisse	76
3.7	Lysesteigerung durch den CD19-4G7SDIE mAb	79
3.7.1	NK-Aktivitätssteigerung durch den CD19-4G7SDIE mAb	79
3.7.2	Einfluss des Fc-Rezeptor-Repertoires auf die 4G7SDIE-Aktivitätssteigerung.....	82
4	DISKUSSION	83
4.1	Antileukämische Aktivität von NK-Zellen	83
4.2	Charakterisierung der NK-Zell-Spender	84
4.3	Charakterisierung der BCP-ALL-Zelllinien.....	85

4.4	Spenderunspezifische Einflüsse auf die NK-Zell-Aktivität	86
4.4.1	Einfluss durch NK-Zellexpansion	86
4.4.2	Einfluss durch den Fc-optimierten CD19-4G7SDIE Antikörper	88
4.5	Individuelle Einflüsse auf die NK-Zellaktivität	91
4.5.1	Einfluss durch KIR & HLA-I über verschiedene Mechanismen	91
4.5.2	Weitere individuelle Einflussfaktoren	101
4.5.3	Zusammenfassung der individuellen Einflüsse	105
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	107
6	ANHANG	110
7	LITERATURVERZEICHNIS	112
8	TABELLENVERZEICHNIS	121
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	121
10	ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL DER DISSERTATIONSSCHRIFT	125
11	VERÖFFENTLICHUNGEN	126
12	DANKSAGUNG	127

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ADDC	antibody-dependent cellular cytotoxicity
AK	Antikörper
aKIR	aktivierender KIR
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
BCP-ALL	B-cell precursor ALL
BL	Biolumineszenz
CAR	chimeric antigen receptor
CIK	cytokine-induced killer
DLI	donor lymphocyte infusion
DSMZ	Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E/T-Ratio	Effektor-Target-Ratio
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FCS	fetales Kälberserum
GvHD	Graft-versus-Host-Disease
GvL	Graft-versus-Leukemia
HSZT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
iKIR	inhibierender KIR
ILC	innate lymphoid cell
KIR	killer cell immunoglobulin-like receptors
LL Modell	Ligand-Ligand Modell
mAb	monoclonal Antibody
MDSC	myeloid-derived suppressor cells
MSC	mesenchymale Stromazelle
MRD	minimal residual disease
MRFI	mean relative fluorescence intensity
MW	Mittelwert

NCR	natural cytotoxicity receptor
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBS	phosphate buffered Saline
RL Modell	Rezeptor-Ligand Modell
SD	standard deviation
Treg	regulatorische T-Zelle
vs	versus

1 EINLEITUNG

1.1 Akute lymphatische Leukämie im Kindesalter

1.1.1 Epidemiologie, Therapie und Prognose

Die akute lymphatische Leukämie (ALL) ist die häufigste Krebserkrankung im Kindesalter. Von 2005 bis 2014 erkrankten in Deutschland im Mittel pro Jahr ca. 1.760 Kinder unter 15 Jahren an Krebs – 26,3% davon an ALL. Die Inzidenz der ALL ist bei Jungen um 20% höher als bei Mädchen und erreicht einen Altersgipfel zwischen dem 2. und 6. Lebensjahr. Während die Inzidenz der kindlichen ALL von 1980 bis 2014 um etwa 16% zugenommen hat, hat sich gleichzeitig auch die 15-Jahres-Überlebensrate von ca. 70% auf 89% erhöht. Bei 97,6% der kindlichen lymphatischen Leukämien handelt es sich um maligne B-Vorläuferzell-Leukämien (B-cell precursor ALL, BCP-ALL).

Seit den 70er Jahren konnten durch die Vereinheitlichung von Therapien und dem Vergleich verschiedener Therapieprotokolle im Rahmen multizentrischer Therapieoptimierungsstudien in der Behandlung kindlicher Krebserkrankungen große Fortschritte gemacht werden. Besonders die Behandlung der kindlichen ALL wurde durch diese Studien deutlich verbessert, sodass heute bis zu 90% der kindlichen ALL Patienten geheilt werden können [2, 3]. In den meisten Fällen ist hierfür eine Chemotherapie ausreichend, welche aus einer Intensiv- und einer Erhaltungs-Therapiephase besteht. Die intensive Chemotherapie-Phase bei Patienten der mittleren Risikogruppe dauert hierbei etwa ein halbes Jahr - die gesamte Chemotherapie bei gutem Verlauf insgesamt 2 Jahre [4].

Nichtsdestotrotz liegt die Rückfallwahrscheinlichkeit kindlicher ALL-Patienten heute bei 20% [5]. Dies bedeutet, dass in Deutschland jährlich mehr Kinder ein ALL-Rezidiv bekommen als eine Neuerkrankung der Akuten Myeloischen Leukämie (AML), die zweithäufigste maligne hämatologische Erkrankung im Kindesalter [1]. Die Heilungschancen des kindlichen ALL-Rezidivs sind dramatisch schlechter als die der Neuerkrankung und hängen stark von der Dauer der rezidivfreien Zeit nach Therapieende bzw. Diagnosestellung und der

Lokalisation des Rezidivs ab. Die meisten Rückfälle treten in den ersten beiden Jahren nach Therapieende auf, wobei die Heilungschancen trotz aggressiver Radiochemotherapie und hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSZT) auf 30-50% reduziert sind [6]. Ist das rezidivfreie Intervall kleiner als 18 Monate ab Diagnosestellung, so ist die Prognose deutlich schlechter [7]. Neue Ansätze zur Erweiterung der Chemotherapie und zur Optimierung der HSZT sind aufgrund dessen Gegenstand aktueller Forschung.

1.1.2 Therapie durch hämatopoetische Stammzelltransplantation

Wenngleich heute die multimodale Chemotherapie zur erfolgreichen Behandlung der meisten kindlichen ALL-Patienten, insbesondere mit B-phänotypischer Vorläuferleukämie ausreicht, erfordert die kurative Therapie einzelner Patientengruppen zusätzlich eine allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation. Wann die Indikation zur HSZT zu stellen ist, wird dabei kontrovers diskutiert. Allgemein gesehen muss sie bei Patienten mit besonders hohem Risiko für einen Rückfall oder Therapie-Versagen in Erwägung gezogen werden. Diese Patientengruppe ist häufig mit Hypodiploidie der leukämischen Zellen (< 44 Chromosomen oder DNA-Index < 0.81) oder Therapie-Refraktion nach Induktion assoziiert. Weitere Hochrisikofaktoren bei kindlichen ALL Erkrankungen sind ein Alter von unter 1 Jahr oder über 10 Jahren, eine Leukozytenzahl über 50.000 Leukozyten/ μL und ein ZNS- oder Hodenbefall [7-9].

Die erste erfolgreiche allogene HSZT wurde 1968 in Minnesota an einem 4 Monate alten Jungen mit angeborener Immundefizienz durchgeführt, wobei als Spenderin seine 8-jährige HLA-identische Schwester herangezogen wurde [10]. Die Vorteile der HSZT bestehen in der Möglichkeit einer Dosisescalation der Chemotherapie bei der vorangehenden Therapie und in der Konditionierungsphase vor der Transplantation. Außerdem wird durch die HSZT ein Graft-vs.-Leukemia-Effekt erzeugt, der auch durch die Alloreaktivität bei minimalen HLA-Merkmal-Unterschieden entstehen kann. Beide Mechanismen wirken einer minimal residual disease (MRD) entgegen und verringern so das Rezidiv-Risiko. Gleichzeitig müssen jedoch schwerwiegende Folgen, wie das

Risiko einer Graft-vs.-Host-Reaktion (Graft-vs.-Host-Disease, GvHD) und eine verlängerte Immundefizienz mit damit verbundener Infektanfälligkeit in Kauf genommen werden [11, 12].

In aller Regel wird für die allogene HSZT ein Spender gesucht, der in beinahe allen HLA-Merkmalen mit dem Empfänger übereinstimmt. Erste Wahl hierbei sind HLA-identische Geschwister, da diese meist mit geringem zeitlichem und finanziellem Aufwand auch für eventuell wiederholte Zellspenden zur Verfügung stehen. Allerdings haben nur circa 25% der Patienten ein Geschwister, welches als Spender in Frage kommt. Für die restlichen Patienten liegt die Wahrscheinlichkeit über nationale und internationale Typisierungs-Datenbanken einen unverwandten, HLA-passenden Spender zu finden bei ca. 60% [13]. Alternativen zur HLA-identischen HSZT stellen Transplantationen von Nabelschnurblut und HSZT von haploidenten Spendern dar [11].

Aufgrund der Naivität der Zellen im Nabelschnurblut ist bei der Transplantation dieser Zellen mit mindestens 3 von 6 HLA-Merkmalen eine geringere HLA-Übereinstimmung notwendig. Nachteile des Verfahrens sind jedoch die sehr limitierte Zahl an Spenderzellen und das verzögerte Engraftment des Transplantats [14].

Bei der haploidentischen HSZT werden im Gegensatz zur HLA-identischen HSZT Stammzellen eines Spenders transplantiert, der in seinen HLA-Merkmalen nur zur Hälfte mit dem Empfänger übereinstimmt. Da diese Merkmale nach den Mendelschen Regeln vererbt werden, erweitert sich somit der Spenderkreis enorm. So kann für nahezu jeden Patienten zeitnah unter den nächsten Verwandten ein passender Spender gefunden werden [13]. Besonders in den Anfängen der Therapie stellten Abstoßungsreaktionen und schwere GvHD große Probleme dar. Dank einer verbesserten Zellauswahl durch CD34+-Selektion, oder CD3+-, sowie TcRab+-Depletion und verbesserten therapeutischen Regimen konnten diese jedoch deutlich reduziert werden [15, 16]. Inzwischen sind die Inzidenzen dieser beiden schwerwiegenden Komplikationen vergleichbar mit denen bei HLA-identischen HSZT [17]. Im Vergleich zur HSZT mit unverwandtem Spender hat die HSZT mit haploidentem Spender allerdings den Vorteil, dass ein passender Spender meist zeitnah gefunden werden kann.

So ist sie auch in Situationen durchführbar, in welchen die Zeit für die Suche nach unverwandten Spendern fehlt und ein Fortschreiten der Krankheit schnellstmöglich unterbunden werden muss. Zudem stehen im haploidenten Setting oftmals mehrere Spender zur Auswahl, was Möglichkeiten zur besseren Spender-Selektion bietet, und es gilt auch hier, dass verwandte Spender in der Regel hoch motiviert und besser greifbar für wiederholte Zellspenden, zum Beispiel als Stammzellboost, sind [18].

Die haploidente HSZT wurde in Tübingen mitentwickelt und stellt bis heute einen Forschungsschwerpunkt der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen dar.

1.2 Biologie der natürlichen Killerzellen

Als Teil des angeborenen Immunsystems spielen natürliche Killerzellen (NK-Zellen) eine wesentliche Rolle bei der frühzeitigen Bekämpfung von Infektionen und Krebserkrankungen [19]. Beim Gesunden machen sie 5-15% der Lymphozyten im peripheren Blut aus [20], sie lassen sich allerdings auch in Knochenmark und Milz sowie in nicht-lymphatischen Organen finden [21]. NK-Zellen gehören zu den angeborenen lymphatischen Zellen (ILCs) und sind charakterisiert durch die Oberflächen-Expression von CD56 bei gleichzeitigem Fehlen von CD3 [22]. Von B- und T-Zellen unterscheiden sie sich unter anderem darin, dass sie eine Vielzahl von Rezeptoren benutzen, deren Gen-Codes allesamt in der Zellentwicklung kein Rearrangement durchlaufen [23].

Die Aktivität von NK-Zellen resultiert aus einem komplexen Zusammenspiel zahlreicher Rezeptoren, wobei Zell-Zell Kontakte mit Targetzellen (vgl. Kapitel 1.2.2) und anderen Immunzellen (vgl. Kapitel 1.2.1) eine zentrale Rolle spielen. Zudem führen Zytokine wie IL-1, IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 und IFN- α & IFN- β im Umfeld von NK-Zellen zu einer vermehrten Maturation und Differenzierung sowie zu einer gesteigerten zytolytischen, sekretorischen, proliferativen und antitumorösen Aktivität [24-26].

Aktivierete NK-Zellen unterstützen die Immunabwehr auf zwei Weisen: Indirekt durch die Produktion und Freisetzung von Chemokinen wie CCL2-5,

XCL1 und CXCL8, von Wachstumsfaktoren sowie von proinflammatorischen, aber auch immunsuppressiven Zytokinen wie $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$ und IL-10 [24]. Hiermit beeinflussen sie das Mikroenvironment der Targetzelle und aktivieren weitere Immunzellen wie T-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen, wodurch sie in das adaptive Immunsystem hineinwirken [19, 27, 28].

Über ihre zytotoxische Funktion unterstützen NK-Zellen die Immunabwehr außerdem direkt. Mithilfe zytolytischer Moleküle wie Perforinen und Granzymen können sie andere Zellen lysieren [29]. Zudem können NK-Zellen über die Aktivierung von Apoptose induzierenden Todes-Rezeptoren wie TRAIL und FasL in Targetzellen Apoptose auslösen [25, 30].

Des Weiteren lassen sich NK-Zellen über den Fc-Rezeptor CD16 durch Antikörper aktivieren, was in der aktuellen Krebstherapie durch den Einsatz antigenspezifischer monoklonaler Antikörper (monoclonal antibody, mAb) eine immer größere Rolle spielt [31].

Neue Erkenntnisse deuten inzwischen darauf hin, dass es auch unter den NK-Zellen eine Subpopulation mit Gedächtnisfunktion, ähnlich wie CD8^+ T-Zellen, gibt [32].

1.2.1 Oberflächenrezeptoren

Jede NK-Zelle exprimiert auf ihrer Oberfläche verschiedene stimulierende, inhibierende oder costimulatorische Rezeptoren, die es ihr ermöglichen, unabhängig von äußeren Einflüssen auf anderen Zellen eine Über- oder Unterexpression einzelner Liganden festzustellen und die eigene Aktivität hierüber anzupassen [27]. Die Zusammensetzung und Expressionsdichte der einzelnen Rezeptoren auf NK-Zellen sind nicht konstant, sondern unterliegen verschiedenen Einflüssen, wie Reifegrad der Zelle und Interaktion mit anderen Immun- oder Targetzellen [33]. Einige der inhibierenden NK-Zell-Rezeptoren binden spezifisch an HLA-I Moleküle. Diese werden von gesunden Zellen exprimiert, sind auf Virus-infizierten oder entarteten Zellen jedoch oft kaum noch vorhanden. Gleichzeitig sind es ebendiese Zellen, die oftmals vermehrt Liganden für aktivierende Rezeptoren auf NK-Zellen exprimieren. Im gesunden Gewebe sind die Zellen folglich in ihrer Aktivität gehemmt, bei Virusinfizierten oder

entarteten Zellen in der Umgebung verschiebt sich das Rezeptorgleichgewicht allerdings und die NK-Zellen werden aktiv [23].

Neben CD56 exprimieren NK-Zellen nach Maturation weitere spezifische Oberflächenmarker wie CD94, NKp46 und CD16. In der FACS-Analyse fällt eine Aufteilung der Zellen in eine CD56^{bright}CD16⁻ und eine CD56^{dim}CD16⁺ NK-Zell-Population auf. CD56^{bright}CD16⁻ NK-Zellen stellen im peripheren Blut mit einem Anteil von 10% eine Minderheit dar, kommen aber gehäuft in den Lymphbahnen vor. Hier produzieren sie vorwiegend Zytokine, können sich allerdings bei IL-2-Stimulation zu CD56^{dim}CD16⁺ NK-Zellen entwickeln [33-36]. Letztere wiederum stellen den Großteil der NK-Zellen im peripheren Blut und besitzen zytolytische Aktivität sowie vermutlich die Fähigkeit zur schnelleren Zytokin-Produktion [37-39].

Das starke zytotoxische Potential der NK-Zellen wird durch Rezeptoren reguliert, die eine aktivierende, inhibierende oder costimulatorische Funktion besitzen (vgl. Abb. 1.2.1). Eine besondere Rolle spielen hierbei spezifische NK-Zell-Rezeptoren (killer cell immunoglobulin-like receptors, KIRs), die aktivierend (aKIR) oder inhibierend (iKIR) wirken können.

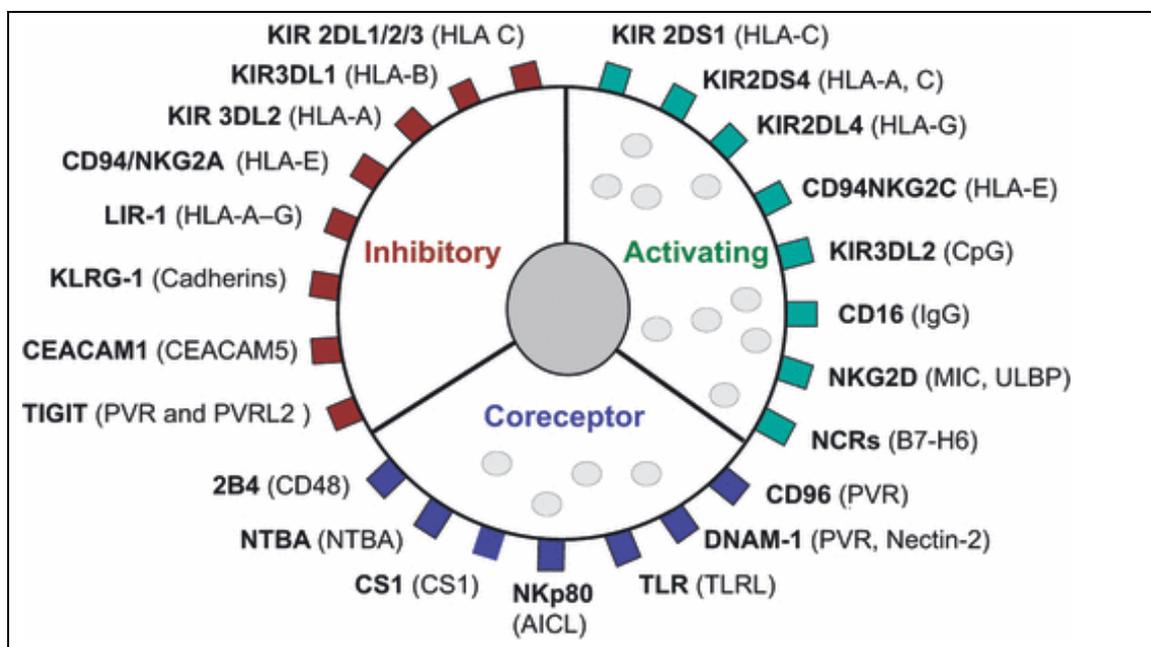


Abbildung 1.1: Übersicht über Oberflächenrezeptoren auf NK-Zellen

Einteilung nach aktivierend, inhibierend, oder costimulatorisch wirkenden Rezeptoren. In Klammern zugeordnet sind jeweils die aktivierenden Liganden.

aus: Leung, W. (2011). "Use of NK cell activity in cure by transplant." Br J Haematol 155(1): 14-29.

1.2.1.1 Aktivierende Rezeptoren

Tabelle 1.1: Aktivierende NK-Zell-Rezeptoren

Rezeptor	Liganden	Bemerkung / Quelle
DNAM-1 (CD226)	Nectin-2 (CD112) & PVR (CD155)	DNAM-1-PVR Interaktion spielt in Neuroblastom-Erkennung wichtige Rolle; [40]
CD69	Galectin-1	Rolle noch weitgehend unklar; [41]
NKG2C	HLA-E	Heterodimer mit CD94 [42]
NKG2D	MicA/B, ULBPs	Liganden werden bei Zellstress und/oder DNA-Schäden gebildet [43, 44]
NKp80	AICL	[45]
CD16	Fc-Teil von Antikörpern	löst ADCC aus, [46]
Aktivierende KIRs	versch. MHC-I Moleküle	[47]
Natural Cytotoxicity Receptors (NCRs)		
NKp30	B7H6, BAG6	[48]
NKp44	unbekannt	
NKp46	unbekannt (Aktivität gegen pankreatische β -Zellen und Hepatozyten)	

Eine Besonderheit vieler aktivierender NK-Zell-Rezeptoren ist die Fähigkeit, Oberflächenmoleküle auf anderen Zellen zu erkennen, welche nicht zur MHC-Familie gehören und insbesondere bei zellulärem Stress exprimiert werden [24, 43]. Dies gilt zum Beispiel für den Rezeptor NKG2D, welcher mit verschiedenen Liganden interagiert. Diese werden auf den meisten Zellen in niedrigen Konzentrationen exprimiert, im Fall von zellulären Problemen wie auftretenden DNA-Schäden aber überexprimiert [43]. Dasselbe gilt für den NKp30-Ligand B7-H6, welcher in gesunden Geweben bislang noch nicht entdeckt wurde, dafür jedoch auf manchen Tumor-Zellen exprimiert wird [49].

Als Immun-Escape-Mechanismen können maligne Tumoren die Liganden für aktivierende NK-Zell-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche herunterreguliert haben. Außerdem schaffen es einzelne Tumorzell-Entitäten durch Produktion des Zytokins TGF- β 1, die Expressionsdichte mancher aktivierenden Rezeptoren wie NKp30 und NKG2D zu verringern, oder lösliche Liganden für den NK-Zell-Rezeptor NKG2D zu exprimieren, was wiederum zu fehlgeleiteter NK-Zell-Aktivität führt [43].

Für die meisten aktivierenden Rezeptoren gilt, dass die Aktivierung eines einzelnen Rezeptors für eine Aktivitätssteigerung von NK-Zellen nicht ausreicht. CD16 stellt hierbei jedoch eine Ausnahme dar. Dieser Rezeptor bindet den Fc-Teil von Antikörpern, was zur antikörper-vermittelten Zytotoxizität (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC) der NK-Zellen führt [46]. Sind schon Antikörper-produzierende Immunzellen aktiviert worden, so sind zur NK-Zell-Aktivierung dank ADCC keine weiteren synergistischen Rezeptoren notwendig [50].

Untersuchungen zeigten, dass der Genotyp des Fc-Rezeptors eine massgebliche Rolle bei der Bindungsaffinität des Rezeptors gegenüber monoklonalen Antikörpern spielen kann. Die Bindungsaffinität erhöht sich bei der genetischen Variante des Fc-Rezeptors, wenn in der Aminosäuresequenz an der Stelle 158 die unpolare Aminosäure Phenylalanin durch die unpolare Aminosäure Valin ausgetauscht ist. Es kommen in der Bevölkerung alle drei Varianten vor: homozygot (V/V), heterozygot (V/F) oder (F/V) sowie homozygot (F/F). Die Bindungsaffinität steigt proportional mit dem Valinanteil und vermittelt dementsprechend eine stärkere ADCC [51, 52].

1.2.1.2 Inhibierende Rezeptoren

Die Aktivität von NK-Zellen wird außerdem über inhibierende Rezeptoren gesteuert. Diese Rezeptoren erkennen die Expression von körpereigenen Molekülen auf der Oberfläche von Zellen und bremsen hierdurch die Aktivität von NK-Zellen gegenüber körpereigenen, gesunden Zellen [53]. Fehlen diese Moleküle auf Zellen, so fehlt auch die Hemmung der NK-Zellen diese zu lysieren. Das Gleichgewicht der Wirkung inhibierender und aktivierender Rezeptoren

verlagert sich dann zugunsten der aktivierenden Rezeptoren. Dieses Zusammenspiel wird als „missing-self“-Mechanismus bezeichnet [19].

Tabelle 1.2: Inhibierende NK-Zell-Rezeptoren

Rezeptor	Ligand	Bemerkung/Quelle
Inhibierende KIRs (iKIR)	HLA-C & HLA-B	[25]
NKG2A/CD94	HLA-E	[25]
LIR-1 (ILT-2/CD85j)	HLA-A/-B/-C HLA-E/-F/-G	[54]

1.2.2 NK-Alloreaktivitätsmodelle

Die HLA Moleküle der Klasse I sind die Bindungsstellen für KIR-Rezeptoren. Allerdings gibt es verschiedene Varianten des HLA-I, für die es wiederum unterschiedliche KIR-Rezeptoren gibt. Daher können diese Moleküle in Gruppen nach passenden KIR-Rezeptoren sortiert werden. Viele Menschen besitzen keine HLA-I-Varianten aus jeder iKIR-spezifischen Gruppe. Bei Stammzelltransplantationen kann daher versucht werden, bewusst ein Mismatch zwischen Rezeptor und Ligand herzustellen, um diese Inhibition eines Teils der NK-Zellen zu umgehen.

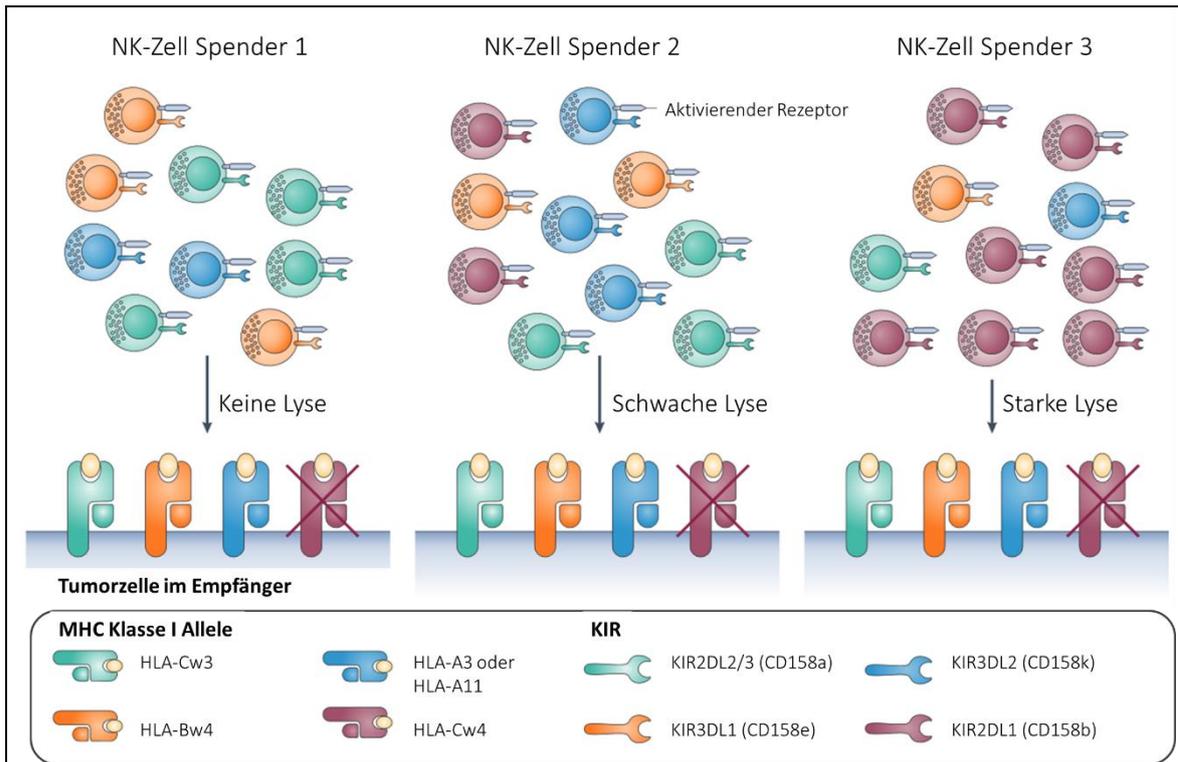


Abbildung 1.2: Darstellung der HLA-KIR-Interaktion

Nicht alle NK-Zellen tragen alle iKIR-Typen. Sind für die beim Spender vorhandenen Rezeptoren die passenden Liganden auf einer Tumorzelle, so werden die NK-Zellen des Spenders gehemmt (s. Spender 1). Fehlt der Tumorzelle ein passendes HLA für einen iKIR, so steigt die NK-Zell-Lyse mit der Zahl dieses Rezeptors auf den NK-Zellen des Spenders (s. Spender 2 & 3).
aus: Horrer, A. (2016). In vitro Untersuchung antileukämischer NK-Zell-Subpopulationen auf ihre Lysefähigkeit gegenüber primärer pädiatrischer BCP-ALL Blasten, Universität Tübingen.

Um das Outcome nach HSZT besser einschätzen zu können, wurden in der Vergangenheit verschiedene Modelle erarbeitet und bei der Spenderauswahl zur Optimierung von NK-Zell-Effekten berücksichtigt.

1.2.2.1 Das Ligand-Ligand Modell

Um das relative Rückfallrisiko einzuschätzen, hat die Perugia-Gruppe das Ligand-Ligand Modell (LL Modell) erarbeitet. Hierbei werden die HLA-I Moleküle von Empfänger und Spender untersucht und anhand ihrer Eigenschaft als iKIR-Ligand in die Gruppen C1 (CD158b-Liganden), C2 (CD158a-Liganden) und Bw4 (CD158e-Liganden) eingeteilt. Anhand des HLA-I-Repertoires des Spenders wird in diesem Modell auf dessen KIR-Repertoire geschlossen. Ein

Ligand-Ligand Mismatch liegt vor, wenn sich die KIR-Liganden des Empfängers von den KIR-Liganden des Spenders unterscheiden [34, 55, 56].

Eine Vorhersage nach dem LL Modell ist allerdings nicht immer zutreffend, da sich die Gene der HLA-I-Liganden und die der KIR-Rezeptoren auf unterschiedlichen Chromosomen befinden und damit unabhängig voneinander vererbt werden können. Das KIR Gen befindet sich auf Chromosom 19, das HLA-I-Gen ist hingegen auf Chromosom 16 lokalisiert. Folglich ist es nicht unwahrscheinlich, dass ein Spender trotz vorhandenem HLA-I-Ligand den passenden Rezeptor nicht exprimiert oder umgekehrt [55].

1.2.2.2 Das Rezeptor-Ligand Modell

Beim Rezeptor-Ligand Modell (RL Modell), welches in Memphis entwickelt wurde, werden direkt die inhibierenden KIR-Rezeptoren auf den Spender NK-Zellen untersucht. Durch die Überprüfung eines Mismatches zwischen den KIR-Rezeptoren des Spenders und dem HLA-I-Profil des Empfängers ist eine genauere Prognose der Rückfallwahrscheinlichkeit möglich als beim LL Modell [57].

1.2.2.3 Das KIR-Genotyping Modell

Neuere Studien zeigten auf, dass die zytotoxische NK-Zell-Aktivität gegenüber lymphoblastischer Zelllinien sowie adulter und kindlicher AML und BCP-ALL Zellen nicht nur durch inhibitorische, sondern auch durch aktivierende KIR-Rezeptoren reguliert wird [34]. Aus dieser Erkenntnis heraus kam es zur Entwicklung des KIR-Genotyping-Modells, bei welchem das Repertoire an KIR-Genen sowohl beim Empfänger als auch beim Spender untersucht wird. Anschließend werden diese je nach Vorhandensein von Genen für aktivierende und inhibierende KIR-Rezeptoren in einen Score von 0-4 eingeteilt. Patienten mit dem KIR-Haplotyp A/A besitzen mit KIR2DS4 nur ein Gen für einen aKIR und bekommen auf dem Score 0 Punkte. Bei Patienten mit dem KIR-Haplotyp B kommen hingegen weitere Gene für aktivierende KIR-Rezeptoren hinzu. Mit

zunehmendem Score nimmt das Verhältnis von Genen für aKIR zu iKIR zu, was zu verstärkter potentieller NK-Zell-Alloreaktivität führt [34].

Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit Haplotyp A/A, welche in der Therapie einer hämatologischen Erkrankung in einer Hochrisiko-Gruppe ein Transplantat von einem Spender mit Haplotyp B erhielten, ein signifikant besseres Überleben haben [58].

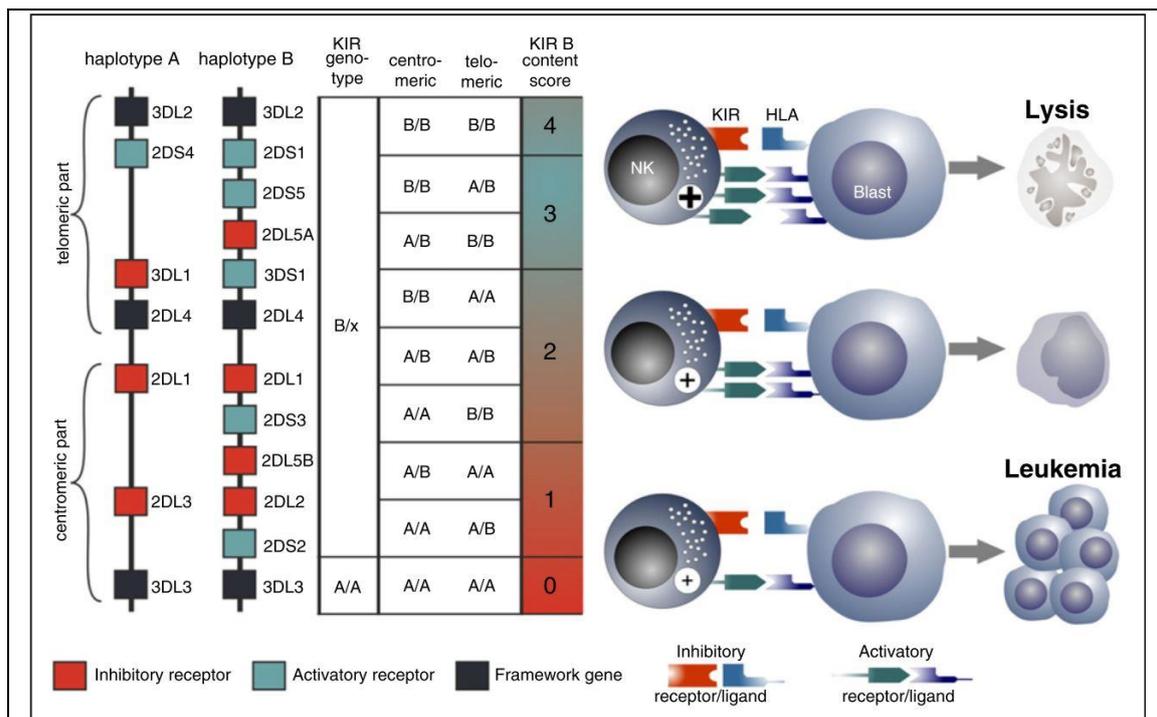


Abbildung 1.3: Einteilung des KIR B Content Score

Anhand der KIR-Haplotypen können Spender in einen Score eingeteilt werden. Beim Haplotyp A sind genetisch 6 iKIR und 1 aKIR vorhanden. Der Haplotyp B hingegen ist genetisch sehr variabel und besitzt bis zu 5 aKIRs. Spender können nun in KIR Genotyp A/A (homozygot für Haplotyp A) oder B/x (mit einem oder zwei B Haplotypen) eingeteilt werden. Danach richtet sich auch die Einteilung im KIR B Content Score, wobei ein höherer Wert einer größeren genetischen Verfügbarkeit an aKIRs entspricht. NK-Zellen eines Spenders mit hohem Score sollten somit, insbesondere beim Vorliegen eines iKIR-HLA-Mismatches, eine höhere Alloreaktivität aufweisen. aus: Handgretinger, R., et al. (2016). "Exploitation of Natural Killer (NK) cells for the treatment of acute leukemia." Blood.

1.2.2.4 Die NK-Zell-Education (Licensing)

Für die NK-Zell-Alloreaktivität sind neben der HLA-I/KIR-Mismatch Situation außerdem die Milieubedingungen *in vivo* verantwortlich. Hier kommt es zu einem wechselhaften Zusammenspiel verschiedener inflammatorischer Zytokine und

Liganden wie MIC-A/B, ULBPs, PVR und Nectin. Man geht davon aus, dass NK-Zellen – ähnlich wie T-Zellen – bis zur vollen Funktionalität eine Entwicklung durchlaufen müssen, welche als Education (Licensing) bezeichnet wird. Hierbei handelt es sich um einen HLA-I-abhängigen Prozess, für welchen es mehrere Erklärungsansätze gibt:

Nach dem Licensing Modell kommt es darauf an, ob die NK-Zellen für ihre KIR-Rezeptoren einen passenden Liganden finden. Ist dies der Fall, erlangen die NK-Zellen ihre volle Funktionalität und proliferieren verstärkt – man spricht von „licensed“ oder „educated“ NK-Zellen [59].

Nach dem Disarming-Modell hingegen, werden NK-Zellen grundsätzlich mit ihren zytotoxischen Eigenschaften „bewaffnet“. NK-Zellen, welche keine passenden KIR-Rezeptoren für körpereigene HLA-I-Liganden exprimieren, werden hingegen „entwaffnet“ und hyporesponsiv [60].

Nach dem Rheostat-Modell entscheidet die Menge an inhibitorischen Einflüssen auf die NK-Zellen permanent über das Level der potentiellen zytotoxischen Aktivität. Das zytotoxische Potential kann somit jederzeit gesteigert oder verringert werden. Somit legen sowohl die Expression inhibitorischer Rezeptoren als auch die Affinität der Rezeptoren zu HLA-I-Liganden die potentielle zytotoxische Aktivität von NK-Zellen fest [61].

1.3 Immuntherapien im haploidenten Setting

War die Entwicklung der Chemotherapie in den 80er und 90er Jahren die große Weiterentwicklung der modernen Onkologie, so liegt ein großes Augenmerk der aktuellen onkologischen Forschung auf neuen immunologischen Verfahren. Dank des immer besser werdenden Verständnisses der Rolle des Immunsystems in der Entstehung und Bekämpfung von Krebs auf molekularer Ebene, gibt es neue und zum Teil sehr vielversprechende Ansätze humoraler und zellulärer immunologischer Therapien. So kann einerseits *in vivo* durch Gabe eines gegen den Tumor gerichteten Antikörpers oder Impfung mit tumorspezifischen Antigenen versucht werden, das Immunsystem verstärkt gegen den Tumor zu richten. Andererseits können Zellen des Immunsystems des

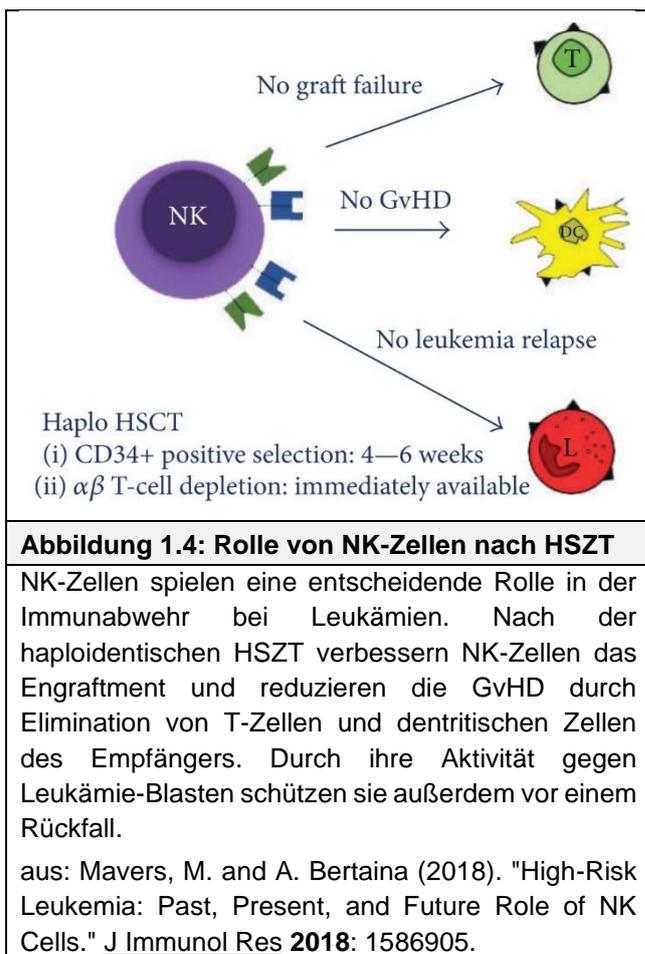
Patienten genommen, *ex vivo* stimuliert oder genetisch gegen die Erkrankung gerichtet und in den Patienten zurückgegeben werden.

Adjuvante Zelltherapien können bei HSZT den Therapieerfolg insgesamt steigern und es kommt bei Immunzellgaben gleichzeitig oder nach Transplantation zu weniger Abstoßungen des Zellprodukts aufgrund des dann identischen Immunsystems [62].

Wie bereits erwähnt, sind Spender im haploidenten Setting oftmals äußerst motiviert und zeitnah erreichbar. Daher ist diese Form der Transplantation prädestiniert für Immunzelltherapien im therapeutischen Zusammenhang mit einer HSZT.

1.3.1 NK-Zell-basierte Immuntherapien

Für die haploidente HSZT bieten insbesondere NK-Zell-basierte Therapien großes Potential. Dank ihrer direkten und indirekten Zytotoxizität gegenüber leukämischen Blasten sind NK-Zellen hauptverantwortlich für den Graft-versus-Leukemia (GvL) Effekt. Gleichzeitig reduzieren sie dank ihrer zytotoxischen Wirkung gegenüber T-Zellen und dendritischen Zellen des Stammzell-Empfängers die GvHD und sorgen für ein besseres Engraftment des Transplantats [63, 64]. Außerdem unterstützen NK-Zellen die körpereigene Virusabwehr, indem sie virusinfizierte Zellen, die eine verminderte HLA-I Expression aufweisen, zerstören. Dadurch können sie vor viralen Infektionen durch Virus-Reaktivierungen und Neuinfektionen in der myeloablativen Phase schützen [65, 66].



Da die Spenderauswahl bei haploidenten Transplantationen meist größer ist, lässt sich hier leichter ein HLA- oder ein KIR-Mismatch zwischen Spender und Empfänger erzeugen. Beide Arten von Mismatch können zu einer gesteigerten Alloreaktivität der NK-Zellen führen. So konnte gezeigt werden, dass alloreaktive NK-Zellen das Outcome von Transplantationen mit KIR-Ligand-Mismatch insgesamt verbessern [62, 63].

Andere Studien wiederum konnten das verbesserte Outcome durch KIR-Ligand-Mismatch nicht darstellen, fanden

jedoch einen positiven Einfluss auf die Rückfallswahrscheinlichkeit nach einer HSZT mit einem Spender der KIR-Haplotyp B Gruppe [62, 67].

1.3.1.1 Stammzelltransplantation

Durch die Aufarbeitung des haploidenten Transplantats (TcRab/CD3/CD19-Depletion) können NK-Zellen im Transplantat verbleiben. Sie haben die Fähigkeit zwischen eigenen sowie fremden/krankhaften Zellen zu unterscheiden und letztere zu lysieren. Dadurch spielen sie eine große Rolle beim GvL-Effekt und in der Virusabwehr in der Posttransplantationsphase [34, 66].

1.3.1.2 Zytokintherapie

Zusätzlich kann die NK-Zellaktivität durch niedrigdosierte subkutane IL-2 Injektionen gesteigert werden. Es konnte gezeigt werden, dass es durch IL-2

Gaben *in vivo* zur Freisetzung von IL-6, TNF- α , IFN- γ kommt und die zytotoxische NK-Zellaktivität gesteigert werden kann [68]. Studien deuten darauf hin, dass die niedrigdosierte Gabe von IL-2 über einen längeren Zeitraum der kurzfristigen Hochdosis-Therapie in puncto Langzeitüberleben überlegen ist, gleichzeitig kommt es hier nur zu geringen Nebenwirkungen. Daher könnten niedrigdosierte IL-2-Gaben ein geeignetes Mittel sein um den GvL-Effekt zu verstärken [69].

1.3.1.3 *Ex vivo* Stimulation

Dank Zellkultur-Verfahren können NK-Zellen auch von Patienten oder Stammzellspender genommen werden und *ex vivo* mit Zytokinen stimuliert werden. Dies bietet die Möglichkeit, um ein Vielfaches gesteigerte Zytokin-Spiegel zu erzeugen, welche *in vivo* aufgrund der Nebenwirkungen nicht erreichbar wären.

So zeigte sich, dass sich NK-Zellen durch *ex vivo* Hochdosis-Inkubation mit IL-2 noch stärker als bei *in vivo* Gabe stimulieren lassen und es nach Gabe der IL-2 voraktivierten NK-Zellen in Patienten zu einer stärkeren antitumoralen Aktivität kommt [68].

Auch eine Inkubation des Transplantats mit IL-15 zur Stimulation der NK-Zellen vor haploidentischer HSZT ist möglich. In Versuchen führte dies zu einem längeren Langzeit-Überleben kindlicher Leukämie-Patienten und einer stärkeren NK-Zell-Aktivität als bei alleiniger IL-2 Stimulation [70].

