

Aus der Universitätsklinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin
(Department) Tübingen
Abteilung I
(Schwerpunkte: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie/Onkologie)
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger

**Charakterisierung antileukämischer NK-Zell-Klone
von gesunden Spendern und Patienten
nach allogener Stammzelltransplantation**

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

**der medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Alexander Heinz Pfäffle
aus Nürtingen
2008**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. P. Lang

2. Berichterstatter: Professor Dr. R. Möhle

*In herzlicher Verbundenheit
Luisa, Felix und Micha
gewidmet*

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 | ALLOGENE STAMMZELLTRANSPLANTATION IM KINDESALTER | 1 |
| 1.2 | DAS HLA-SYSTEM | 3 |
| 1.2.1 | HLA-Klasse I..... | 4 |
| 1.2.2 | HLA-Klasse II..... | 5 |
| 1.2.3 | HLA-Klasse III..... | 5 |
| 1.2.4 | HLA-Polymorphismus..... | 7 |
| 1.2.5 | Klinische Relevanz des HLA-Systems..... | 8 |
| 1.3 | GRAFT VERSUS HOST DISEASE | 9 |
| 1.3.1 | Allgemeine Immunpathophysiologie der GvHD | 9 |
| 1.3.2 | Risikofaktoren der GvHD | 10 |
| 1.3.3 | Vorbeugende Maßnahmen zur Vermeidung einer GvHD | 10 |
| 1.4 | NATÜRLICHE KILLERZELLEN | 11 |
| 1.4.1 | NK-Zell-Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle | 13 |
| 1.4.1.1 | <i>Killer cell inhibitory receptors (KIR)</i> | 14 |
| 1.4.1.2 | <i>Killer cell activating receptors (KAR)</i> | 15 |
| 1.4.1.3 | <i>Adhäsionsmoleküle</i> | 15 |
| 1.4.2 | Mechanismen der NK-Zell-Lyse..... | 16 |
| 1.5 | NK-ZELL-ALLOREAKTIVITÄT | 17 |
| 1.6 | STUDIENZIELE | 19 |
| 2 | MATERIAL | 20 |
| 2.1 | ALLGEMEINE MATERIALIEN..... | 20 |
| 2.1.1 | Geräte sowie Glas- und Plastikmaterial..... | 20 |
| 2.1.2 | Stammlösungen..... | 21 |
| 2.2 | MATERIAL FÜR DIE ISOLIERUNG MONONUKLEÄRER ZELLEN..... | 22 |
| 2.3 | SPEZIELLE MATERIALIEN FÜR DIE ZELLZÄHLUNG UND MIKROSKOPIE | 22 |
| 2.4 | SPEZIELLE MATERIALIEN FÜR DIE ZELLANREICHERUNG..... | 23 |
| 2.5 | SPEZIELLE MATERIALIEN FÜR DIE NK-ZELL-KLONIERUNG | 23 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.6 | MATERIAL FÜR DIE DURCHFLUSSZYTOMETRIE | 24 |
| 2.7 | MATERIAL FÜR DEN ZYTOTOXIZITÄTSTEST | 25 |
| 2.8 | ZELLINIEN | 26 |
| 2.9 | ALLGEMEINE SOFTWARE..... | 26 |
| 3 | METHODEN..... | 27 |
| 3.1 | ISOLIERUNG VON PERIPHEREN MONONUKLEÄREN ZELLEN | 27 |
| 3.1.1 | Prinzip..... | 27 |
| 3.1.2 | Dichtezentrifugation mit Ficoll-Hypaque® nach Böyum..... | 27 |
| 3.2 | ZELLZAHLBESTIMMUNG | 28 |
| 3.3 | ZELLANREICHERUNG MIT DEM MACS-SYSTEM | 29 |
| 3.3.1 | Prinzip des MACS-Systems..... | 29 |
| 3.3.2 | Anreicherung von NK-Zellen mit Miltenyi Microbeads | 30 |
| 3.3.3 | Depletion von T-Zellen mit Miltenyi Microbeads | 31 |
| 3.4 | T-ZELL-DEPLETION MIT DYNABEADS | 31 |
| 3.4.1 | Prinzip..... | 31 |
| 3.4.2 | Durchführung | 32 |
| 3.5 | KLONIERUNG VON NATÜRLICHEN KILLERZELLEN | 33 |
| 3.6 | ZYTOTOXIZITÄTSTEST | 36 |
| 3.6.1 | Prinzip des BATDA-Release..... | 36 |
| 3.6.2 | BATDA-Markierung der Targetzellen..... | 37 |
| 3.6.3 | Vorbereitung der Effektorzellen | 38 |
| 3.6.4 | Durchführung des Zytotoxizitätstests..... | 39 |
| 3.7 | IMMUNPHÄNOTYPISIERUNG MIT DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE | 41 |
| 3.7.1 | Prinzip..... | 41 |