1.3.1.4 *Ex vivo* Expansion

Außerdem ist es möglich NK-Zellen nach Transplantation *ex vivo* zu expandieren, um voraktivierte NK-Zellen in hoher Quantität zu erhalten. Erste Veröffentlichungen hierzu sind vielversprechend. Es konnte gezeigt werden, dass NK-Zell-Infusionen bezüglich ihrer Nebenwirkungen möglich und sicher sind. Zur besseren Beurteilung unterschiedlicher Expansionsansätzen und deren Effizienz fehlen allerdings aktuell noch ausreichende Daten. So bestehen verschiedene Expansionsprotokolle, bei denen zum Beispiel durch Stimulation

mittels Zytokinen wie IL-2 und IL-15, oder mit bestrahlten Feederzelllinien gearbeitet wird [64, 65, 71, 72]. Dank spezieller Bioreaktoren wie dem G-Rex-flasks (Wilson Wolf Manufacturing, Minneapolis, MN, USA) oder dem WAVE bioreactor (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ; USA) könnten die NK-Zell-Expansionen in Zukunft weiter vereinfacht und gleichzeitig effektiver werden [65]. Vielversprechend ist hier auch der Einsatz etablierter NK-Zell-Linien wie zum Beispiel NK92. Durch GMP-gerechte Produktion könnten so patientenunabhängig gebrauchsfertige Zellprodukte hergestellt werden [65].

1.3.1.5 Weitere Therapie-Optionen

Aufgrund der vielversprechenden Daten zur Rolle von NK-Zellen in der Behandlung von Leukämie-Patienten der Hochrisiko-Gruppe wird weiter an neuen Therapieansätzen zur Maximierung der Effizienz von NK-Zell-Therapien gearbeitet [64].

Anti-KIR-mAb zeigten zum Beispiel sowohl im Mausmodell als auch in einer Phase-I-Studie vielversprechende Ergebnisse [73, 74]. Auch ein neu entwickelter NKG2A-Antikörper führte im Mausmodell zu einer optimierten NK-Zell-Aktivität gegenüber Leukämie-Zellen. Durch diese Antikörper könnten in Zukunft die hemmenden Einflüsse auf NK-Zellen durch HLA-Moleküle reduziert werden, wodurch die Suche nach einem alloreaktiven Spender für HSZT oder adoptive NK-Zelltransfers an Stellenwert verlieren könnte [64].

Außerdem hat der momentane Erfolg von chimeric antigen receptor-engineered T-Zellen (CAR-T-Zellen) in der Behandlung von B-Zell Leukämien einige Arbeitsgruppen ermutigt, CAR-Konstrukte in NK-Zellen zu testen. CAR-NK-Zellen hätten den Vorteil, dass inhibitorische Einflüsse von Tumorzellen auf NK-Zellen dank des CAR-Konstrukts überbrückt werden könnten und CAR-NK-Zellen auch von HLA-mismatched Zellen abstammen können. Hier steht die Forschung allerdings noch am Anfang, wobei die Herstellung einer ausreichend großen Zellzahl, die geringere Effektivität des Gen-Transfers im Vergleich zu dem von T-Zellen sowie die eingeschränkte Expansion und Persistenz von infundierten CAR-NK-Zellen *in vivo* aktuell noch die größten Hindernisse darstellen [64, 75].

1.4 Der monoklonale chimäre CD19-4G7SDIE Antikörper

Ein bekannter Antikörper der mit seiner Wirkung gegen B-Zell assoziierte Malignome überzeugen konnte, ist der CD20-spezifische monoklonale Antikörper Rituximab [76]. Mit seiner Einführung in den späten 90er Jahren haben sich die Möglichkeiten in der Therapie von Patienten mit B-Zell Non-Hodgkin-Lymphomen deutlich erweitert und insbesondere in Kombination mit Chemotherapie konnten sowohl Prognose als auch Überleben dieser Patienten signifikant verbessert werden [77]. Inzwischen wurde mit Obinutuzumab ein vollständig humanisierter monoklonaler Antikörper der nächsten Generation gegen das CD20-Antigen entwickelt, welcher dank Fc-Optimierung mittels Glycoengineering eine stärkere Antikörper-vermittelte zelluläre zytotoxische Aktivität (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC) vermittelt. Die klinische Anwendung von Obinutuzumab wird aktuell in verschiedenen Phase-II-Studien untersucht. In der Kombinationstherapie mit Chemotherapeutika konnte dabei schon eine verbesserte Wirkung gegen chronisch lymphatische Leukämie gegenüber Rituximab nachgewiesen werden [77].

Nur ein geringer Prozentsatz der pädiatrischen BCP-ALL exprimiert das Antigen CD20, was den Nutzen dieser Antikörper für kindliche Patienten einschränkt. Allerdings findet sich auf kindlichen BCP-ALL Zellen regelmäßig das Antigen CD19 [78, 79]. Hierbei handelt es sich um ein Transmembranprotein, welches nicht nur bei mehr als 90% der ALL-Fälle, sondern auch auf B-Zell Non-Hodgkin-Lymphomen und chronisch lymphatischen Leukämien exprimiert wird [80]. Auch für das CD19-Antigen gibt es bereits Fc-optimierte Antikörper, welche im Vergleich zu nicht-Fc-optimierten Antikörpern eine verstärkte ADCC auslösen und aktuell in klinischen Studien getestet werden [76].

In der vorliegenden Arbeit wurde ein chimärer, Fc-optimierter IgG1 CD19-Antikörper vom Klon 4G7 verwendet. Durch den Austausch der beiden Aminosäuren S239D und I332E (SDIE-Modifikation) kommt es zur verbesserten Bindung an den FcGR3A-Rezeptor und dadurch zur Verstärkung der ADCC. Auf Basis des Klons und der Fc-Optimierung ergibt sich die Nomenklatur CD19-4G7SDIE mAb. Dieselbe Modifikation findet sich in der humanisierten Version des 4G7-Antikörpers MOR00208, welcher sich in Erprobung in mehreren

klinischen Studien (z.B. ClinicalTrials.gov, Identifier: NCT02763319) befindet [80, 81]. *In vitro* konnte für den CD19 mAb eine deutlich gesteigerte ADCC-Aktivität sowohl gegen BCP-ALL-Zelllinien als auch gegen frische BCP-ALL-Blasten gezeigt werden. In der klinischen Testung an kindlichen Patienten mit persistierender MRD nach mehrmaligem Rückfall einer B-Zell-ALL führte die Behandlung mit dem CD19-4G7SDIE mAb zu einer deutlichen Reduktion der MRD. Dabei konnte die Tumorlast bei circa der Hälfte der Patienten auf unterhalb der Nachweisgrenze reduziert werden [76].

Insgesamt stellen CD19-Antikörper wie der CD19-4G7SDIE mAb eine gute Therapieoption für Patienten mit MRD, für Patienten, die keine stärkeren unerwünschten Nebenwirkungen anderer Therapien vertragen können, und als prophylaktische Therapie für Patienten mit hohem Rückfallrisiko dar.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die Relevanz spenderspezifischer Unterschiede auf die NK-Zell vermittelte Lyse pädiatrischer ALL-Blasten der B-Zelllinie, mit und ohne Zugabe eines monoklonalen Fc-optimierten CD19-Antikörpers zu eruieren. Es wird untersucht, ob ein KIR-Rezeptor-Ligand-Mismatch die Lyse von BCP-ALL-Blasten erhöht und welchen Einfluss die Expansion von NK-Zellen im Vergleich zu nativen NK-Zellen auf die Lyseaktivität durch NK-Zellen hat. Hierzu wurden gesunde NK-Zell-Donoren herangezogen und hinsichtlich relevanter NK-Zell-Eigenschaften untersucht.

Zur Untersuchung der NK-Zellen der unterschiedlichen Spender wurden diese geno- und phänotypisiert, native NK Zellen verwendet oder diese *in vitro* expandiert und die Expansionseffizienz sowie die Lysefähigkeit gegenüber pädiatrischer BCP-ALL Blasten getestet.

Die Target-Zelllinien und Spender wurden entsprechend des Rezeptor-Ligand Modells ausgewählt. Zur Evaluation der Alloreaktivität kommen das Ligand-Ligand-Modell, das Rezeptor-Ligand-Modell, das KIR-Genotyping-Modell und das Licensing-Modell zur Anwendung. Bei der Immunphänotypisierung und funktionellen Testung werden die NK-Zellen nach den single-KIR-positiven

NK-Subpopulationen KIR2DL1, KIR2DL2/KIR2DL3, KIR3DL1 sowie der KIR-negativen NK-Subpopulation getrennt analysiert. Außerdem wird der Einfluss weiterer wichtiger aktivierender und inhibierender Rezeptoren auf die zytotoxische NK-Zellaktivität gegenüber pädiatrischen BCP-ALL Blasten berücksichtigt. Insbesondere werden die aktivierenden Rezeptoren DNAM-1 und NKG2D untersucht.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Allgemeine Materialien und Programme

2.1.1 Geräte

Sicherheitswerkbank HERAsafe	Heraeus
Sterilbank Biowizard	Kojair
Brutschrank HERAcell	Heraeus
Standzentrifugen: - ROTANTA 46 RSC - ROTIXA 420 R	Hettich
Blutanalysegerät ABX Micros CRP 100	Horiba
Aufsichtmikroskop	Olympus IM
Advia 120	Siemens
Kryokonservierungstank der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen	Cryostorage System
Eismaschine	Scotsman
Gefrierschrank Premium Frost	Liebherr
Kühlschrank Profi-Line	Liebherr
Wasserbad, beheizbar	GFL
Schüttler Titramax 100	Heidolph
Vortexer: - MS1 Minishaker - Reax Top	IKA Works Heidolph
Pipettiergeräte: - Pipetboy acu - Pipetboy 2	Integra Biosciences
Multikanalpipette 200 µl Discovery Comfort	HTC Lab Solutions
Pipetten, verstellbar: Research: 2.5 µl, 100µl, 1000µl	Eppendorf

Pipetman: 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Gilson
--	--------

2.1.2 Verbrauchsmaterialien, Glas- und Plastikwaren

Zellkulturflaschen Cellstar: 50 ml, 250 ml, 550 ml	Greiner Bio-One
Falconröhrchen, Polypropylen (PP), steril: 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One
FACS Analyseröhrchen Rundboden, Polystyren (PS), 5 ml	Corning
Kryoröhrchen, Cryotube Cryo.S, steril, 2 ml	Greiner Bio-One
Reaktionsgefäße, PP, steril, 1,5 ml	Sarstedt Eppendorf
Mikrotiterplatte Rundboden 96-well	Greiner Bio-One
Mikrotiterplatte Flachboden 96-well	Greiner Bio-One
Mehrfachkulturplatten, steril: 96-well, 48-well, 24-well, 6-well	Costar
Einmalpipetten, Plastik, steril: 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Corning inc.
Pipettenspitzen: 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Ratiolab Sarstedt
Spritzen, steril: 5 ml, 10 ml, 20 ml 50 ml	Braun BD™ Diagnostics
Kanülen, Microlance, 19G	BD™ Diagnostics
Butterfly, Safety-Multifly-Set	Sarstedt
Hautdesinfektionsmittel Softasept	Braun
Desinfektionsspray Descosept	Dr. Schumacher
Einmalhandschuhe	Hartmann
Zellsieb, 40 µm	BD™ Biosciences
Verschlussfolie Parafilm "M"	Bemis
Zellsieb, 40µl	BD™ Diagnostics

2.1.3 Stammlösungen und Puffer

Dulbecco's phosphate buffered Saline (PBS)	Sigma
RPMI 1640	Biochrom
VLE Dulbecco's MEM	Biochrom
Penicillin(10.000U/ml)/ Streptomycin(10.000µg/ml)	Biochrom
L-Glutamin 200mM	Biochrom
100x NEA (non-essential Aminoacids)	Biochrom
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco
Trypsin/EDTA-Solution 0.25%	Biochrom
Natrium-Pyruvat	Biochrom
Dymethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
D-Natrium-EDTA 1.107%	AlleMan Pharma GmbH
Formaldehyd 37%	
β-Mercaptoethanol	
Na-Azid (10%)	
Privigen (100mg/ml)	
Saponin S-7900	Sigma
BSA Bovine Serum Albumin A-3059	Sigma

Stammlösung A1: Medium für die Expansion der Zelllinien Nalm-6, Nalm-16 & SEM

- 500 ml RPMI 1640 Medium
- 50 ml FCS
30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert
- 5 ml L-Glutamin (200 mM)
- 5 ml Penicillin (10 000 U/ml)

Streptomycin (10 000 µg/ml)

Stammlösung A2: Medium für die Expansion der Zelllinie MHH-cALL-4

- 500 ml RPMI 1640 Medium
- 100 ml FCS
30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert
- 5 ml L-Glutamin (200 mM)
- 5 ml Penicillin (10 000 U/ml) /
Streptomycin (10 000 µg/ml)

Stammlösung B: Medium für die Expansion von NK-Zellen

- Stammlösung A
Interleukin-2 (IL2) Proleukin 2×10^6 IE/ml Univ.-Apotheke Tübingen
auf 100 IE/ml eingestellt

Stammlösung C: Zellmedium CD107a

- 500 ml PBS
- 50 ml FCS
- 1% L-Glutamin
- 1% Penicillin+Streptomycin
- 1% 1mM Na-Pyruvat
- 1% Non-Essential Aminoacids
- 50µM β-Mercaptoethanol

PBSE-Puffer

- 500 ml PBS
- 2mM EDTA

FACS-Puffer

- 500 ml PBS
- 5 ml FCS
30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert

- 2mM EDTA
- 2% FCS
- 0,01% Na-Azid
- 0.05% Privigen

Permwash

- 500 ml PBS
- 0.1% Saponin
- 0.5% BSA
- 0.02 Na-Azid

PFA-Lösung

- FACS-Puffer
- 1% Formaldehyd

Einfriermedium

- FCS
- 10% DMSO

2.1.4 Software

FCS Express 5.0	De Novo Software
GraphPad Prism 5	Statcon
Excel 2016	Microsoft
PowerPoint 2016	Microsoft
Word 2016	Microsoft

2.2 Zellmaterial

Aus peripherem Vollblut gewonnene NK-Zellen	gesunde, freiwillige Spender
---	------------------------------

Transfuzierte erythroleukämische Zelllinie: K562-mb15-41BBL	Dr. D. Campana MD, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, USA
Zelllinien: <ul style="list-style-type: none"> - Erythroleukämische Zelllinie K562 - kindliche BCP-ALL Zelllinie Nalm-16 - kindliche BCP-ALL Zelllinie Nalm-6 - kindliche BCP-ALL MHH-cALL - kindliche BCP-ALL Zelllinie SEM 	Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig

2.2.1 Gesunde Spender zur NK-Zell-Expansion

Für die Versuche wurden freiwillige, gesunde Spender rekrutiert. Um die verschiedenen Settings bei der Austestung der Alloreaktivität darzustellen, wurden die Spender auf das genetische Repertoire zur Expression der Allele der HLA-Cw3, HLA-Cw4 und HLA-Bw4 Gruppen untersucht. Hierbei wurde zumeist auf Daten der DKMS zurückgegriffen. Außerdem wurde eine KIR- und FcGR3A-Genotypisierung der NK-Zellen Spender durchgeführt.

Insgesamt konnten 16 Spender rekrutiert werden.

2.2.2 Isolierung peripherer mononukleärer Zellen

Peripheres Vollblut	gesunde Spender
Heparin-Natrium-25 000®-ratiopharm	Ratiopharm
Biocoll Separating Solution	Biochrom
Dulbecco's Phosphat buffered saline (PBS)	Sigma

Hintergrund

Aus heparinisiertem Vollblut freiwilliger Spender wurden mithilfe der Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Hypaque nach der Verfahrensweise

von Böyum [82] die verschiedenen zellulären Blutbestandteile aufgrund ihrer Dichteigenschaften getrennt. Das Copolymer übernimmt mit der geeigneten Dichte von 1,077 g/ml eine Art Siebfunktion, um durch Zentrifugation Zellen höherer Dichte durch die Ficoll-Trennschicht passieren zu lassen und dies bei Zellen geringerer Dichte zu verhindern. Erythrozyten, Granulozyten und polymorphkernige Leukozyten befinden sich unterhalb der Trennschicht. Sie können wie die Thrombozyten in der Plasmaphase verworfen werden. Leukozyten und Monozyten reichern sich hingegen als mononukleäre Zellen (PBMCs) in der Interphase auf der Ficollschicht an und sind so einer Isolierung durch einfaches Abnehmen des Lymphozytenrings zugänglich.

Durchführung

- 1) Heparinisiertes Vollblut wird im Verhältnis von 1:1 mit PBS gemischt. In einem 50 ml Falconröhrchen werden auf 20 ml Ficoll-Hypaque vorsichtig unter Erzeugung zweier deutlich getrennter Phasen 30 ml der Zellsuspension geschichtet.
- 2) Nach der Dichtegradientenzentrifugation mit 400 g für 30 min bei Raumtemperatur, Beschleunigung 1 (B1) und Bremse 1 (R1) wird die Plasmaphase bis 1 cm oberhalb des Lymphozytenrings abgenommen und verworfen.
- 3) Mit einer sterilen Pipette wird der trübe Ring aus PBMCs vorsichtig abgesaugt und in ein neues 50 ml Falconröhrchen überführt.
- 4) Das Falconröhrchen wird mit PBS auf 50 ml aufgefüllt, mit 400 g für 10 min bei Raumtemperatur, B7 und R5 gewaschen und anschließend der Überstand vorsichtig abgekippt. Das entstandene Zellpellet wird mit PBS gelöst, um dann erneut bei gleichen Einstellungen gewaschen zu werden. Je nach weiterem Verwendungszweck werden die gewonnenen PBMCs manuell oder maschinell gezählt und in Medium oder FACS-Puffer aufgenommen.

2.2.3 Feederzelllinie K562-mb15-41BBL

Die Feederzelllinie K562-mb15 wurde uns freundlicherweise von Dr. D. Campana MD, St. Jude Children's Research Hospital Memphis zur Verfügung gestellt. Hierbei handelt es sich um eine erythroleukämische AML-Zelllinie, welche genetisch verändert wurde, so dass die Zellen membrangebunden an der Oberfläche IL-15 sowie den Liganden 4-1BBL exprimieren [83]. Da K562-Zellen kein MHC-I und damit keine Liganden für iKIR-Rezeptoren präsentieren, eignen sie sich besonders gut als Targetzellen für NK-Zellen [84].

2.2.4 Expansion von NK-Zellen

Zelllinie K562-mb15-41BBL	siehe Kapitel 2.2.3
Bestrahlungsgerät GammaCell 1 000 Elite	Nordion
BGA-Gerät ABL 800 Flex	Radiometer
Interleukin-2 (IL2) Proleukin 2×10^6 IE/ml	Universitätsapotheke

Prinzip

Bei Inkubation von PBMCs mit IL-2 und K562-mb15-41BBL, die zuvor mit 100 Gy bestrahlt wurden, expandieren die NK-Zellen unter den PBMCs massiv (3-6 Logstufen) und überwachsen dabei alle anderen Zellfraktionen. Die Aktivierung und die Induktion der Zellproliferation erfolgen hierbei über den CD137-Rezeptor, sowie den IL-2/IL-15-Rezeptor-Komplex (CD122/CD132) [83, 85].

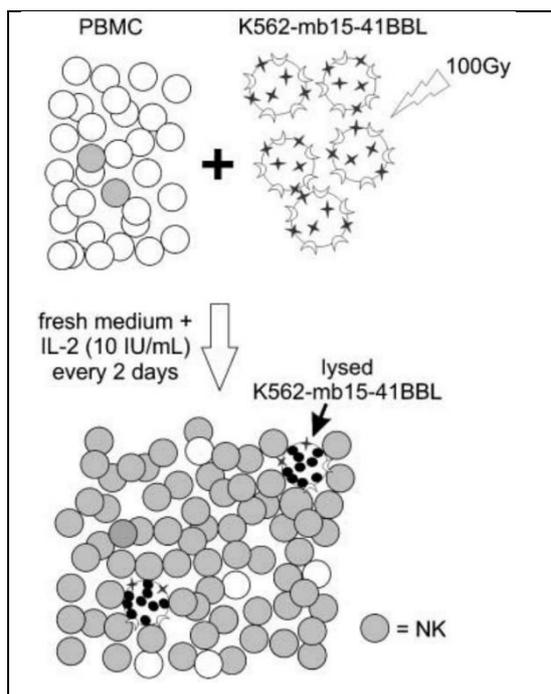


Abbildung 2.1: Schema der NK-Zell-Expansion aus PBMC

Bestrahlte K562-mb15-41BBL Zellen werden in einem Verhältnis von 15:1 mit PBMC gemischt. Im Verlauf kommt es zur Proliferation und Aktivierung der NK-Zellen sowie zur Lyse der Feeder-Zellen.

aus: Fujisaki, H., et al. (2009). "Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy." *Cancer Res* **69**(9): 4010-4017.

Bei der Expansion können verschiedene Phasen unterschieden werden:

Tag 1-5: Die NK-Zellen bilden mit den Feederzellen zusammenhängende Zellansammlungen (Zellcluster), welche bei der Zellpflege nicht zerstört werden sollen.

Tag 6-14: Die Zellcluster werden rasch weniger, wobei die Zellen in eine exponentielle Wachstumskurve mit starker Vermehrung der Lymphozyten übergehen.

Tag 15-22: Das Zellwachstum lässt nach und sistiert schließlich fast komplett.

Durchführung

Tag 0: Mittels Ficoll werden aus heparinisiertem Vollblut freiwilliger und gesunder Spender PBMC isoliert. Zur Bestimmung des prozentualen NK-Zell-Anteils, werden 1×10^6 PBMC in ein

FACS-Tube überführt, abzentrifugiert, mit CD3- sowie CD56-Antikörpern gefärbt und nach dem Waschen am FACS-Gerät gemessen (s. Kap. 2.4.1). Im Verhältnis 15:1 zu den NK-Zellen, werden den PBMC dann mit 100 Gy bestrahlte Zellen der Feederzelllinie K562mb-15-41BBL zugegeben. Anschließend werden die Zellen in einer Konzentration von 1×10^6 /ml in Stammlösung B im Brutschrank bei 37°C in Zellkulturflaschen inkubiert.

Ab Tag 1: Tägliche Zellpflege, wobei eine mikroskopische Wachstumskontrolle, eine Zellzahlbestimmung am Advia sowie eine BGA durchgeführt wird. Bei einem Glucosewert <100 mg/dl wird den Zellen frisches Stammmedium B zugegeben, wobei eine Zellkonzentration von $0,8 \times 10^6$ Leukos/ml nicht unterschritten wird.

Mindestens jeden 2. Tag wird frische Stammlösung ergänzt, um die Zellen mit frischen IL-2 zu versorgen.

2.2.5 BCP-ALL Zelllinien

Für die *in vitro* Untersuchungen wurden vier verschiedene pädiatrische BCP-ALL Zelllinien herangezogen.

Zur Austestung der Alloreaktivität wurden Zelllinien gesucht, die Vertreter von mindestens einer der HLA-Gruppen Cw3, Cw4, oder Bw4 exprimieren. Die Auswahl wurde anhand der Expression der HLA-Gruppen durchgeführt, wobei die Typisierung durch das HLA-Labor der Universitätsklinik Tübingen erfolgte.

Alle verwendeten Zelllinien sind Suspensionszellen. Zur Kultivierung wurden die Stammlösungen A1/A2 verwendet. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ gelagert. Die Zellqualität wurde alle 2-3 Tage im Lichtmikroskop beurteilt, die Zellzahl im ABX-Counter/Advia bestimmt und die Zellkonzentrationen gemäß der Empfehlung durch die Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) eingestellt. Beim Farbumschlag des Indikators des RPMI-Mediums von Rot nach Orange-Gelb, wurden die Zellen zur Hälfte abzentrifugiert und mit frischem Medium resuspendiert.

2.2.5.1 Stimulation der HLA-I Expression mit IFN γ

Imukin (IFN γ)	Boehringer Ingelheim
------------------------	----------------------

Prinzip

Durch Inkubation von PBMC mit IFN γ kann die HLA-I-Expression auf der Zelloberfläche stimuliert werden [86]. Dieser Effekt wurde zur Untersuchung des Einflusses der HLA-I Expression auf die Aktivierung expandierter NK-Zellen und frisch isolierter PBMC genutzt.

Durchführung

Zur effektiven Stimulation der HLA-I Expression ist im Zellkulturmedium eine IFN γ -Konzentration von 1×10^3 IE/ml anzustreben.

- 1) Zugabe von IFN γ in eine frisch gepflegten Zellkultur (s. Kapitel 2.2.5, Zielkonzentration: 1×10^3 IE/ml)
- 2) Inkubation für 72h bei 37°C und 5% CO $_2$ im Brutschrank
- 3) Überprüfung der Stimulation mittels Durchflusszytometrie mit FITC fluoreszenzmarkierten Anti-HLA-A, -B und -C Antikörpern; Kontrolle mit unstimulierten Zellen

2.2.5.2 Transduktion der Zelllinien mit Luciferase

Prinzip

Um für den Luciferase-Assay (s. Kapitel 2.3.5) Targetzellen mit Luciferase-Enzym zu erhalten, wurden in Zellen von BCP-ALL-Zelllinien durch einen lentiviralen Doppelvektor ein mCherry/Luciferase- oder ein GFP/Luciferase-Gen transduziert. Hierdurch sind die Zellen in der Lage GFP/mCherry auf ihrer Oberfläche zu exprimieren und D-Luciferin zu oxidieren.

Durchführung

Es wurden die pädiatrischen BCP-ALL Zelllinien Nalm-6, Nalm-16, MHH und SEM transduziert.

- 1) Befüllen von je 3 wells einer 48 well-Platte pro Zelllinie mit jeweils 25.000 Zellen in 200 μ l Zellkulturmedium
- 2) Zugabe des Virusüberstands:
 1. well: 45 μ l / 2. well: 5 μ l / 3. well: negativ-Kontrolle
- 3) Zentrifugation der Platte für 30 min bei 800G und 32°C (B9/R0)
- 4) Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO $_2$ für 24h
- 5) Ab dann Zellpflege nach Protokoll der einzelnen Zelllinien
- 6) Kontroll-FACS nach 14 Tagen zur Bestimmung der Transduktionsrate

2.2.6 Zellzahlbestimmung und Zellkulturbeobachtung

Inversionsmikroskop IX50	Olympus
Lichtmikroskop CX40LF200	Olympus
Neubauer Zählkammer	Assistent

Deckglas	Menzel
Trypanblau (0.4 %)	Sigma
Zähluhr	Ivo

Die ALL-Zelllinien wurden gemäß den Empfehlungen der „Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen“ kultiviert. Zur regelmäßigen Zellzahlbestimmung und Einschätzung der Zellqualität wurde das ABX-Gerät verwendet.

Zur Kontrolle der Effektor-Zellen und beim Vorbereiten der Zelllinien auf einen Assay wurde aufgrund der höheren Genauigkeit das Advia benutzt.

Bei Unklarheiten zur Zellqualität, insbesondere nach dem Auftauen kryokonservierter Zellen, wurden die Zellen zusätzlich mittels Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop beurteilt. Hierfür wurden die Zellen im Verhältnis 1:1 mit 0,4% Trypanblau angefärbt.

2.2.7 Kryokonservierung und Auftauen

-86°C Freezer	Forma Scientific
Mr. Frosty, Gefrierbehälter	Nalgene

Kryokonservierung

Zur mittelfristigen Lagerung der Zellen wurden die gut wachsenden und gemäß Kapitel 2.2.5 gepflegten Zellen gezählt, bei Raumtemperatur mit 300g (B9/R9) für 5 min zentrifugiert und anschließend in Einfriermedium resuspendiert. Pro Kryotube wurden bis zu 100×10^6 Zellen in einem vorgekühlten (mind. 1h bei 4°C) Mr. Frosty-Gefrierbehälter bei -80°C eingefroren.

Auftauen

Zum Auftauen wurden die Zellen im Kryotube langsam im Wasserbad (37°C) geschwenkt und sobald das Medium flüssig wurde in 15ml Falconröhrchen mit 37°C-warmem Zellkulturmedium überführt. Nun wurde das Medium zweimal ausgetauscht (Zentrifuge jeweils: 5min, 300g, B9/R9) und anschließend die Zahl

lebender Zellen bestimmt. Gemäß Kapitel 2.2.5 wurden die Zellen daraufhin weiter gepflegt. Eine Nachkontrolle der Zellzahl erfolgte am Folgetag.

2.3 Therapeutischer CD19 Antikörper

monoklonaler FC-optimierter CD19-4G7SDIE Antikörper
(Bereitgestellt durch Dr. L. Grosse-Hovest, Prof. Dr. G. Jung, Universität Tübingen)

2.4 Assays

2.4.1 Immunphänotypisierung mittels Durchflusszytometrie

BD™ LSR II Cytometer	Biolegend
Angeschlossene Hardware, PC	Hewlett-Packard
Auswerteprogramm FCS Express 5	De Novo Software
Software BD™ FACS Diva	BD™ Biosciences

Monoklonale Antikörper

Antikörper	Subtyp	Fluorochrom	Klon	Hersteller
Isotyp γ 1 Mouse	IgG ₁	FITC	X40	BD™ Biosciences
Isotyp γ 1 Mouse	IgG ₁	PE	X40	BD™ Biosciences
Isotyp γ 1 Mouse	IgG ₁	APC	X40	BD™ Biosciences
Isotyp γ 2 Mouse	IgG _{2a}	FITC	X39	BD™ Biosciences
Isotyp γ 2 Mouse	IgG _{2a}	PE	X39	BD™ Biosciences
CD3	IgG _{2a}	PB	HIT3a	BioLegend
	IgG _{2a}	APC-Cy7	HIT3a	BioLegend
CD10	IgG ₁	Percp	MEM-78	Exbio Praha

CD16	IgG ₁	AF700	3G8	BioLegend
CD19	IgG ₁	PE	HIB19	Becton Dickinson
CD45	IgG ₁	APC/Cy7	HI30	BioLegend
CD56	IgG _{2a}	Pe/Cy7	HCD56	BioLegend
CD58j	IgG ₁	PE		BioLegend
CD62L	IgG _{2a}	FITC		BioLegend
CD69	IgG ₁	PerCp	FN50	BioLegend
CD85j (ILT2)	IgG ₁	PE		BD™ Biosciences
CD94	IgG ₁	FITC	DX22	BioLegend
CD107a	IgG ₁	APC	H4A3	BioLegend
CD112	IgG ₁	PE	TX31	BioLegend
CD155	IgG ₁	APC	SKII.4	BioLegend
CD158a	IgG ₁	FITC	HP-3E4	BD™ Biosciences
CD158b	IgG _{2a}	PE	DX27	BioLegend
CD158e	IgG ₁	BV421	DX9	BioLegend
CD274	IgG ₁	PE	MIH1	BD™ Biosciences
CD276	IgG ₁	PE		
CD279	IgG ₁	PE	EH12.2H7	BioLegend
DNAM-1	IgG ₁	unlabelled PE	11A8	BioLegend
NKG2A	IgG _{2a}	PerCp		R&D Systems
NKG2D	IgG ₁	unlabelled APC	1D11	BioLegend
NKp30	IgG ₁	PE	P30-15	BioLegend
NKp44	IgG ₁	PE	4A4.D10	Miltenyi Biotec
NKp46	IgG ₁	APC	9E2	Miltenyi Biotec
NKp80	IgG ₁	FITC	4A4.D10	Miltenyi Biotec
HLA-A, -B, -C		FITC	w6/32	BioLegend
HLA-E		APC	3D12	BioLegend
HLA-G		PE	87G	BioLegend
HLA-I Bw4	IgG ₁	PE	REA274	Miltenyi Biotec

MIC-A/B	IgG _{2a}	PE	6D4	BioLegend
ULBP-1	IgG _{2a}	PE	170818	R&D Systems
ULBP-2/5/6	IgG _{2a}	PE	165903	R&D Systems
ULBP-3	IgG _{2a}	PE	166510	R&D Systems
Lebend/Tot	-	Aqua		Invitrogen

Hintergrund:

Mit dem Prinzip der Durchflusszytometrie (FACS: fluorescence activated cell sorting) ist es möglich, Zellen schnell und in hoher Quantität auf ein weites Spektrum von Fluoreszenzen und Lichtstreuung zu untersuchen. Dies erlaubt Rückschlüsse auf die Zellmorphologie, intra- und extrazelluläre Proteinexpression, Gen-Expression sowie Zellphysiologie [87].

Bei dem Verfahren werden Zellen aus einer Zellsuspension mittels Überdruck durch eine Kapillare in das FACS-Gerät aufgenommen und in einer Messkammer stark beschleunigt. Hierdurch gelingt es Zellaggregate in Einzelzellen aufzuteilen, sodass diese hintereinander einen fokussierten Laserstrahl durchqueren. Mittels verschiedener Laser mit unterschiedlichen Wellenlängen, Lichtsensoren und vorgeschalteter optischer Filter können so Streuungseffekte von Zellen und Fluoreszenzen von Antikörpern bestimmt werden [87, 88].

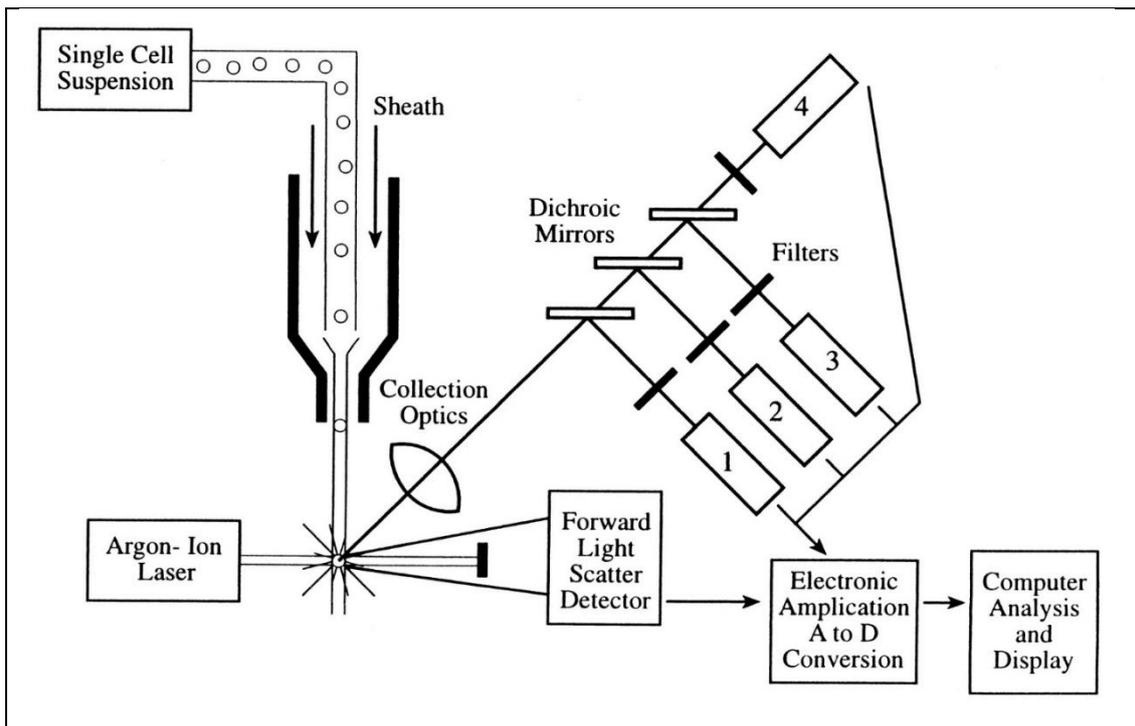


Abbildung 2.2: Funktionsweise der Durchfluss-Zytometrie

Zellen einer Zellsuspension werden durch eine Kapillare in das FACS-Gerät aufgenommen und in einer Messkammer stark beschleunigt. Einzeln durchqueren sie hintereinander einen fokussierten Laserstrahl. Mittels Spiegeln, optischer Filter und Lichtsensoren können Streuungseffekte von Zellen und Fluoreszenzen von Antikörpern bestimmt werden.

aus: Brown, M. and C. Wittwer (2000). "Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology." *Clinical Chemistry* **46**(8): 1221-1229.

Grundsätzliche Aussagen über Zelleigenschaften können über Streuungseffekte der Zellen getroffen werden: Anhand des Vorwärtstreulichts (FSC: forward light scatter) kann die Größe der einzelnen Zellen bestimmt werden, anhand des Seitwärtstreulichts (SSC: sideward light scatter) können Aussagen zur intrazellulären Granularität getroffen werden [88]. Trägt man bei der Analyse von Vollblut FSC und SSC in einem Schaubild gegeneinander auf, kann man schon anhand der charakteristischen Verteilung Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten voneinander unterscheiden.

Weitere Aussagen zu Zelleigenschaften können beim FACS mittels extra- und intrazellulärer Färbung der Zellen mit monoklonalen Antikörpern getroffen werden, welche mit Fluoreszenz-Farbstoffen konjugiert sind. Passieren Antikörper-markierte Zellen einen Laser, werden die Fluorochrome angeregt und erreichen ein höheres Energie-Level. Bei der Rückkehr ins vorherige Energie-Level emittieren die Farbstoffe Lichtenergie in höheren Wellenlängen. Durch

optische Filter und Lichtsensoren können diese gemessen und schließlich in digitale Signale umgewandelt werden. Benutzt man verschiedene Fluorochrome, die von Licht in der gleichen Wellenlänge angeregt werden, jedoch in unterschiedlichen Wellenlängen emittieren, so können die Zellen gleichzeitig auf verschiedene Eigenschaften überprüft werden [88, 89].

Zwischen der Anzahl der mit einem Farbstoff-konjugierten Antikörper (AK) besetzten Bindungsstellen und der Intensität der Fluoreszenz besteht eine direkte Proportionalität. Aufgrund der Autofluoreszenz von Zellen auch ohne AK, muss zusätzlich immer eine ungefärbte Probe gemessen werden. So kann ein Grenzwert bestimmt werden, ab dem ein Fluoreszenzwert als positiv gilt und auf den Fluorochrom-konjugierten AK zurückzuführen ist.

Als semi-quantitatives Verfahren zur Bestimmung einer Oberflächenrezeptordichte, können Zellen im FACS-Assay auf ein Oberflächenprotein hin gefärbt und mit Zellen in Isotyp-Färbung verglichen werden. Aus den Mittelwerten (MW) der beiden Verteilungskurven kann schließlich ein Quotient gebildet werden (mean relative fluorescence intensity, MRFI).

Durchführung:

Der Versuchsablauf erfolgt auf Eis. Die Zentrifugationsschritte werden bei 4 °C mit 300 g für 7 min, B9 und R9 durchgeführt.

- 1) Die zu untersuchenden Zellen werden in einem FACS-Analyseröhrchen oder einer 96-well Rundbodenplatte mit FACS-Puffer gewaschen. Nach dem Dekantieren sollte das entstandene Zellpellet lediglich ein minimales Restvolumen beinhalten.
- 2) Zur Unterscheidung lebender und toter Zellen wird zu den Zellen je 40µl L/D Aqua gegeben und das Zellpellet durch ein- bis zweimaliges Resuspendieren mit der Pipette gelöst.
- 3) Es folgt eine 20minütige Inkubation unter Lichtabschluss im Kühlschrank.
- 4) Anschließend werden die Zellen zweimal gewaschen und dekantiert.
- 5) Färbung mit gewünschter Antikörper-Kombination: Entsprechend der Ergebnisse der AK-Verdünnungsreihe werden 1–10 µl der AK nachgelegt und

das Zellpellet durch ein- bis zweimaliges Resuspendieren mit der Pipette gelöst

- 6) Es folgt wiederum eine 20minütige Inkubation unter Lichtabschluss im Kühlschrank.
- 7) Die Zellen werden anschließend zweimal gewaschen.
- 8) Bis zur Messung werden die Zellen unter Lichtabschluss im Kühlschrank aufbewahrt. Erfolgte die Messung nicht am selben Tag, wurden die Zellen mit 0,5 % Formaldehyd (PFA) fixiert.

Messung und Auswertung

Als Durchflusszytometer wurde das BD™ LSR II Flow Cytometer verwendet. Auswertungen erfolgten mit der Software FCS Express 5.0.

Vor der Messung werden die Verstärkerspannungen FSC (x-Achse) und SSC (y-Achse) so eingestellt, dass die übliche Darstellung der Zellverteilung erreicht wird. Es erfolgt die Messung der Proben. Für die Auswertung werden Ausschnitte des Schaubilds als Gates definiert, die dann in einem folgenden Diagramm weiter ausgewertet werden können. Im Gate der Lymphozyten Population werden so einzeln vorkommende und lebende Zellen hinsichtlich ihrer Fluoreszenz gemessen. Zwei Kanäle z.B. PeCy7 und APC-Cy7 werden dabei gegeneinander dargestellt. Durch setzen eines Quadranten um die gewünschten Populationen wird die absolute und relative Zellzahl der doppelt positiven, einfach positiven und doppelt negativen Zellen automatisch berechnet. Soll berechnet werden, wie viele NK-Zellen beispielsweise einen bestimmten Rezeptor tragen, wird ein Subtraktionsverfahren verwendet. Im Programm FCS Express 5.0 wird anhand der Isotypkontrolle ein Gate so gesetzt, dass alle Zellen gezählt werden, die auf der Achse im positiveren Bereich liegen. Die angegebene Zahl entspricht dem Anteil positiver NK-Zellen in Prozent.

2.4.2 Durchflusszytometrische Zellsortierung

BD™ FACS Aria Cell Sorter	BD™ Biosciences
Angeschlossene Hardware, PC	Hewlett-Packard
Software BD™ FACS Diva	BD™ Biosciences

Hintergrund

Die durchflusszytometrische Zellsortierung basiert auf dem Prinzip der klassischen Durchflusszytometrie (Kap. 2.4.1). Bei diesem Verfahren können Zellen nicht nur anhand ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften charakterisiert, sondern gleichzeitig auch anhand dieser Eigenschaften isoliert werden. Hierdurch kann man bestimmte Zellpopulationen aus einer Menge von Zellen filtern. Zunächst werden die Zellen wie in Kap. 2.4.1 beschrieben mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern markiert. In der Software BD™ FACS Diva können durch das Setzen von Gates nun Zellpopulationen definiert werden, die man isolieren möchte. Im Gerät werden die Zellen unmittelbar nach der Immunphänotypisierung je nach Zugehörigkeit zu einer zuvor definierten Zellpopulation mit einer elektrischen Ladung versehen. In der Folge kommen die Zellen zu einem Abrisspunkt, wo der Flüssigkeitsstrahl mittels piezoelektrischem Schwingungsgeber in Einzeltropfen mit je einer Zelle gebrochen wird. Diese Tropfen passieren nun ein elektrisches Feld und werden entsprechend ihrer elektrischen Ladung in unterschiedliche Auffangbehälter abgelenkt.

Durchführung

Mittels Zellsorter werden die BCP-ALL-Zelllinien nach Transduktion anhand der Expression des GFP/ bzw. mCherry/Luciferase Doppelvektors sortiert. Da GFP und mCherry in den Kanälen FITC und PE-Dyomics590 fluoreszieren, erfolgt lediglich eine lebend/tot-Färbung mit L/D-Aqua. Am Ende werden nur die erfolgreich transfizierten und lebenden Zellen behalten und zur weiteren Kultur in Falcon-Tubes mit 1ml der passenden Stammlösung aufgefangen.

2.4.3 CD107a Assay

Ionomycin	Sigma
PMA 1mg (Phorbol-12-myristate-13-acetate)	Sigma
Brefeldin A	Sigma
Golgi-Stop (Monensin)	BD™ Biosciences
Cytofix/Cytoperm	BD™ Biosciences

Hintergrund

In NK-Zellen befinden sich Vesikel mit Granzym und Perforin. Bei der Interaktion der Zellen mit Target-Zellen kommt es zur Fusion der zytoplasmatischen Granula mit der Zellmembran der NK-Zelle, wobei Proteasen sowie Perforin freigesetzt werden. Die durch Perforin geschaffenen Poren in der Target-Zellmembran erlauben den Proteasen in das Zytoplasma der Zelle einzudringen und eine Apoptose zu verursachen. CD107a (LAMP-1) ist in der Granula-Membran lokalisiert und wird bei der Fusion der Vesikel mit der Zellmembran an der NK-Zell-Oberfläche nachweisbar. Die CD107a Expression ist daher ein sensibler Marker für die Aktivierung von NK-Zellen [90].

Im CD107a Assay werden NK-Zellen mit Zielzellen inkubiert und der fluoreszenzmarkierte CD107a-AK hinzugefügt. Auch andere Oberflächenmoleküle können so zusätzlich bestimmt werden. Durch eine FACS-Analyse kann die unterschiedliche CD107a Expression der NK-Zell-Subpopulationen bestimmt werden.

Durchführung

- 1) Einstellen der Target- und Effektorzellen auf 2×10^6 Zellen/ml.
- 2) Vorlegen von je 50 μ l Target- und Effektorzellen nach Pipettierschema in 96-well-Platte.
- 3) Zugabe von 50 μ l Brefeldin A (final 10 μ g/ml) und Monensin.
- 4) Ggf. Zugabe des CD19-4G7SDIE mAb (final 1 μ g/ml) / von PMA/Ionomycin in einem Volumen von 50 μ l.
- 5) Zugabe von 2 μ l CD107a-AK pro Well.

- 6) Inkubation der Zellen für 6h im Brutschrank (37°C, 5% CO₂)
- 7) Abzentrifugieren und Färben des Zellpelletts mit gewünschter AK-Kombination nach Protokoll oben.

2.4.4 Luciferase-Assay

Cellstar 96-well-Microplate, F-Bottom, weiß	Greiner Bio One
D-Luciferin	Sigma
Victor 1420 Multilabel Counter	Counter Wallac
Software Wallac 1420 Workstation	Wallac
Angeschlossene Hardware, PC	Compacq

Prinzip

Für diesen Assay wird das in der Natur vorkommende Prinzip der Biolumineszenz (BL) angewandt. Hierbei handelt es sich um eine Enzym-abhängige Reaktion, bei welcher das Enzym Luciferase aus chemischer Energie aus dem Umsatz von Substraten Licht erzeugt. So oxidiert die firefly-Luciferase der nordamerikanischen Leuchtkäferart *Photinus phyalis* das Substrat Luciferin unter Sauerstoff- und ATP-Verbrauch, wodurch gelb-grün bis rot leuchtendes Oxyluciferin entsteht. Als Cofaktor wird hierbei Magnesium benötigt [91, 92].



Mittels Transfektion von ALL-Zelllinien (s. Kapitel 2.2.5.2) mit einem Luciferase-Gen, kann sich oben beschriebene Reaktion zunutze gemacht werden: Bei Zugabe von D-Luciferin zu Target-Zellen mit Luciferase-Enzym emittieren diese nun Licht, welches mittels Photometer gemessen werden kann. Da für die Reaktion ATP gebraucht wird, kann die Reaktion nur in lebenden Zellen stattfinden und anhand der gemessenen Lichtintensität lassen sich Rückschlüsse auf die Anzahl lebender Target-Zellen ziehen.

Durchführung

In den Assays wurden E/T-Ratios von 1:1 und 0,5:1 verwendet.

- 1) Pflege der Effektor- und Targetzellen gemäß Kapitel 2.5 und Einstellen der Zellen auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml
- 2) Erstellen einer Titrationsreihe der Targetzellen mit 1×10^5 , $0,75 \times 10^5$, $0,5 \times 10^5$, $0,25 \times 10^5$, $0,1 \times 10^5$ Zellen
- 3) Pipettieren der Effektor- und Targetzellen in die 96-well-Microplate und des CD19-4G7SDIE mAb nach dem Pipettierschema. Zuletzt Zugabe von Luciferin in abgedunkeltem Raum
- 4) Inkubation der Zellen bei 37°C und $5\% \text{ CO}_2$. Messungen nach 6h, 12h, 24h und 48h im Victor 1420 Multilabel Counter, welcher auf 37°C vorgewärmt wurde

Auswertung

Grund-Pipettierschema aller Versuchsplatten zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Target only								1.00×10^5			Target only
B	Target only								0.75×10^5			Target only
C	Target only								0.50×10^5			Target only
D	Target only								0.25×10^5			Target only
E	Target only								0.10×10^5			Target only
F	Target only								Medium only			Target only
G	Target only											Target only
H	Target only											Target only

Der Messvorgang im Victor 1420 Multilabel Counter erfolgt reihenweise von A1 bis H12. Aufgrund der Temperaturabnahme und pH-Schwankungen nimmt die BL währenddessen kontinuierlich ab. Mit den Ergebnissen der beiden äußeren *Target only* Spalten wird in Microsoft Excel eine Ausgleichsgerade berechnet, anhand derer die prozentuale Abnahme der Lumineszenz pro well dargestellt

werden kann. Mit diesem Korrekturfaktor KF_{BL} und dem Zeitintervall t kann folgende Formel zur Berechnung der korrigierten BL erstellt werden:

$$BL_{korr} = BL \cdot (1 + (KF_{BL} \cdot T))$$

Um anhand der Biolumineszenzwerte auf die Anzahl lebender Targetzellen schließen zu können, wird auf die Titrationsreihe (gelber Bereich des Pipettierschemas) zurückgegriffen. Dank der definierten Zellzahlen kann hiermit eine Ausgleichsgerade erstellt werden, deren y-Achsenabschnitt die Biolumineszenz ohne Zellen (BL_0) und deren Steigung den Lysefaktor LF darstellt. Mit folgender Formel kann nun die Anzahl der lebenden Targetzellen n berechnet werden:

$$n = (BL_{korr} - BL_0) / LF$$

Da die maximale Zellzahl in einem well 1×10^5 Zellen betrug, folgt:

$$Vitalität = \frac{n}{100000}$$

$$Lyse = 1 - Vitalität$$

2.5 Ethikvotum

Vor Beginn der experimentellen Arbeit lag ein positives Ethikvotum vor.
Aktenzeichen: 622/2012BO1

3 ERGEBNISSE

3.1 Auswahl und Charakterisierung der Spender

3.1.1 HLA-I, KIR und FcGR3A Analyse der NK-Zell-Spender

In Tabelle 3.1 ist eine Übersicht aller für die Arbeit rekrutierten gesunden NK-Zell-Spender mitsamt ihres genetischen KIR-Ligand-Repertoires, der KIR-Genotypisierung (B-Content-Score), der KIR-Phänotypisierung sowie der FcGR3A-Genotypisierung der frischen NK-Zellen dargestellt. Die Ergebnisse der KIR- und der FcGR3A-Genotypisierung wurden freundlicherweise von Dr. Dr. M. Mezger (Laborleiter Chimärismuslabor, Kinderklinik der Universität Tübingen) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3.1: NK-Zell-Spender

Auflistung der rekrutierten gesunden NK-Zell-Spender mitsamt Interpretation des jeweiligen KIR-Ligand-Repertoires, der KIR-Genotypisierung, der KIR-Phänotypisierung und der FcGR3A-Genotypisierung der frischen Spender-NK-Zellen.

Spender	C1	C2	Bw4	KIR-Geno	KIR-Phänotypisierung frische NK, (%)				FcGR3A
					CD158a	CD158b	CD158e	KIR neg	
1		x	x	0	16,3	5,11	24,74	37,78	FF
2	x	x	x	0	11,04	5,19	6,98	69	FF
3	x	x		3	5,39	17,52	-	73,5	FV
4	x	x		0	5,71	10,46	6,2	49,62	VV
5	x	x	x	0	25,19	5,02	1,52	65,88	FF
6	x			2	5,16	16,52	6,38	68,22	FF
7	x	x	x	3	5,58	15,45	9,87	51,46	FF
8		x	x	1	-	-	-	-	FV
9	x			2	10,24	5,8	12,73	62,62	VV
10	x	x		1	2,84	11,18	18,6	48,69	FV
11	x		x	1	33,7	1	-	63	FV
12	x			3	-	-	-	-	VV
13	x	x	x	1	3,77	13,6	15,55	32,64	VV
14	x	x	x	0	25,9	5,2	16,29	42,96	FV
15	x	x	x	1	14,35	12,61	4,24	59,44	FV

16		x	x	1	1,97	14,01	22	39,14	FV
17	x		x	-	-	-	-	-	-
18	x	x	x	1	29,78	4,39	-	61,38	FV
19	x	x	x	2	12,45	11,21	7,57	58,47	-
20	x	x	x	1	5,3	12,05	-	60,32	-
21	x			1	5,8	29,57	7,06	47,13	-
22	x	x	x	0	11,95	10,33	16,37	43,74	-
23	x	x	x	-	4	21	10	41	-
24	x		x	-	6	19	10	43	-

Gemäß dem Licensing-Modell passt sich die Größe der single-KIR tragenden NK-Zellpopulationen der Spender an die Education der NK Zellen an (vgl. Kap. 1.2.2.4). Zur Überprüfung dieser Hypothese können aus dem Spenderpool von 24 Spendern zehn Spender herangezogen werden, da bei den übrigen Spendern alle relevanten HLA-Liganden vorhanden sind oder von den Spendern keine frischen NK-Zellen untersucht wurden. Der Übersichtlichkeit halber wurde Tabelle 3.1 in Tabelle 3.2 auf diese Spender und die Fragestellung hin reduziert und farblich markiert.

Tabelle 3.2: Untersuchung des KIR-Phänotypisierung gemäß Licensing-Modell

HLA-Repertoire und Größenverhältnis der single-KIR tragenden NK-Zell-Gruppen einzelner Spender.

Gemäß dem Licensing-Modell proliferieren „educated“ NK-Zellen stärker als solche, die mangels passenden KIR-Liganden keine Education durchlaufen konnten. Die passenden Rezeptor-Ligand-Gruppen sind: C1 ↔ CD158b; C2 ↔ CD158a; Bw4 ↔ CD158e.

Grün = Größenverhältnis gemäß Licensing-Modell

Rot = Größenverhältnis nicht gemäß Licensing-Modell

Spender	C1	C2	Bw4	KIR-Phänotypisierung frische NK, (%)			
				CD158a	CD158b	CD158e	KIR neg
1		x	x	16,3	5,11	24,74	37,78
3	x	x		5,39	17,52	-	73,5
4	x	x		5,71	10,46	6,2	49,62
6	x			5,16	16,52	6,38	68,22
9	x			10,24	5,8	12,73	62,62
10	x	x		2,84	11,18	18,6	48,69
11	x		x	33,7	1	-	63
16		x	x	1,97	14,01	22	39,14
21	x			5,8	29,57	7,06	47,13
24	x		x	6	19	10	43

3.1.2 Oberflächenexpression aktivierender und inhibierender NK-Zell-Rezeptoren

Sowohl frische als auch expandierte NK-Zellen wurden semi-quantitativ auf die Oberflächendichte aktivierender und inhibierender Rezeptoren hin untersucht, wobei die MRFI berechnet wurde.

Durch alle Spender hinweg besaßen die aktivierenden Rezeptoren NKG2D und DNAM-1 mit einer mittleren MRFI von 14,96 und 14,86 sowie der inhibierende Rezeptor CD85j mit der mittleren MRFI von 13,24 die größte Expressionsdichte auf den frischen NK-Zellen.

Auch die Unterschiede in der Expressions-Dichte waren von Oberflächenprotein zu Oberflächenprotein verschieden. Größere Unterschiede konnten bei den aktivierenden Rezeptoren NKp46 (22,3 Log-Stufen), NKp80 (10,7 Log-Stufen), NKG2D (4,6 Log-Stufen), NKp30 (3,9 Log-Stufen), DNAM-1 (3,8 Log-Stufen) sowie bei den inhibierenden Rezeptoren NKG2A (4,2 Log-Stufen) und CD85j (3,1 Log-Stufen) festgestellt werden.

Tabelle 3.3: Expression von Oberflächenproteinen der frischen NK-Zellen

Tabellarische Darstellung des MRFI von frischen NK-Zellen jedes Spenders.

Gelb = MRFI im Bereich der meisten Spender; Rot = MRFI <1 SD; Grün = MRFI >1 SD

	1	2	3	4	5	6	7	9	8	11	13	14	15	16	Ø
NKG2A	1,92	3,79	1,98	1,78	1,84	2,04	2,05	2,49	1,45	1,57	2,13	2,79	4,78	2,87	2,39
NKG2D	27,73	9,14	7,74	6,61	7,26	20,11	3,59	38,42	2,22	4,91	22,97	22,89	20,47	15,26	14,95
DNAM-1	14,11	13,82	11,68	3,69	7,29	30,06	3,12	43,76	2,70	4,11	13,10	24,38	19,23	16,92	14,86
CD85j	4,35	24,29	6,13	27,24	5,08	6,43	41,15	8,02	31,11	11,97	3,34	3,37	7,52	5,39	13,24
NKp30	9,92	3,24	5,84	3,08	5,21	27,98	2,70	13,00	2,36	3,21	7,14	17,36	14,24	14,94	9,30
NKp44	1,26	1,21	1,54	1,92	1,49	1,44	1,65	1,44	1,55	1,42	1,30	1,36	1,54	1,24	1,45
NKp46	9,61	5,73	3,11	2,22	1,84	10,25	2,18	6,59	1,11	2,49	3,90	6,75	2,58	1,24	4,26
NKp80	6,68	4,34	2,89	1,37	1,75	5,31	1,42	8,36	1,24	1,59	9,99	5,66	4,42	5,39	4,32
CD62L	2,77	1,50	1,91	1,29	1,69	1,40	2,07	1,33	1,34	1,59	1,51	1,30	1,24	1,31	1,59
CD69	3,75	3,57	2,42	3,01	3,66	7,98	3,47	5,53	3,21	3,13	3,52	3,89	4,97	3,56	3,98
CD94	3,75	13,95	2,47	1,45	2,01	3,69	1,62	6,32	1,43	1,79	6,72	5,69	3,58	6,41	4,35
CD279	1,43	1,25	1,33	1,74	1,57	1,37	1,49	1,50	1,52	1,40	1,32	1,41	1,53	1,28	1,44

Bei der Untersuchung der expandierten NK-Zellen fällt eine hohe Expressionsdichte vor allem bei den aktivierenden Rezeptoren NKG2D und NKp30 mit Mittelwerten der MRFI von 68,65 und 59,46 auf.

Die größten Unterschiede zwischen den Spendern in der Expressionsdichte bestand hier bei den Oberflächenproteinen CD279 (26,8 Log-Stufen) und NKp80 (14,2).

Die Unterschiede bei den anderen untersuchten Oberflächenproteinen waren geringer: DNAM-1 (2,2 Log), CD85j (3,2 Log), NKp30 (2,4 Log), NKp44 (3,1 Log), NKp46 (3,2 Log), CD69 (2,2 Log), CD94 (1,9 Log).

Tabelle 3.4: Expression von Oberflächenproteinen der expandierten NK-Zellen

Tabellarische Darstellung des MRFI von expandierten NK-Zellen der Spender.

Gelb = MRFI im Bereich der meisten Spender; Rot = MRFI <1 SD; Grün = MRFI >1 SD

	1	2	4	5	6	7	9	12	11	13	14	15	16	Ø
NKG2A	5,67	5,92	7,16	3,15	6,12	4,80	7,62	2,68	3,59	5,29	3,44	4,78	5,23	5,03
NKG2D	69,94	56,95	114,1	68,33	42,56	62,22	69,80	82,49	73,61	82,17	71,90	59,74	38,62	68,65
DNAM-1	12,48	5,46	41,30	18,83	24,35	39,48	26,57	29,16	43,06	9,39	23,56	12,56	16,33	23,27
CD85j	2,55	3,04	3,88	15,27	3,77	4,08	4,23	4,57	4,18	2,62	3,57	3,32	2,32	4,42
NKp30	34,50	10,04	94,68	67,13	80,48	108,2	37,10	34,59	155,6	8,09	65,24	64,94	12,37	59,46
NKp44	2,31	1,80	2,36	4,23	3,27	6,09	2,97	2,87	4,36	1,92	2,59	3,65	1,65	3,08
NKp46	2,97	1,63	3,61	2,73	2,62	4,30	2,69	1,71	4,46	3,90	2,34	2,38	1,90	2,86
NKp80	2,16	1,93	1,63	1,56	2,40	1,92	1,69	1,25	2,20	2,00	23,56	2,54	1,99	3,60
CD62L	1,28	1,26	1,32	1,34	1,32	1,24	1,30	1,14	1,28	1,53	1,37	1,30	1,60	1,33
CD69	23,21	33,62	17,25	34,79	75,66	24,05	48,71	60,27	32,14	10,96	34,93	65,82	7,32	36,06
CD94	22,13	28,91	17,35	16,94	15,41	21,36	21,64	14,51	13,99	22,27	5,75	14,85	25,27	18,49
CD279	1,53	1,28	1,50	1,80	1,52	1,52	1,66	3,69	1,77	1,45	2,02	1,62	1,05	1,72

3.2 Auswahl und Charakterisierung der Targetzelllinien

Gemäß den Kriterien in Kapitel 2.2.5 wurden folgende pädiatrische BCP-ALL Zelllinien ausgewählt und untersucht. Für eine bessere Vergleichbarkeit der

Ergebnisse der CD107a-Assays wurde hier als Target überwiegend auf Nalm-16 Zellen zurückgegriffen. Bei den durchgeführten Luciferase-Assays konnte die Lyse der vier BCP-ALL-Zelllinien miteinander verglichen werden.

3.2.1 Genetisches HLA-I Repertoire

In Zusammenarbeit mit dem HLA-Labor von Frau Prof. Dr. Klein, Universitätsklinik Tübingen, wurden die Targetzellen HLA-I typisiert. Gemäß der Typisierung tragen Nalm-16, SEM und MHH-cALL4 keinen KIR-Liganden der Gruppe C2.

Tabelle 3.5: Genetisches HLA-Repertoire der Target-Zelllinien

Auflistung der untersuchten pädiatrischen BCP-ALL-Zelllinien, ihres genetischen HLA-I Repertoires gemäß der HLA I Typisierungen sowie des Repertoires an KIR-Liganden.

Target	HLA-I Typisierung	Interpretation
Nalm-16	A*30:01; B*44:02; C*07:04	C1, Bw4 vorhanden Kein C2
Nalm-6	A*01:01; *02:01 B*08:01; *15:01 C*07:01; *04:02	C1, C2 vorhanden Kein Bw4
SEM	A*01:01, *32:01; B*08:01; *15:01; C*07:01, *03:03	C1, Bw4 vorhanden Kein C2
MHH-cALL-4	A*03:01; *24:02; B*07:02, *37:01; C*07:02	C1, Bw4 vorhanden Kein C2

3.2.2 Quantitative HLA-I Expression

Zur Quantifizierung der HLA-Expression wurden die Zelllinien Nalm-16 und Nalm-6 außerdem in einem gemeinsamen FACS-Assay mit dem HLA-I Antikörper

w6/32 untersucht. Hier zeigte sich bei Blasten der Zelllinie Nalm-16 eine MRFI von 88,9, bei Nalm-6 Zellen lag diese bei 121,92.

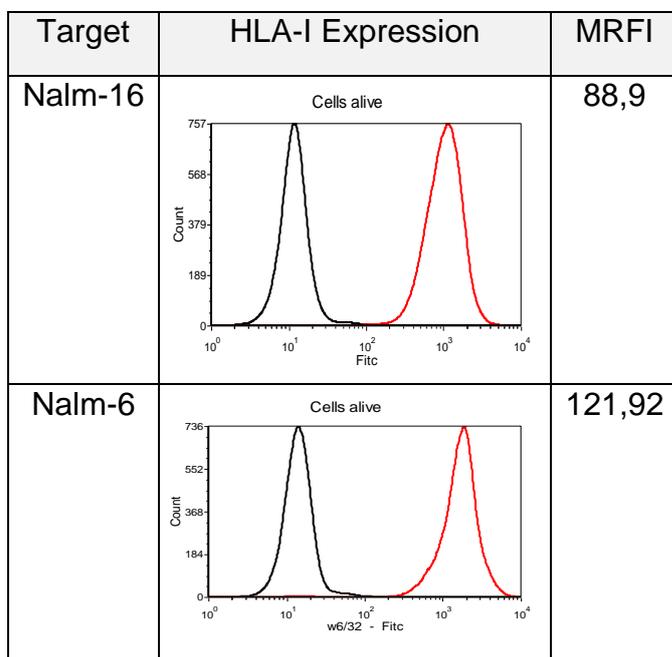


Tabelle 3.6: HLA-Phänotypisierung von Targetzelllinien mittel FACS

Quantifizierung der HLA-Expression der Zelllinien Nalm-16 und Nalm-6 in einem gemeinsamen FACS-Assay mit dem HLA-I-Antikörper w6/32 (Fitc-markiert). Zur besseren Übersichtlichkeit sind die Histogramme normalisiert. Die schwarzen Kurven zeigen jeweils die Isotyp-Kontrollen, die roten Kurven die gefärbten Zelllinien.

In einer isolierten Färbung des KIR-Liganden bw4 zeigte sich auf Blasten der Nalm-16 Zelllinie eine schwächere Expressionsdichte, als auf expandierten NK-Zellen. Zur Einordnung wurden als negativ-Kontrolle nicht bw4-exprimierende Nalm-6 Zellen gefärbt.

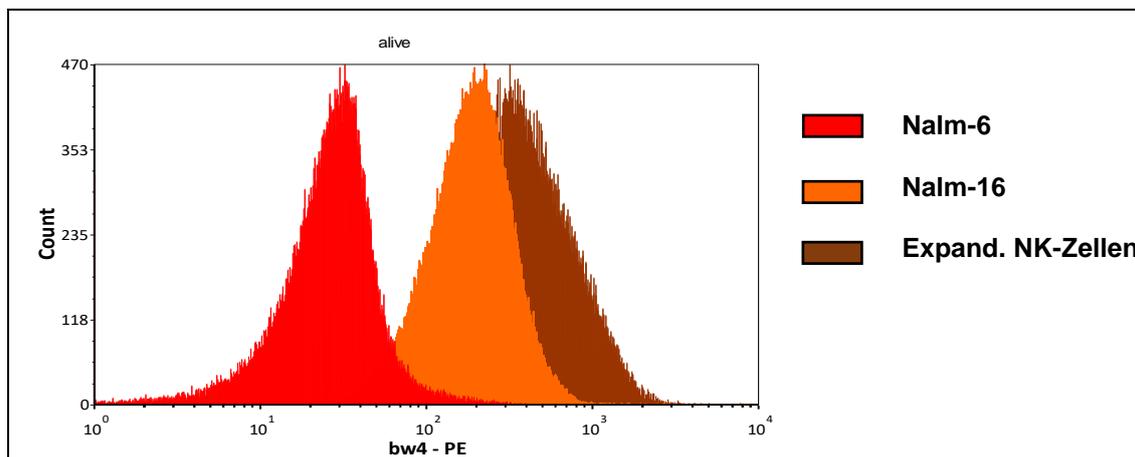


Abbildung 3.1: Bw4 Expression auf Target-Zelllinien

Expression der HLA-I-Liganden der Gruppe Bw4 auf den Zelllinien Nalm-16 (orange) und Nalm-6 (rot) sowie auf expandierten NK-Zellen (braun). Untersuchung in gemeinsamen FACS-Assay mit einem bw4-Antikörper der Farbe PE. Histogramm normalisiert.

3.2.3 Weitere NK-Zell-Liganden auf den BCP-ALL-Zelllinien

Die Tumorzelllinien wurden auf Oberflächenproteine mit Einfluss auf die NK-Zell-Interaktion hin untersucht, wobei für eine Vergleichbarkeit des Ergebnisses neben den Nalm-16 auch die Zelllinie Nalm-6 untersucht wurde.

Hier zeigte sich, dass Blasten der Zelllinie Nalm-16 eine um 12,5 Log-Stufen höhere Oberflächenexpression des DNAM-1-Liganden CD155 sowie eine um 4,1 Log-Stufen höhere Expression des NKG2D-Liganden Mic-A/B besitzen als Blasten der Nalm-6 Zelllinie (vgl. Tabelle 3.7).

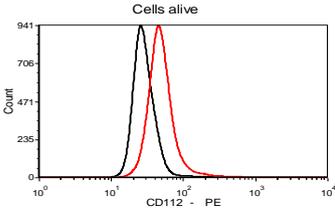
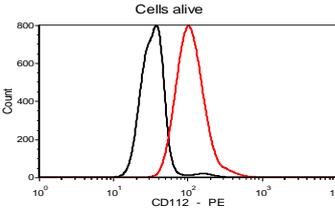
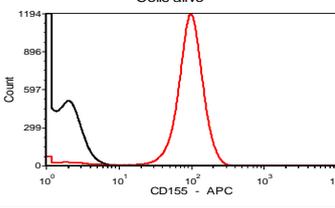
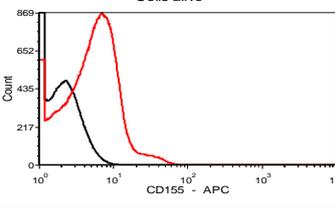
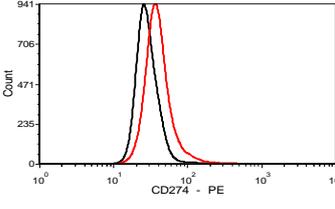
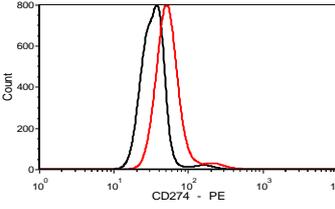
Andererseits erwies sich die Oberflächenexpression des zweiten untersuchten DNAM-1-Liganden bei Nalm-6 Zellen im Vergleich zu Nalm-16 Zellen um 2,1 Log-Stufen höher und die Expression von HLA-E (Ligand für NKG2A) um 2,2 Log-Stufen höher.

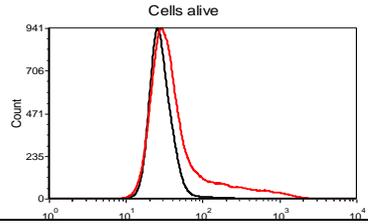
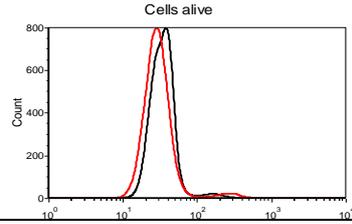
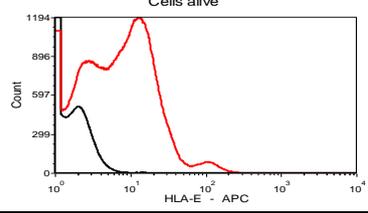
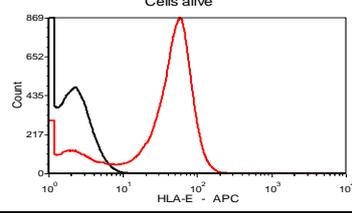
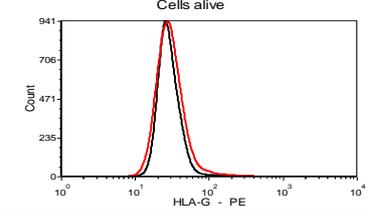
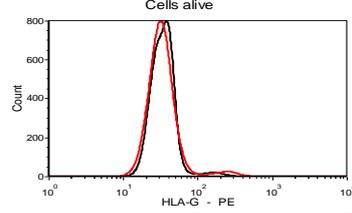
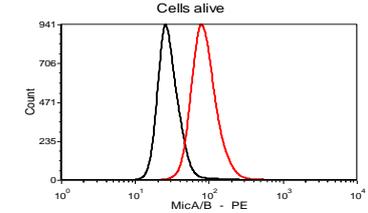
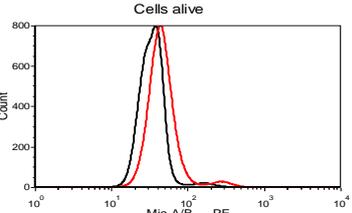
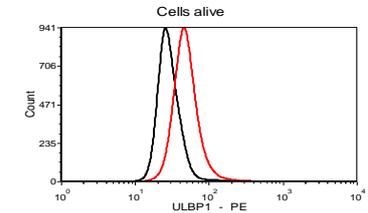
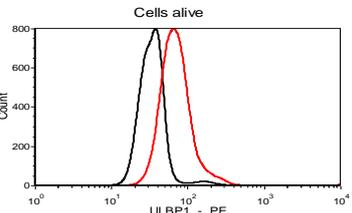
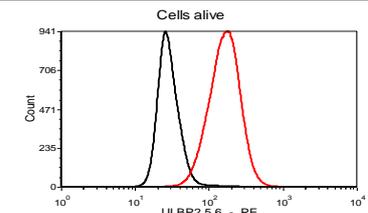
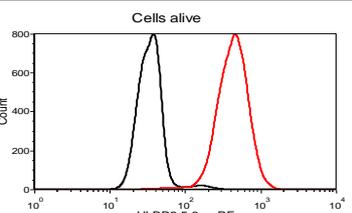
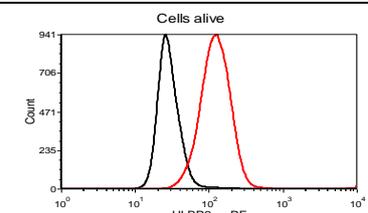
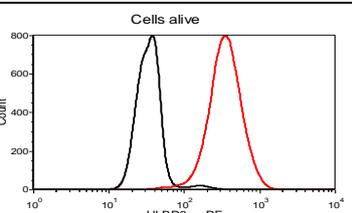
Alle weiteren Unterschiede blieben kleiner als 2 Log-Stufen.

Tabelle 3.7: Oberflächencharakterisierung der Tumorzelllinien

Die Färbung erfolgte mit den Fluorophoren CD112 (PE), CD155 (APC), CD274 (PE), CD276 (PE), HLA-E (APC), HLA-G (PE), Mic-A/B (PE), ULBP1 (PE), ULBP2,4,5 (PE) und ULBP3 (PE).

Zur besseren Übersichtlichkeit sind die Histogramme normalisiert. Die schwarzen Kurven zeigen jeweils die Isotyp-Kontrollen, die roten Kurven die gefärbten Zelllinien.

Ligand	Histogramm		MRFI	
	Nalm-16	Nalm-6	Nalm-16	Nalm-6
CD112			1,73	3,13
CD155			55,8	1,38
CD274			1,38	1,54

CD276			1,25	0,84
HLA-E			4,22	22,27
HLA-G			1,04	1,31
Mic-A/B			3,05	1,31
ULBP1			1,72	1,98
ULBP2,5,6			5,99	12,75
ULBP3			4,45	10,37

3.3 NK-Zell-Expansion

Als Grundlage für die folgenden Experimente wurden NK-Zell-Expansionen hergestellt. Hierbei wurde die Proliferationsrate der NK-Zellen während der Expansion sowie ihre Lyseaktivität nach Expansion gemessen.

3.3.1 Effizienz der NK-Expansionen

Mittels Expansion gelang es, die Zahl der Lymphozyten von durchschnittlich 53×10^6 (Tag 0) auf durchschnittlich 711×10^6 an Tag 14 zu vermehren.

Gleichzeitig nahm der prozentuale Anteil der im automatisierten Blutbild (Advia) gemessenen Lymphozyten an den Leukozyten von ursprünglich circa 60% auf > 90% zu.

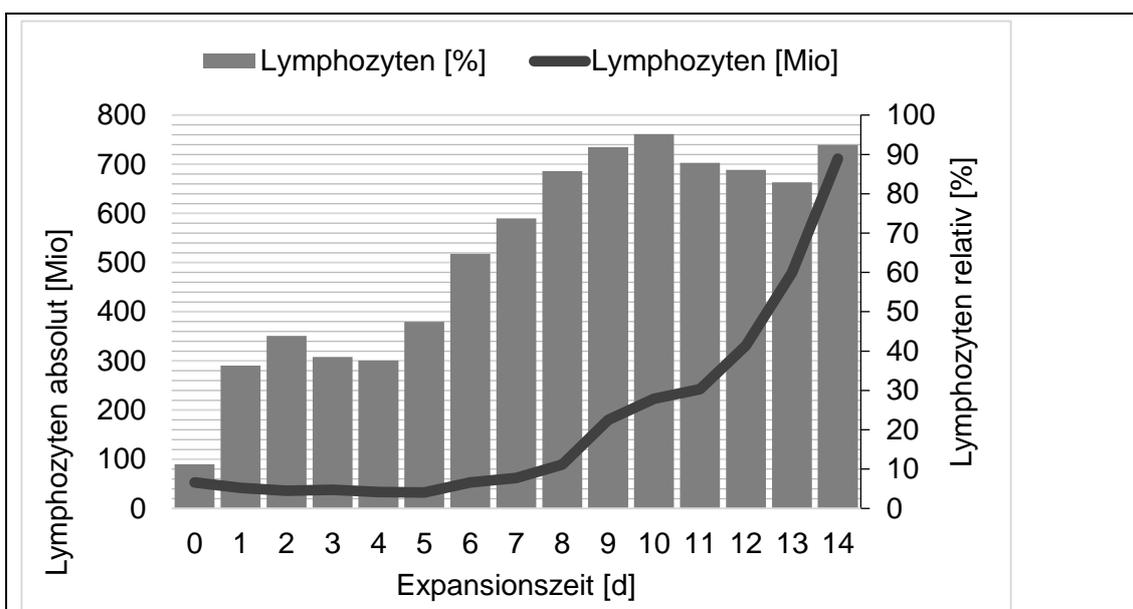
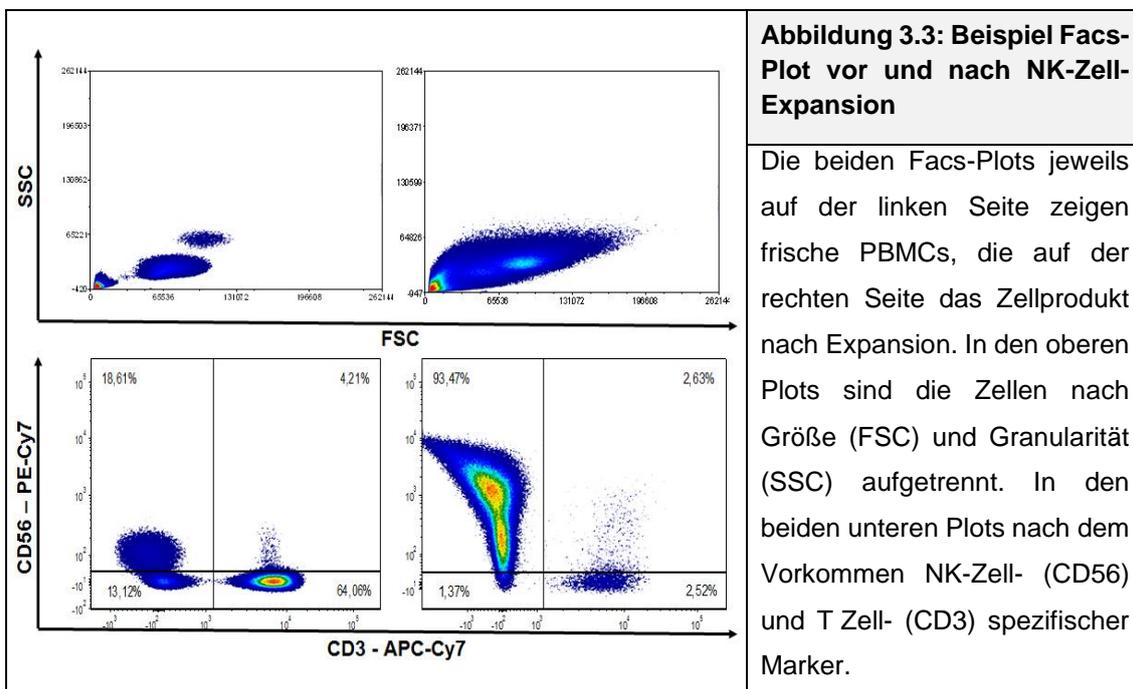


Abbildung 3.2: Lymphozytenpopulation während NK-Zell-Expansion; n=10

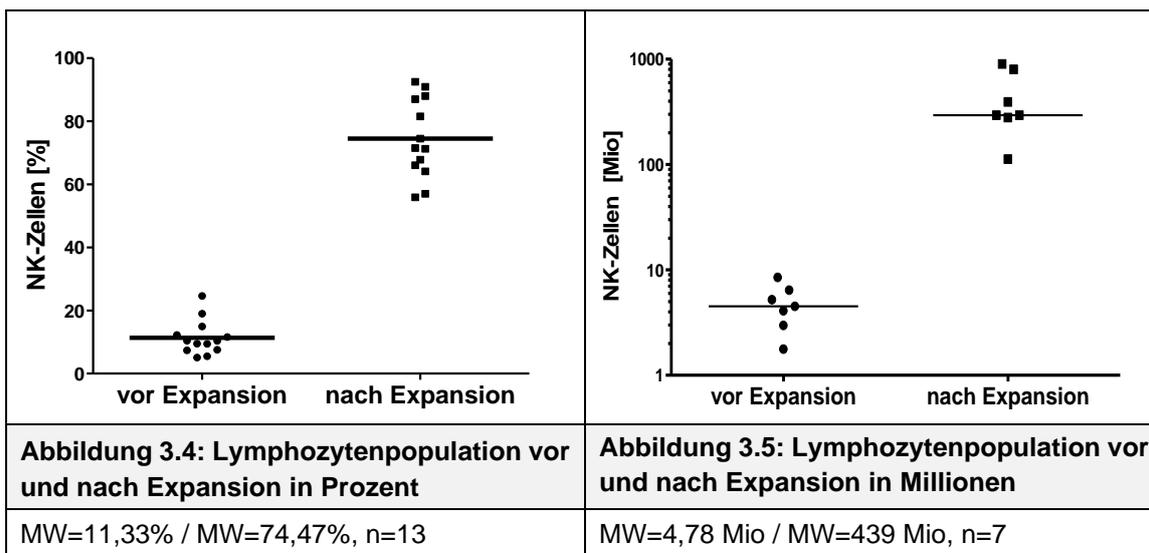
In den ersten Tagen der Expansion bleibt die Zahl der im Advia gemessenen Lymphozyten weitgehend konstant. Von Tag 0 zu Tag 1 kommt es jedoch zu einem sprunghaften Anstieg des prozentuellen Anteils der automatisch gemessenen Lymphozyten an den Leukozyten. Ab Tag 5 der Expansion beginnt sich die Zahl der Lymphozyten exponentiell zu vergrößern. Der prozentuelle Anteil nähert sich dabei sehr rasch an 100% an.

Im Fenster FSC vs. SSC zeigt sich auf der Seite der expandierten NK-Zellen eine dichte und große Lymphozytenpopulation. Bei den frischen PBMCs finden sich drei kleine Populationen. Im Fenster CD3 vs. CD56 zeigt sich ein kleinerer Anteil

CD3-positiver Zellen und eine große Population CD56-positiver Zellen. Innerhalb der CD56-positiven Zellen sind 2 Zellpopulationen erkennbar (vgl. Abb. 3.3).



Vor NK-Zell-Expansion zeigte sich ein NK-Zell-Anteil von durchschnittlich 11,3%, nach Expansion war dieser Anteil bei 74,5%. Die absolute Zahl der NK-Zellen war vor Expansion bei durchschnittlich $4,78 \times 10^6$ und nach Expansion bei durchschnittlich 439×10^6 . Dies entspricht einem Zellwachstum von 2,6 Log-Stufen.

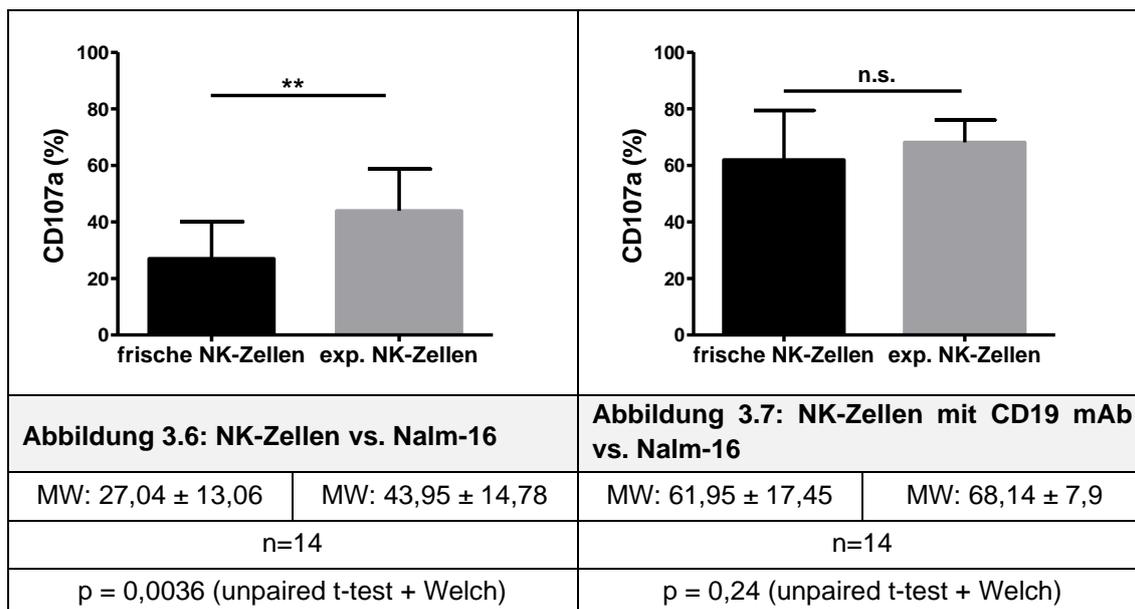


3.3.2 Lyseaktivität

Um die Lysefähigkeit expandierter NK-Zellen mit der von frischen NK-Zellen gegenüber kindlicher Leukämie zu vergleichen, wurden die expandierten NK-Zellen jedes Spenders mit frisch abgenommenen NK-Zellen desselben Spenders im CD107a-Assay getestet.

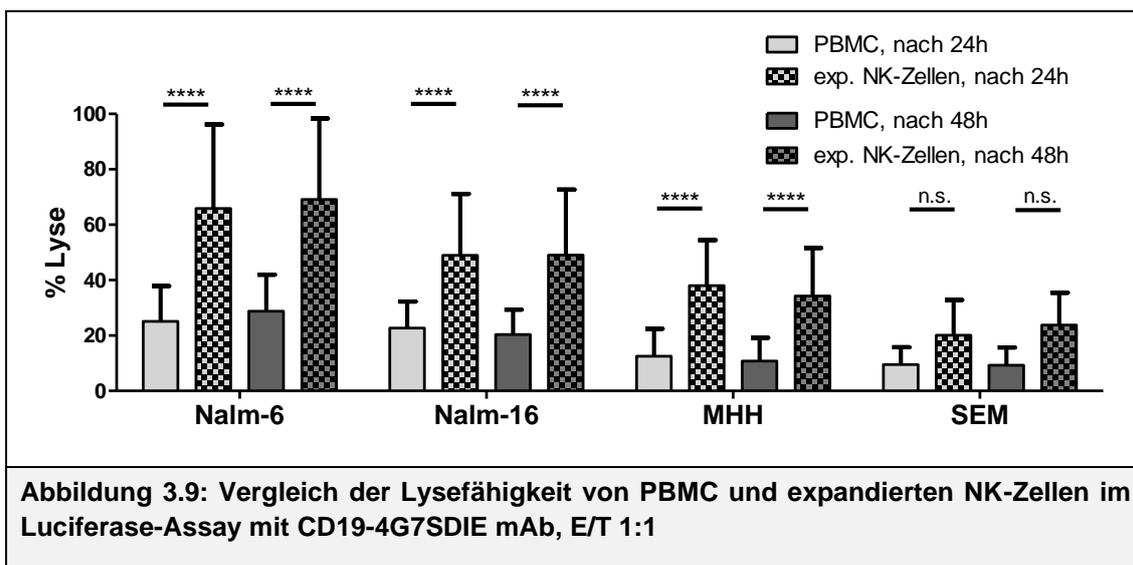
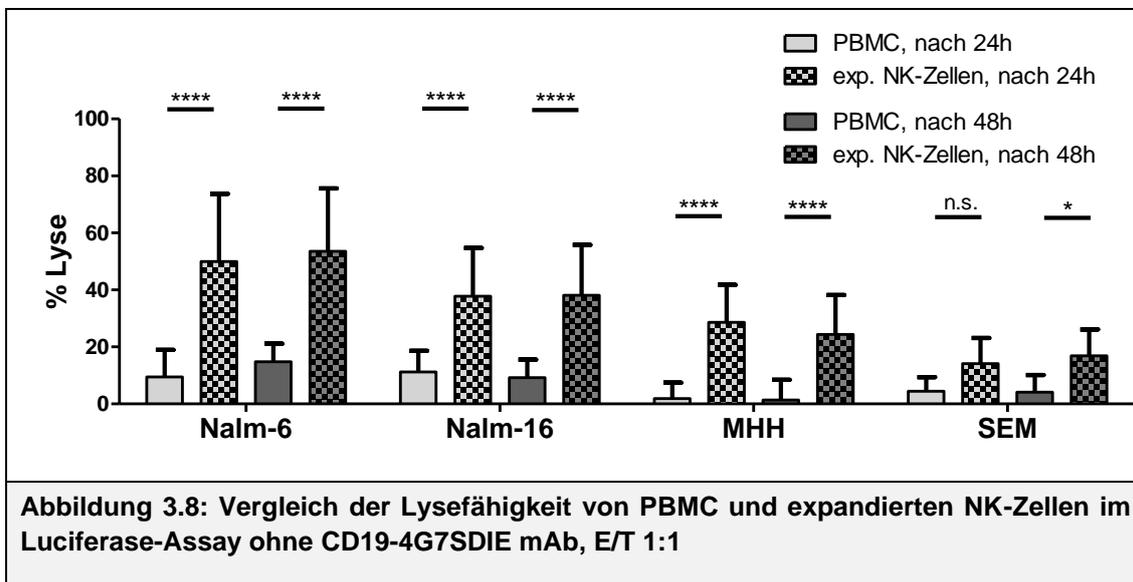
Die frischen NK-Zellen waren durchschnittlich zu 27% CD107a-positiv. Der Anteil an CD107a-positiven expandierten NK-Zellen lag im Mittel bei 44%. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen ist mit $p=0,0036$ signifikant, wobei die Standardabweichung (standard deviation, SD) in beiden Gruppen vergleichbar ist.

Im gleichen Ansatz, aber mit dem CD19-4G7SDIE mAb, kamen die frischen NK-Zellen auf eine durchschnittliche CD107a-Positivität von 62%, die expandierten NK-Zellen auf durchschnittlich 68,1%. Der Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen ist im t-Test mit $p=0,24$ jedoch nicht signifikant.