| 3.7.2 | Immunfluoreszenzfärbung | 43 |
| 3.7.3 | Messung und Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung..... | 43 |
| 3.8 | ZELLKULTUR | 45 |
| 3.8.1 | Kultivierung der Zelllinien..... | 45 |
| 3.8.2 | Kryokonservierung von Zellen | 45 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4 | ERGEBNISSE..... | 46 |
| 4.1 | KLONIERUNG UND EXPANSION VON NK-ZELLEN..... | 46 |
| 4.1.1 | NK-Zell-Anreicherung mit dem MACS-System | 47 |
| 4.1.2 | Depletion von T-Zellen mit Dynabeads..... | 48 |
| 4.1.3 | Depletion von T-Zellen mit dem MACS-System..... | 48 |
| 4.1.4 | Klonierungseffizienz..... | 50 |
| 4.1.5 | Expansion der NK-Klone | 54 |
| 4.2 | EXPRESSION INHIBITORISCHER REZEPTOREN AUF NK-KLONEN | 55 |
| 4.2.1 | Ermittlung des KIR-Phänotyps..... | 55 |
| 4.2.2 | KIR-Expression in Abhängigkeit vom Spender-HLA-Typ..... | 57 |
| 4.3 | ZYTOTOXISCHE AKTIVITÄT VON NK-KLONEN GEGENÜBER HLA-CW TRANSFIZIERTEN B-LCL 721.221 | 63 |
| 4.4 | ZYTOTOXISCHE AKTIVITÄT VON NK-KLONEN GEGENÜBER B-LCL MISSING HLA-CW ZELLINIEN..... | 68 |
| 4.5 | ZYTOTOXISCHE AKTIVITÄT VON NK-KLONEN GEGENÜBER PRÄ-B-ALL BLASTEN EINER 4-JÄHRIGEN PATIENTIN (PAT. 1) | 73 |
| 4.6 | ZYTOTOXISCHE AKTIVITÄT ALLER GEGENÜBER KINDLICHEN PRÄ-B-ALL BLASTEN GETESTETEN NK-KLONE GESUNDER SPENDER..... | 78 |
| 4.6.1 | NK-Zell-Lyse der Prä-B-ALL Blasten in Korrelation mit der quantitativen HLA-Klasse I-Expression der Blasten..... | 79 |
| 4.6.2 | NK-Zell-Lyse der Prä-B-ALL Blasten entsprechend der HLA-Klasse I-Zugehörigkeit der Spender | 81 |
| 4.6.3 | NK-Zell-Lyse der Prä-B-ALL Blasten entsprechend des KIR-Phänotyps der NK-Klone | 83 |
| 4.6.4 | Zytotoxische NK-Aktivität gegenüber den einzelnen Prä-B-ALL Blasten entsprechend dem KIR-Phänotyp der NK-Klone und dem HLA-Typ der Spender..... | 87 |
| 4.6.5 | Zytotoxische Aktivität der mehrfach KIR ⁺ NK-Klone..... | 92 |
| 4.7 | ZYTOTOXISCHE AKTIVITÄT VON NK-KLONEN HAPLOIDENT TRANSPLANTIRTER PÄDIATRISCHER PATIENTEN..... | 95 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 4.8 | STEIGERUNG DER NK-ZELL-ZYTOTOXIZITÄT | 100 |
| 4.8.1 | HLA-Maskierung..... | 100 |
| 4.8.2 | ADCC | 101 |
| 4.9 | WEITERE CHARAKTERISIERUNG VON NK-KLONEN MIT SEHR HOHER ODER SEHR NIEDRIGER ANTILEUKÄMISCHER AKTIVITÄT | 103 |
| 5 | DISKUSSION | 106 |
| 5.1 | METHODENKRITIK..... | 107 |
| 5.1.1 | Immunomagnetische Anreicherung von NK-Zellen..... | 107 |
| 5.1.2 | Generierung von NK-Klonen..... | 108 |
| 5.1.3 | Zytotoxizitätstests | 109 |
| 5.1.4 | Durchflusszytometrie | 109 |
| 5.2 | KLONIERUNGSEFFIZIENZ UND EXPANSION VON NK-KLONEN..... | 110 |
| 5.3 | KIR-PHÄNOTYPEN DER GENERIERTEN NK-KLONE..... | 111 |
| 5.4 | ALLOREAKTIVITÄT GEGENÜBER REFERENZZELLINIEN | 114 |
| 5.4.1 | B-LCL Transfektanten..... | 115 |
| 5.4.2 | B-LCL missing HLA-Cw Zelllinien | 117 |
| 5.5 | ALLOREAKTIVITÄT GEGENÜBER PRÄ-B-ALL BLASTEN | 118 |
| 5.6 | GOOD KILLER UND BAD KILLER | 123 |
| 5.7 | STEIGERUNG DER NK-ZELL-ZYTOTOXIZITÄT | 124 |
| 5.8 | PERSPEKTIVEN FÜR DIE KLINISCHE ANWENDUNG VON ALLOREAKTIVEN NK-ZELLEN | 126 |
| 6 | ZUSAMMENFASSUNG | 128 |
| 7 | LITERATURVERZEICHNIS | 131 |
| 8 | ANHANG..... | 145 |
| 8.1 | HLA-GENOTYPEN DER SPENDER UND PRÄ-B-ALL BLASTEN | 145 |
| 8.2 | ABBILDUNGSVERZEICHNIS | 146 |
| 8.3 | TABELLENVERZEICHNIS..... | 150 |
| 8.4 | ABKÜRZUNGEN | 152 |
| 9 | DANKSAGUNG | 153 |
| 10 | LEBENS LAUF | 154 |