Darüber hinaus wurde die Lysefähigkeit der Zellen im Luciferase-Assay gegenüber den BCP-ALL-Zelllinien Nalm-6, Nalm-16, MHH-cALL-4 und SEM getestet. Hier zeigte sich im Vergleich PBMC mit expandierten NK-Zellen ebenso eine deutlich höhere Lyseaktivität der expandierten NK-Zellen. Diese Unterschiede bestanden sowohl nach 24h als auch nach 48h und sowohl mit als auch ohne CD19-4G7SDIE mAb. Abgesehen von den Lysewerten von

SEM-Zellen waren die Unterschiede zwischen PBMC und expandierten NK-Zellen in allen getesteten Konstellationen mit einem Signifikanzniveau $<0,0001$ signifikant.

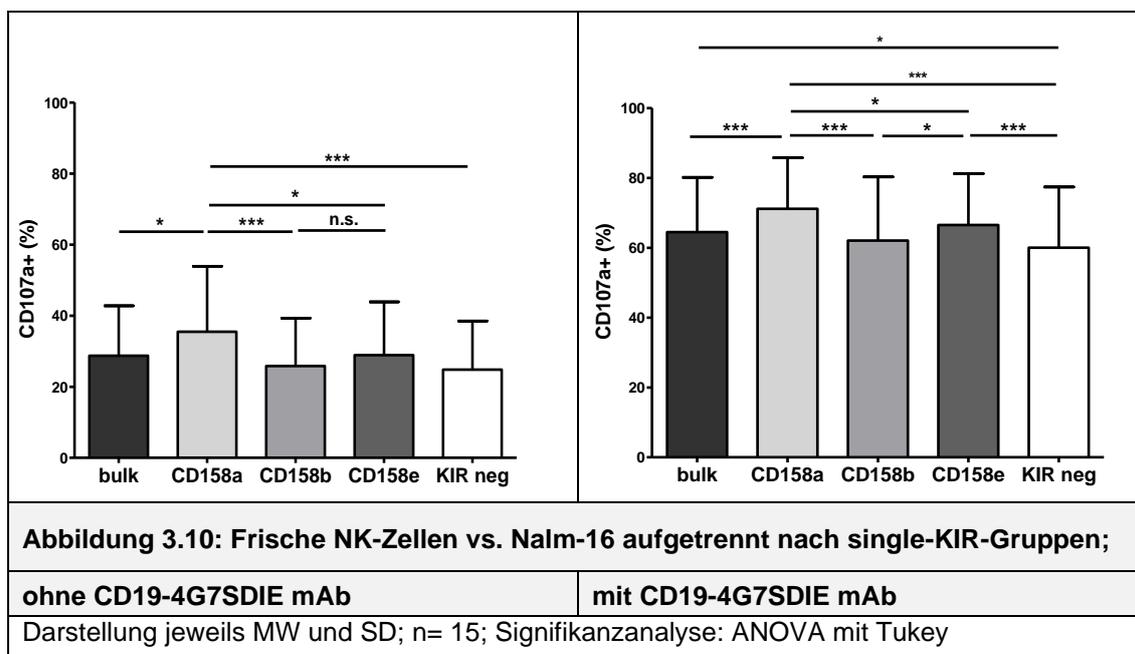


3.4 HLA-I Einfluss

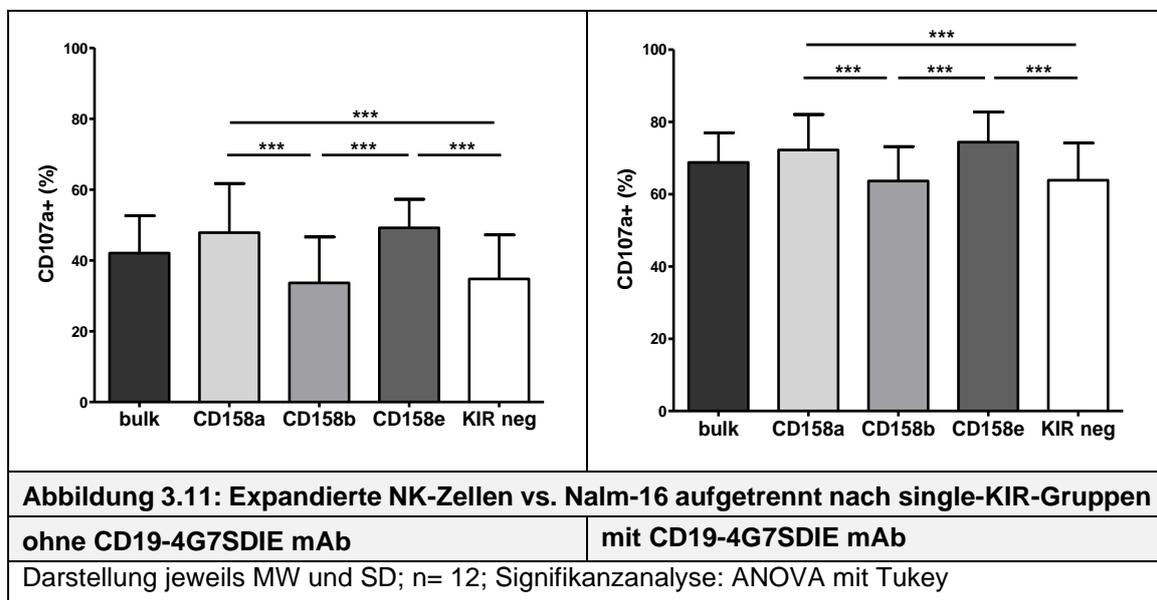
3.4.1 KIR-Ligand Mismatch

Um den Einfluss des KIR-Ligand Mismatch auf die NK-Zell-Aktivität zu untersuchen, wurden im FACS-Assay die KIR-Rezeptoren der NK-Zellen nach der Inkubation mit den Targets gefärbt. So konnten die NK-Zellen in single-KIR-tragende Zellen unterteilt und die Unterschiede in der Aktivierung zwischen den einzelnen Gruppen dargestellt werden.

Der Durchschnitt aller NK-Zellen (bulk) erreicht ohne CD19-4G7SDIE mAb eine CD107a-Aktivität mit einem MW von 29% und mit CD19-4G7SDIE mAb einen MW von 65%. Die Gruppe mit der höchsten CD107a-Aktivität ist in beiden Ansätzen die der single-158a-positiven Zellen mit einem MW von 36% / 71%, wobei der Unterschied zu allen anderen Gruppen jeweils signifikant ist. Eine erhöhte CD107a-Aktivität erreicht außerdem die Gruppe der single-CD158e-positiven NK-Zellen mit einem MW von 29% / 67%. Hier ist der Unterschied beim Ansatz mit CD19-4G7SDIE mAb im Vergleich zu den anderen single-KIR-Gruppen, nicht jedoch zu den bulk Zellen signifikant (vgl. Abbildung 3.10: Frische NK-Zellen vs. Nalm-16 aufgetrennt nach single-KIR-Gruppen; Abbildung 3.10).



Auch bei der CD107a-Aktivität von expandierten NK-Zellen versus Nalm-16 zeigen sich zwischen den single-KIR-Gruppen signifikante Unterschiede. Hier erreicht die Gruppe der single-CD158a-positiven NK-Zellen Mittelwerte von 47,8% und 72,2%. Bei den single-CD158e-positiven NK Zellen liegen diese bei 49,2% und 74,4%. Der Unterschied zur Gruppe der single-CD158b-positiven NK-Zellen (MW 33,7% / 63,6%) und zur Gruppe der KIR-negativen NK-Zellen (MW 34,7% / 63,8%) ist mit $p < 0,0005$ signifikant. Sowohl mit als auch ohne CD19-4G7SDIE mAb weisen die single-CD158a und die single-CD158e Gruppe jeweils höhere Aktivitätswerte als die single-CD158b und die KIR-negative Gruppe auf. Mittelwerts-Unterschiede zur bulk-Gruppe sind vorhanden, allerdings nicht signifikant (vgl. Abbildung 3.11).



3.4.2 Effekt der HLA-I-Expressionsstärke

Zur weiteren Untersuchung der Höhe des Einflusses der HLA-I Expression auf Target-Zellen wurde die HLA-I Expression auf der Zelllinie Nalm-16 vor dem CD107a-Assay manipuliert.

Durch Stimulation mit IFN- γ (vgl. Kapitel 2.2.5.1) konnte die HLA-I Expression auf Nalm-16 deutlich gesteigert werden. Nach Blockade mit dem Antikörper w6/32 konnte nur noch eine geringe HLA-I Expression auf den Zellen gemessen werden (s. Abbildung 3.12).

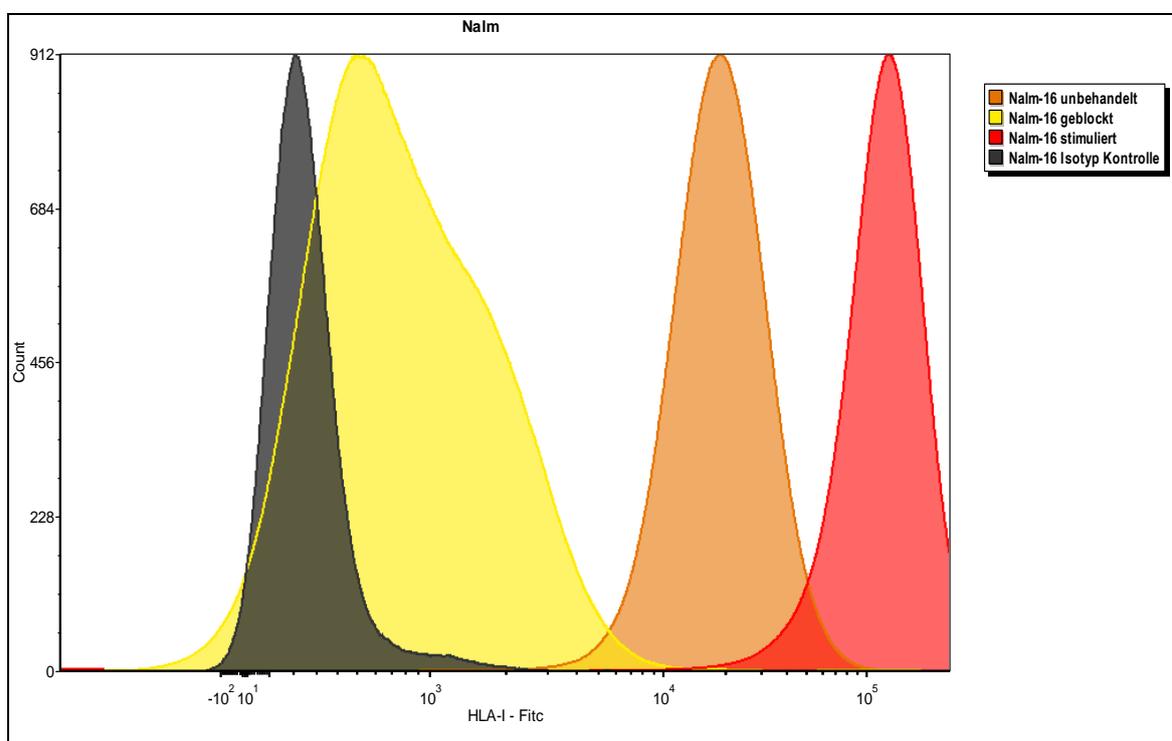


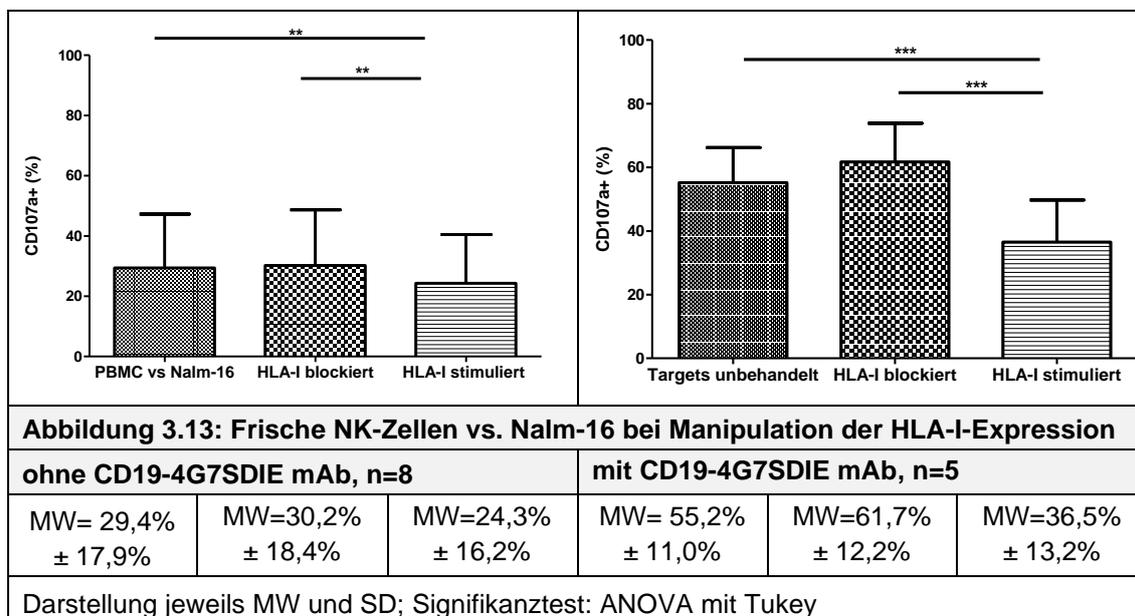
Abbildung 3.12: HLA-I-Expression auf Nalm-16

Im Histogramm aufgetragen ist die HLA-I Expression von Nalm-16 unbehandelt (orange), nach HLA-I Stimulation (rot) und nach HLA-I Blockade (gelb). Gemessen wurde in einem gemeinsamen FACS-Assay mittels HLA-I Antikörper markiert mit dem Fluorophor FITC.

Das Histogramm ist für eine bessere Darstellung der unterschiedlichen Spitzenwerte normalisiert. Die Darstellung auf der x-Achse ist logarithmisch.

Ohne Manipulation der HLA-I-Expression der Targets waren durchschnittlich 29,4% der frischen NK-Zellen CD107a positiv. Bei vorangegangener HLA-I Blockade lag der MW bei 30,2%, nach vorheriger Stimulation der HLA-I Expression bei 24,3%. Der Unterschied zwischen dem Ansatz mit stimulierten Targets jeweils zu den anderen Ansätzen ist signifikant.

Bei Zugabe von CD19-4G7SDIE mAb in die Ansätze betrug der MW der NK-Zellen im Ansatz mit unbehandelten Targets 55,2%, im Ansatz mit blockierten Targets 61,7% und bei stimulierten Targets 36,5%. Auch hier ist der Unterschied zwischen dem Ansatz mit stimulierten Targets und den anderen beiden Ansätzen jeweils hoch signifikant.



Beim selben Versuchsaufbau mit expandierten NK-Zellen zeigte sich, dass ohne Manipulation der HLA-I-Expression durchschnittlich 41,5% der NK-Zellen CD107a-positiv waren. Bei vorangegangener HLA-I-Blockade lag der MW bei 55,3%, bei vorangegangener Stimulation der HLA-I-Expression bei 27,4%. Allein der Unterschied zwischen dem Ansatz mit HLA-I blockierten Targets zum Ansatz mit HLA-I stimulierten Targets ist jedoch signifikant (vgl. Abbildung 3.14).

Bei Zugabe von CD19-4G7SDIE mAb in die Ansätze betrug der MW der expandierten NK-Zellen im Ansatz mit unbehandelten Targets 68,2%, im Ansatz mit blockierten Targets 72,9% und bei stimulierten Targets 51,8%. Im ANOVA-Test mit Tukey ist allerdings keiner dieser Unterschiede signifikant.

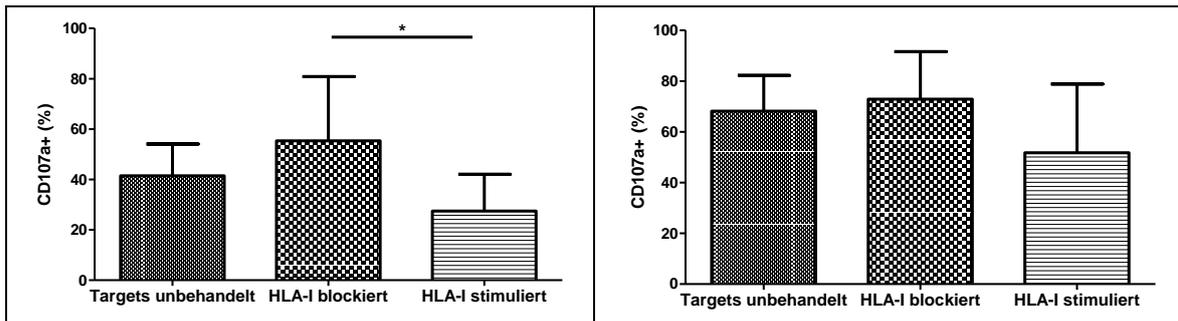


Abbildung 3.14: Expandierte NK-Zellen vs. Nalm-16 bei Manipulation der HLA-I-Expression

ohne CD19-4G7SDIE mAb			mit CD19-4G7SDIE mAb		
MW= 41,5% ± 12,5%	MW=55,3% ± 25,49%	MW=27,4% ± 14,61%	MW= 68,2% ± 14,1%	MW=72,9% ± 18,8%	MW=51,8% ± 27,1%

n=3; Darstellung jeweils MW und SD; Signifikanztest: ANOVA mit Tukey

Allein der Unterschied zwischen dem Ansatz mit HLA-I blockierten Targets zum Ansatz mit HLA-I stimulierten Targets ist im ANOVA-Test mit Tukey mit $p < 0,05$ signifikant.

Untersucht man die NK-Zellen in single-KIR-tragenden Gruppen getrennt, so zeigen sich sowohl bei frischen als auch bei expandierten NK-Zellen jeweils mit HLA-I-Stimulation oder HLA-I-Blockade meist ähnliche Aktivitätsunterschiede zwischen den single-KIR-Gruppen wie ohne Manipulation (vgl. Abb. 3.15 & 3.16).

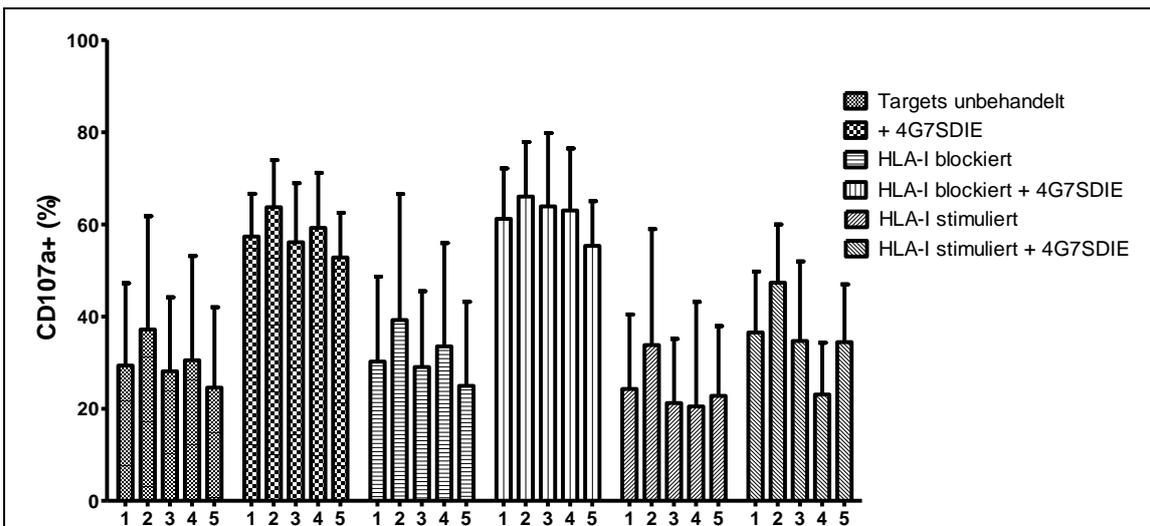


Abbildung 3.15: Frische NK-Zellen vs. Nalm-16 mit HLA-I Manipulation, aufgetrennt nach single-KIR-Gruppen

- 1) Alle NK-Zellen
- 2) Single-CD158a-positive NK-Zellen
- 3) Single-CD158b-positive NK-Zellen
- 4) Single-CD158e-positive NK-Zellen
- 5) KIR-negative NK-Zellen

n=8; Darstellung jeweils MW und SD

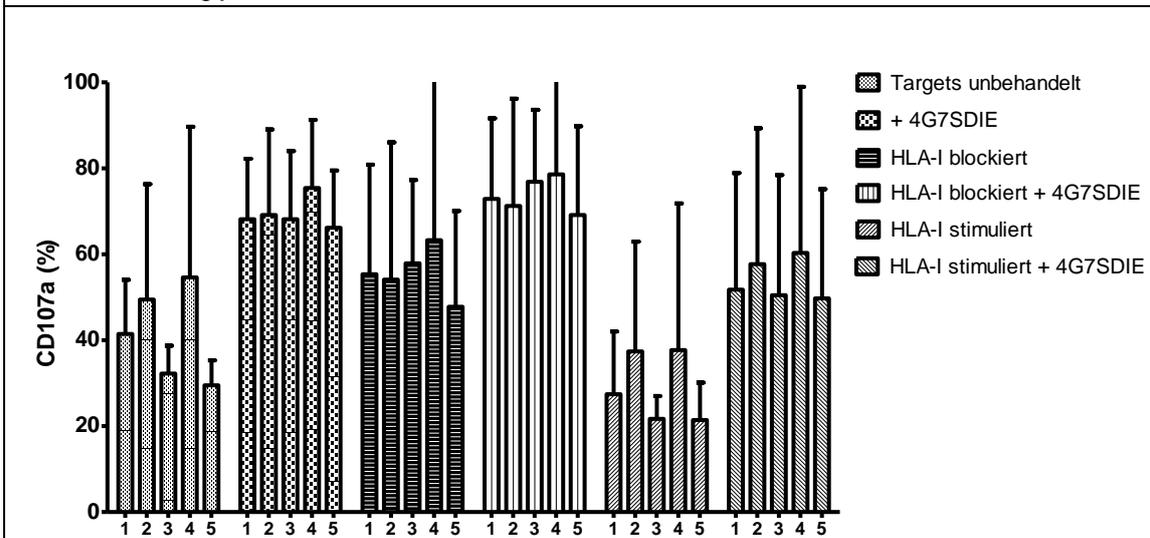


Abbildung 3.16: Expandierte NK-Zellen vs. Nalm-16 mit HLA-I Manipulation, aufgetrennt nach single-KIR-Gruppen

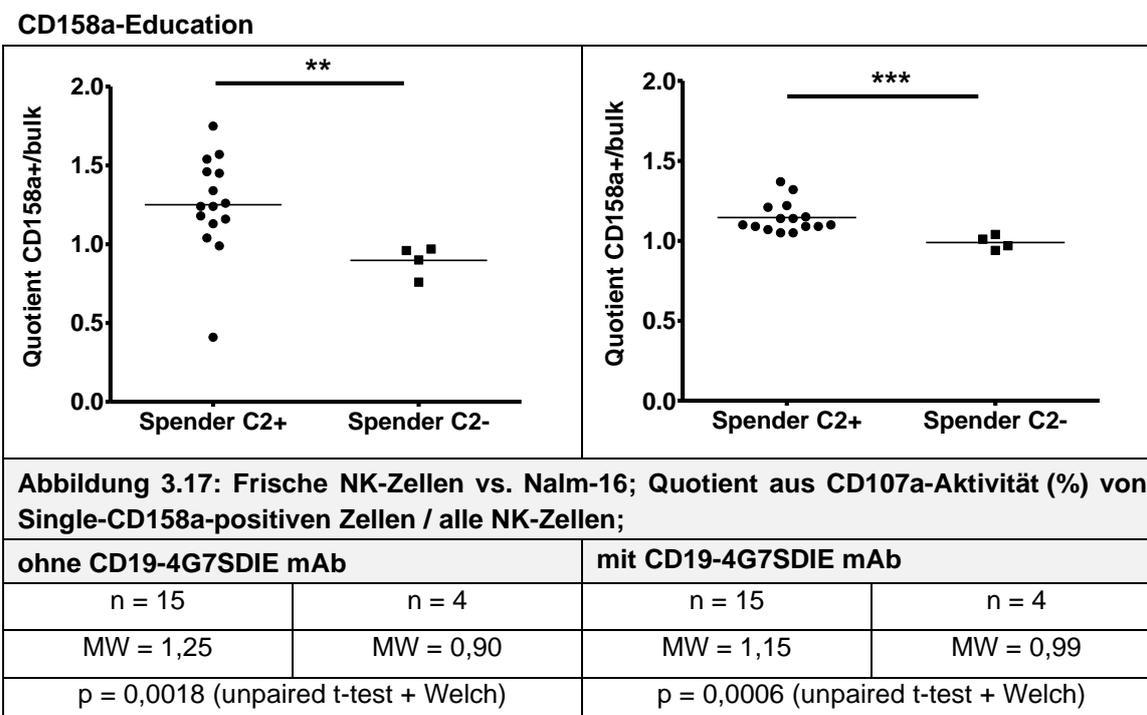
- 1) Alle NK-Zellen
- 2) Single-CD158a-positive NK-Zellen
- 3) Single-CD158b-positive NK-Zellen
- 4) Single-CD158e-positive NK-Zellen
- 5) KIR-negative NK-Zellen

n=4; Darstellung jeweils MW und SD

3.4.3 Einfluss der HLA-Education

Um den Einfluss der HLA-Education zu untersuchen, wurden die Spender danach eingeteilt, ob sie die entsprechenden Liganden für die untersuchten KIR-Rezeptoren tragen. Nun wurde die CD107a-Aktivität der single-KIR-tragenden NK-Zellen der Spender mit passendem Ligand mit denen der Spender ohne passenden Ligand vs. Nalm-16 verglichen, wobei zur besseren Vergleichbarkeit der Quotient aus der Aktivität der Zellen und der Aktivität der bulk-Gruppe benutzt wurde.

Bei den frischen NK-Zellen zeigen sich bei allen KIR-Rezeptoren Unterschiede in der CD107a-Aktivität zwischen den Gruppen mit und ohne passenden Liganden. Hierbei ist durchweg der MW der Quotienten der Gruppe der Spender ohne passenden Liganden <1 und damit gleichzeitig kleiner als der MW der Spender mit passenden Liganden für den betreffenden KIR-Rezeptor. Die Differenz ist jeweils im Ansatz mit CD19-4G7SDIE mAb geringer als ohne Antikörper. Insgesamt sind die Differenzen bei der Untersuchung der CD158e-Education am geringsten. Nicht in allen Konstellationen konnte jedoch ein Signifikanzniveau von $<0,05$ erreicht werden (vgl. Abb. 3.17 – 3.19).



Single 158b-Education

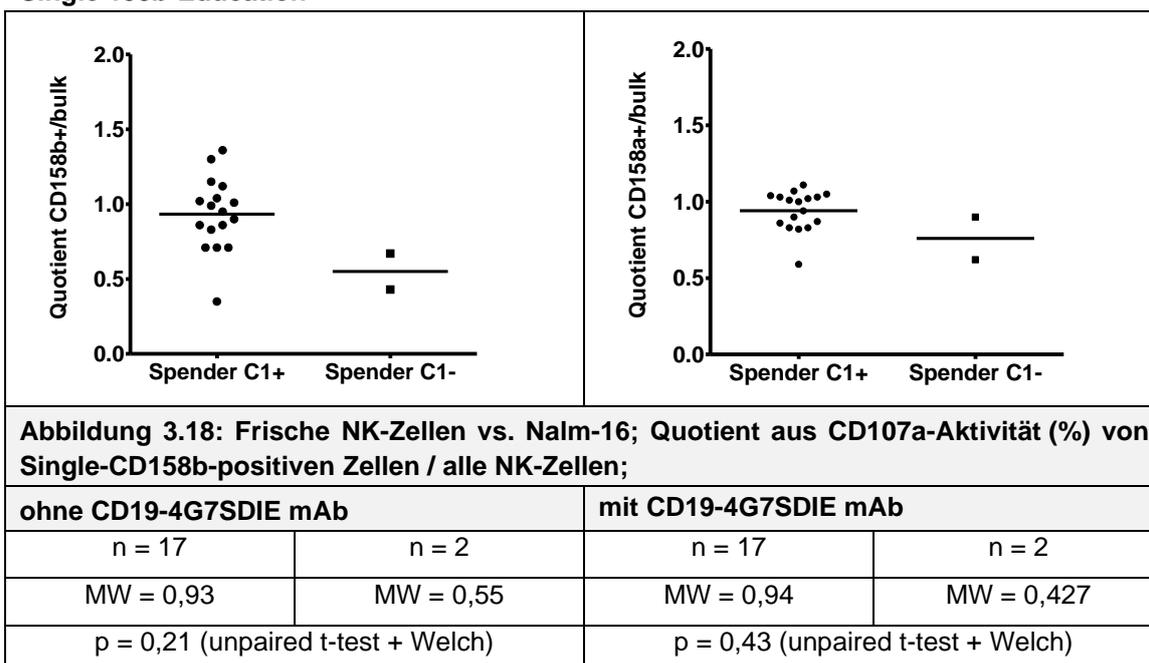


Abbildung 3.18: Frische NK-Zellen vs. Nalm-16; Quotient aus CD107a-Aktivität (%) von Single-CD158b-positiven Zellen / alle NK-Zellen;

Single CD158e-Education

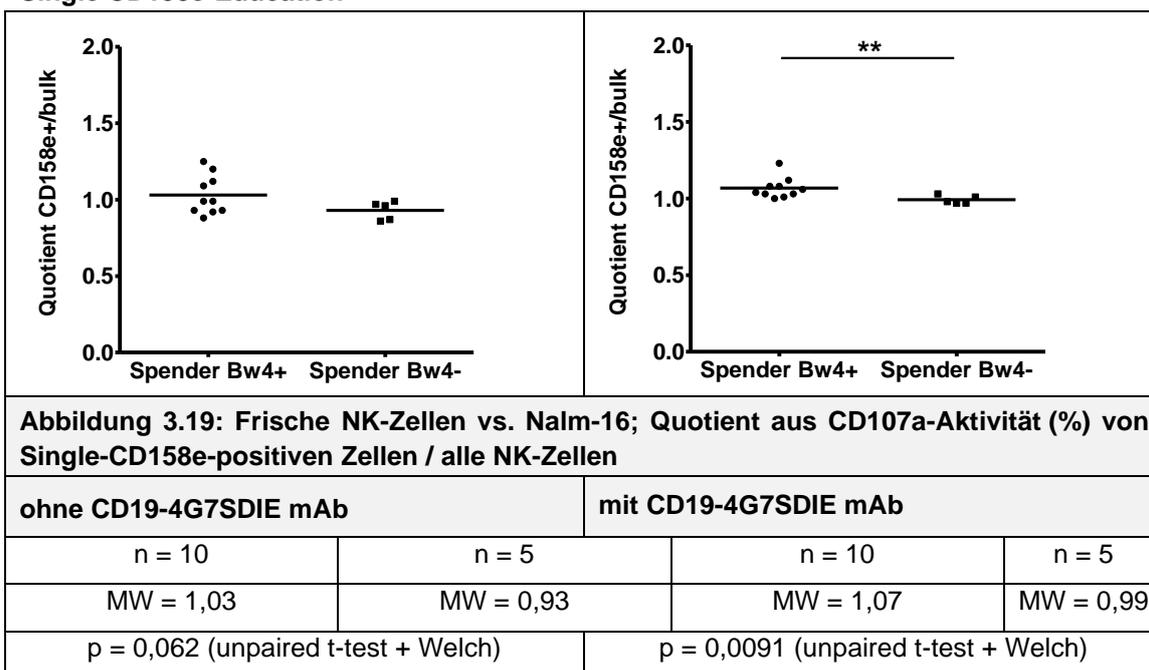
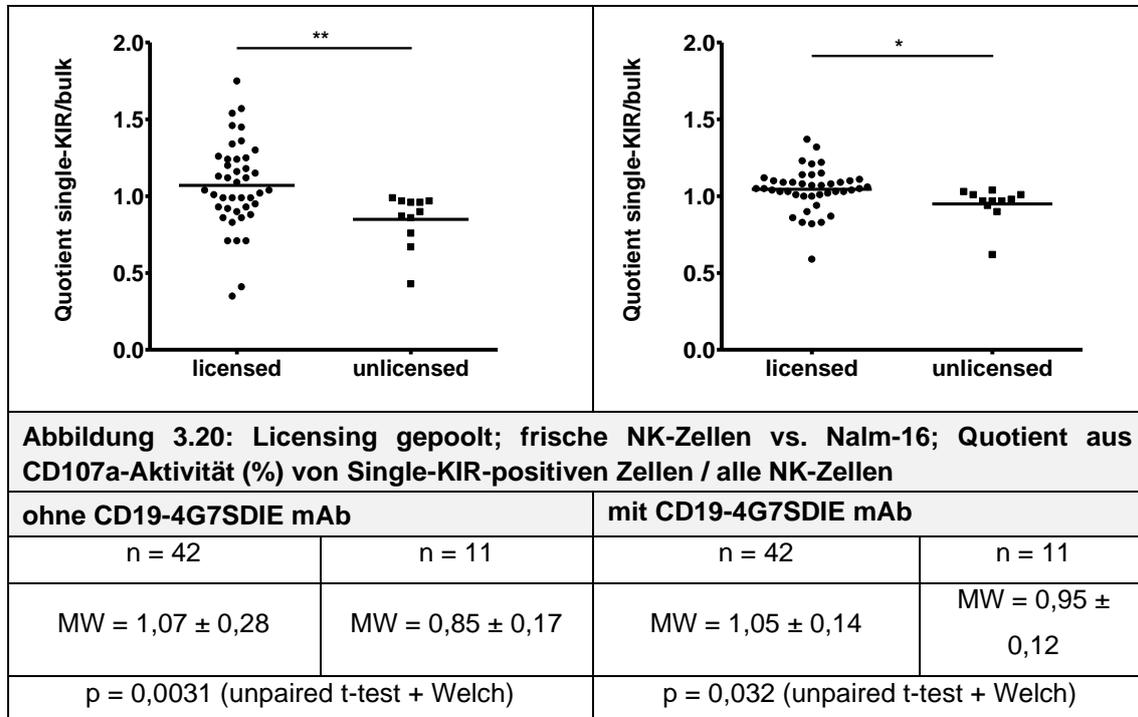


Abbildung 3.19: Frische NK-Zellen vs. Nalm-16; Quotient aus CD107a-Aktivität (%) von Single-CD158e-positiven Zellen / alle NK-Zellen

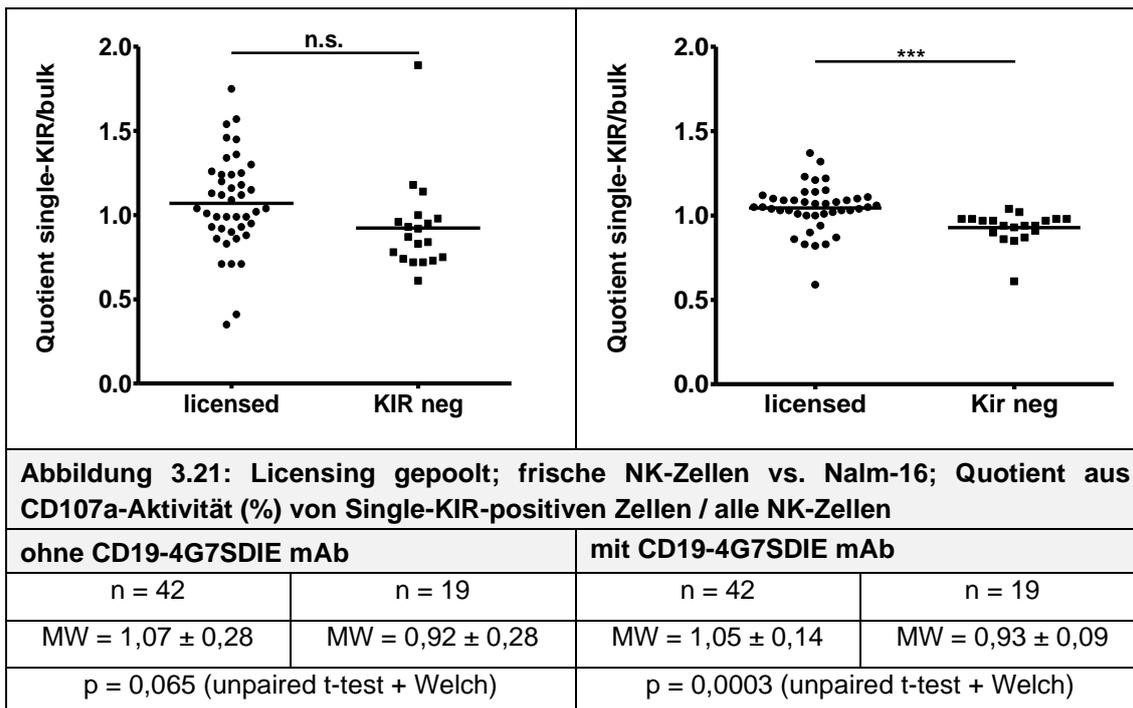
Um die grundsätzliche KIR-Rezeptor-unabhängige Rolle des Licensings bei frischen NK-Zellen zu untersuchen, wurden die CD107a-Aktivitätsquotienten für alle 3 KIR-Rezeptoren gepoolt. Hier zeigten die frischen NK-Zellen aus educated KIR-Populationen ohne Zugabe des CD19-4G7SDIE mAb einen MW der Quotienten von 1,07. Mit CD19 mAb lag der Quotient bei einem MW von 1,05. Der MW bei den uneducated KIR-Populationen lag bei 0,85 ohne CD19 mAb und

0,95 mit dem mAb. Sowohl mit als auch ohne CD19-4G7SDIE mAb-Zugabe waren die Unterschiede zwischen beiden Gruppen signifikant (vgl. Abbildung 3.20).

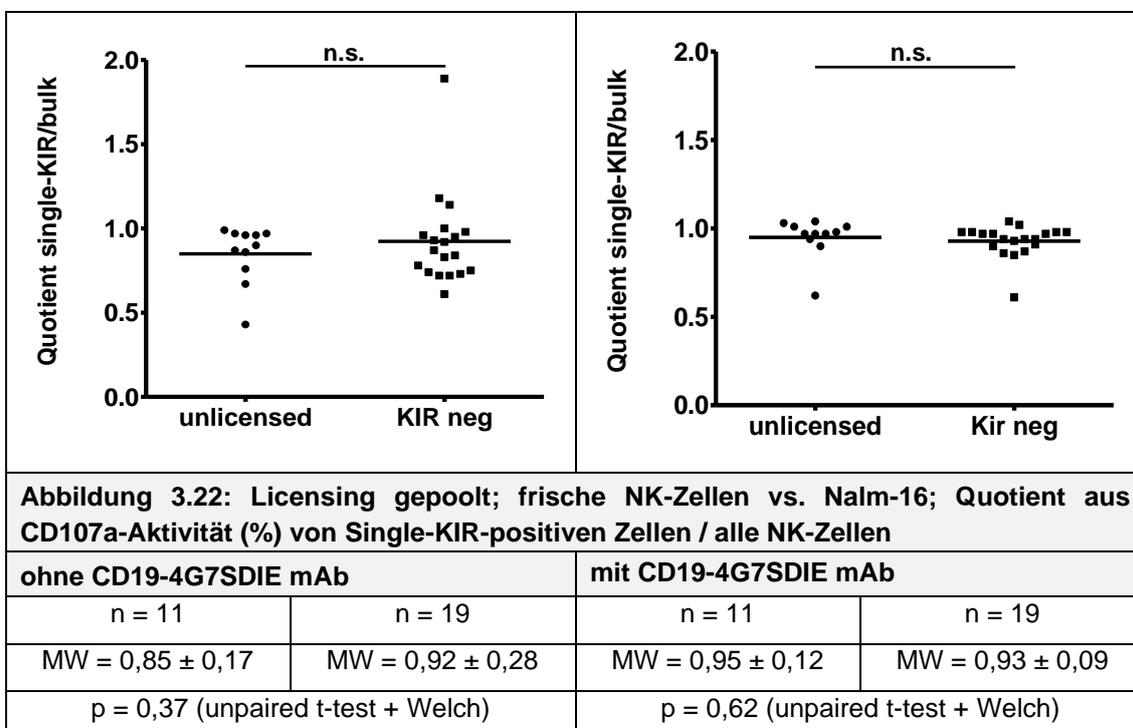


Außerdem wurde die NK-Zell-Aktivität der Gruppe von frischen NK-Zellen ohne KIR-Rezeptor jeweils mit der Aktivität der licensed und der unlicensed NK-Zellen verglichen.

Es zeigte sich, dass frische NK-Zellen der KIR-negativen NK-Zell-Population ohne CD19-4G7SDIE mAb im Mittel einen CD107a-Aktivitätsquotient von 0,92 aufwiesen. Mit CD19 mAb Zugabe war dieser Quotient bei 0,93. Im Vergleich mit den Werten der licensed NK-Zellen stellten sich die Unterschiede nach Zugabe des CD19 mAb als signifikant dar (vgl. Abb. 3.21).



Im Vergleich frischer uneducated NK-Zellen gegenüber KIR-negativer NK-Zellen zeigte sich sowohl mit als auch ohne CD19-4G7SDIE mAb ein geringer Aktivitätsunterschied, welcher jeweils nicht signifikant ist (vgl. Abb. 3.22).



Betrachtet man auf dieselbe Weise die Ergebnisse der expandierten NK-Zellen, so zeigt sich, dass sowohl mit als auch ohne CD19-4G7SDIE mAb der CD107a-Aktivitätsquotient der uneducated NK-Zellen für CD158a und CD158b geringer als der Quotient der educated NK-Zellen ist. Die Unterschiede sind allerdings in keiner der Konstellationen signifikant (vgl. Abb. 3.23 & 3.24).

Single CD158a positive NK-Zellen

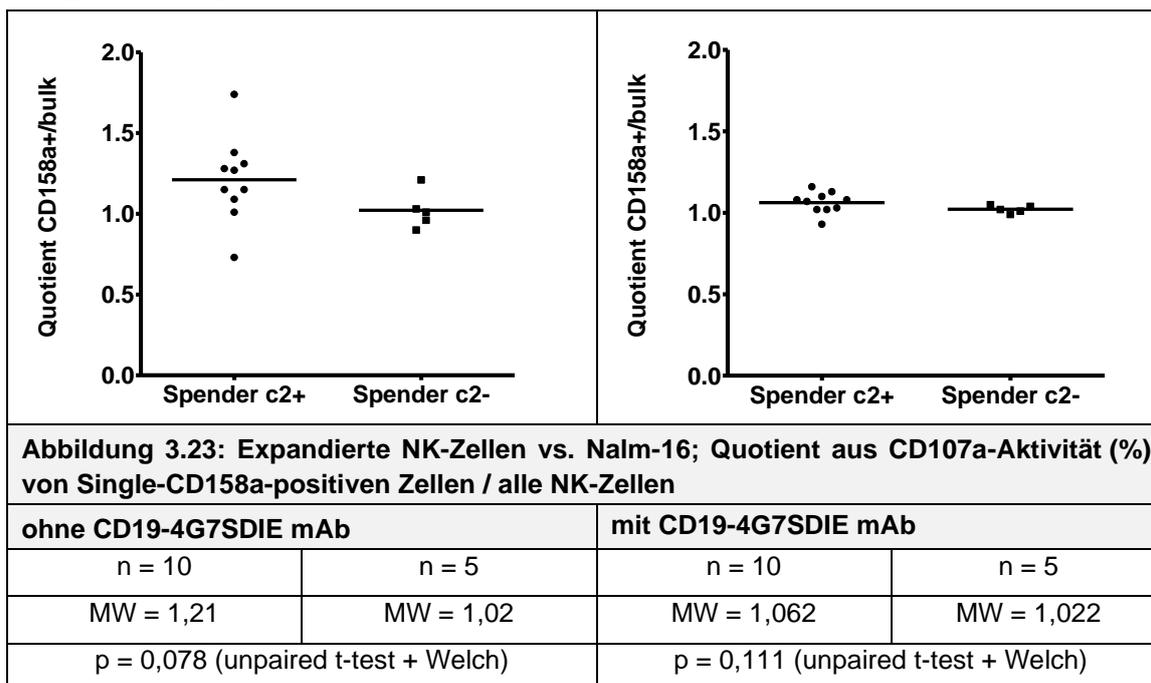


Abbildung 3.23: Expandierte NK-Zellen vs. Nalm-16; Quotient aus CD107a-Aktivität (%) von Single-CD158a-positiven Zellen / alle NK-Zellen

Single CD158b positive NK-Zellen

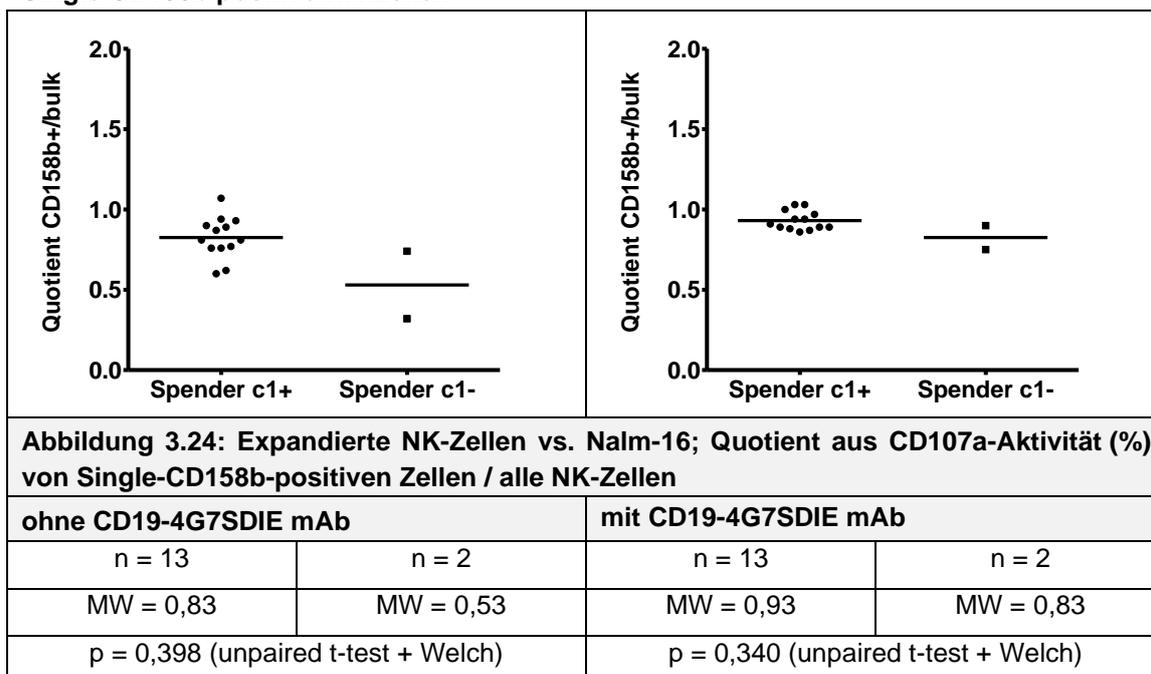
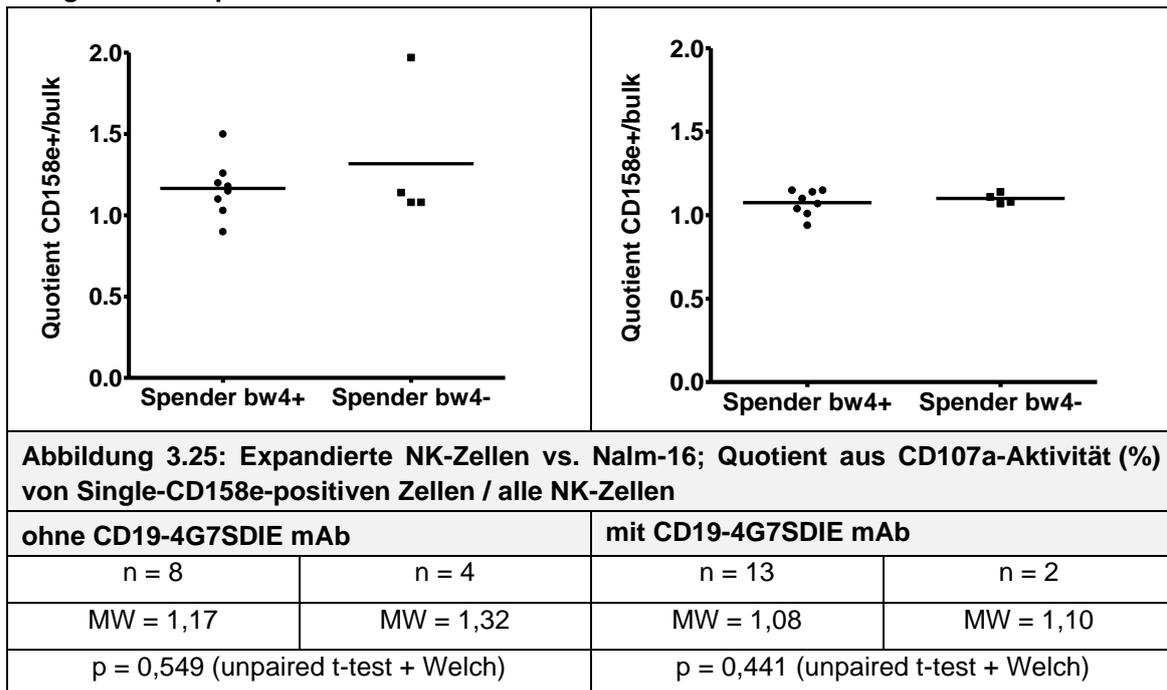


Abbildung 3.24: Expandierte NK-Zellen vs. Nalm-16; Quotient aus CD107a-Aktivität (%) von Single-CD158b-positiven Zellen / alle NK-Zellen

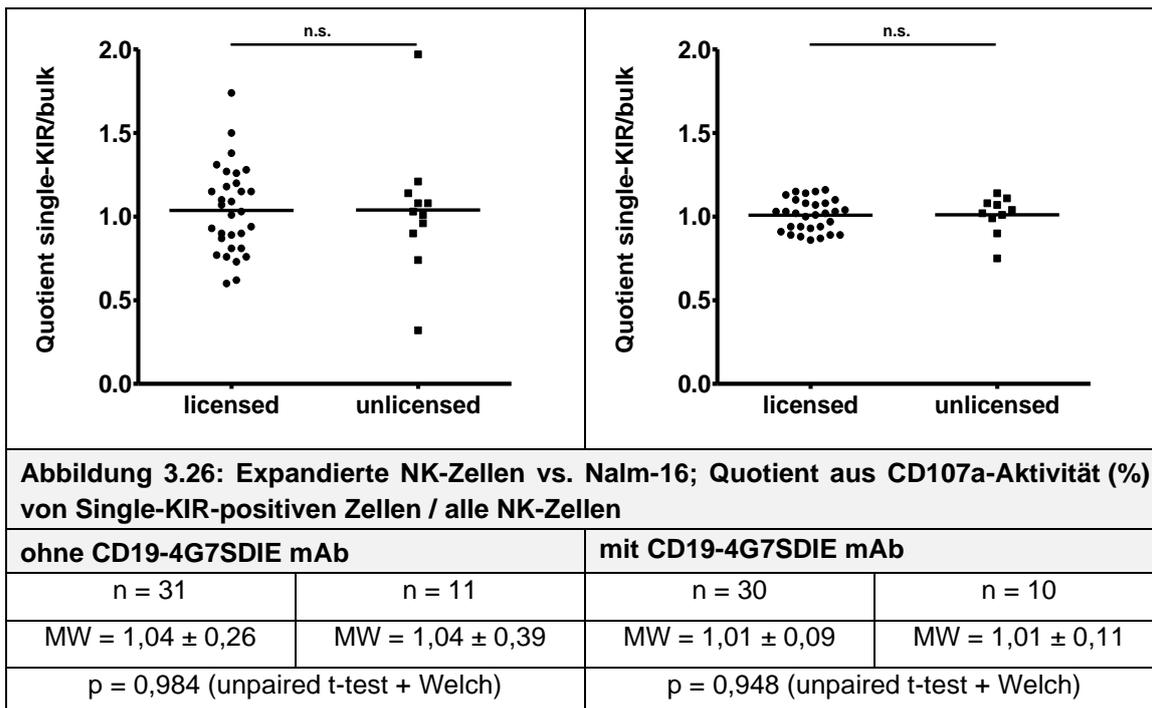
Bei der Untersuchung der CD158e-Education zeigte sich ein umgekehrtes Bild. Hier lag der CD107a-Aktivitätsquotient der bw4-positiven Gruppe ohne CD19-4G7SDIE mAb Zugabe bei 1,17 und mit CD19 mAb Zugabe bei 1,08. Der Quotient der unlicensed Gruppe lag hingegen bei 1,32 mit sowie bei 1,10 ohne 4G7SDIE-Zugabe. Auch diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (vgl. Abb. 3.25).

Single CD158e positive NK-Zellen



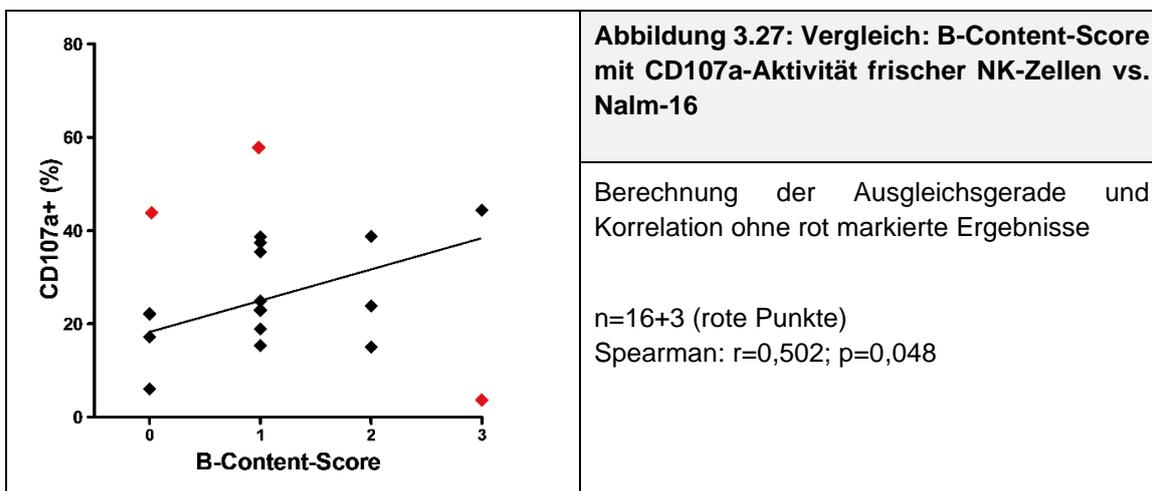
Um auch bei expandierten NK-Zellen die grundsätzliche, KIR-Rezeptor-unabhängige Rolle des Licensings zu untersuchen, wurden wiederum die CD107a-Aktivitätsquotienten für alle 3 KIR-Rezeptoren gepoolt.

Es zeigten sich sowohl mit als auch ohne 4G7SDIE-Zugabe keine Unterschiede zwischen den Mittelwerten von licensed und unlicensed expandierten NK-Zellen (vgl. Abb. 3.26).



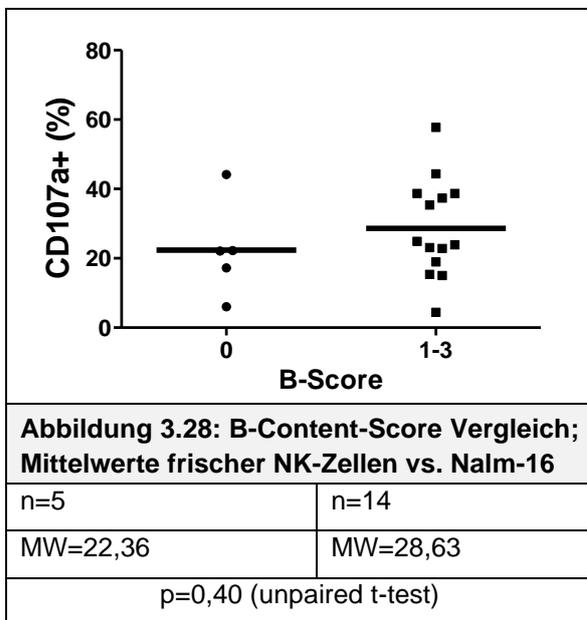
3.4.4 B-Content-Score (Gen-Gen-Modell)

Um den Einfluss des KIR-Rezeptor-Repertoires der Spender auf die antileukämische Aktivität der NK-Zellen zu untersuchen, wurden die Spender KIR-genotypisiert und gemäß dem B-Content-Score eingeteilt (vgl. Tabelle 3.1).



Aus Abb. 3.27 wird ersichtlich, dass die CD107a-Aktivität frischer NK-Zellen mit zunehmendem Score-Ergebnis zuzunehmen scheint. Gleichzeitig sind die CD107a-Aktivitäten auch innerhalb der Score Gruppen noch sehr unterschiedlich. Betrachtet man die Ergebnisse genauer, so fallen drei Ausreißer

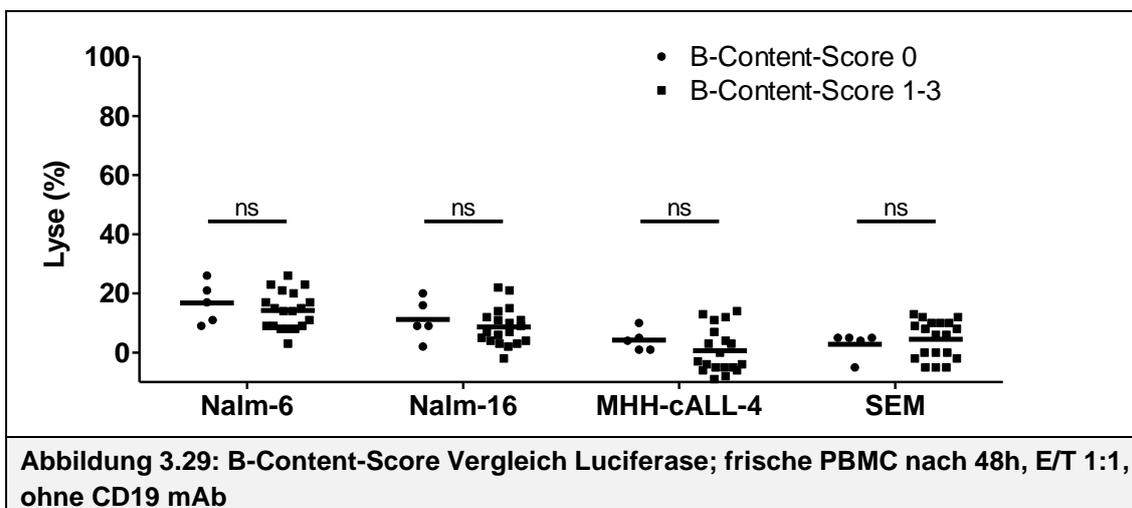
aus ihren jeweiligen Gruppen auf (rote Punkte), die sich allesamt um mehr als 15 Prozentpunkte vom nächsten Ergebnis ihrer Gruppe unterscheiden. Lässt man diese Ergebnisse in der Analyse außen vor, so findet sich zwischen CD107a-Aktivität und B-Content-Score-Einteilung eine positive Korrelation.



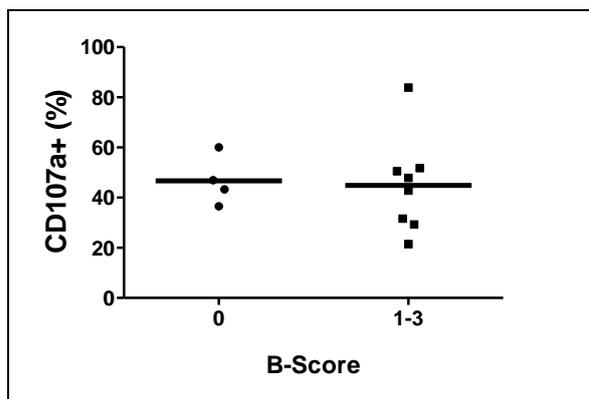
Teilt man die Spender in eine Gruppe mit dem B-Content-Score von 0 (5 Spender) und in eine Gruppe mit einem Score zwischen 1-3 (14 Spender), so zeigt sich ein Unterschied zwischen den Mittelwerten der CD107a-Aktivitäten von frischen NK-Zellen in beiden Gruppen. Der MW der Gruppe aller Spender mit dem B-Content-Score von 0 beträgt 22,4%. Der MW der Gruppe mit einem Score von 1-3 liegt

hingegen bei 28,6%. Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant (vgl. Abb. 3.28).

Unterscheidet man bei den Ergebnissen der Luciferase-Assays zwischen oben genannten Gruppen, so findet sich in der Lyse durch PBMC bei keiner der untersuchten BCP-ALL-Zelllinien ein signifikanter Unterschied zwischen den B-Content-Score Gruppen (vgl. Abb. 3.29).



Beim Vergleich der CD107a-Aktivität expandierter NK-Zellen zwischen der



Gruppe mit einem B-Content-Score von 0 (5 Spender) und der Gruppe von Spendern mit einem B-Content-Score zwischen 1-3 (8 Spender) zeigt sich ein geringer Unterschied, welcher nicht signifikant ist (vgl. Abb. 3.30).

Abbildung 3.30: B-Content-Score Vergleich Mittelwerte expandierter NK-Zellen vs. Nalm-16

n=5

n=8

MW=46,72

MW=44,90

p=0,86 (unpaired t-test)

Auch bei den Luciferase-Assays mit expandierten NK-Zellen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Lyse der untersuchten Target-Zelllinien zwischen den beiden B-Content-Score-Gruppen (vgl. Abb. 3.31).

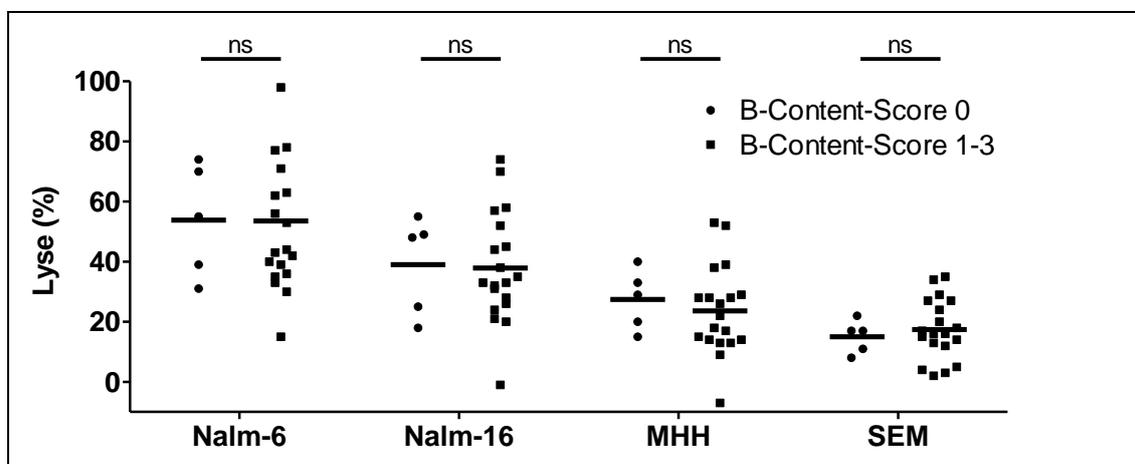


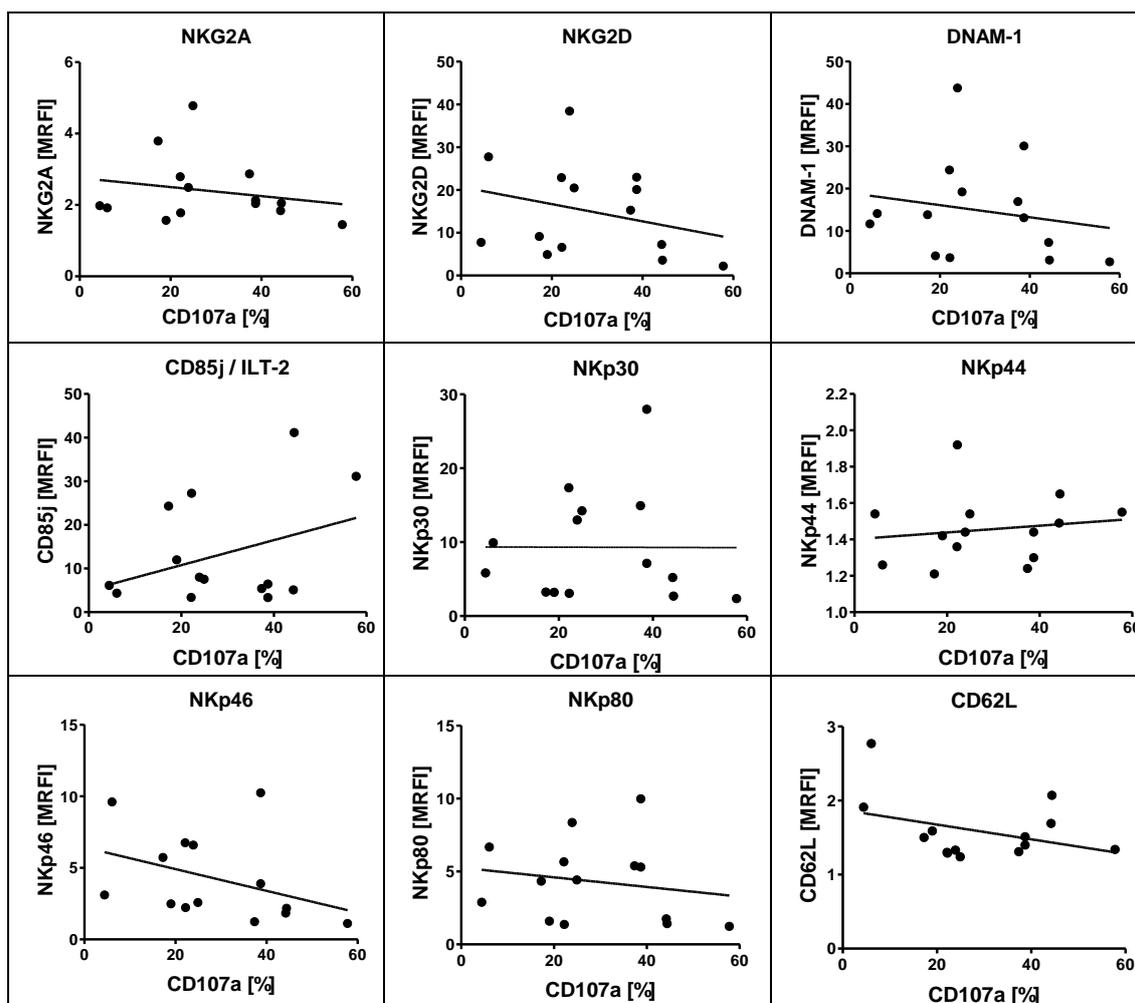
Abbildung 3.31: B-Content-Score Vergleich Luciferase exp. NK-Zellen nach 48h, E/T 1:1, ohne CD19 mAb

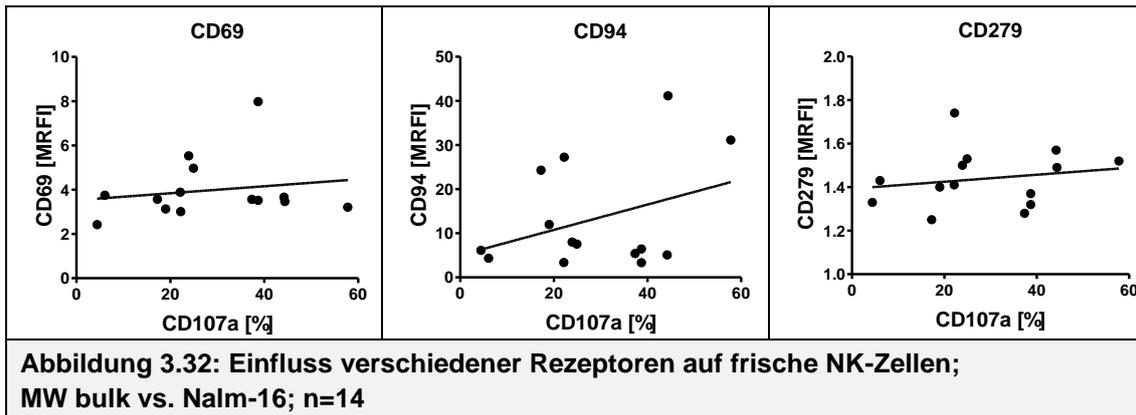
3.5 Einfluss der aktivierenden/inhibierenden Rezeptoren

3.5.1 Einfluss auf die Aktivität frischer NK-Zellen

Um den Einfluss von einzelnen aktivierenden und inhibierenden NK-Zell-Rezeptoren zu analysieren, wurden die Mittelwerte der CD107a-Aktivität zusammen mit dem MRFI der getesteten Spender in eine Grafik eingetragen, eine Ausgleichsgerade berechnet und die Ergebnisse auf eine Korrelation hin untersucht.

Insgesamt zeigt sich in den Schaubildern eine große Streubreite der Ergebnisse (vgl. Abb. 3.32). Im Pearson-Test ergab sich für keinen Rezeptor eine Korrelation zwischen der Höhe der MRFI und der Höhe der CD107a-Aktivität der frischen NK-Zellen.





Zur weiteren Untersuchung des Einflusses der wichtigen aktivierenden Rezeptoren NKG2D und DNAM-1 wurden diese in einem CD107a-Assay mit frischen NK-Zellen zweier Spender per Antikörper blockiert. Hier kam es nach Blockade beider Rezeptoren jeweils zu einer Verminderung der NK-Zell-Aktivität gegenüber der kindlichen ALL-Zelllinie Nalm-16. So kam es im Ansatz mit Nalm-16 ohne CD19-4G7SDIE mAb nach Blockade von je NKG2D oder DNAM-1 zu einer relativen Aktivitätsreduktion von 34% und 64%. Waren beide Rezeptoren im gleichen Ansatz blockiert, so kam es zu einer relativen Reduktion von 72%, welche im Test mit $p < 0,005$ signifikant war (vgl. Abb. 3.33).

Auch nach Zugabe des CD19 mAb war die NK-Zell-Aktivität nach der Rezeptor-Blockade jeweils vermindert. Nach der einzelnen Blockade der Rezeptoren kam es zu einer relativen Aktivitätsreduktion von 12% (NKG2D) und 33% (DNAM-1). Nach Blockade der beiden Rezeptoren gemeinsam reduzierte sich die Aktivität um 43%. Im Ansatz mit CD19-4G7SDIE mAb waren alle Unterschiede stark signifikant mit mindestens $p < 0,005$ (vgl. Abb. 3.33, linke Seite).

Derselbe Versuchsaufbau wurde für eine bessere Übertragbarkeit der Ergebnisse mit der Zelllinie SEM durchgeführt. Hier kam es nach Blockade der Rezeptoren ebenfalls zur Aktivitätsreduktion der NK-Zellen, welche sich allerdings nicht so ausgeprägt wie mit Nalm-16 als Target darstellte (vgl. Abb. 3.33, rechte Seite).

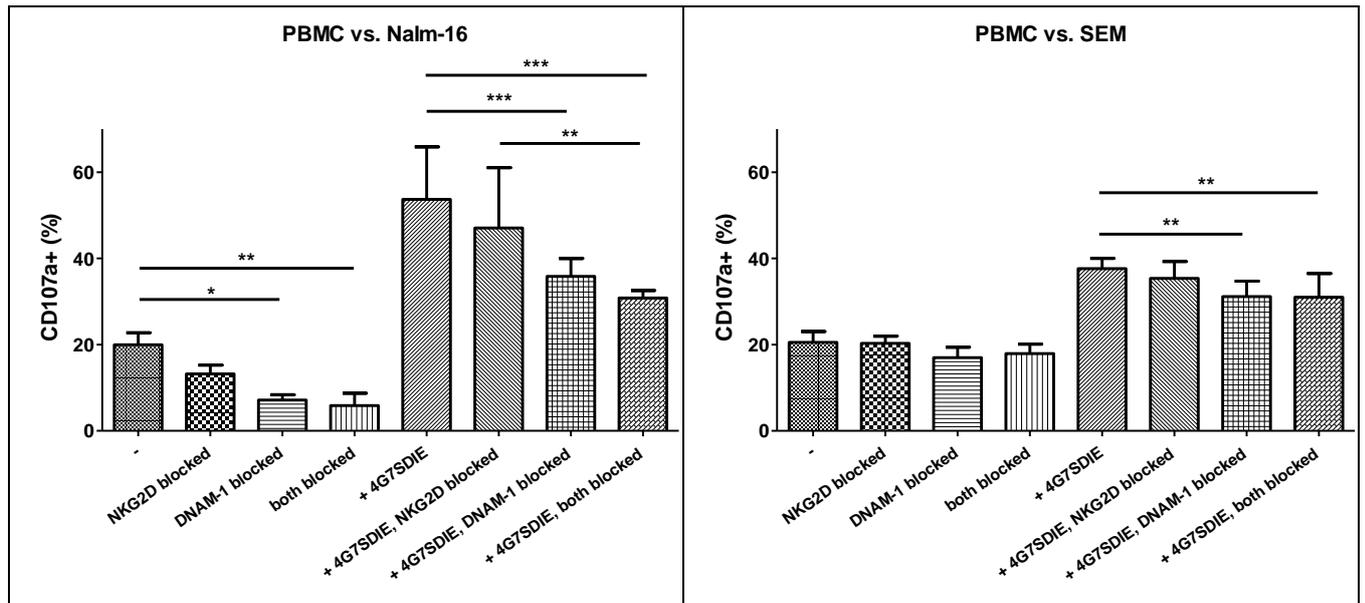


Abbildung 3.33: CD107a-Aktivität frischer NK-Zellen mit NKG2D/DNAM-1 Blockade

MW frischer NK-Zellen vs. Nalm-16 / SEM mit SD; n=2; Signifikanztest: One-way ANOVA mit Tukey

Betrachtet man hier die NK-Zell-Aktivität nach single-KIR-Gruppen aufgetrennt, so zeigen sich bei frischen PBMC sowohl versus Nalm-16 als auch gegen SEM in allen Konditionen CD107a-Aktivitätsunterschiede zwischen den single-KIR-Gruppen. Bei frischen PBMC vs. Nalm-16 ist in allen Konditionen die single-KIR-158a-positive Fraktion der NK Zellen die Gruppe mit der stärksten CD107a-Aktivität (vgl. Abb. 3.34).

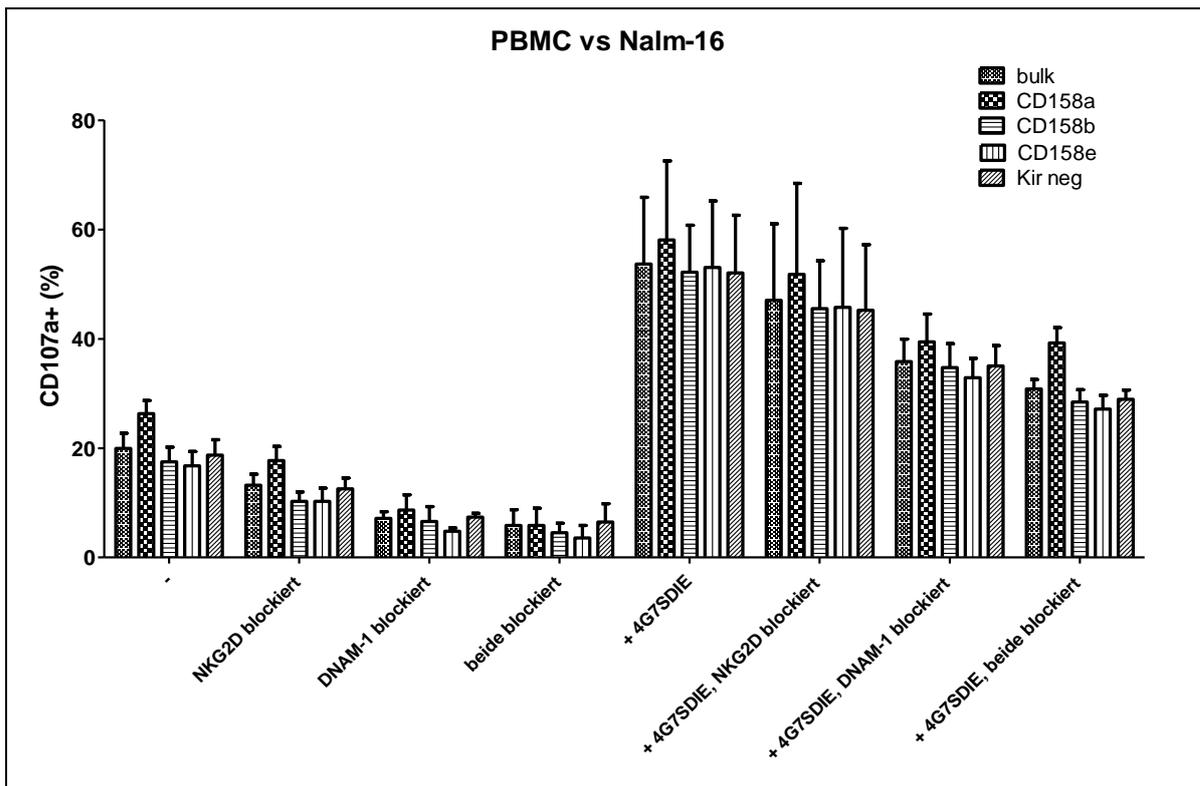


Abbildung 3.34: CD107a-Aktivität frischer NK-Zellen mit NKG2D/DNAM-1 Blockade nach KIR-Gruppen; n=2

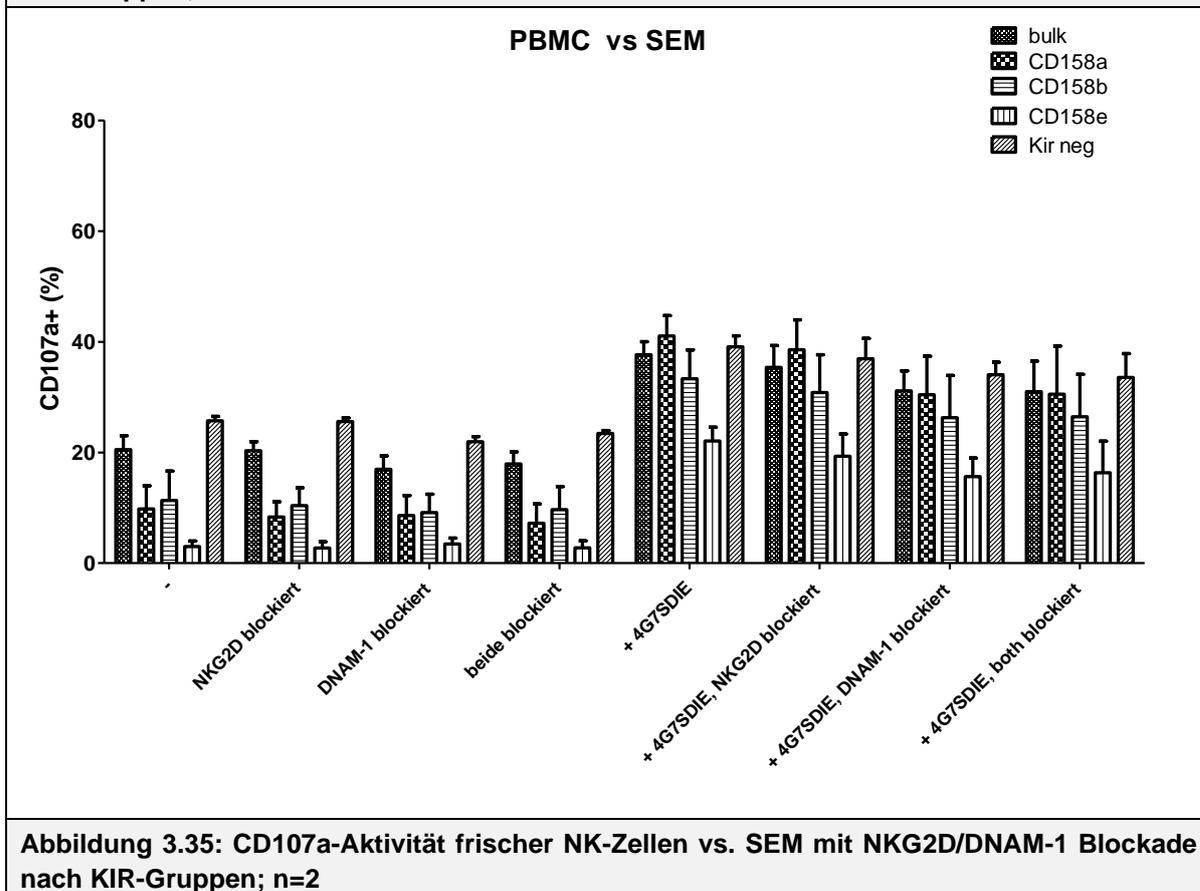
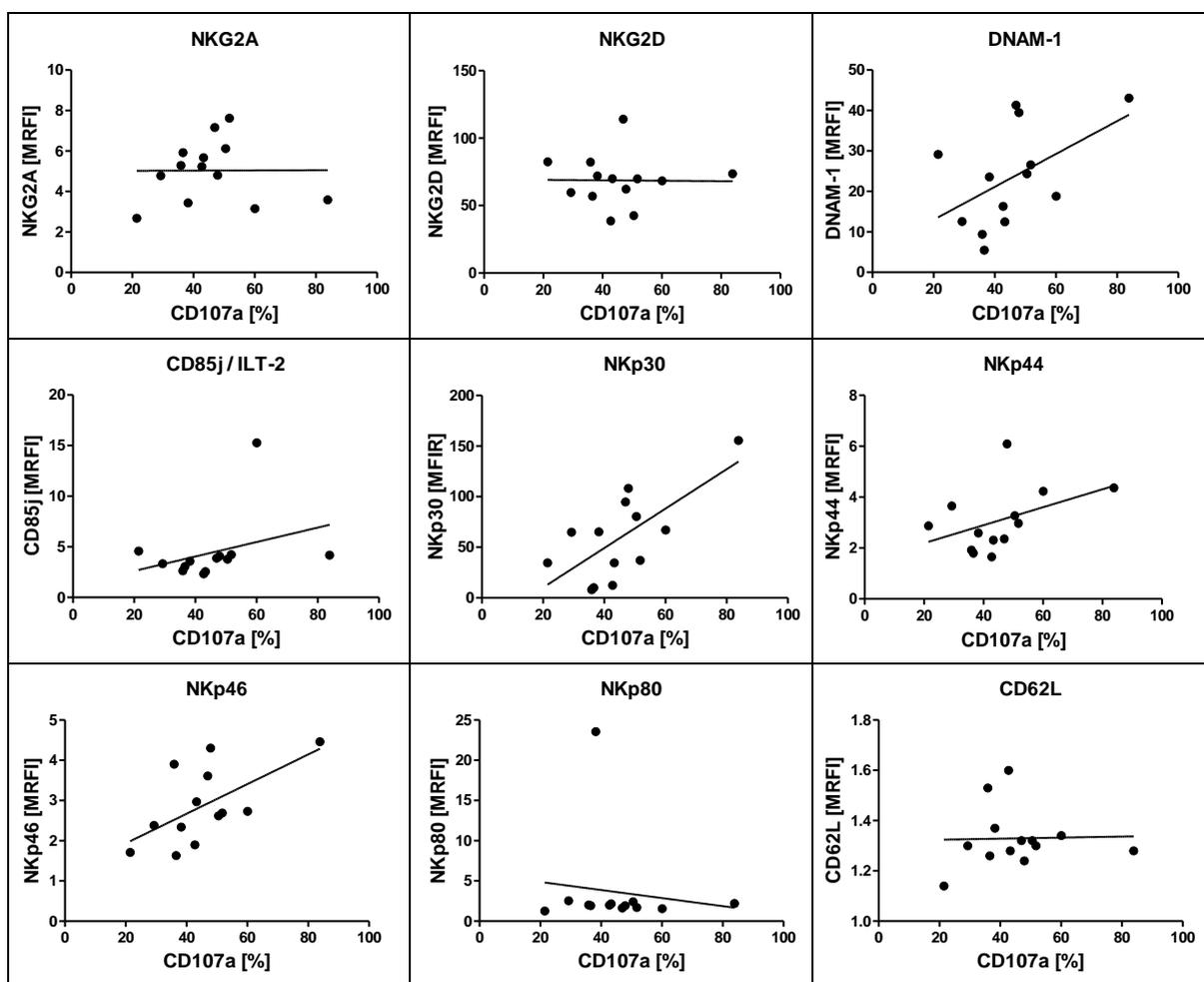


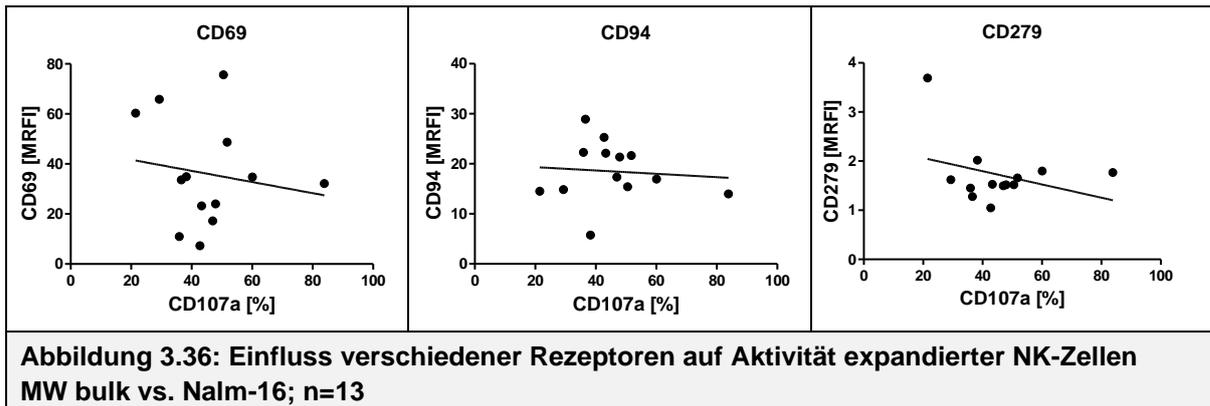
Abbildung 3.35: CD107a-Aktivität frischer NK-Zellen vs. SEM mit NKG2D/DNAM-1 Blockade nach KIR-Gruppen; n=2

3.5.2 Einfluss auf die Aktivität expandierter NK-Zellen

Zur Überprüfung des Einflusses der aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren auf der Oberfläche der expandierten Spender-NK-Zellen, wurden auch hier die Mittelwerte der CD107a-Aktivität mit dem MRFI zusammen aufgetragen.

Die Streubreite um die Ausgleichsgeraden ist sehr unterschiedlich. Für die Oberflächenproteine CD69 und CD94 ist sie relativ groß. Bei anderen Oberflächenrezeptoren ist sie geringer und für NKp30 und NKp46 bestätigt sich eine positive Korrelation auch im Pearson-Test mit $r=0,69/p=0,009$ und $r=0,60/p=0,030$ (vgl. Abb. 3.36).





3.6 Spenderspezifische Lyse-Ergebnisse

Zur Darstellung der individuellen Veränderungen der NK-Zell-Aktivität wurden die Ergebnisse der Spender, von denen alle Konstellationen getestet wurden, in unterschiedlichen Ansätzen einzeln aufgetragen und mit Linien verbunden. Hierdurch können die spenderspezifische Aktivierung ohne und mit Antikörper sowie die Reihenfolge zwischen den Spendern verglichen werden.

Beim Vergleich des gleichen NK-Zellprodukts mit und ohne Antikörper (Abb. 3.37, Grafik A & B) zeigt sich, dass die Verbindungslinien weitgehend parallel verlaufen und es nur wenige Überschneidungen der Linien gibt.

Beim Vergleich frische NK-Zellen mit expandierten NK-Zellen (Abb. 3.37, Grafik C & D) verlaufen die Linien vermehrt überkreuz.