1 Einleitung

1.1 Allogene Stammzelltransplantation im Kindesalter

Für eine Reihe von Hochrisikoleukämien und –lymphomen im Kindesalter stellt eine myeloablative Therapie mit anschließender Transplantation allogener hämatopoetischer Stammzellen, aus denen sich eine normale Hämatopoese entwickeln kann, die einzige kurative Behandlungsmöglichkeit dar.

Auch verschiedene nichtmaligne Erkrankungen, wie bestimmte Stoffwechseldefekte, aplastische Anämien und Immundefekte können eine Transplantation notwendig machen.

Als Spender dienen in erster Linie HLA-identische Geschwister und weiterhin HLA-haploidentische Familienmitglieder sowie unverwandte, HLA-identische Fremdspender (matched unrelated donor, MUD), die mit Hilfe von Spenderkarteien gesucht werden müssen (1).

In 30% der Fälle ist es gegenwärtig möglich, als Spender ein hinsichtlich der relevanten Histokompatibilitätsantigene HLA-A, -B, -C, DRB₁ und DQB₁ identisches Geschwister zu finden. Beim HLA-identischen Fremdspender muss von einer schlechteren Übereinstimmung als beim Geschwisterspender ausgegangen werden, da bei weitem noch nicht alle Histokompatibilitätsantigene bekannt sind und auch nur eine begrenzte Zahl von Allelen getestet werden können (1).

Hierbei stellt die Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (graft versus host disease, GvHD) eines der Hauptprobleme dar. T-Lymphozyten im Transplantat erkennen den Empfänger als fremd und können an verschiedenen Organen (v.a. Haut, Leber, Darm) lebensbedrohliche Schäden verursachen. Die GvHD ist dabei umso massiver, je stärker die HLA-Disparität ausgeprägt ist (2) und macht deshalb nach Transplantation eine prophylaktische Behandlung in Form von immunsuppressiven Medikamenten (Methotrexat, Cyclosporin A) notwendig.

Ohne GvHD-Prophylaxe beträgt selbst bei HLA-identischen Geschwister-spendern die Inzidenz einer GvHD Grad II-IV 80-100% (3).