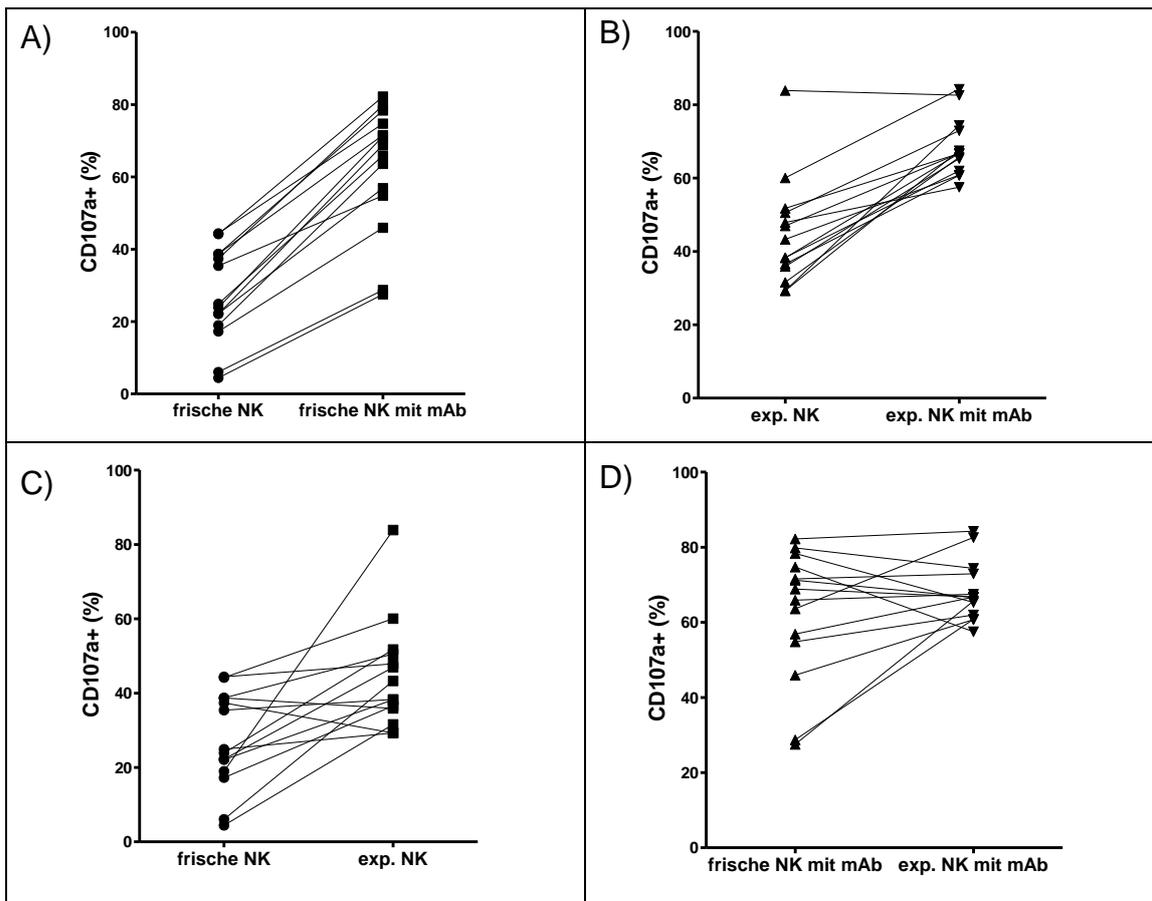


Abbildung 3.37: Mittelwerte der NK-Zellen einzelner Spender versus Nalm-16; n=14

- A) frische NK-Zellen und frische NK-Zellen mit CD19-4G7SDIE mAb**
- B) expand. NK-Zellen und expand. NK-Zellen mit CD19-4G7SDIE mAb**
- C) frische NK-Zellen und expand. NK Zellen**
- D) frische NK-Zellen und expand. NK-Zellen, jeweils mit CD19-4G7SDIE mAb**

In den Grafiken sind die Mittelwerte der Spender, von denen alle Konstellationen getestet wurden, von jeweils zwei Ansätzen aufgetragen und mit Linien verbunden. Sich stark überkreuzende Verbindungslinien deuten auf eine völlig veränderte Reihenfolge der NK-Zellaktivitäten hin – bei parallel verlaufenden Verbindungslinien ist die Reihenfolge zwischen den Spendern in beiden Ansätzen gleich geblieben.

Bei der Auswertung der Lyse-Ergebnisse in den Luciferase-Assays fielen bei den unterschiedlichen Target-Zelllinien gewisse Regelmäßigkeiten sowohl bei PBMC als auch bei expandierten NK-Zellen zwischen den Spendern auf. Um zu untersuchen, ob es zwischen den Spendern eine Target-Zelllinien unabhängige Rangfolge in der Lyseaktivität der NK-Zellen gibt, wurde ein Lysescore für jeden Spender berechnet und die Spender anhand des Ergebnisses sortiert (s. Abb. 3.38 & Abb. 3.39). So wurden für jede Zelllinie sowohl mit als auch ohne CD19-4G7SDIE mAb Zugabe eine Rangfolge der Spender nach ihrer

Lyseaktivität erstellt und entsprechend des Ranges Punkte verteilt. Da es 24 Spender gab, erhielt der Spender mit der höchsten Lyseaktivität 24 Punkte und der Spender mit der niedrigsten Aktivität einen Punkt. Diese Punkte aus den verschiedenen Assays wurden nun zum Lysescore addiert und im Balkendiagramm aufgetragen.

In beiden Diagrammen zeigen sich große Punkte-Unterschiede zwischen den Spendern auf den vorderen und den Spendern auf den hinteren Reihen. Außerdem wird im Vergleich beider Balkendiagramme miteinander ersichtlich, dass es bei PBMC und bei expandierten NK-Zellen eine ähnliche Anordnung der Spender gibt. Spender 20 belegt zum Beispiel beides mal den zweiten Platz, Spender 21 beides mal den letzten Platz.

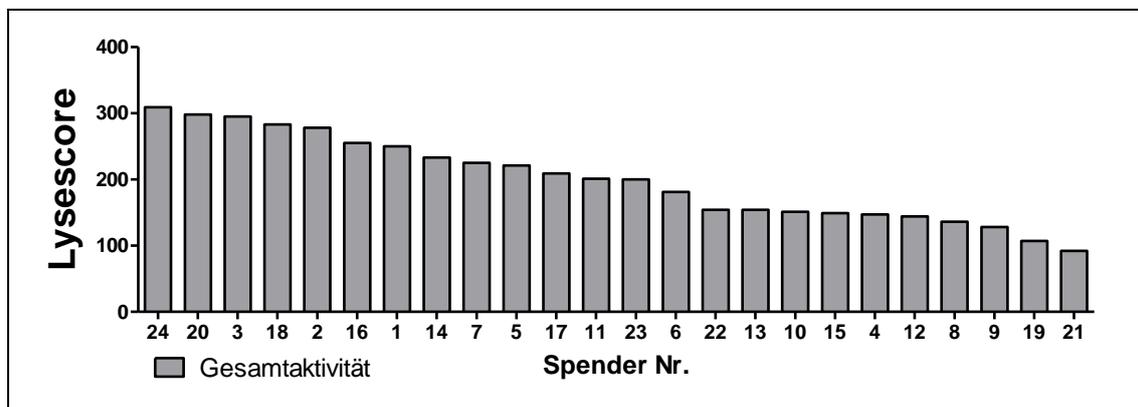


Abbildung 3.38: Gesamtanalyse der PBMC aller Spender im Luciferase-Assay

Kumulation der Lysewerte von PBMC jedes Spenders im Luciferase-Assay über alle Zelllinien hinweg. Alle Zellen waren im Vorfeld kryokonserviert und wurden in einem gemeinsamen Assay getestet.

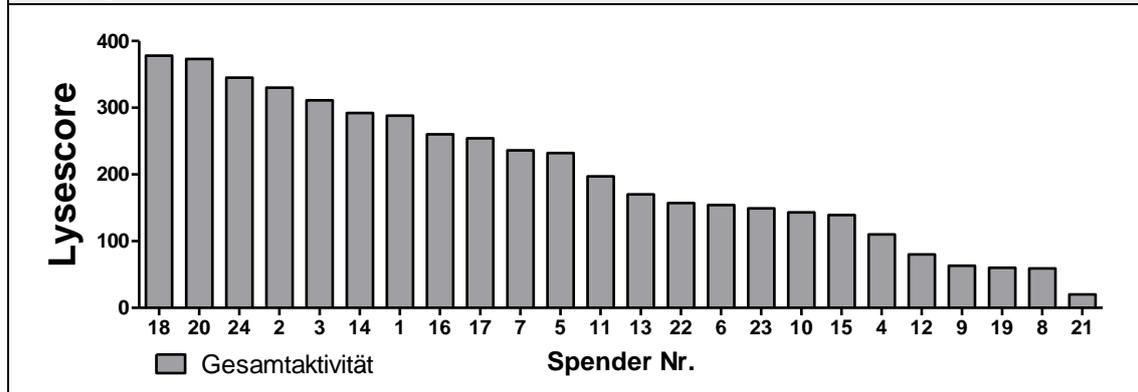
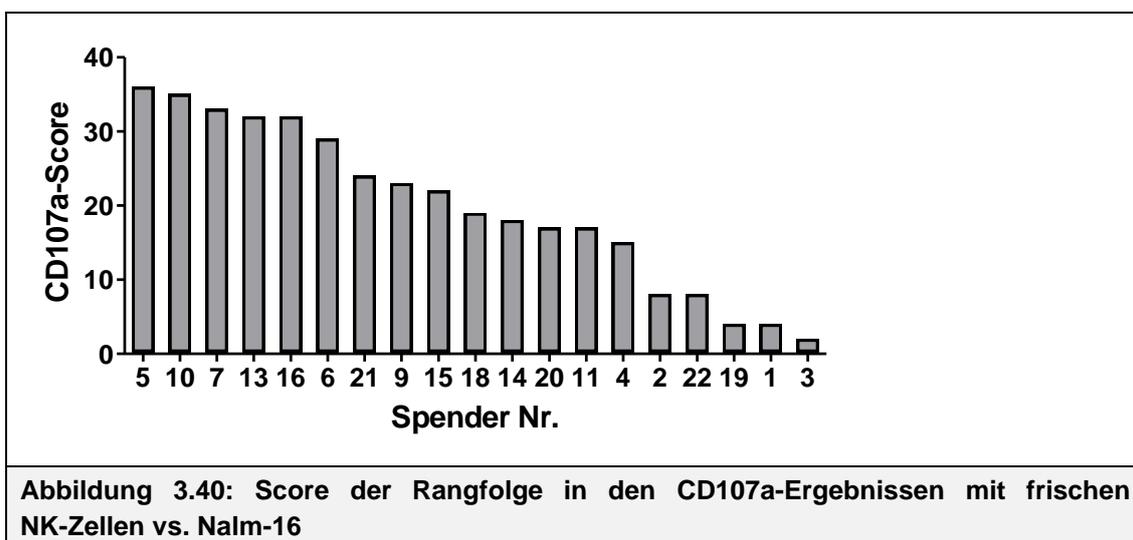


Abbildung 3.39: Gesamtanalyse expandierter NK-Zellen aller Spender

Kumulation der Lysewerte von expandierten NK-Zellen jedes Spenders im Luciferase-Assay über alle Zelllinien hinweg. Alle Zellen waren im Vorfeld kryokonserviert und wurden in einem gemeinsamen Assay getestet.

Im Sinne des oben beschriebenen Scores wurden nun auch die Ergebnisse der frischen NK-Zellen im CD107a-Assay untersucht. Hier zeigt sich ebenso eine Rangfolge mit großen Punkte-Unterschieden zwischen den Spendern. Allerdings fallen im Vergleich mit den Lyse-Scores der Luciferase-Assays keine Gemeinsamkeiten in der Rangfolge der Spender auf.



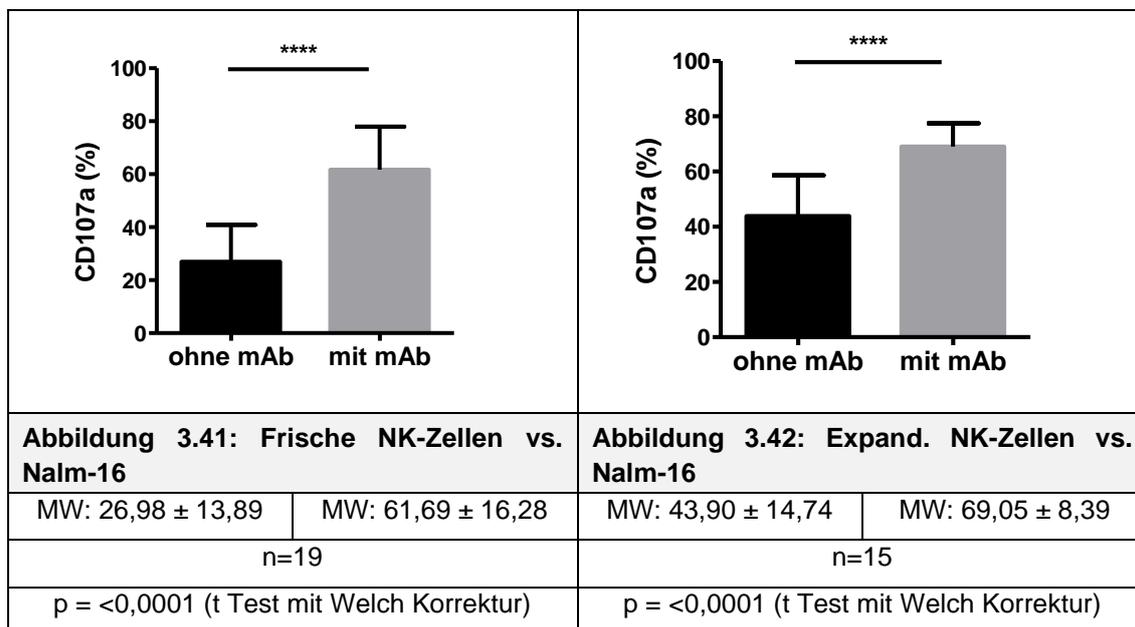
3.7 Lysesteigerung durch den CD19-4G7SDIE mAb

Um die Lysefähigkeit der NK-Zellen gegenüber BCP-ALL-Blasten zu erhöhen, wurde der Fc-optimierte CD19-4G7SDIE Antikörper verwendet (s. Kapitel 1.4). Außerdem wurde der Zusammenhang zwischen der NK-Zell-Aktivität nach CD19-4G7SDIE mAb Gabe und dem FcGR3-Rezeptor-Repertoire der Spender getestet.

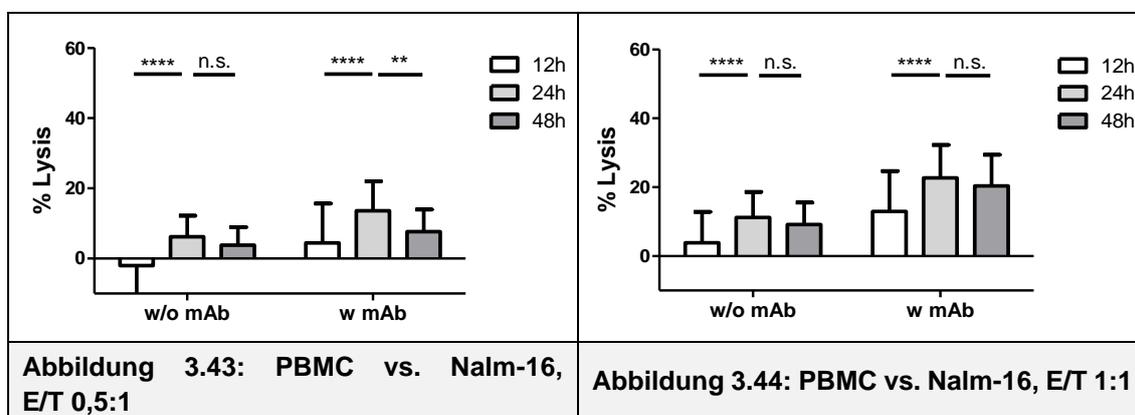
3.7.1 NK-Aktivitätssteigerung durch den CD19-4G7SDIE mAb

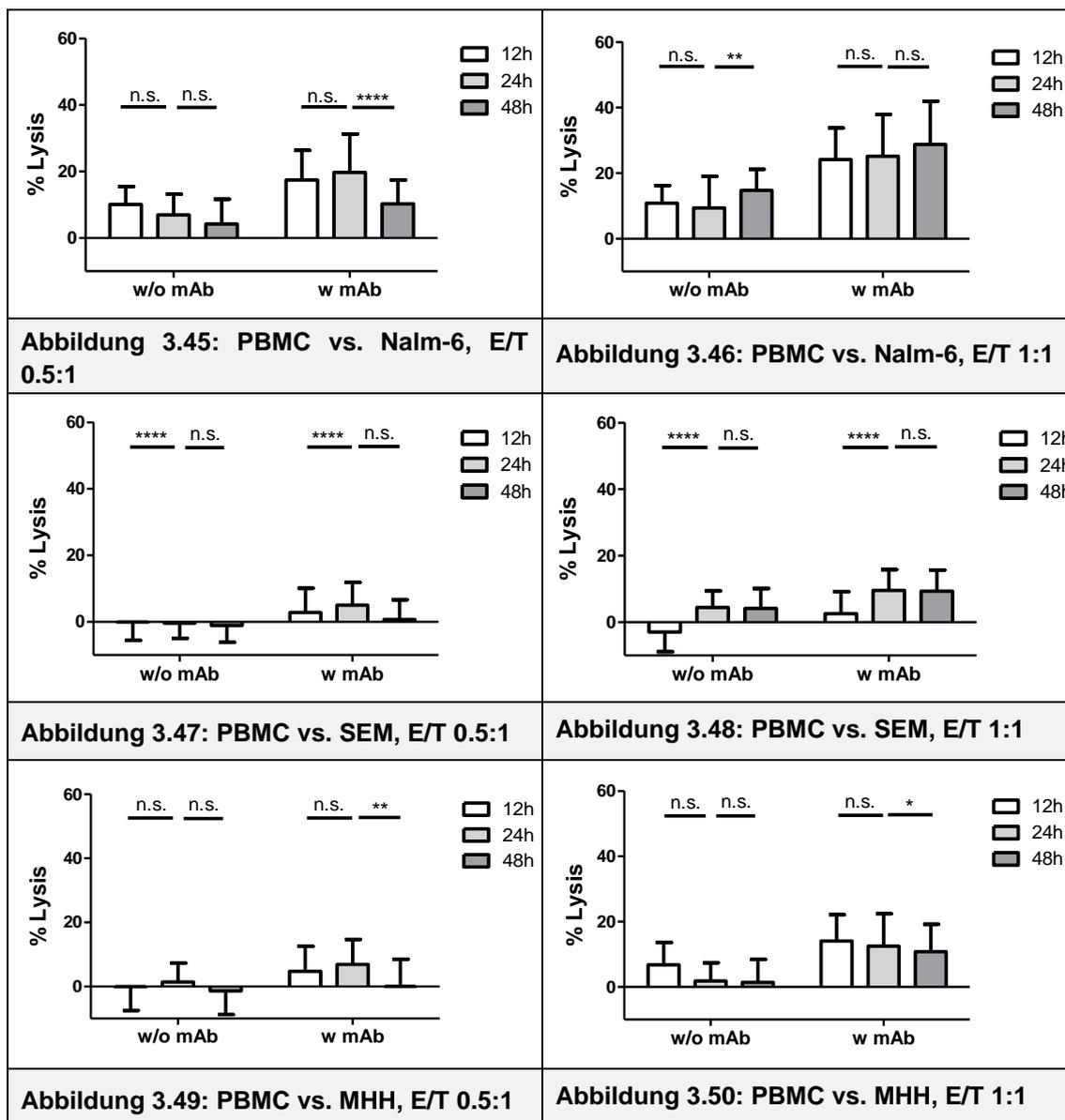
Sowohl bei frischen, als auch bei expandierten NK-Zellen kam es nach Zugabe des CD19-4G7SDIE mAb zu einer höheren CD107a-Expression. Die Zunahme von 27% auf 62% bei frischen NK-Zellen entspricht mehr als einer Verdopplung der NK-Zell-Aktivität. Bei expandierten NK-Zellen nahm die Aktivität von ursprünglich 44% nach Antikörper-Zugabe um 26 Prozentpunkte zu. Die

Steigerung der NK-Aktivierung war für frische und expandierte NK-Zellen mit $p < 0.0001$ signifikant.

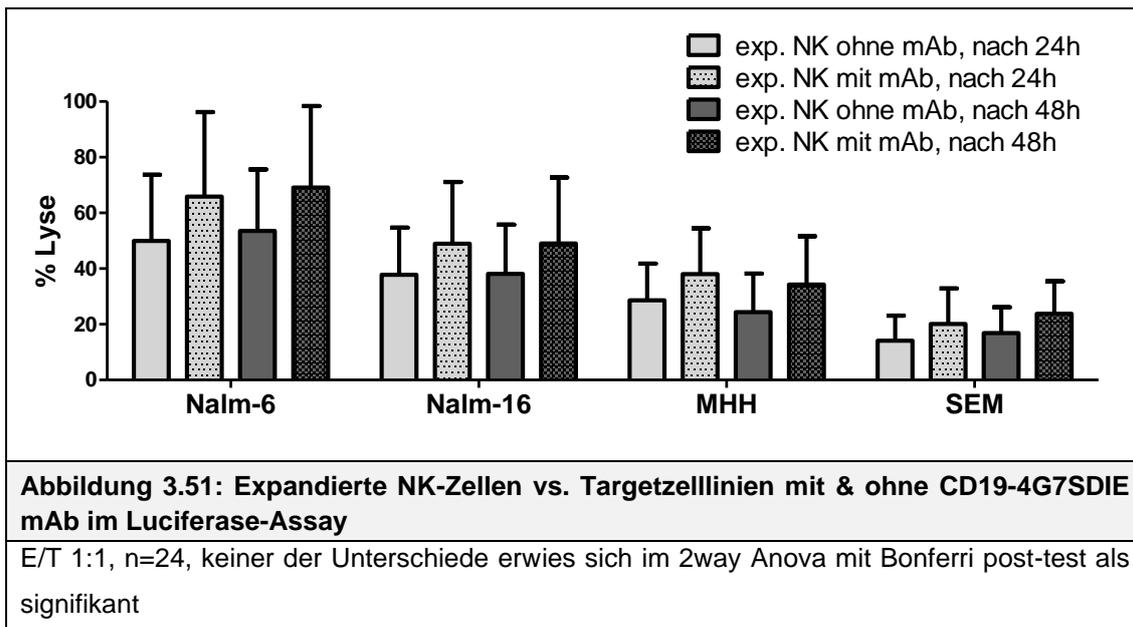


Im Luciferase-Assay zeigte sich bei frischen PBMC mit CD19-4G7SDIE mAb versus der vier BCP-ALL-Zelllinien Nalm-16, Nalm-6, SEM und MHH-cALL-4 im zeitlichen Verlauf eine stärkere Lyse als ohne CD19 mAb. Bei der Effektor-Target-Ratio (E/T-Ratio) von 0.5:1 kommt es zu geringeren Lysewerten als bei der E/T-Ratio von 1:1. Dies führt dazu, dass die Lyse bei der E/T-Ratio von 0.5:1 bei SEM- und MHH-cALL-4-Zellen ohne CD19 mAb negativ ausfällt – die Target-Zellzahl also trotz Effektoren weiter zunimmt. Bei Ansätzen mit dem CD19-4G7SDIE mAb kommt es nicht zu negativen Lysewerten. Der zeitliche Verlauf der Lyse ist bei allen Ansätzen mit der E/T-Ratio von 0.5:1 und Zugabe des CD19 mAb gipfelförmig mit einem Peak nach ca. 24h.



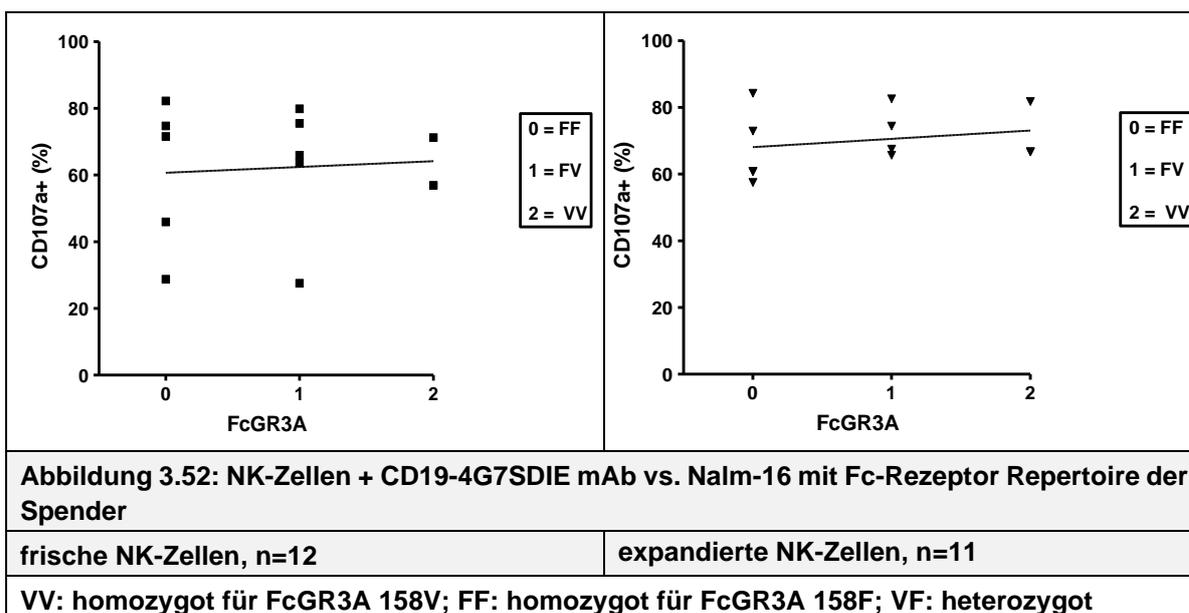


Auch bei expandierten NK-Zellen konnte im Luciferase-Assay eine höhere Lyse in allen Ansätzen mit CD19-4G7SDIE mAb gemessen werden. Dies gilt für alle vier getesteten pädiatrischen BCP-ALL-Zelllinien, wobei die Unterschiede nicht signifikant sind.



3.7.2 Einfluss des Fc-Rezeptor-Repertoires auf die 4G7SDIE-Aktivitätsteigerung

Das Gen-Repertoire für den Fc-Rezeptor FcGR3A der Spender (s. Tabelle 2.1) wurde in Korrelation zur NK-Zell-Aktivität im CD107a-Assay gegenüber Nalm-16 bei CD19-4G7SDIE mAb Zugabe gesetzt. Weder bei frischen, noch bei expandierten NK-Zellen ist eine klare Korrelation zwischen dem FcGR3A-Gen-Repertoire und der CD107a-Aktivität der NK-Zellen nach CD19 mAb Zugabe gegeben.



4 DISKUSSION

4.1 Antileukämische Aktivität von NK-Zellen

NK-Zellen spielen eine entscheidende Rolle in der körpereigenen Abwehr und in der therapeutischen Behandlung von Leukämien [64, 65]. Mit ihren aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren zur Erkennung molekularer Strukturen auf Zelloberflächen stellen sie einen Grundpfeiler der angeborenen Immunabwehr dar [93].

Die klinische Relevanz der antileukämischen Aktivität von NK-Zellen wurde in klinischen Studien sowohl bei allogenen als auch bei autolog transplantierten Patienten nachgewiesen [64, 94]. Insbesondere adulte und pädiatrische AML-Zellen zeigten sich als potente Angriffsziele von NK-Zellen [95, 96]. In ihrer Arbeit zeigten Lang et al. 2011 außerdem, dass eine hohe NK-Zell-Aktivität nach allogener HSZT mit T-Zell-Depletion auch bei Leukämie-kranken Kindern mit ALL das Rezidivrisiko reduzieren kann [97].

Zur Erkennung entarteter Zellen besitzen NK-Zellen verschiedene Möglichkeiten. Grundsätzlich gibt das Gleichgewicht aus aktivierenden und hemmenden Signalen den Ausschlag, ob es zur zytotoxischen NK-Zell-Aktivität kommt. Bei verringerter HLA-I Expression oder gesteigerter Expression von aktivierenden Liganden wie DNAM-1 oder NKG2D durch Tumorzellen kann es im Sinne eines „missing self“, beziehungsweise „induced self“ zu einem Ungleichgewicht und damit zu einer Aktivierung der zytotoxischen Aktivität der NK-Zelle kommen [93]. In dieser Arbeit waren im CD107a-Assay bereits über ein Viertel der nativen NK-Zellen nach sechsstündiger Inkubation mit Nalm-16 Zellen in einer E/T-Ratio von 1:1 aktiviert (vgl. Abbildung 3.6). Eine vergleichbare zytotoxische Aktivierung zeigte sich in den Luciferase-Assays, wo es bei gleicher E/T-Ratio über 48h zur Lyse mit deutlicher Reduktion der Tumormasse aller getesteten pädiatrischen BCP-ALL Zelllinien kam (vgl. Abbildung 3.8). Das hohe antileukämische Potential von NK-Zellen bestätigte sich somit in dieser Arbeit [65], was einen Hinweis auf den hohen Stellenwert von NK-Zellen in der Heilung kindlicher ALL-Patienten gibt [64].

4.2 Charakterisierung der NK-Zell-Spender

Aus Tabelle 3.1 wird der zur Arbeit herangezogene Pool von 24 Spendern für frische PBMC zur direkten Testung und zur NK-Zell-Expansion ersichtlich.

Gemäß des Licensing-Modells, spielt die Education der NK-Zellen im Spender gegenüber den KIR-Liganden eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Aktivierung der NK-Zellen [59]. Für diese Arbeit wurden für jeden iKIR-Rezeptor mehrere Spender gefunden, die keinen passenden HLA-I-Liganden zum Rezeptor exprimieren, sodass wir den Einfluss des NK-Zell-Licensing auswerten konnten. Nach diesem Modell sollen unlicensed Zellen *in vivo* weniger proliferieren und damit einen geringeren Anteil an den Gesamt-NK-Zellen eines Spenders darstellen [59]. Diese These wurde mittels KIR-Phänotypisierung frisch abgenommener NK-Zellen überprüft, kann jedoch nur bei vier von zehn untersuchten Spendern nachvollzogen werden (vgl. Tabelle 3.1 & 3.2).

Gemäß des B-Content-Score-Modells lassen sich Spender anhand des Vorhandenseins verschiedener aKIR- und iKIR-Rezeptoren in einen Score einteilen. Für alle vier Gruppen dieses Scores wurden für die Arbeit Spender rekrutiert (s. Tabelle 3.1), was eine Vorhersage der antitumoralen NK-Zell-Aktivität ermöglichen soll [34, 58].

Da es sich in der Vergangenheit zeigte, dass bei der ADCC das genetische Repertoire für den Fc-Rezeptor FcGR3A relevant sein kann [51, 52], wurden zur Überprüfung dieses Einflusses auf die CD19-4G7SDIE mAb vermittelte ADCC sowohl homozygote Spender für einen der beiden FcGR3-Subtypen als auch heterozygote Spender rekrutiert (s. Tabelle 3.1). Homozygote NK-Zellen für FcGR3A 158 V (V/V) haben eine höhere Bindungsaffinität von IgG1-Antikörpern als homozygote NK-Zellen für den Rezeptor FcGR3A 158 F (F/F), weshalb hier eine stärkere ADCC zu erwarten wäre [51, 98].

Entscheidend für die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen ist das Verhältnis von inhibitorischen und aktivierenden Einflüssen durch die NK-Zell-Rezeptoren [33, 99, 100]. Bei unserer Untersuchung der NK-Zell-Spender auf die Oberflächenexpression relevanter aktivierender und inhibierender NK-Zell-Rezeptoren hin zeigte sich, dass es je nach Rezeptor unterschiedlich stark ausgeprägte Unterschiede in der Expressionsdichte zwischen den Spendern

gibt. Besonders große Unterschiede fanden sich bei den aktivierenden Rezeptoren NKp46, NKp80, NKG2D, NKp30 und DNAM-1 sowie bei den inhibierenden Rezeptoren NKG2a und CD85j (vgl. Tabelle 3.3). NKG2D und die NCRs können aufgrund ihres aktivierenden Potentials als „major activating receptors“ der zytotoxischen NK-Zellaktivität angesehen werden, was sie für mögliche spenderspezifischen Unterschiede besonders interessant macht [100].

4.3 Charakterisierung der BCP-ALL-Zelllinien

Das Vorhandensein von Liganden für die iKIR-Rezeptoren auf Targetzellen ist ein entscheidender Faktor für die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen [25]. Aus Tabelle 3.5 wird das Ergebnis der HLA-Typisierungen der Targetzelllinien ersichtlich. Drei der vier getesteten Targetzelllinien exprimieren gemäß der Typisierung nach Velardi et al. kein C2 und damit keinen Liganden für den Rezeptor CD158a. Die Zelllinie Nalm-6 ist die einzige der herangezogenen Zelllinien, welche C2 exprimiert, allerdings kein Bw4 und damit keinen Liganden für CD158e. Mit unserer Auswahl an Targetzellen lässt sich daher sehr gut der Einfluss des KIR-Ligand/Rezeptor Mismatch untersuchen, welcher zu einer stärkeren zytotoxischen NK-Zell-Aktivität führen sollte [55].

Um der Kontrolle des Immunsystems zu entgehen, entwickeln Tumorzellen Escape-Mechanismen, wobei sie die Oberflächenexpression aktivierender und inhibierender Liganden für NK-Zellen verändern [101]. In der semiquantitativen Analyse zeigte sich bei der Nalm-16 Zelllinie im Vergleich mit Nalm-6 Zellen eine um ca. 30% geringere Oberflächenexpression von HLA-I (vgl. Tabelle 3.6).

Es ist bekannt, dass ALL Blasten pädiatrischer Patienten insgesamt eine erhöhte Expression des DNAM-1-Liganden Nec-2 (CD112) und der NKG2D-Liganden ULBP 1 und 3 aufweisen [102]. Für den DNAM-1-Liganden PVR (CD155) zeigte sich in der vorliegenden Arbeit auf Nalm-16 Zellen eine deutlich höhere Expression. Gleichzeitig waren die NKG2D-Liganden MicA/B etwas stärker sowie der Ligand des inhibitorischen Rezeptors NKG2A HLA-E etwas schwächer exprimiert.

Andererseits ist die Expression der aktivierenden NKG2D-Liganden ULBP 2,5,6 & 3 auf Nalm-6 Zellen wiederum jeweils doppelt so hoch als auf Nalm-16 Zellen (vgl. Tabelle 3.7).

Betrachtet man die verschiedenen Rezeptor-Liganden Interaktionen als gleichwertig, müsste man also davon ausgehen, dass Nalm-16 Zellen ein deutlich potenteres Lyseziel von NK-Zellen darstellen als Nalm-6 Zellen. Dies bestätigte sich in dieser Arbeit jedoch nicht (vgl. Abb. 3.8 & 3.9) und wurde auch durch andere Arbeitsgruppen bereits vielfach festgestellt. So stellt die HLA-I Expression auf Targetzellen einen sehr wichtigen inhibitorischen Reiz für NK-Zellen dar [103]. Gleichzeitig wurde allerdings mehrfach gezeigt, dass z.B. NKG2D getriggerte NK-Zell-Aktivierung bei HLA-I exprimierenden Tumorzellen die Inhibierung durch KIR/HLA-I überwinden kann [28, 104, 105]. Zudem stellte die Nec-2/DNAM-1 Interaktion in Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen einen entscheidenden pathway für die NK-Zellerkennung von ALL Blasten dar [102]. Auf den unterschiedlichen Stellenwert der Interaktionen soll in Kapitel 4.5 weiter eingegangen werden.

4.4 Spenderunspezifische Einflüsse auf die NK-Zell-Aktivität

4.4.1 Einfluss durch NK-Zellexpansion

Die hohe Effektivität von NK-Zell-Expansionen zur Vermehrung von NK-Zellen konnte schon mehrfach gezeigt werden [26, 65, 72, 83]. Durch das in Kapitel 2.2.4 beschriebene Protokoll wurden aus frisch isolierten PBMC gezielt NK-Zellen expandiert, was uns die funktionellen Testungen mit expandierten NK-Zellen ermöglichte (s. Abbildung 3.2). Die getesteten KIR-Match und -Mismatch Situationen spielen bei allogenen HSZT eine wichtige Rolle und waren daher für die vorliegende Arbeit von großem Interesse [34].

Die Zelllinie K562mb15 erwies sich in den Expansionen einmal mehr als potente Feederzelllinie um die Anzahl von NK-Zellen zu vervielfachen und schon ohne weitere Behandlung einen sehr hohen NK-Zellanteil in einem Zellprodukt aus ficollisierten Lymphozyten zu erhalten [83]. Dank der Stimulation mit mbIL-15,

mb41-BBL und zusätzlich IL-2 proliferierten die NK-Zellen während der 12-20 tägigen Expansion sehr stark, was zu einer Vermehrung der NK-Zellen um 2,6 Log-Stufen führte (vgl. Abbildung 3.5).

Wie in Abb. 3.3 ersichtlich, kam es neben der NK-Zell-Vermehrung auch zur Proliferation weiterer Leukozytenpopulationen wie Zytokin-induzierte Killer-Zellen (CIK-Zellen) und $\gamma\delta$ T-Zellen. Der prozentuelle Anteil der NK-Zellen an der Gesamtzahl von Lymphozyten wuchs allerdings dennoch auf durchschnittlich 75% (vgl. Abbildung 3.4). T-Zellen erhalten im durchgeführten Expansionsprotokoll keine spezifische Antigenstimulation. Deshalb werden die T-Zellen durch die starke NK-Zell-Proliferation überwachsen und der prozentuale Anteil an T-Zellen sinkt relativ gesehen zu den NK Zellen ab [84].

Bei CIK-Zellen handelt es sich um eine heterogene Gruppe von CD3⁺CD56⁺ T-Zellen. Sie können durch Inkubation von PBMC mit CD3-Antikörper, IFN- γ und IL-2 generiert werden und besitzen eine FasL- und Perforin-vermittelte antitumorale Zytotoxizität [106, 107]. Dank aktivierender NK-Zell-Rezeptoren wie NKp46, NKG2D und NKp30 können sie MHC-unabhängig Tumorzellen lysieren sowie proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , IFN- γ und IL-2 sekretieren und stellen daher eine gute Möglichkeit zur ergänzenden zellulären Immuntherapie bei hämato-onkologischen Erkrankungen, aber auch bei soliden Tumoren wie Lungenkarzinomen, gastrointestinalen Tumoren oder hepatozellulären Tumoren dar [107, 108].

Durch die Expansion kam es zu einer deutlichen und signifikanten Zunahme der zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen gegenüber den kindlichen BCP-ALL-Zelllinien (vgl. Abb. 3.6 & 3.8). Dies entspricht den Erfahrungen anderer Arbeitsgruppen, die zeigten dass mit K562-mb15-41BBL und IL-2 expandierte NK-Zellen *in vitro* eine deutlich stärkere antitumorale Aktivität gegenüber AML Zellen besitzen, als native NK-Zellen oder IL-2 stimulierte NK-Zellen [83].

Die Zunahme der antitumoralen Aktivität expandierter NK-Zellen könnte sich durch die vermehrte Expression aktivierender Rezeptoren nach Expansion erklären [83]. In unseren Versuchen führte die Expansion zu einer deutlichen Steigerung der CD56-Expression, sodass anhand der CD56-Intensität eine klare Unterscheidung zwischen CD56^{bright}- und CD56^{dim}-Zellen möglich

wird (s. Abbildung 3.3). Zudem kam es auf expandierten NK-Zellen zu einer deutlich gesteigerten Oberflächenexpression der aktivierenden Rezeptoren NKG2D, NKp30, NKp44, CD69, CD94 und des inhibierenden Rezeptors NKG2A, während gleichzeitig der inhibierende Rezeptor CD85j und der aktivierende Rezeptor NKp46 schwächer exprimiert wurden (vgl. Tab. 3.3 & 3.4). Eine stärkere Expression der aktivierenden Rezeptoren CD69, NKG2D, NKp30, NKp44 und NKp46 durch mittels K562-mb15-41BBL expandierte NK-Zellen konnte sowohl in unserer Arbeitsgruppe als auch in anderen Forschungsgruppen bereits mehrfach gezeigt werden [83, 109, 110]. Die schwächere Expression von NKp46 in dieser Arbeit passt allerdings nicht ins Bild. Auffällig ist hier, dass für diesen Rezeptor bei frischen NK-Zellen der größte Unterschied zwischen den Spendern bestand. Nach Expansion ist die durchschnittliche Expression geringer, aber auch der Unterschied zwischen den Spendern stark verringert. Diese Beobachtung wurde bereits von anderen Gruppen publiziert [111].

Für die aktivierenden Rezeptoren NKG2D und NKp30 kam es zu großen Unterschieden in der Expressionsdichte bei frischen NK-Zellen. Nach Expansion wurden beide Rezeptoren stark vermehrt exprimiert, sodass sich spenderspezifische Unterschiede verringerten. Der aktivierende Rezeptor DNAM-1 hingegen wurde nicht vermehrt exprimiert. Nach Expansion waren die Unterschiede zwischen den Spendern auch weiterhin gegeben. Daher könnte dieser Rezeptor für konstante spenderspezifische Unterschiede auch nach Expansion verantwortlich sein (vgl. Tab. 3.3 & 3.4).

Es lässt sich somit bestätigen, dass NK-Zell-Expansionen aus frisch isolierten PBMC gut klinisch einsetzbar sind. Schon aus einer relativ geringen Menge Vollblut lässt sich eine große Zahl an aktivierten NK-Zellen expandieren [83, 112].

4.4.2 Einfluss durch den Fc-optimierten CD19-4G7SDIE Antikörper

Die antitumorale Aktivität von NK-Zellen kann durch den Einsatz von Antikörpern gesteigert werden [46]. Antikörper binden an spezifische Oberflächenmoleküle von Tumorzellen und können wiederum über den Fc γ III-Rezeptor CD16 durch NK-Zellen erkannt werden. Durch diesen stark aktivierenden Rezeptor kommt es

zur ADCC und damit Lyse der Targetzellen [103]. In Studien zur Behandlung verschiedenster onkologischer Erkrankungen wie Non-Hodgkin-Lymphom (Rituximab), Multiples Myelom (Daratumumab), Brustkrebs (Herceptin) und Kolonkarzinom (Cetuximab) konnte eine NK-Zell vermittelte ADCC nachgewiesen werden [113], welche mittels Zytokinen wie IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 und IL-21 weiter gesteigert werden kann [114].

Das Transmembranprotein CD19 befindet sich im menschlichen Körper fast ausschließlich auf B-Zellen [115]. Da es in mehr als 90% der ALL-Fälle auf der Blastenoberfläche vorkommt und insbesondere auf B-Zell-Leukämie-Zellen in hoher Qualität exprimiert wird, stellt es ein gutes Ziel zur Antikörper-Therapie mit potentiell hoher Selektivität und geringen Nebenwirkungen dar [80, 115].

In den durchgeführten CD107a- und Luciferase-Assays wird deutlich, dass sowohl die Aktivität frischer NK-Zellen als auch die Aktivität expandierter NK-Zellen gegenüber kindlicher BCP-ALL Zellen durch den CD19-4G7SDIE mAb deutlich gesteigert werden. Bei den nativen NK-Zellen vs. Nalm-16 kam es nach CD19 mAb Zugabe zu mehr als einer Verdopplung der CD107a-positiven NK-Zellen (vgl. Abbildung 3.41). Die CD19 mAb vermittelte Aktivität gegenüber den kindlichen BCP-ALL-Zelllinien bleibt bei frischen NK-Zellen auch nach Blockade der beiden aktivierenden Rezeptoren DNAM-1 und NKG2D um ca. 50 Prozent erhöht (vgl. Abbildung 3.33), was den bereits diskutierten besonderen Stellenwert des FcγRIIIA-Rezeptors unter den aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren verdeutlicht [50].

Auch im Luciferase-Assay kam es nach Antikörperzugabe in allen Ansätzen zu einer deutlichen Steigerung der Lyseaktivität. Die relevante Lysesteigerung durch den CD19-4G7SDIE mAb war in Coinkubationsexperimenten mit verschiedenen BCP-ALL-Zelllinien zu erkennen. So kam es in der Kondition ohne Antikörper bei einer E:T-Ratio von 0,5:1 zu einem Fortwachsen der Tumorzellen (negative Lyse-Werte), wohingegen es nach Zugabe des CD19-4G7SDIE mAb eindrücklich zu einer Reduktion der Tumorzellen kam (vgl. Abb. 3.43 - 3.50). Die Effektivität des CD19 mAb zur Steigerung der Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber pädiatrischen BCP-ALL-Blasten wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits mehrfach gezeigt. Durch den CD19-4G7SDIE mAb kam es *in vitro* nach

Inkubation mit BCP-ALL Zelllinien nicht nur zu einer gesteigerten CD107a-Expression frischer NK-Zellen, sondern gleichzeitig auch zu einer intrazellulären Anreicherung von IFN- γ und TNF- α [76], womit die Funktionalität des Antikörpers auf unterschiedlichen Effektorebenen gegenüber der Kontrolle bewiesen wurde. Bei der Behandlung von kindlichen ALL-Patienten der Hochrisiko-Gruppe wurde die individuell messbare MRD Last durch Zugabe des CD19 mAb *in vivo* signifikant reduziert oder eliminiert [76].

Bei den expandierten NK-Zellen vs. Nalm-16 nahm der Anteil der CD107a-positiven NK-Zellen nach Antikörper-Zugabe um mehr als die Hälfte zu – im Luciferase-Assay zeigte sich die Lyse gegenüber allen vier getesteten BCP-ALL-Zelllinien nach Antikörper-Zugabe gesteigert. Diese Steigerung der ADCC kommt vermutlich durch die oben diskutierte vermehrte Expression aktivierender und verminderte Expression inhibierender Rezeptoren auf den NK-Zellen nach Expansion zustande und wurde auch von anderen Forschungsgruppen nach vorheriger Expansion mit K562-mb15-41BBL-Feederzellen beobachtet [116] (s. Kap. 4.4.1).

Der Unterschied in der CD107a-Aktivität zwischen frischen NK-Zellen nach CD19-4G7SDIE mAb Zugabe und expandierten NK-Zellen nach CD19 mAb Zugabe ist geringer ausgeprägt (vgl. Abb. 3.7). Zwar unterscheidet sich die Lyseaktivität im Luciferase-Assay zwischen diesen beiden Gruppen weiterhin deutlich, relativ gesehen ist die durch den CD19 mAb ausgelöste Steigerung der Lyse nach Expansion allerdings geringer ausgeprägt als bei frischen NK-Zellen (vgl. Abb. 3.9). Dies dürfte ebenso mit der beschriebenen, durch die Expansion veränderten Rezeptorexpression auf NK-Zellen zusammenhängen. Hierdurch befinden sich die Zellen bereits in einem voraktivierten Zustand, was ihnen eine hohe antileukämische Aktivität auch ohne CD19-4G7SDIE mAb ermöglicht (s. Kap. 4.4.1).