In den vergangenen Jahren wurden aus diesem Grunde verschiedene physikalische und immunologische Methoden zur Transplantatbearbeitung (Graft Manipulation) entwickelt, um T-Zellen aus dem Zellgemisch des Transplantats zu entfernen und damit die Wahrscheinlichkeit einer GvH-Erkrankung zu verringern. Durch die Technik der Positivanreicherung von CD34⁺ Stammzellen mittels immunomagnetischer Methoden ist es möglich geworden, Transplantationen mit großen Mengen hochreiner Progenitorzellen auch von HLA-nichtidentischen Spendern ohne zusätzliche Immunsuppression erfolgreich durchzuführen. In Verbindung mit intensivierten Konditionierungsprotokollen konnte damit ein sicheres Engraftment erreicht und eine GvHD wirkungsvoll verhindert werden (4-7).

Hiermit steht zumindest für pädiatrische Patienten in Form der haploidentischen Eltern im Prinzip immer ein Spender zur Verfügung.

Tab. 1.1: Maligne hämatologische Erkrankungen, die mit allogener Stammzelltransplantation kurativ behandelt werden können.

| | |
|------------------------------------|---|
| ▪ Akute myeloische Leukämie | ▪ Non-Hodgkin-Lymphome |
| ▪ Akute lymphatische Leukämie | ▪ M. Hodgkin |
| ▪ Chronische myeloische Leukämie | ▪ Chronische lymphozytische Leukämie |
| ▪ Myelodysplastische Syndrome | ▪ Multiples Myelom/Plasmozytom |
| ▪ Myeoloproliferative Erkrankungen | ▪ Juvenile chronische myeloische Leukämie |

Das Hauptproblem nach allogener Stammzelltransplantation (SZT) stellt eine hohe Rezidivrate maligner Erkrankungen dar. Dies gilt vor allem für Patienten, die zum Zeitpunkt der Transplantation nicht in Remission waren und damit eine besonders resistente Blastenpopulation aufweisen. Vor diesem Hintergrund ist die Untersuchung des so genannten Graft versus Leukemia Effektes (GvL) von großem Interesse. Zunächst in tierexperimentellen und später auch in klinischen Studien konnte eine antileukämische Wirkung des neu etablierten,

vom Spender abstammenden Immunsystems für bestimmte Krankheitsentitäten nachgewiesen werden.

Da es bei der CD34-Anreicherung zu einer massiven indirekten T-Zell-Depletion kommt und nach Transplantation zunächst eine Phase ohne reife T-Zellen besteht, tritt zu diesem Zeitpunkt das sich schnell regenerierende NK-System als Träger potentieller antileukämischer Aktivität in den Vordergrund (6). Aktuelle Untersuchungen weisen darauf hin, dass auch der Einsatz von NK-Zellen als Effektoren einer adoptiven Immuntherapie eine vielversprechende Option zur Verbesserung der Prognose nach allogener SZT bei malignen Erkrankungen darstellt (8;9).

1.2 Das HLA-System

Unter dem HLA (Human-Leukocyte-Antigen)-System oder synonym auch MHC (Major-Histocompatibility-Complex) versteht man ein komplexes System aus körpereigenen Antigenen (Glykoproteinen) mit immunologischen und nicht-immunologischen Funktionen, die auf nahezu allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden. Ihr auffälligstes strukturelles Merkmal ist eine Spalte quer über ihre äußere Oberfläche, in der eine Reihe von verschiedenen Peptiden gebunden werden kann. Hierdurch sind Effektorzellen des Immunsystems (T-Zellen und in gewissem Maße auch NK-Zellen) in der Lage, zwischen „Selbst und Nicht-Selbst“ (also körpereigenen und –fremden Zellen) zu diskriminieren. Außerdem können antigenwirksame Peptidstrukturen präsentiert werden, die vom T-Zellrezeptor (TCR) spezifischer T-Zellen erkannt werden. NK-Zellen exprimieren verschiedene inhibitorisch wirksame Rezeptoren (Killer cell inhibitory receptors, KIRs), deren Liganden ebenfalls bestimmte HLA-Antigene darstellen (10).

Die Gene des HLA-Systems werden auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 kodiert und in drei verschiedene Regionen eingeteilt, die im Folgenden näher beschrieben werden sollen.