So lässt sich hier zusammenfassen, dass expandierte präaktivierte NK-Zellen bereits eine signifikant gesteigerte direkte zelluläre Toxizität vermitteln, welche durch den Einsatz des CD19-4G7SDIE mAb weiter gesteigert werden kann. Die Ergebnisse bestätigen die Erfahrungen anderer Forschergruppen, dass in der Behandlung bösartiger Tumorerkrankungen der adoptive Transfer expandierter

NK-Zellen die Möglichkeit bietet, die ADCC durch Antigen-spezifische mAb weiter zu steigern [111, 117].

Der Einfluss des CD16-V158F Polymorphismus wurde bereits mehrfach beschrieben. So wurde beobachtet, dass NK-Zellen von Spendern, welche homozygot für FcGR3a 158 V (V/V) sind, stärker IgG1 binden, als solche von Spendern, die homozygot für FcGR3A 158 F (F/F) sind [51, 98]. In unseren Experimenten blieb die Steigerung der NK-Zell-Aktivität jedoch unabhängig vom FcGR3A-Repertoire der Spender (vgl. Abb. 3.52). Hieraus lässt sich schließen, dass die Fc-Optimierung so gut ist, dass man keinen Unterschied mehr zwischen den CD16-V158F-Polymorphismus-Gruppen der Spender sieht. Dies bedeutet, dass alle Patienten gleichermaßen, unabhängig von ihrem Genotyp, vom CD19-4G7SDIE mAb profitieren könnten. Ein sehr ähnlicher Effekt lässt sich beim CD20 mAb Obinutuzumab beobachten. Unterlag die ADCC beim nicht Fc-optimierten CD20 mAb Rituximab noch einem deutlichen Einflusses des CD16-V158F Polymorphismus, so ist diese beim mAb der zweiten Generation Obinutuzumab, welcher mittels Glykoengineering Fc-optimiert wurde, unabhängig des Polymorphismus [118]. Zudem war der Einfluss des FcGR-Polymorphismus auch in Studien, welche die klinische antitumorale Aktivität von therapeutischen mAbs des IgG1 Isotyps untersucht haben, nicht konsistent. So unterschied sich der Effekt des FcGR-Genotyps bei verschiedenen Tumorentitäten und therapeutischen Antikörpern [52]. Desweiteren zeigte sich, dass eine Fc-Optimierung monoklonaler Antikörper zu einer insgesamt stärkeren zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen führt [119, 120].

4.5 Individuelle Einflüsse auf die NK-Zellaktivität

4.5.1 Einfluss durch KIR & HLA-I über verschiedene Mechanismen

4.5.1.1 HLA-I Expressionsstärke

Wie in Kapitel 1.2.1. gezeigt wird die NK-Zellaktivität auch entscheidend durch inhibitorische Rezeptoren reguliert. Die meisten dieser Rezeptoren binden

HLA-I Moleküle, wodurch die NK-Zellen im Sinne eines „missing self“-Mechanismus gegenüber Zellen zytotoxisch aktiv werden, welche wenig oder gar kein HLA-I auf ihrer Oberfläche exprimieren. In der Vergangenheit konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass es insbesondere bei Tumorzellen als Immun-Escape-Mechanismus zur Herunterregulation der HLA-I Expression kommen kann. Damit können diese einer Aktivierung zytotoxischer T-Zellen entgehen, machen sich hierdurch jedoch zu potenziellen Zielen von NK-Zellen [121]. Eine direkte Korrelation zwischen HLA-I Expressionsdichte und der Suszeptibilität kindlicher BCP-ALL Blasten zeigten Pfeiffer et al. bereits 2007 in einer Arbeit. In ihrer Untersuchung kindlicher BCP-ALL Blasten zeigte sich zudem eine hohe Variabilität der individuellen HLA-I Expressiondichten, wobei die Mehrheit der kindlichen BCP-ALL Blasten eine geringere HLA-I Dichte im Vergleich zu CD19positiven B-Zellen gesunder Spender besaß [122].

In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluss der HLA-I-Expression auf die NK-Zellaktivität nachvollziehbar, indem die HLA-I-Expression auf BCP-ALL Zellen stimuliert oder geblockt wurde (vgl. Abb. 3.12). Durch eine HLA-I-Blockade lässt sich die Aktivität frischer NK-Zellen geringfügig erhöhen, da die Inhibierung der NK-Zellen durch iKIR reduziert wird [53]. Durch die Stimulation der HLA-I-Expression auf den Targetzellen hingegen erhöht sich die Aktivität der iKIR, was in unseren Experimenten zu einer Reduktion der NK-Zellaktivität um etwa ein Fünftel führte [53]. Die Ergebnisse stützen die Hypothese, dass die NK-Zellaktivität durch iKIR-Aktivierung nicht komplett blockiert sondern vielmehr proportional zur Menge der exprimierten HLA-I Molekülen auf Targetzellen gehemmt wird [122]. Dass die Blockade von HLA-I auf den Targets bei der Aktivität der frischen NK-Zellen keinen sehr großen Effekt bringt, dürfte zudem an einer grundsätzlich geringen HLA-I Dichte auf den Targetzellen liegen: Im Vergleich mit Nalm-6 Zellen war auf Nalm-16 Zellen etwa ein Viertel weniger HLA-I exprimiert (vgl. Tabelle 3.6). Dies fügt sich ins Bild oben genannter Erkenntnisse zur hohen Variabilität und mehrheitlich eher geringer ausgeprägten HLA-I Expression auf kindlichen BCP-ALL Blasten [122].

Deutlicher fielen die Unterschiede aus, wenn die NK-Zellen durch Expansion oder CD19-4G7SDIE mAb Zugabe schon gegen unbehandelte Targets aktiver

waren. Die größte Differenz tritt zwischen der Aktivität bei HLA-blockierten und HLA-stimulierten Targets bei den expandierten NK-Zellen zutage (vgl. Abb. 3.13 & 3.14). Dieser große Einfluss der HLA-I-Expressionsdichte auf die Aktivität expandierter NK-Zellen wurde bisher noch nicht gezeigt. Wie oben bereits diskutiert kommt es durch die Expansion zu einer Zunahme der aktivierenden Rezeptoren auf der Oberfläche der NK-Zellen (s. Kap. 4.4.1). In einer früheren Arbeit unserer Arbeitsgruppe konnte A. Horrer 2016 zeigen, dass sich durch die Expansion der NK-Zellen nach vorliegendem Protokoll nicht nur die Dichte aktivierender, sondern zugleich auch die Dichte der inhibierenden KIR-Rezeptoren signifikant erhöht [110]. Da diese vornehmlich auf HLA-I reagieren [25, 54], ist eine Zunahme des Einflusses von HLA-I auf die Aktivität expandierter NK-Zellen plausibel. In den vorliegenden Ergebnissen wird deutlich, dass die eigentlich voraktivierten expandierten NK-Zellen bei hoher HLA-I-Expression auf Targetzellen in ihrer zytotoxischen Aktivität sogar hinter frischen NK-Zellen mit unbehandelten Targetzellen zurückfallen (vgl. Abb. 3.13 & 3.14). Bei Tumorzellen mit hoher HLA-I Expression scheint die alleinige, adoptive Therapie mit expandierten NK-Zellen daher vermutlich keinen therapeutischen Vorteil gegenüber frischen NK-Zellen zu besitzen. Kombiniert man die Therapie allerdings mit dem Fc-optimierten CD19-4G7SDIE Antikörper, so ließen sich auch bei BCP-ALL Targets mit hoher HLA-I Dichte Lysewerte im Bereich expandierter NK-Zellen gegenüber BCP-ALL Blasten mit blockierter HLA-I Expression erzeugen (vgl. Abb. 3.14). Allerdings unterliegt auch die durch expandierte NK-Zellen gesteigerte CD19-4G7SDIE-vermittelte ADCC einem, wenn auch geringerem, HLA-I Einfluss. Dies stützt die These anderer Arbeitsgruppen, dass ein iKIR-Ligand Mismatch auch bei der Kombination von antigen-spezifischem mAb und adoptivem Transfer *ex vivo* expandierter NK-Zellen noch eine Rolle spielt [117]. Als Ergänzung der Therapie mit adoptiven Transfers expandierter NK-Zellen und Antigen-spezifischem mAb käme bei hoher HLA-I Expression eines Tumors auch ein therapeutischer KIR-Antikörper in Frage. Durch andere Forschungsgruppen wurden hier schon vielversprechende Ergebnisse präsentiert [46, 123]. Außerdem könnte man in einer KIR-Rezeptor/Ligand Mismatch Situation durch eine Anpassung des

Expansionsprotokolls zum Beispiel mit Feederzellen ohne desselben KIR-Liganden versuchen, besonders alloreaktive NK-Zellen zum adoptiven Transfer zu expandieren [124].

4.5.1.2 Ligand-Ligand Modell

Bei dem von der Perugia-Gruppe entwickelten LL Modell werden Unterschiede zwischen den KIR-Liganden von Empfänger und Spender untersucht und anhand des HLA-I Repertoires des Spenders auf dessen KIR-Repertoire geschlossen. Besitzen Spender und Empfänger die gleichen HLA-I-Liganden, so liegt ein LL Match vor. Ein Ligand-Ligand Mismatch hingegen entsteht, wenn sich in Graft-versus-Host Richtung die KIR-Liganden des Empfängers von den KIR-Liganden des Spenders unterscheiden [34, 55].

Beim LL Modell wird folglich beim Spender von den HLA-I-Liganden auf das KIR Repertoire geschlossen. Da sich die Gene der HLA-I-Liganden und die der KIR-Rezeptoren auf unterschiedlichen Chromosomen befinden und damit unabhängig voneinander vererbt werden, ist allerdings die Vorhersage nach dem LL Modell nicht immer zutreffend. Das KIR-Gen befindet sich auf Chromosom 19, das HLA-I-Gen hingegen auf Chromosom 16. Daher ist es nicht unwahrscheinlich, dass ein Spender trotz vorhandenem HLA-I-Ligand den passenden Rezeptor nicht exprimiert oder umgekehrt [55]. Durch Leung et al konnte 2004 gezeigt werden, dass sich das LL Modell zur Vorhersage einer Niedrigrisiko-Gruppe von Patienten eignet, da das Auftreten von KIR-Liganden bei Spendern in der Regel mit der Expression der passenden KIR-Rezeptoren korreliert. Zur Vorhersage der Patienten mit hohem Risiko war es jedoch zu ungenau, da es bei Spendern auch zur Expression von KIR-Rezeptoren kam, für die kein passender KIR-Ligand vorhanden war. Genau die NK-Zellen mit diesen Rezeptoren besitzen jedoch ein hohes alloreaktives Potential [57].

4.5.1.3 Rezeptor-Ligand Modell

Das Rezeptor-Ligand Modell ist eine Weiterentwicklung des Ligand-Ligand-Modells, wobei nun auf die Mismatch-Situation zwischen den KIR-Rezeptoren

des Spenders und den HLA-I-Liganden des Empfängers geachtet wird. Gibt es für single-KIR-positive NK-Zellen keinen passenden Liganden, so ist eine erhöhte zytotoxische Aktivität der Zellen zu erwarten [34, 55].

Auf der zur Testung der NK-Alloreaktivitätsmodelle herangezogenen Targetzelllinie Nalm-16 befindet sich kein Ligand der Gruppe C2. Da alle herangezogenen Spender NK-Zellen mit dem KIR-Rezeptor CD158a besitzen, konnte diese Mismatch-Situation in der vorliegenden Arbeit gut untersucht werden. Liganden der Gruppen C1 und Bw4 befinden sich im genetischen Repertoire der Nalm-16 Zellen, allerdings wird in Abb. 3.1 deutlich, dass die Zellen eine vergleichsweise geringe Menge von Bw4 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Somit ist für die single-CD158e-positiven NK-Zellen ebenso eine dem Mismatch ähnliche, erhöhte NK-Zell-Aktivität zu erwarten.

Die besondere Rolle des KIR-Ligand Mismatch bei der zytotoxischen NK-Zellaktivität gegenüber pädiatrischer ALL-Blasten mit mittlerer bis hoher HLA-I Expressionsdichte zeigten Pfeiffer et al. 2007 [122]. Diese Erwartungen konnten durch unsere Ergebnisse bestätigt werden da sich im CD107a-Assay mit frischen NK-Zellen eine stärkere Aktivität der single-CD158a-tragenden Zellen gegenüber allen anderen NK-Zell-Gruppen zeigte und es gleichzeitig auch zu einer erhöhten Aktivität der single-CD158e-tragenden NK-Zellen kam. Durch die Zugabe des CD19-4G7SDIE mAb nahm die Aktivität der KIR-Gruppen gleichermaßen zu und die Unterschiede zwischen den single-KIR-Gruppen blieben bestehen. (vgl. Abb. 3.10).

Die Ergebnisse der Testung expandierter NK-Zellen fiel ähnlich aus, wobei die Unterschiede zwischen CD158a und CD158e geringer und nicht mehr signifikant waren. Auffallend ist, dass die Unterschiede zwischen den KIR-Gruppen nach der Kombination aus Expansion und CD19-4G7SDIE mAb Zugabe geringer ausfallen. Durch die Aktivierung der NK-Zellen bei Expansion und CD19 mAb Zugabe scheint die Rolle des RL Mismatch also geringer zu werden (vgl. Abb. 3.11).

Entsprechend dem RL Modell konnten wir die Alloreaktivität single-KIR-tragender NK-Zellen bei RL Mismatch bestätigen. Dennoch besitzt die Vorhersage nach dem RL Modell auch eine gewisse Unschärfe, da der HLA-I Genotyp noch nicht

voraussagt, in welcher Stärke ein HLA-I Molekül tatsächlich exprimiert wird. Wie bereits diskutiert kann es insbesondere im Rahmen eines Immun-Escape-Mechanismus bei Tumorzellen zur Herunterregulation der HLA-I Expression kommen [121, 125] (s. Kap. 4.5.1.1). In der Folge kann dies, durch eine schwache Expression des KIR-Liganden, zu einem funktionellen Mismatch trotz vorhandenem Genotyp des Liganden führen. Der funktionelle Mismatch führte in dieser Arbeit einem beinahe genauso großen Effekt auf die NK-Zell-Aktivität wie ein tatsächlicher Mismatch nach dem RL Modell.

Spannend ist, wie sich diese Situation bei HLA-I Stimulation verhält: Tatsächlich führte die durch IFN- γ gesteigerte HLA-I Expression dazu, dass die single-CD158e-positiven frischen NK-Zellen weniger stark versus Nalm-16 Zellen aktiviert wurden (vgl. Abb. 3.15). Bei expandierten NK-Zellen hingegen blieb diese KIR-Gruppe weiterhin stärker aktiviert als der Durchschnitt der expandierten NK-Zellen (vgl. Abb. 3.16). Dies könnte mit der Voraktivierung expandierter NK-Zellen zusammenhängen, wodurch wie in Kap. 4.5.1.1 diskutiert insgesamt der Einfluss einer höheren HLA-I Expression auf Targetzellen zunehmen könnte. Andererseits könnte es allerdings auch ein Artefakt sein, wofür die hohen Standardabweichungen bei kleiner Stichprobe in diesem Versuchsansatz sprechen.

Zur Verbesserung des RL Modell könnte neben der direkten quantitativen oder semiquantitativen Bestimmung der HLA-I Moleküle auf der Zelloberfläche auch eine RNA-Sequenzierung beitragen, um über die Genexpression Aufschluss zur HLA-I Expression der Zellen zu erhalten [125].

4.5.1.4 HLA-Education

Eine wichtige Rolle in der Maturation von Vorläuferzellen zu alloreaktiven, immunkompetenten NK-Zellen spielt die NK-Zell-Education. Hierbei entwickeln sich jene Zellen zu potentiell stärker zytotoxisch aktivierbaren NK-Zellen, welche in der Lage sind über ihre KIR-Rezeptoren gesunde körpereigene Zellen zu erkennen. NK-Zellen, welche keinen passenden KIR-Liganden finden, sind im Umkehrschluss uneducated/unlicensed, werden hyporesponsiv und verlieren damit zytotoxisches Potential [59, 126-128]. Insbesondere für die GvL Reaktion

nach HSZT ist die HLA-Education zur Abschätzung der Alloreaktivität von NK-Zellen relevant [129, 130].

Gemäß dem Licensing-Modell passt sich die Größe der single-KIR tragenden NK-Zellpopulationen der Spender an die Education der NK Zellen an. Nach von Kim et al. 2005 veröffentlichten Daten werden NK-Zellen, welche einen KIR-Rezeptor für einen körpereigenen HLA-I-Liganden exprimieren nicht nur licensed, sondern auch zur Proliferation angeregt [59]. Zur Überprüfung dieser Hypothese können aus dem Spenderpool von 24 Spendern zehn Spender herangezogen werden, da bei den übrigen Spendern alle relevanten HLA-Liganden vorhanden sind oder von den Spendern keine frischen NK-Zellen untersucht wurden. Der Übersichtlichkeit halber wurde Tabelle 3.1 in Tabelle 3.2 auf diese Spender und die Fragestellung hin reduziert. Es zeigte sich, dass die Hypothese bei vier der zehn Spender zutreffend war. Bei den anderen sechs Spendern entsprach die single-KIR Verteilung nicht der nach dem Licensing-Modell zu erwartenden Verteilung. Die Anpassung der Größe der NK-Zellpopulationen an das Licensing konnte somit nur in knapp der Hälfte der Fälle nachempfunden werden. Dass die erwartete Korrelation nicht gezeigt werden konnte, könnte an der sehr kleinen Stichprobe von nur zehn Probanden liegen.

Die Rolle des Licensing bei der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen wurde in unseren Experimenten deutlich. So zeigte sich, dass bei frischen NK-Zellen sowohl mit als auch ohne CD19-4G7SDIE mAb Zugabe, licensed KIR-Populationen eine signifikant stärkere antileukämische Lyse-Aktivität aufweisen als KIR-Populationen, die nicht licensed wurden (vgl. Abb. 3.17 - 3.19). Dies könnte durch eine vermehrte Expression aktivierender Rezeptoren und verminderten Expression von iKIR auf licensed NK-Zellen erklärbar sein [131]. Der Einfluss der NK-Zell-Education ist allerdings im Ansatz ohne CD19-4G7SDIE mAb deutlich stärker ausgeprägt, da besonders die unlicensed KIR-Gruppen weiter unter der Durchschnittsaktivität liegen als nach CD19 mAb Zugabe (vgl. Abb. 3.20). Dies zeigt, dass die Education der NK-Zellen durch die ADCC überwunden werden könnte und dadurch einen deutlich geringeren Einfluss auf die NK-Zellaktivität nimmt und unterstützt damit

durch Du et al. 2014 veröffentlichte Daten, welche zeigen, dass durch eine Rituximab vermittelte ADCC nach HSZT auch hyporesponsive NK-Zellen aktiviert werden können [132]. Bei Untersuchungen mit Neuroblastom-Patienten scheint es sogar gegensätzliche Beobachtungen zu geben. Von Hsu et al. wurde 2012 gezeigt, dass insbesondere hyporesponsive unlicensed NK-Zellen eine besonders gute ADCC vermitteln können [133]. Dieser Widerspruch könnte in der Tatsache begründet sein, dass die Untersuchungen bei Neuroblastom-Patienten durchgeführt wurden. Da das Immunsystem bei Patienten sowohl durch den Tumor als auch durch die Therapie massiv beeinflusst wird, dürfte die Übertragbarkeit auf gesunde Probanden eingeschränkt sein. Alle diese Erkenntnisse passen allerdings zu rheostatischen Modellen der NK-Zell-Education, wonach NK-Zellen nicht lebenslang licensed oder „armed“ sind, sondern durch das Wechselspiel aktivierender und inhibitorischer Einflüsse zwischen hypo- und hyperresponsiven Zuständen wechseln können [134].

Zur Einordnung von NK-Zellen ohne iKIR-Rezeptor in Education-Modelle erfolgte der Vergleich der antileukämischen Aktivität frischer KIR-negativer NK-Zellen mit frischen licensed und unlicensed NK-Zellen. Es zeigte sich, dass NK-Zellen ohne iKIR-Rezeptor in ihrem zytotoxischen Potential bei unlicensed NK-Zellen einzuordnen sind. So kommt es zwischen frischen licensed und KIR-negativen NK-Zellen zu einem signifikanten und ähnlich großen Aktivitätsunterschied, wie er zwischen licensed und unlicensed NK-Zellen beobachtet werden konnte (vgl. Abb. 3.21). Gleichzeitig ist der Aktivitätsunterschied zwischen unlicensed und KIR-negativen NK-Zellen marginal und nicht signifikant (vgl. Abb. 3.22). Dies unterstreicht den, schon in vorangegangenen Arbeiten gezeigten, Stellenwert von iKIR-Rezeptoren für die Education von NK-Zellen. Ohne vorhandenen iKIR-Rezeptor bleiben die NK-Zellen uneducated und sind hyporesponsiv [59, 135]. An diesem Zustand scheint auch die ADCC nichts zu verändern, wengleich sich die Aktivität auch von KIR-negativen NK-Zellen durch CD19-4G7SDIE mAb Zugabe beinahe verdoppeln ließ (vgl. Abb. 3.21, 3.22 & 3.10).

Bei expandierten NK-Zellen scheint die Education keine große Rolle mehr zu spielen. In keinem der Vergleiche zwischen ursprünglich licensed und unlicensed expandierten NK-Zellen kam es zu einem signifikanten Unterschied (vgl. Abb. 3.23 – 3.26). Insbesondere im Vergleich der Durchschnittsaktivität aller licensed NK-Zellen mit allen unlicensed NK-Zellen sind die Unterschiede sowohl mit als auch ohne CD19 mAb Zugabe marginal und nicht signifikant (vgl. Abb. 3.26). Diese Ergebnisse decken sich mit bereits veröffentlichten Daten, nach denen der Licensing-Effekt bei voraktivierten NK-Zellen weniger großen Einfluss hat [59]. So zeigte sich beispielsweise, dass sich auch uneducated NK-Zellen durch Zytokine soweit aktivieren lassen, dass sie selbst HLA-I exprimierende Tumorzellen angreifen [127]. Ins Bild passt, dass es im Rahmen des Licensings auf NK-Zellen zu einer Verschiebung der Rezeptorexpression hin zu mehr aktivierenden Rezeptoren wie DNAM-1 und zur geringeren Expression von iKIR zu kommen scheint [131] – was mit der Veränderung der Rezeptorexpression im Rahmen unserer NK-Zellexpansion vergleichbar ist (vgl. Kap. 4.4.1).

4.5.1.5 B-Content-Score

Bei der Berechnung des B-Content-Scores fließen gemäß des KIR-Genotyping Modells nicht nur das Repertoire an inhibitorischen KIR-Rezeptoren, sondern vielmehr auch das Repertoire aktivierender KIR-Rezeptoren zur Einschätzung der NK-Zell-Alloreaktivität ein. Nach diesem Modell können die Spender in die zwei Gruppen „A“ und „B“ eingeteilt werden, wobei „A“ einem KIR-Haplotyp von A/A und damit einem B-Content-Score von 0 entspricht. Die Gruppe „B“ wiederum entspricht dem KIR-Haplotyp B/x und damit den Scores 1-4. Je höher der Score, desto größer die genetische Verfügbarkeit an aKIRs - NK-Zellen eines Spenders mit hohem Score sollen damit eine höhere Alloreaktivität aufweisen [34].

Vorangegangene Arbeiten zeigten einen Vorteil für Empfänger nach HSZT von Spendern der Haplotyp-Gruppe B. So hatten AML-Patienten nach HSZT von Spendern der Gruppe B ein signifikant erhöhtes rezidivfreies Überleben [58, 136]. Und auch bei kindlichen ALL-Patienten konnte durch Oevermann et al.

2014 ein signifikant längeres rückfallfreies Überleben bei Kindern mit einem Transplantat von einem KIR-Haplotyp B Spender im Vergleich zu solchen mit einem Transplantat eines KIR-Haplotyp A Spenders nachgewiesen werden [137].

Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine Korrelation zwischen der antileukämischen CD107a-Aktivität frischer NK-Zellen und dem B-Content-Score. Allerdings gab es hier klare Ausreißer, welche zur Berechnung der Ausgleichsgeraden nicht hinzugezogen wurden (vgl. Abb. 3.27). Teilt man die Spender in die KIR-Haplogruppen A und B, so wird hier eine erhöhte CD107a-Aktivität frischer NK-Zellen der Gruppe B deutlich, wobei auch hier Ausreißer vorhanden sind (vgl. Abb. 3.28). Somit stützen unsere Daten die These, dass es bei frischen NK-Zellen einen Unterschied zwischen der NK-Zellaktivität gegenüber kindlicher BCP-ALL-Zellen je nach KIR-Haplotyp gibt. Allerdings ist dieser Unterschied im Vergleich zum RL-Mismatch schwach ausgeprägt und es gibt innerhalb des Scores deutliche Ausreißer. Dies stützt die These von Handgretinger et al., wonach nach aktuellem Stand ein Spender mit hohem B-Contentscore bei gleichzeitig vorliegendem iKIR-Ligand-Mismatch ein optimaler Spender mit hoher antileukämischer NK-Zellaktivität zur T-Zelldepletierten HSZT wäre [34]. Wie bereits erwähnt, werden die Spender beim B-Contentscore in erster Linie nach der genetisch verfügbaren Zahl ihrer aktivierenden KIR-Rezeptoren eingeteilt (s. Kap. 1.2.2.3). Die Expressionsdichte und weitere aktivierende und inhibierende NK-Zelleinflüsse spielen im Score keine Rolle. Unsere Arbeit zeigt, dass im Einzelfall regelmäßig andere Einflüsse auf NK-Zellen eine übergeordnete Rolle zu spielen scheinen, wodurch die Kenntnis der aktivierenden KIR-Rezeptoren des B-Contentscores individuell keine sichere Vorhersage der antileukämischen Aktivität der NK-Zellen erlaubt. Die Ergebnisse des Luciferase-Assays stützen diese These, da auch hier mit frischen PBMC gegenüber keiner der getesteten BCP-ALL-Zelllinien eine erhöhte Aktivität von Spendern der Gruppe B (vgl. Abb. 3.29) auftrat. Hier spielt sicherlich auch die Tatsache eine Rolle, dass im Luciferase Assay nicht frische NK-Zellen allein getestet wurden. Die Mischung aus ficollisierten PBMCs könnte zu einer Überlagerung von gering ausgeprägten Unterschieden geführt haben.

Ein ähnliches Bild bot sich bei der Testung expandierter NK-Zellen. Hier konnte in keinem Assay ein Aktivitätsunterschied zwischen den Gruppen des B-Contentscores festgestellt werden (vgl. Abb. 3.30 & 3.31). Dies deutet darauf hin, dass der Einfluss des KIR-Haplotyps auf die zytotoxische NK-Zellaktivität versus kindlicher BCP-ALL-Blasten nach Expansion nicht mehr relevant ist. Eine Spenderselektion nach dem B-Contentscore wäre zur Spenderauswahl für einen adoptiven Transfer expandierter NK-Zellen bei der Therapie kindlicher ALL-Patienten damit nicht nötig.

Neuere Daten zeigen außerdem, dass es für eine erhöhte zytotoxische NK-Zellaktivität neben aktivierenden KIR-Rezeptoren auch auf das Repertoire an KIR-Liganden ankommt. Zum aktivierenden Rezeptor KIR2DS1 muss beim Spender für eine erhöhte NK-Zellaktivität gleichzeitig zumindest eine Heterogenität für einen C1-Liganden vorliegen [138]. Eine individuelle Anpassung des B-Contentscores an den einzelnen Patienten könnte somit eine weitere Optimierung der Spenderauswahl im Rahmen einer haploidenten HSZT bedeuten.

4.5.2 Weitere individuelle Einflussfaktoren

Die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen wird neben den KIR-Rezeptoren auch über ein komplexes Zusammenspiel weiterer aktivierender, inhibierender und costimulatorischer Rezeptoren gesteuert. Dank dieser Rezeptoren können NK-Zellen eine Über- oder Unterexpression einzelner Liganden auf anderen Zellen feststellen und krankhafte Zellen erkennen. Kommt es im Zell-Zell-Kontakt zu einem Übergewicht aktivierender Signale auf die NK-Zellen, so werden diese zytotoxisch aktiv. Eine wichtige Rolle unter den aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren nehmen NKG2D und DNAM-1 ein [28], weswegen in dieser Arbeit ein besonderer Fokus auf diese Rezeptoren gelegt wurde. Doch auch andere aktivierende Rezeptoren können die NK-Zellaktivität entscheidend verstärken. So korrelierte in Untersuchungen die zytotoxische antitumorale Aktivität von NK-Zellen direkt mit der Expressionsdichte von NKp44 und NKp46 [48, 139].

In dieser Arbeit konnte zwischen der CD107a-Aktivität von frischen NK-Zellen und der individuellen Expressionsdichte einzelner aktivierender und inhibierender Rezeptoren keine Korrelation festgestellt werden (vgl. Abb. 3.32). Diese Ergebnisse müssen nicht die aktivierenden und inhibierenden Einflüsse der Rezeptoren in Frage stellen, sondern unterstreichen vielmehr, dass nicht einzelne Rezeptoren allein für die NK-Zellaktivität verantwortlich sind. Besitzt eine NK-Zelle beispielsweise eine hohe Dichte des aktivierenden Rezeptors DNAM-1, so kann ihre Aktivität dennoch durch eine gleichzeitig vorherrschende hohe Dichte des inhibierenden Rezeptors CD94 gebremst sein. Noch komplexer wird das Zusammenspiel der Rezeptoren beim Blick auf die zugehörigen Liganden. So ist für die Liganden Nectin-2 (CD112) und PVR (CD155) bekannt, dass sie neben dem aktivierenden Rezeptor DNAM-1 auch von den inhibierenden Co-Rezeptoren TIGIT und CD96 gebunden werden [129]. Zudem wurde im Rahmen der Education-Modelle immer wieder über die Beobachtung diskutiert, dass gerade NK-Zellen, welche viele aktivierende Signale erhalten dazu tendieren hyporesponsiv zu werden und im Umkehrschluss NK-Zellen, welche vermehrt inhibitorischen Einflüssen ausgesetzt sind, ein hohes zytotoxisches Aktivierungspotential besitzen [140]. Um die Korrelation zwischen den getesteten aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren und der NK-Zellaktivität weiter zu untersuchen, könnte man daher beispielsweise andere parallel wirkende Einflüsse blockieren oder mit einer größeren Probandengruppe arbeiten.

Auch für die beiden aktivierenden Rezeptoren NKG2D und DNAM-1 konnte in dieser Arbeit keine Korrelation zwischen CD107a-Aktivität und Rezeptor-Expressionsdichte auf frischen NK-Zellen nachgewiesen werden. Wurde jedoch einer dieser beiden aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren geblockt, so kam es zu deutlich verminderten NK-Zellaktivitäten gegenüber den kindlichen BCP-ALL-Zelllinien Nalm-16 und SEM. Eine Blockade von DNAM-1 wirkte sich hierbei deutlich stärker aus als eine Blockade von NKG2D. Wie bereits diskutiert findet sich auf Nalm-16 Zellen eine deutlich erhöhte Konzentration des DNAM-1-Liganden PVR (CD155) (s. Kap. 4.3). Der große Einfluss der DNAM-1 Blockade fügt sich daher ins Bild der hohen Relevanz des aktivierenden DNAM-1-

Rezeptors auf die zytotoxische NK-Zellaktivität gegenüber Nalm-16 Zellen. Dies passt zu den Erkenntnissen anderer Arbeitsgruppen, welche unter anderem in funktionellen Tests mit monoklonalen anti-NKG2D und anti-DNAM-1 Antikörpern zu dem Schluss kamen, dass DNAM-1 Interaktionen eine entscheidende Rolle in der zytotoxischen NK-Zellaktivität gegenüber Leukämiezell-Blasten spielen und hierbei wichtiger als NKG2D Interaktionen sind [102, 141].

Den stärksten aktivitätsmindernden und dabei deutlich signifikanten Einfluss hatte erwartungsgemäß die gleichzeitige Blockade beider aktivierender Rezeptoren mit einer Reduktion der CD107a-Aktivität auf ein Viertel des Vergleichswerts. Derselbe Effekt wurde auch nach Zugabe des CD19-4G7SDIE mAb beobachtet. Allerdings fiel die relative Reduktion hier geringer aus und es zeigt sich, dass die CD19 mAb vermittelte ADCC auch nach Blockade der beiden aktivierenden Rezeptoren DNAM-1 und NKG2D immer noch um circa 50 Prozent höher liegt als die Aktivität der frischen NK-Zellen ohne CD19 mAb und ohne Rezeptorblockade (vgl. Abb. 3.33). Zudem wurde in dieser Arbeit deutlich, dass auch bei Blockade von NKG2D und/oder DNAM-1 die KIR-Rezeptoren auf den NK-Zellen und deren Einfluss über den RL-Mismatch relevant bleiben. Man kann besonders beim Ansatz mit Nalm-16 Zellen den Eindruck bekommen, dass die Relevanz des KIR RL-Mismatches bei Blockade von NKG2D und DNAM-1 weiter zunimmt (vgl. Abb. 3.34 & 3.35). Diese Ergebnisse sind plausibel, da es durch die Blockade der beiden aktivierenden NK-Zell pathways vermutlich zu einer Aufwertung der Rolle der anderen NK-Zell-Interaktionen kommt. Somit zeigt sich, dass BCP-ALL Patienten mit Blasten geringer NK-Zellsuszeptibilität besonders von einer adoptiven Therapie mit dem CD19-4G7SDIE mAb und bei haploidenter HSZT von einer Spenderauswahl nach dem Rezeptor-Ligand-Modell profitieren dürften. Zudem gibt es Forschungsgruppen, die sich der Suche nach Möglichkeiten zur Stimulation der Expression von Liganden für DNAM-1 und NKG2D auf Tumorzellen *in vivo*, beispielsweise durch Chemotherapeutika oder Hyperthermie-Behandlung, widmen [142].

Wie bereits diskutiert hat sich durch die Expansion die Expressionsdichte der aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren auf den NK-Zellen verschoben.

Passend zu den Ergebnissen vorangegangener Arbeiten kam es bei fast allen Rezeptoren zu einer durchschnittlich stärkeren Oberflächenexpression (s. Kap. 4.4.1). Im Vergleich der Expressionsdichten mit der zytotoxischen Aktivität der expandierten NK-Zellen, konnten für die aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren NKp30 und NKp46 signifikante, positive Korrelationen festgestellt werden (vgl. Abb. 3.36). Dass hier, im Gegensatz zu den Ansätzen mit frischen NK-Zellen, positive Korrelationen festgestellt werden konnten, könnte an geringeren Streubreiten der Rezeptordichte bei den expandierten NK-Zellen liegen. Durch die Expansion kam es wie oben diskutiert zur verstärkten Expression aktivierender NK-Zellrezeptoren bei allen Spendern, wobei die interindividuellen Unterschiede zwischen den Spendern geringer wurden. Ins Bild passt, dass genau die beiden Rezeptoren NKp30 und NKp44, für welche nun eine positive Korrelation zur NK-Zellaktivität festgestellt werden konnte, durch die Expansion besonders stark auf der NK-Zelloberfläche zugenommen haben (s. Kapitel 4.4.2). Die Nivellierung der Unterschiede zwischen den Expressionsdichten der Spender könnte folglich genau den bei den frischen NK-Zellen diskutierten Effekt aufgehoben und damit für eine bessere Vergleichbarkeit einzelner Rezeptoreinflüsse gesorgt haben.

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass sich aus der Analyse der Oberflächenexpression einzelner aktivierender Rezeptoren kein valider Rückschluss auf die antileukämische NK-Zellaktivität ziehen lässt. Der große Stellenwert der aktivierenden Liganden DNAM-1 und NKG2D für die antileukämische NK-Zellaktivität hat sich in den durchgeführten Blockierungsexperimenten bestätigt, gleichwohl scheint sich auch hier aus der alleinigen Bestimmung der Rezeptordichte auf Spender-NK-Zellen keine sichere Vorhersage zum antileukämischen Potential der NK-Zellen ableiten zu lassen.

Durch die getestete NK-Zellexpansion lassen sich interindividuelle Unterschiede in der Oberflächenexpression von NK-Zellen allerdings angleichen, was besonders für Patienten oder Spender mit geringer intrinsischer NK-Zellaktivität relevant sein könnte.

4.5.3 Zusammenfassung der individuellen Einflüsse

Wie gezeigt, unterscheiden sich NK-Zellen verschiedener Spender deutlich in der Expression individueller Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. Erwartungsgemäß gibt es auch in der NK-Zellaktivität gegenüber den Targetzellen deutliche interindividuelle Unterschiede. Bei der Darstellung der Ergebnisse der einzelnen Spender mit Verbindungslinien zwischen den Ergebnissen der unterschiedlichen Ansätze in Abb. 3.37 zeigt sich nicht nur, dass es bei nahezu jedem Spender zu einer deutlichen Steigerung der zytotoxischen Aktivität frischer und expandierter NK-Zellen bei Zugabe des CD19-4G7SDIE mAb kommt. An den sich weitgehend nicht kreuzenden Verbindungslinien wird vielmehr deutlich, dass es sowohl bei den frischen als auch bei den expandierten NK-Zellen zwischen den Spendern eine Reihenfolge in der NK-Zellaktivität gibt, welche ohne und mit Zugabe des CD19 mAb besteht. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass es Menschen mit besserer und solche mit geringerer NK-Zellaktivität gibt. Auch im Luciferase-Assay konnte eine solche Konstanz in der Rangfolge der Spender nach NK-Zellaktivität festgestellt werden. Die großen Punktunterschiede zwischen den Spendern innerhalb der angefertigten Scores deuten darauf hin, dass die Reihenfolge der Spender über die verschiedenen Targetzellen hinweg mit und ohne CD19-4G7SDIE mAb Zugabe ähnlich zu sein scheint.

BCP-ALL-Targetunabhängig und über die Aktivierung von NK-Zellen durch Expansion und CD19 mAb Gabe hinweg scheint es folglich Spender mit gleichbleibend starker oder schwacher NK-Zellaktivität zu geben. Ein ganz ähnliches Muster konnten Jochner et al. 2020 in einer Arbeit unserer Arbeitsgruppe mit Neuroblastomzellen als Targetzellen für frische und expandierte NK-Zellen darstellen [143].

Bei unseren Ergebnissen handelt es sich um Hinweise auf eine Erscheinung, die noch weiter untersucht werden muss. Sollte es sich bewahrheiten, dass Spender anhand ihrer NK-Zellaktivität grundsätzlich in „gute“ und „schlechte“ Spender einteilbar sind, so hätte das für die Spenderauswahl vor einer HSZT größte Relevanz. Bisher werden zur Spenderauswahl unterschiedlichste Faktoren wie Alter, Geschlecht, Blutgruppenantigene und KIR-Genotyping (KIR gene content score aktivierender KIR-Rezeptoren) berücksichtigt. Es gibt jedoch noch keinen

etablierten festen Algorithmus, nach welchem Spender zum Beispiel bei der Haploidenten HSZT ausgewählt werden [144]. Wie oben diskutiert kann eine solche Auswahl zum Beispiel mittels iKIR Rezeptor-Ligand Mismatch und B-Content Score Analysen erfolgen [34]. Diese Arbeit gibt allerdings Argumente dafür, die Auswahl des am besten geeigneten Spenders, um einen standardisierten funktionellen Assay mit mehreren zur Tumorentität des Patienten passenden Zelllinien zu erweitern. Durch einen solchen Assay könnte mit relativ einfachen Mitteln die potentielle Lysefähigkeit von PBMC aller verfügbaren Spender gegenüber dem Tumor des Patienten getestet werden. Außerdem wird in dieser Arbeit deutlich, dass sich die interindividuellen Unterschiede in der NK-Zellaktivität sowohl nach CD19-4G7SDIE mAb Zugabe als auch nach NK-Zellexpansion deutlich verringern (s. Abb. 3.37). Dies dürfte für den klinischen Alltag sehr interessant sein, da es darauf hindeutet, dass onkologische Patienten mit geringer intrinsischer NK-Zellaktivität besonders von einer zusätzlichen Therapie mit dem CD19-4G7SDIE mAb und/oder von einem adoptiven Transfer expandierter NK-Zellen profitieren dürften.

5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die Behandlung der kindlichen B-Zell-Leukämie stellt insbesondere bei Patienten der Hochrisiko-Gruppe bis heute eine große Herausforderung dar. Zur Verbesserung der Therapie ist eine Optimierung der Stammzelltransplantation essentiell, gleichzeitig stellen neue immunologische Verfahren vielversprechende Erweiterungen der Therapieoptionen dar.

In der vorliegenden Arbeit ging es darum, die NK-Zellvermittelte antileukämische Aktivität spenderspezifisch zu untersuchen, um Möglichkeiten der Verbesserung von adoptiven immunologischen Therapien oder der Spenderauswahl vor einer HSZT aufzuzeigen. Hierfür wurden NK-Zellen gesunder Spender expandiert und sowohl frische als auch expandierte NK-Zellen funktionell *in vitro* gegenüber mehreren pädiatrischen BCP-ALL-Zelllinien getestet. Außerdem wurde der Einfluss des therapeutischen monoklonalen CD19-4G7SDIE Antikörpers auf die zytotoxische NK-Zellaktivität gegenüber B-Vorläufer-Leukämiezelllinien untersucht.

Das antileukämische Potential von NK-Zellen hat sich in dieser Arbeit bestätigt. NK-Zellen-Expansionen nach dem vorliegenden Protokoll erweisen sich als sehr effizient und führen durch die Voraktivierung der NK-Zellen zu einer deutlich gesteigerten antileukämischen Aktivität.

Auch durch die Zugabe des CD19-4G7SDIE mAb kommt es zu einer deutlichen Steigerung der NK-Zellaktivität, wobei der CD16 Polymorphismus keine Rolle zu spielen scheint. Es zeigte sich, dass die Kombination aus NK-Zellexpansion und CD19-4G7SDIE mAb Zugabe zur größten Steigerung der antileukämischen NK-Zellaktivität führt.

Zwischen der NK-Zellaktivität der einzelnen Spender traten deutliche Unterschiede auf. KIR-HLA Interaktionen spielen hier eine deutliche Rolle und ermöglichen Therapieansätze durch eine passende Spenderauswahl oder KIR-Antikörper. Allerdings erlaubte in unseren Experimenten kein KIR-HLA Modell eine sichere Vorhersage im Einzelfall.

DNAM-1 wurde in anderen Arbeiten als einer der wichtigsten aktivierenden Rezeptoren identifiziert. Die vorrangige Stellung des Rezeptors wurde in den durchgeführten Blockierungsexperimenten sichtbar, die Stärke der

Oberflächenexpression erwies sich jedoch genauso wenig als geeignet zur Vorhersage der NK-Zellaktivität im Einzelfall. Das komplexe Zusammenspiel weiterer aktivierender und inhibierender Rezeptoren scheint somit eine Reduktion der NK Alloreaktivität auf einzelne, wenige Rezeptoren nicht zuzulassen, wobei der wichtige Stellenwert der KIR-Rezeptoren, DNAM-1 und NKG2D in der NK-Alloreaktivität bei der BCP-ALL bestätigt wurden.

In Zusammenschau der Erkenntnisse aus eigenen Experimenten und veröffentlichten Daten anderer Arbeitsgruppen wird deutlich, dass die Überprüfung der HLA-I Expression auf Targetzellen sowie des KIR-Potentials bei Patient und Spender sinnvoll ist, da sich hieraus eventuell sinnvolle Therapieanpassungen ergeben können und durch die Evaluation eines möglichen HLA-I Rezeptor-Ligand Mismatch sowie des B-Contentscores eine bessere Spenderauswahl vor einer haploidenten HSZT möglich wird. Gleichzeitig scheint eine funktionelle Testung der NK-Zellen bei pädiatrischen BCP-ALL Patienten der Hochrisikogruppe und bei in Frage kommenden Spendern spätestens vor einer haploidenten HSZT sinnvoll und vergleichsweise einfach durchführbar zu sein. Mögliche Testverfahren könnten die in dieser Arbeit angewandten CD107a- oder Luciferase-Assays sein, wobei ein standardisierter Ablauf zu etablieren wäre.

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass durch die getestete NK-Zellexpansion, genauso wie durch Zugabe des CD19-4G7SDIE mAb, alle Spender-NK-Zellen ähnlich profitierten, da sich hierdurch interindividuelle Unterschiede in der Potenz der NK-Zell-Alloreaktivität angeglichen haben. Diese Erkenntnisse sind damit besonders für onkologische Patienten mit geringer intrinsischer NK-Zellaktivität relevant, da diese folglich umso mehr von einer CD19-4G7SDIE vermittelten ADCC oder vom adoptiven Transfer expandierter NK-Zellen profitieren könnten. Außerdem wurde in dieser Arbeit deutlich, dass eine gute NK-Zellaktivität spenderabhängig ist, was einen hohen Fokus auf die Spenderauswahl bei der allogenen HSZT unterstützt. Patienten und mögliche Spender mit geringer intrinsischer antileukämischer NK-Zellaktivität könnten hierdurch zuverlässig erkannt und der Nutzen weiterer Therapieoptionen besser evaluiert werden.

Für noch verlässlichere Aussagen zur tatsächlichen, individuellen antileukämischen NK-Zellaktivität sollte eine standardisierte funktionelle NK-Zell-Testung direkter Zytotoxizität und Antikörper-vermittelter Zytotoxizität etabliert werden. Patienten und mögliche Spender mit geringer intrinsischer antileukämischer NK-Zellaktivität könnten hierdurch zuverlässig erkannt und der Nutzen weiterer Therapieoptionen besser evaluiert werden.

6 ANHANG

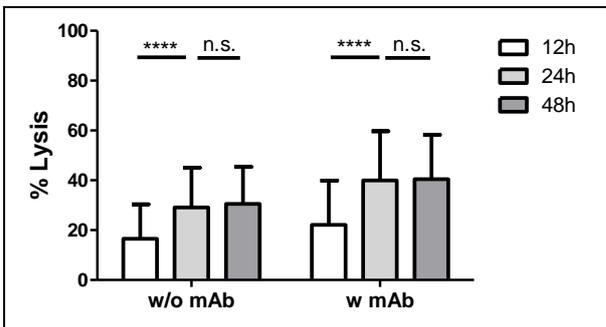


Abbildung 6.1: Exp. NK-Zellen vs. Nalm-16, E/T 0,5:1

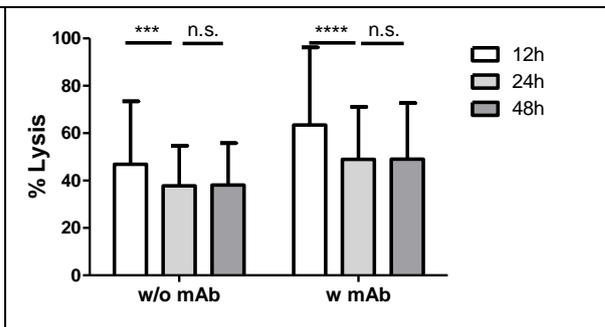


Abbildung 6.2: Exp. NK-Zellen vs. Nalm-16, E/T 1:1

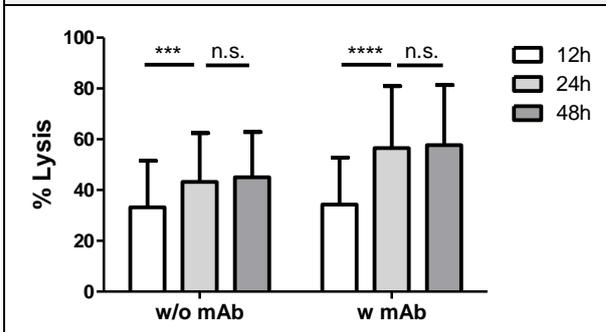


Abbildung 6.3: Exp. NK-Zellen vs. Nalm-6, E/T 0.5:1

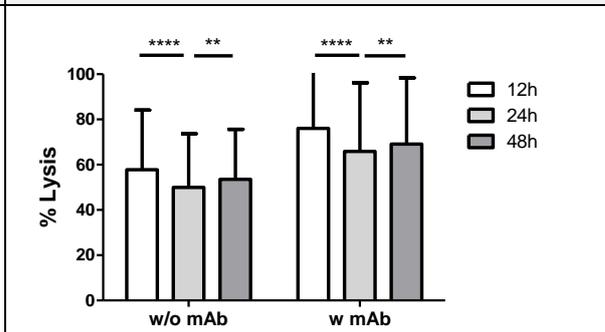


Abbildung 6.4: Exp. NK-Zellen vs. Nalm-6, E/T 1:1

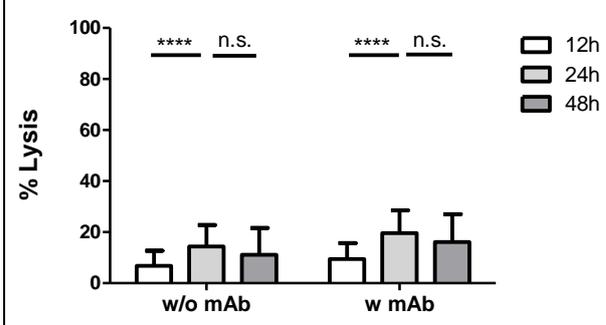


Abbildung 6.5: Exp. NK-Zellen vs. SEM, E/T 0.5:1

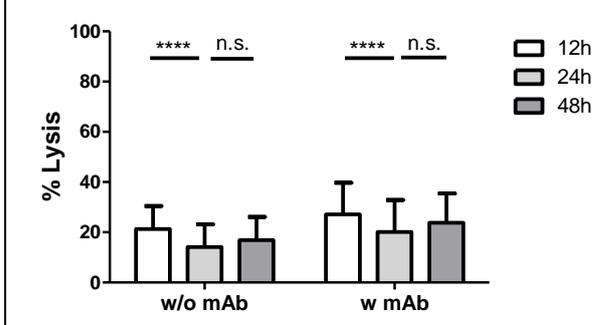


Abbildung 6.6: Exp. NK-Zellen vs. SEM, E/T 1:1

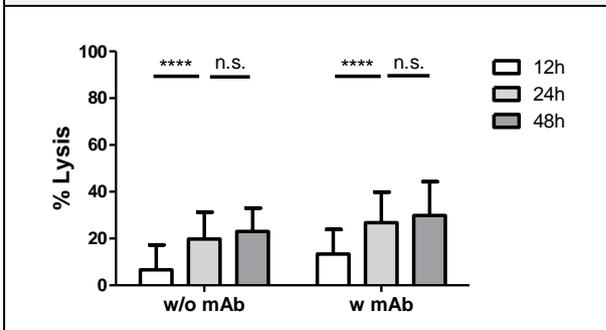


Abbildung 6.7: Exp. NK-Zellen vs. MHH, E/T 0.5:1

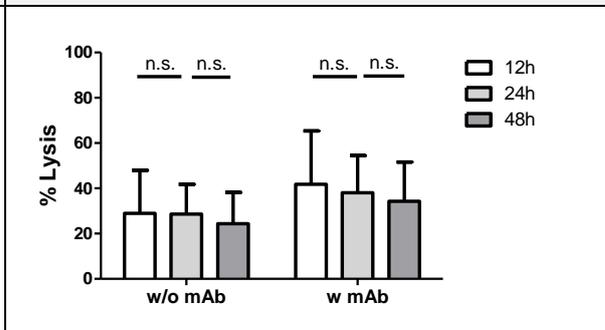
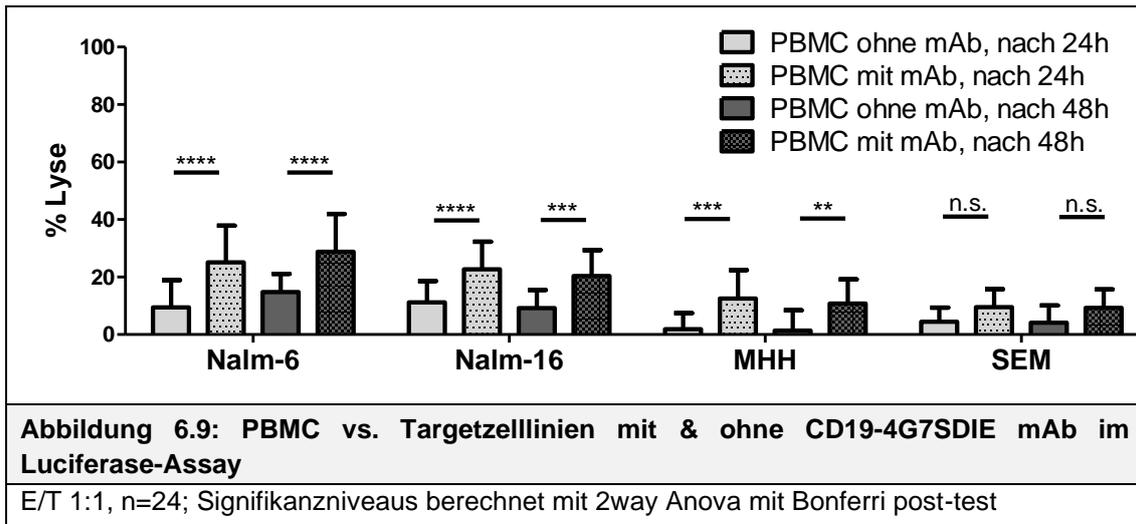


Abbildung 6.8: Exp. NK-Zellen vs. MHH, E/T 1:1



7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Kaatsch P, Spix C, German Childhood Cancer Registry - Annual Report 2015 (1980-2014). Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz, 2015.
2. Pui, C.H., et al., *Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Progress Through Collaboration*. J Clin Oncol, 2015. **33**(27): p. 2938-48.
3. Hunger, S.P. and C.G. Mullighan, *Acute Lymphoblastic Leukemia in Children*. N Engl J Med, 2015. **373**(16): p. 1541-52.
4. AIEOP-BFM ALL 2009, in Version 1.3, 07.01.2013
5. Nguyen, K., et al., *Factors influencing survival after relapse from acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study*. Leukemia, 2008. **22**(12): p. 2142-50.
6. Locatelli, F., et al., *How I treat relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 2012. **120**(14): p. 2807-16.
7. Cooper, S.L. and P.A. Brown, *Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia*. Pediatr Clin North Am, 2015. **62**(1): p. 61-73.
8. Pulsipher, M.A., C. Peters, and C.-H. Pui, *High-Risk Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia: To Transplant or Not to Transplant?* Biology of Blood and Marrow Transplantation, 2011. **17**(1, Supplement): p. S137-S148.
9. Wayne, A.S., K. Baird, and R.M. Egeler, *Pediatric Clinics of North America: Hematopoietic Stem Cell Transplantation Stem Cell Transplantation for Leukemia*. Pediatric clinics of North America, 2010. **57**(1): p. 1-25.
10. Gatti, R., et al., *Originally published as Volume 2, Issue 7583 IMMUNOLOGICAL RECONSTITUTION OF SEX-LINKED LYMPHOPENIC IMMUNOLOGICAL DEFICIENCY*. The Lancet, 1968. **292**(7583): p. 1366-1369.
11. Henig, I. and T. Zuckerman, *Hematopoietic Stem Cell Transplantation—50 Years of Evolution and Future Perspectives*. Rambam Maimonides Medical Journal, 2014. **5**(4): p. e0028.
12. Horowitz, M.M., et al., *Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation*. Blood, 1990. **75**(3): p. 555-62.
13. Rocha, V. and F. Locatelli, *Searching for alternative hematopoietic stem cell donors for pediatric patients*. Bone Marrow Transplant, 2008. **41**(2): p. 207-14.
14. Rocha, V. and E. Gluckman, *Improving outcomes of cord blood transplantation: HLA matching, cell dose and other graft- and transplantation-related factors*. Br J Haematol, 2009. **147**(2): p. 262-74.
15. Locatelli, F., et al., *Negative depletion of alpha/beta+ T cells and of CD19+ B lymphocytes: a novel frontier to optimize the effect of innate immunity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation*. Immunol Lett, 2013. **155**(1-2): p. 21-3.
16. Aversa, F., et al., *Treatment of High-Risk Acute Leukemia with T-Cell-Depleted Stem Cells from Related Donors with One Fully Mismatched HLA Haplotype*. New England Journal of Medicine, 1998. **339**(17): p. 1186-1193.

17. Apperley, J., et al., *Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Global Overview Comparing Asia, the European Union, and the United States*. Biol Blood Marrow Transplant, 2015.
18. Im, H.J., K.N. Koh, and J.J. Seo, *Recent advances in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation using ex vivo T cell-depleted graft in children and adolescents*. Blood Res, 2016. **51**(1): p. 8-16.
19. Martinet, L. and M.J. Smyth, *Balancing natural killer cell activation through paired receptors*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(4): p. 243-254.
20. Kannan, G.S., A. Aquino-Lopez, and D.A. Lee, *Natural killer cells in malignant hematology: A primer for the non-immunologist*. Blood Reviews.
21. Shi, F.-D., et al., *Organ-specific features of natural killer cells*. Nature Reviews Immunology, 2011. **11**: p. 658.
22. Walzer, T., et al., *Identification, activation, and selective &in vivo& ablation of mouse NK cells via NKp46*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(9): p. 3384.
23. Raulat, D.H. and N. Guerra, *Oncogenic stress sensed by the immune system: role of natural killer cell receptors*. Nature Reviews Immunology, 2009. **9**: p. 568.
24. Vivier, E., et al., *Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells*. Science, 2011. **331**(6013): p. 44-9.
25. Smyth, M.J., et al., *New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer*. Nature Reviews Cancer, 2002. **2**: p. 850.
26. Suck, G., et al., *Interleukin-15 supports generation of highly potent clinical-grade natural killer cells in long-term cultures for targeting hematological malignancies*. Exp Hematol, 2011. **39**(9): p. 904-14.
27. Vivier, E., et al., *Functions of natural killer cells*. Nature Immunology, 2008. **9**: p. 503.
28. Malmberg, K.-J., et al., *Natural killer cell-mediated immunosurveillance of human cancer*. Seminars in Immunology, 2017. **31**: p. 20-29.
29. Fauriat, C., et al., *Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition*. Blood, 2010. **115**(11): p. 2167.
30. Screpanti, V., et al., *Impact of FASL-induced apoptosis in the elimination of tumor cells by NK cells*. Molecular Immunology, 2005. **42**(4): p. 495-499.
31. McDowell, K.A., et al., *NK Cell-based Immunotherapies in Pediatric Oncology*. Journal of pediatric hematology/oncology, 2015. **37**(2): p. 79-93.
32. O'Sullivan, T.E., J.C. Sun, and L.L. Lanier, *Natural Killer Cell Memory*. Immunity, 2015. **43**(4): p. 634-645.
33. Farag, S.S. and M.A. Caligiuri, *Human natural killer cell development and biology*. Blood Reviews, 2006. **20**(3): p. 123-137.
34. Handgretinger, R., P. Lang, and M.C. Andre, *Exploitation of Natural Killer (NK) cells for the treatment of acute leukemia*. Blood, 2016.
35. Bjorkstrom, N.K., et al., *Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education*. Blood, 2010. **116**(19): p. 3853-64.

36. Ferlazzo, G., et al., *The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic*. J Immunol, 2004. **172**(3): p. 1455-62.
37. De Maria, A., et al., *Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56dimCD16+ NK cells as rapid producers of abundant IFN- γ on activation*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. **108**(2): p. 728-732.
38. Fauriat, C., et al., *Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition*. Blood, 2010. **115**(11): p. 2167-2176.
39. Poli, A., et al., *CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset*. Immunology, 2009. **126**(4): p. 458-65.
40. Castriconi, R., et al., *Natural Killer Cell-Mediated Killing of Freshly Isolated Neuroblastoma Cells. Critical Role of DNAX Accessory Molecule-1–Poliovirus Receptor Interaction*, 2004. **64**(24): p. 9180-9184.
41. Cibrian, D. and F. Sanchez-Madrid, *CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper*. Eur J Immunol, 2017. **47**(6): p. 946-953.
42. Wagner, J.A. and T.A. Fehniger, *Human Adaptive Natural Killer Cells: Beyond NKG2C*. Trends in immunology, 2016. **37**(6): p. 351-353.
43. Bottino, C., et al., *Cellular ligands of activating NK receptors*. Trends in Immunology, 2005. **26**(4): p. 221-226.
44. Raulet, D.H. and R.E. Vance, *Self-tolerance of natural killer cells*. Nature Reviews Immunology, 2006. **6**: p. 520.
45. Klimosch, S.N., et al., *Genetically coupled receptor-ligand pair NKp80-AICL enables autonomous control of human NK cell responses*. Blood, 2013. **122**(14): p. 2380-9.
46. Ochoa, M.C., et al., *Antibody-dependent cell cytotoxicity: immunotherapy strategies enhancing effector NK cells*. Immunology and Cell Biology, 2017. **95**(4): p. 347-355.
47. Colonna, M., et al., *Alloantigen recognition by two human natural killer cell clones is associated with HLA-C or a closely linked gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(17): p. 7983-5.
48. Koch, J., et al., *Activating natural cytotoxicity receptors of natural killer cells in cancer and infection*. Trends in Immunology, 2013. **34**(4): p. 182-191.
49. Brandt, C.S., et al., *The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans*. The Journal of Experimental Medicine, 2009. **206**(7): p. 1495.
50. Long, E.O., et al., *Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition*. Annu Rev Immunol, 2013. **31**: p. 227-58.
51. Koene, H.R., et al., *Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype*. Blood, 1997. **90**(3): p. 1109-14.
52. Mellor, J.D., et al., *A critical review of the role of Fc gamma receptor polymorphisms in the response to monoclonal antibodies in cancer*. Journal of Hematology & Oncology, 2013. **6**(1): p. 1.
53. Parham, P., *MHC class I molecules and kirs in human history, health and survival*. Nature Reviews Immunology, 2005. **5**: p. 201.

54. Roberti, M.P., et al., *Overexpression of CD85j in TNBC patients inhibits Cetuximab-mediated NK-cell ADCC but can be restored with CD85j functional blockade*. European Journal of Immunology, 2015. **45**(5): p. 1560-1569.
55. Leung, W., *Use of NK cell activity in cure by transplant*. British Journal of Haematology, 2011. **155**(1): p. 14-29.
56. Ruggeri, L., et al., *Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation*. Blood, 1999. **94**(1): p. 333-9.
57. Leung, W., et al., *Determinants of Antileukemia Effects of Allogeneic NK Cells*. The Journal of Immunology, 2004. **172**(1): p. 644-650.
58. Symons, H.J., et al., *Improved survival with inhibitory killer immunoglobulin receptor (KIR) gene mismatches and KIR haplotype B donors after nonmyeloablative, HLA-haploidentical bone marrow transplantation*. Biol Blood Marrow Transplant, 2010. **16**(4): p. 533-42.
59. Kim, S., et al., *Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules*. Nature, 2005. **436**: p. 709.
60. Fernandez, N.C., et al., *A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules*. Blood, 2005. **105**(11): p. 4416-23.
61. Wagner, A.K., et al., *Expression of CD226 is associated to but not required for NK cell education*. Nature Communications, 2017. **8**: p. 15627.
62. Kongtim, P., et al., *Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation as a Platform for Post-Transplantation Cellular Therapy*. Biol Blood Marrow Transplant, 2015. **21**(10): p. 1714-20.
63. Ruggeri, L., et al., *Effectiveness of Donor Natural Killer Cell Alloreactivity in Mismatched Hematopoietic Transplants*. Science, 2002. **295**(5562): p. 2097-2100.
64. Mavers, M. and A. Bertaina, *High-Risk Leukemia: Past, Present, and Future Role of NK Cells*. Journal of Immunology Research, 2018. **2018**: p. 1586905.
65. Suck, G., Y.C. Linn, and T. Tonn, *Natural Killer Cells for Therapy of Leukemia*. Transfus Med Hemother, 2016. **43**(2): p. 89-95.
66. Vacca, P., et al., *NK Cells and Other Innate Lymphoid Cells in Hematopoietic Stem Cell Transplantation*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 188.
67. Michaelis, S.U., et al., *KIR haplotype B donors but not KIR-ligand mismatch result in a reduced incidence of relapse after haploidentical transplantation using reduced intensity conditioning and CD3/CD19-depleted grafts*. Annals of Hematology, 2014. **93**(9): p. 1579-1586.
68. Burns, L.J., et al., *IL-2-based immunotherapy after autologous transplantation for lymphoma and breast cancer induces immune activation and cytokine release: a phase I/II trial*. Bone Marrow Transplantation, 2003. **32**: p. 177.
69. Schlegel, P., et al., *Long-term IL-2 therapy after transplantation of T cell depleted stem cells from alternative donors in children*. Best Pract Res Clin Haematol, 2011. **24**(3): p. 443-52.

70. Pfeiffer, M.M., et al., *IL-15-stimulated CD3/CD19-depleted stem-cell boosts in relapsed pediatric patients after haploidentical SCT*. *Leukemia*, 2012. **26**(11): p. 2435-9.
71. Lang, P.J., et al., *Co-Transfusion of Donor NK Cells in Haploidentical Stem Cell Transplantation*. *Blood*, 2008. **112**(11): p. 2907-2907.
72. Suck, G. and M.B. Koh, *Emerging natural killer cell immunotherapies: large-scale ex vivo production of highly potent anticancer effectors*. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*, 2010. **3**(3): p. 135-42.
73. Romagne, F., et al., *Preclinical characterization of 1-7F9, a novel human anti-KIR receptor therapeutic antibody that augments natural killer-mediated killing of tumor cells*. *Blood*, 2009. **114**(13): p. 2667-77.
74. Vey, N., et al., *A phase 1 trial of the anti-inhibitory KIR mAb IPH2101 for AML in complete remission*. *Blood*, 2012. **120**(22): p. 4317-23.
75. Hermanson, D.L. and D.S. Kaufman, *Utilizing chimeric antigen receptors to direct natural killer cell activity*. *Front Immunol*, 2015. **6**: p. 195.
76. Seidel, U.J.E., et al., *Reduction of Minimal Residual Disease in Pediatric B-lineage Acute Lymphoblastic Leukemia by an Fc-optimized CD19 Antibody*. *Molecular Therapy*, 2016. **24**(9): p. 1634-1643.
77. Tobinai, K., et al., *A Review of Obinutuzumab (GA101), a Novel Type II Anti-CD20 Monoclonal Antibody, for the Treatment of Patients with B-Cell Malignancies*. *Advances in Therapy*, 2017. **34**(2): p. 324-356.
78. Hammer, O., *CD19 as an attractive target for antibody-based therapy*. *MAbs*, 2012. **4**(5): p. 571-7.
79. Lang, P., et al., *Chimeric CD19 antibody mediates cytotoxic activity against leukemic blasts with effector cells from pediatric patients who received T-cell-depleted allografts*. *Blood*, 2004. **103**(10): p. 3982-5.
80. Naddafi, F. and F. Davami, *Anti-CD19 Monoclonal Antibodies: a New Approach to Lymphoma Therapy*. *International journal of molecular and cellular medicine*, 2015. **4**(3): p. 143-151.
81. Kellner, C., et al., *The Fc-engineered CD19 antibody MOR208 (XmAb5574) induces natural killer cell-mediated lysis of acute lymphoblastic leukemia cells from pediatric and adult patients*. *Leukemia*, 2013. **27**(7): p. 1595-8.
82. Boyum, A., *Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g*. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 1968. **97**: p. 77-89.
83. Fujisaki, H., et al., *Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy*. *Cancer Res*, 2009. **69**(9): p. 4010-7.
84. Imai, C., S. Iwamoto, and D. Campana, *Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells*. *Blood*, 2005. **106**(1): p. 376-383.
85. Anderson, D.M., et al., *Functional characterization of the human interleukin-15 receptor alpha chain and close linkage of IL15RA and IL2RA genes*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(50): p. 29862-9.
86. Keskinen, P., et al., *Regulation of HLA class I and II expression by interferons and influenza A virus in human peripheral blood mononuclear cells*. *Immunology*, 1997. **91**(3): p. 421-9.

87. Ibrahim, S.F. and G. van den Engh, *Flow cytometry and cell sorting*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2007. **106**: p. 19-39.
88. Brown, M. and C. Wittwer, *Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology*. Clinical Chemistry, 2000. **46**(8): p. 1221-1229.
89. Herzenberg, L.A., et al., *The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford*. Clin Chem, 2002. **48**(10): p. 1819-27.
90. Alter, G., J.M. Malenfant, and M. Altfeld, *CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity*. J Immunol Methods, 2004. **294**(1-2): p. 15-22.
91. White, E.H., et al., *The chemi- and bioluminescence of firefly luciferin: An efficient chemical production of electronically excited states*. Bioorganic Chemistry, 1971. **1**(1): p. 92-122.
92. Azad, T., A. Tashakor, and S. Hosseinkhani, *Split-luciferase complementary assay: applications, recent developments, and future perspectives*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014. **406**(23): p. 5541-5560.
93. Mandal, A. and C. Viswanathan, *Natural killer cells: In health and disease*. Hematol Oncol Stem Cell Ther, 2015. **8**(2): p. 47-55.
94. Rueff, J., et al., *Lymphocyte subset recovery and outcome after autologous hematopoietic stem cell transplantation for plasma cell myeloma*. Biol Blood Marrow Transplant, 2014. **20**(6): p. 896-9.
95. Schlegel, P., et al., *NKG2D Signaling Leads to NK Cell Mediated Lysis of Childhood AML*. J Immunol Res, 2015. **2015**: p. 473175.
96. Rubnitz, J.E., et al., *NKAML: a pilot study to determine the safety and feasibility of haploidentical natural killer cell transplantation in childhood acute myeloid leukemia*. J Clin Oncol, 2010. **28**(6): p. 955-9.
97. Lang, P., et al., *Natural killer cell activity influences outcome after T cell depleted stem cell transplantation from matched unrelated and haploidentical donors*. Best Pract Res Clin Haematol, 2011. **24**(3): p. 403-11.
98. Wu, J., et al., *A novel polymorphism of FcγRIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease*. J Clin Invest, 1997. **100**(5): p. 1059-70.
99. Moretta, L., et al., *Different checkpoints in human NK-cell activation*. Trends in Immunology, 2004. **25**(12): p. 670-676.
100. Sivori, S., et al., *Human NK cells: surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational applications*. Cellular & Molecular Immunology, 2019. **16**(5): p. 430-441.
101. Malmberg, K.-J. and H.-G. Ljunggren, *Escape from immune- and nonimmune-mediated tumor surveillance*. Seminars in Cancer Biology, 2006. **16**(1): p. 16-31.
102. Torelli, G.F., et al., *Recognition of adult and pediatric acute lymphoblastic leukemia blasts by natural killer cells*. Haematologica, 2014. **99**(7): p. 1248.
103. Moretta, L., et al., *Human NK cells: From surface receptors to clinical applications*. Immunol Lett, 2016. **178**: p. 15-9.

104. Cerwenka, A., J.L. Baron, and L.L. Lanier, *Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor &em>in vivo&em>*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98**(20): p. 11521.
105. Diermayr, S., et al., *NKG2D ligand expression in AML increases in response to HDAC inhibitor valproic acid and contributes to allorecognition by NK-cell lines with single KIR-HLA class I specificities*. Blood, 2008. **111**(3): p. 1428-36.
106. Lee, H.K., et al., *Cytokine-induced killer cells interact with tumor lysate-pulsed dendritic cells via CCR5 signaling*. Cancer Lett, 2016. **378**(2): p. 142-9.
107. Gao, X., et al., *Cytokine-Induced Killer Cells As Pharmacological Tools for Cancer Immunotherapy*. Frontiers in Immunology, 2017. **8**(774).
108. Linn, Y.C., S.M. Wang, and K.M. Hui, *Comparative gene expression profiling of cytokine-induced killer cells in response to acute myloid leukemic and acute lymphoblastic leukemic stimulators using oligonucleotide arrays*. Experimental Hematology, 2005. **33**(6): p. 671-681.
109. Phan, M.-T.T., et al., *Expansion of NK Cells Using Genetically Engineered K562 Feeder Cells*, in *Natural Killer Cells: Methods and Protocols*, S.S. Somanchi, Editor. 2016, Springer New York: New York, NY. p. 167-174.
110. Horrer, A., *In vitro Untersuchung antileukämischer NK-Zell Subpopulationen auf ihre Lysefähigkeit gegenüber primärer pädiatrischer BCP-ALL Blasten*, in *Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen*. 2016, Universität Tübingen: Tübingen.
111. Liu, Y., et al., *Growth and Activation of Natural Killer Cells Ex Vivo from Children with Neuroblastoma for Adoptive Cell Therapy*. 2013. **19**(8): p. 2132-2143.
112. Becker, P.S., et al., *Selection and expansion of natural killer cells for NK cell-based immunotherapy*. Cancer Immunol Immunother, 2016.
113. Becker, P.S.A., et al., *Selection and expansion of natural killer cells for NK cell-based immunotherapy*. Cancer Immunology, Immunotherapy, 2016. **65**(4): p. 477-484.
114. Floros, T. and A.A. Tarhini, *Anticancer Cytokines: Biology and Clinical Effects of Interferon- α 2, Interleukin (IL)-2, IL-15, IL-21, and IL-12*. Seminars in Oncology, 2015. **42**(4): p. 539-548.
115. Shalabi, H., A. Angiolillo, and T.J. Fry, *Beyond CD19: Opportunities for Future Development of Targeted Immunotherapy in Pediatric Relapsed-Refractory Acute Leukemia*. Front Pediatr, 2015. **3**: p. 80.
116. Voskens, C.J., et al., *Ex-vivo expanded human NK cells express activating receptors that mediate cytotoxicity of allogeneic and autologous cancer cell lines by direct recognition and antibody directed cellular cytotoxicity*. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2010. **29**(1): p. 134.
117. Wang, W., et al., *Human NK cells maintain licensing status and are subject to killer immunoglobulin-like receptor (KIR) and KIR-ligand inhibition following ex vivo expansion*. Cancer immunology, immunotherapy : CII, 2016. **65**(9): p. 1047-1059.

118. Capuano, C., et al., *Obinutuzumab-mediated high-affinity ligation of FcγRIIIA/CD16 primes NK cells for IFNγ production*. *Oncoimmunology*, 2017. **6**(3): p. e1290037-e1290037.
119. Liu, S.D., et al., *Afucosylated antibodies increase activation of FcγRIIIa-dependent signaling components to intensify processes promoting ADCC*. *Cancer Immunol Res*, 2015. **3**(2): p. 173-83.
120. Terszowski, G., et al., *How to outsmart NK cell tolerance*. *Oncoimmunology*, 2015. **4**(9): p. e1016708-e1016708.
121. Garrido, F., et al., *Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours*. *Immunology Today*, 1997. **18**(2): p. 89-95.
122. Pfeiffer, M., et al., *Intensity of HLA class I expression and KIR-mismatch determine NK-cell mediated lysis of leukaemic blasts from children with acute lymphatic leukaemia*. *British Journal of Haematology*, 2007. **138**(1): p. 97-100.
123. Kohrt, H.E., et al., *Anti-KIR antibody enhancement of anti-lymphoma activity of natural killer cells as monotherapy and in combination with anti-CD20 antibodies*. *Blood*, 2014. **123**(5): p. 678-86.
124. Eissens, D.N., et al., *Selective expansion of human natural killer cells leads to enhanced alloreactivity*. *Cell Mol Immunol*, 2014. **11**(2): p. 160-8.
125. Hicklin, D.J., F.M. Marincola, and S. Ferrone, *HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story*. *Mol Med Today*, 1999. **5**(4): p. 178-86.
126. Rogatko-Koroś, M., et al., *Prediction of NK Cell Licensing Level in Selection of Hematopoietic Stem Cell Donor, Initial Results*. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 2016. **64**(1): p. 63-71.
127. Campbell, K.S. and J. Hasegawa, *Natural killer cell biology: An update and future directions*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2013. **132**(3): p. 536-544.
128. Yokoyama, W.M. and S. Kim, *Licensing of natural killer cells by self-major histocompatibility complex class I*. *Immunol Rev*, 2006. **214**: p. 143-54.
129. Locatelli, F., et al., *NK Cells Mediate a Crucial Graft-versus-Leukemia Effect in Haploidentical-HSCT to Cure High-Risk Acute Leukemia*. *Trends in Immunology*, 2018. **39**(7): p. 577-590.
130. Ruggeri, L., et al., *Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value*. *Blood*, 2007. **110**(1): p. 433-440.
131. Guillamón, C.F., et al., *NK Cell Education in Tumor Immune Surveillance: DNAM-1/KIR Receptor Ratios as Predictive Biomarkers for Solid Tumor Outcome*. *Cancer Immunology Research*, 2018. **6**(12): p. 1537.
132. Du, J., et al., *CALGB 150905 (Alliance): Rituximab Broadens the Antilymphoma Response by Activating Unlicensed NK Cells*. *Cancer Immunology Research*, 2014. **2**(9): p. 878.
133. Tarek, N., et al., *Unlicensed NK cells target neuroblastoma following anti-GD2 antibody treatment*. *J Clin Invest*, 2012. **122**(9): p. 3260-70.
134. Brodin, P., K. Karre, and P. Hoglund, *NK cell education: not an on-off switch but a tunable rheostat*. *Trends Immunol*, 2009. **30**(4): p. 143-9.

135. Anfossi, N., et al., *Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I*. *Immunity*, 2006. **25**(2): p. 331-42.
136. Mancusi, A., et al., *Donor Activating Kir Genes and Survival after Haplo-Identical Hematopoietic Transplantation*. *Blood*, 2004. **104**(11): p. 2219.
137. Oevermann, L., et al., *KIR B haplotype donors confer a reduced risk for relapse after haploidentical transplantation in children with ALL*. *Blood*, 2014. **124**(17): p. 2744-7.
138. Venstrom, J.M., et al., *HLA-C-dependent prevention of leukemia relapse by donor activating KIR2DS1*. *The New England journal of medicine*, 2012. **367**(9): p. 805-816.
139. Biassoni, R., et al., *Human natural killer cell receptors and co-receptors*. *Immunological Reviews*, 2001. **181**(1): p. 203-214.
140. He, Y. and Z. Tian, *NK cell education via nonclassical MHC and non-MHC ligands*. *Cellular & Molecular Immunology*, 2016. **14**: p. 321.
141. Pende, D., et al., *Analysis of the receptor-ligand interactions in the natural killer-mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias: evidence for the involvement of the Poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112)*. *Blood*, 2005. **105**(5): p. 2066-2073.
142. MORISAKI, T., H. ONISHI, and M. KATANO, *Cancer Immunotherapy Using NKG2D and DNAM-1 Systems*. *Anticancer Research*, 2012. **32**(6): p. 2241-2247.
143. Joechner, A.H., *Einfluss aktivierender und inhibitorischer Rezeptoren auf die NK- und $\gamma\delta$ T Zell vermittelte Zytotoxizität und Antikörper vermittelte Lyse von Neuroblastomzelllinien*, in *Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen*. 2020, Universität Tübingen: Tübingen.
144. Schmeel, L.C., et al., *Cytokine-induced killer (CIK) cells in cancer immunotherapy: report of the international registry on CIK cells (IRCC)*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2015. **141**(5): p. 839-49.

8 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1.1: Aktivierende NK-Zell-Rezeptoren	7
Tabelle 1.2: Inhibierende NK-Zell-Rezeptoren	9
Tabelle 3.1: NK-Zell-Spender	44
Tabelle 3.2: Untersuchung des KIR-Phänotypisierung gemäß Licensing-Modell	45
Tabelle 3.3: Expression von Oberflächenproteinen der frischen NK-Zellen	46
Tabelle 3.4: Expression von Oberflächenproteinen der expandierten NK-Zellen	47
Tabelle 3.5: Genetisches HLA-Repertoire der Target-Zelllinien	48
Tabelle 3.6: HLA-Phänotypisierung von Targetzelllinien mittel FACS	49
Tabelle 3.7: Oberflächencharakterisierung der Tumorzelllinien.....	50

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1: Übersicht über Oberflächenrezeptoren auf NK-Zellen.....	6
Abbildung 1.2: Darstellung der HLA-KIR-Interaktion	10
Abbildung 1.3: Einteilung des KIR B Content Score	12
Abbildung 1.4: Rolle von NK-Zellen nach HSZT.....	15
Abbildung 2.1: Schema der NK-Zell-Expansion aus PBMC	29
Abbildung 2.2: Funktionsweise der Durchfluss-Zytometrie.....	36
Abbildung 3.1: Bw4 Expression auf Target-Zelllinien	49
Abbildung 3.2: Lymphozytenpopulation während NK-Zell-Expansion; n=10	52
Abbildung 3.3: Beispiel Facs-Plot vor und nach NK-Zell-Expansion	53
Abbildung 3.4: Lymphozytenpopulation vor und nach Expansion in Prozent ...	53
Abbildung 3.5: Lymphozytenpopulation vor und nach Expansion in Millionen .	53
Abbildung 3.6: NK-Zellen vs. Nalm-16	54
Abbildung 3.7: NK-Zellen mit CD19 mAb vs. Nalm-16	54
Abbildung 3.8: Vergleich der Lysefähigkeit von PBMC und expandierten NK- Zellen im Luciferase-Assay ohne CD19-4G7SDIE mAb, E/T 1:1	55
Abbildung 3.9: Vergleich der Lysefähigkeit von PBMC und expandierten NK- Zellen im Luciferase-Assay mit CD19-4G7SDIE mAb, E/T 1:1	55

Abbildung 3.10: Frische NK-Zellen vs. Nalm-16 aufgetrennt nach single-KIR-Gruppen;	56
Abbildung 3.11: Expandierte NK-Zellen vs. Nalm-16 aufgetrennt nach single-KIR-Gruppen	57
Abbildung 3.12: HLA-I-Expression auf Nalm-16	58
Abbildung 3.13: Frische NK-Zellen vs. Nalm-16 bei Manipulation der HLA-I-Expression.....	59
Abbildung 3.14: Expandierte NK-Zellen vs. Nalm-16 bei Manipulation der HLA-I-Expression.....	60
Abbildung 3.15: Frische NK-Zellen vs. Nalm-16 mit HLA-I Manipulation, aufgetrennt nach single-KIR-Gruppen	61
Abbildung 3.16: Expandierte NK-Zellen vs. Nalm-16 mit HLA-I Manipulation, aufgetrennt nach single-KIR-Gruppen	61
Abbildung 3.17: Frische NK-Zellen vs. Nalm-16; Quotient aus CD107a-Aktivität (%) von Single-CD158a-positiven Zellen / alle NK-Zellen; .	62
Abbildung 3.18: Frische NK-Zellen vs. Nalm-16; Quotient aus CD107a-Aktivität (%) von Single-CD158b-positiven Zellen / alle NK-Zellen; .	63
Abbildung 3.19: Frische NK-Zellen vs. Nalm-16; Quotient aus CD107a-Aktivität (%) von Single-CD158e-positiven Zellen / alle NK-Zellen..	63
Abbildung 3.20: Licensing gepoolt; frische NK-Zellen vs. Nalm-16; Quotient aus CD107a-Aktivität (%) von Single-KIR-positiven Zellen / alle NK-Zellen	64
Abbildung 3.21: Licensing gepoolt; frische NK-Zellen vs. Nalm-16; Quotient aus CD107a-Aktivität (%) von Single-KIR-positiven Zellen / alle NK-Zellen	65
Abbildung 3.22: Licensing gepoolt; frische NK-Zellen vs. Nalm-16; Quotient aus CD107a-Aktivität (%) von Single-KIR-positiven Zellen / alle NK-Zellen	65
Abbildung 3.23: Expandierte NK-Zellen vs. Nalm-16; Quotient aus CD107a-Aktivität (%) von Single-CD158a-positiven Zellen / alle NK-Zellen..	66
Abbildung 3.24: Expandierte NK-Zellen vs. Nalm-16; Quotient aus CD107a-Aktivität (%) von Single-CD158b-positiven Zellen / alle NK-Zellen..	66

Abbildung 3.25: Expandierte NK-Zellen vs. Nalm-16; Quotient aus CD107a-Aktivität (%) von Single-CD158e-positiven Zellen / alle NK-Zellen..	67
Abbildung 3.26: Expandierte NK-Zellen vs. Nalm-16; Quotient aus CD107a-Aktivität (%) von Single-KIR-positiven Zellen / alle NK-Zellen	68
Abbildung 3.27: Vergleich: B-Content-Score mit CD107a-Aktivität frischer NK-Zellen vs. Nalm-16.....	68
Abbildung 3.28: B-Content-Score Vergleich; Mittelwerte frischer NK-Zellen vs. Nalm-16.....	69
Abbildung 3.29: B-Content-Score Vergleich Luciferase; frische PBMC nach 48h, E/T 1:1, ohne CD19 mAb	69
Abbildung 3.30: B-Content-Score Vergleich.....	70
Abbildung 3.31: B-Content-Score Vergleich Luciferase	70
Abbildung 3.32: Einfluss verschiedener Rezeptoren auf frische NK-Zellen;.....	72
Abbildung 3.33: CD107a-Aktivität frischer NK-Zellen mit NKG2D/DNAM-1 Blockade.....	73
Abbildung 3.34: CD107a-Aktivität frischer NK-Zellen mit NKG2D/DNAM-1 Blockade nach KIR-Gruppen; n=2.....	74
Abbildung 3.35: CD107a-Aktivität frischer NK-Zellen vs. SEM mit NKG2D/DNAM-1 Blockade nach KIR-Gruppen; n=2.....	74
Abbildung 3.36: Einfluss verschiedener Rezeptoren auf Aktivität expandierter NK-Zellen	76
Abbildung 3.37: Mittelwerte der NK-Zellen einzelner Spender versus Nalm-16; n=14	77
Abbildung 3.38: Gesamtanalyse der PBMC aller Spender im Luciferase-Assay	78
Abbildung 3.39: Gesamtanalyse expandierter NK-Zellen aller Spender.....	78
Abbildung 3.40: Score der Rangfolge in den CD107a-Ergebnissen mit frischen NK-Zellen vs. Nalm-16	79
Abbildung 3.41: Frische NK-Zellen vs. Nalm-16.....	80
Abbildung 3.42: Expand. NK-Zellen vs. Nalm-16	80
Abbildung 3.43: PBMC vs. Nalm-16, E/T 0,5:1.....	80
Abbildung 3.44: PBMC vs. Nalm-16, E/T 1:1.....	80

Abbildung 3.45: PBMC vs. Nalm-6, E/T 0.5:1.....	81
Abbildung 3.46: PBMC vs. Nalm-6, E/T 1:1	81
Abbildung 3.47: PBMC vs. SEM, E/T 0.5:1	81
Abbildung 3.48: PBMC vs. SEM, E/T 1:1	81
Abbildung 3.49: PBMC vs. MHH, E/T 0.5:1	81
Abbildung 3.50: PBMC vs. MHH, E/T 1:1	81
Abbildung 3.51: Expandierte NK-Zellen vs. Targetzelllinien mit & ohne CD19- 4G7SDIE mAb im Luciferase-Assay.....	82
Abbildung 3.52: NK-Zellen + CD19-4G7SDIE mAb vs. Nalm-16 mit Fc-Rezeptor Repertoire der Spender.....	82
Abbildung 6.1: Exp. NK-Zellen vs. Nalm-16, E/T 0,5:1	110
Abbildung 6.2: Exp. NK-Zellen vs. Nalm-16, E/T 1:1	110
Abbildung 6.3: Exp. NK-Zellen vs. Nalm-6, E/T 0.5:1	110
Abbildung 6.4: Exp. NK-Zellen vs. Nalm-6, E/T 1:1.....	110
Abbildung 6.5: Exp. NK-Zellen vs. SEM, E/T 0.5:1.....	110
Abbildung 6.6: Exp. NK-Zellen vs. SEM, E/T 1:1.....	110
Abbildung 6.7: Exp. NK-Zellen vs. MHH, E/T 0.5:1	110
Abbildung 6.8: Exp. NK-Zellen vs. MHH, E/T 1:1	110
Abbildung 6.9: PBMC vs. Targetzelllinien mit & ohne CD19-4G7SDIE mAb im Luciferase-Assay	111

10 ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL DER DISSERTATIONSSCHRIFT

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. med. Peter Lang durchgeführt.

Die Konzeption der Arbeit erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. med. Patrick Schlegel, Facharzt.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Anne Schilling, Dr. Ursula Seidel und Dr. med. Patrick Schlegel von mir eigenständig durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich. Ich versichere, das Manuskript selbständig nach Anleitung durch Dr. med. Patrick Schlegel verfasst und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

11 VERÖFFENTLICHUNGEN

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Schlegel, Patrick; Lang, Anne-Marie; Matela, Marie; Horrer, Annika; Schilling, Anne; Jöchner, Alexander; Wiedenmann, Max; Seitz, Christian; Döring, Michaela; Feuchtinger, Tobias; Heubach, Florian; Rabsteyn, Armin; Handgretinger, Rupert; Lang, Peter - Ex vivo expansion of autologous, donor-derived NK-, $\gamma\delta$ T-, and cytokine induced killer (CIK) cells post haploidentical hematopoietic stem cell transplantation results in increased antitumor activity - Bone Marrow Transplantation – 2019 – Band 54 – Seiten 727-732

12 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Besonders danken möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Peter Lang für die Betreuung und das Ermöglichen der Dissertation sowie meinem zweiten Berichterstatter PD Dr. Dr. Martin Müller.

Von ganzem Herzen danken möchte ich Dr. Patrick Schlegel, nicht nur für die intensive Betreuung und Unterstützung, sondern vor allem weil aus der zurückliegenden Arbeit neben der Dissertation auch eine enge Freundschaft entstanden ist.

Außerdem möchte ich mich bei den Kollegen im Labor bedanken, insbesondere bei meinem Mitstreiter und Freund Alexander Jöchner, sowie meiner Vorgängerin Annika Horrер.

Ein großer Dank gilt auch Prof. Dr. Jürgen Frank und dem gesamten IRTG des SFB 685 für die begleitende Unterstützung und Ausbildung.

Und sicherlich nicht zuletzt danken möchte ich allen Freunden, meiner Familie und meiner Freundin Carolin, die mich über die Zeit unterstützt haben und so auf direkte und indirekte Weise einen wirklich großen Beitrag zur Arbeit geleistet haben.