1.2.1 HLA-Klasse I

Die HLA-Klasse I-Region auf dem Chromosom 6 besteht aus 17 Loci von denen drei die HLA-A, -B und -C Alloantigene kodieren. Ferner wurden drei weitere Loci definiert (HLA-E, -F, -G), deren Bedeutung noch nicht eindeutig geklärt ist. HLA-E wurde als Ligand für bestimmte inhibitorische NK-Zell-Rezeptoren erkannt.

Antigene der HLA-Klasse I sind auf fast allen kernhaltigen Zellen sowie Thrombozyten nachweisbar. Auf lymphoiden Zellen, Granulozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen ist die Expression besonders ausgeprägt. Ihre Funktion liegt in der Präsentation von endogen synthetisierten Antigenen. Es handelt sich um zelleigene oder virale Peptide, die im Zytosol der Zelle abgebaut werden und anschließend von Transportmolekülen (TAP = Transportproteine assoziiert mit Antigen-Prozessierung) ins endoplasmatische Retikulum transportiert und dort an HLA-Klasse I-Moleküle gebunden werden. HLA-Klasse I-Moleküle bestehen jeweils aus einer schweren hochpolymorphen α -Kette (44 kDa) mit drei Domänen (α 1-3) und einer leichten nicht polymorphen Kette (12 kDa), dem β 2-Mikroglobulin. Durch Faltung der α 1- und α 2-Domänen entsteht die so genannte Peptid-Bindungsgrube, eine Antigen aufnehmende Struktur, in der Oligopeptide gebunden werden können. Die HLA-Peptid-Komplexe werden anschließend auf der Zelloberfläche exprimiert.

T-Zellen erkennen via T-Zellrezeptor (TCR) sowohl das zu ihnen passende HLA-Molekül als auch das in seiner Grube enthaltene Peptid. Es entsteht ein sogenannter trimolekularer Komplex, der Voraussetzung ist für die Erkennung von spezifischen, über HLA präsentierten Antigenen (11).

Eine Peptidpräsentation scheint allerdings für die Erkennung der Allospezifität (also „Selbst“ oder „Fremd“) nicht notwendig zu sein. Die hochpolymorphen α 1- und α 2-Domänen wirken selbst auch als Antigene und ihre Struktur bestimmt die Zugehörigkeit zum jeweiligen HLA-Allel. (12)

1.2.2 HLA-Klasse II

Die Gene dieser Region kodieren Antigene, die nach Entdeckung von HLA-A, -B und -C als HLA-D bezeichnet wurden. Es wurden neun Loci definiert: HLA-DR (R von „related“) -A, -B1, -B3, -B4, -B5; HLA-DQ-A, -B; HLA-DP-A, -B (13). Diese Antigene konnten bisher nur auf der Oberfläche bestimmter Zellen nachgewiesen werden. Dazu gehören vor allem immunkompetente antigenpräsentierende Zellen (engl. antigen presenting cells; APCs) wie zum Beispiel B-Lymphozyten, Makrophagen, aktivierte T-Lymphozyten, dendritische Zellen und aktivierte T-Zellen. Die Moleküle bestehen aus einer α - und einer β -Kette. Wiederum bilden zwei hochpolymorphe Domänen ($\alpha 1$ und $\beta 1$) eine korbähnliche Struktur zur Antigenaufnahme (14). Die Funktion dieser HLA-Moleküle liegt in der Präsentation von zuvor durch die oben genannten Zellen aufgenommenen und prozessierten Antigenen. Proteine werden über Rezeptoren oder Endozytose in die Zelle aufgenommen und in endosomalen Vesikeln durch Proteasen zu 10-20 Aminosäuren großen Peptiden gespalten. Nach Verschmelzung mit Vesikeln aus dem endoplasmatischen Retikulum, die HLA-Klasse II-Moleküle enthalten, erfolgt die Abspaltung der invarianten γ -Kette und es entstehen HLA-Peptid-Komplexe, die wiederum an der Zelloberfläche exprimiert werden. HLA-Klasse II-Antigene führen über Ausschüttung von Zytokinen zu einer Stimulation und Aktivierung von $CD4^+$ -T-Helferzellen sowie zu Interaktion mit B-Zellen und anderen Effektorzellen des Immunsystems. (12)

1.2.3 HLA-Klasse III

Die Gene der HLA-Klasse III kodieren für verschiedene Proteine, die an der unspezifischen Immunabwehr beteiligt sind und für die Gewebserkennung keine Rolle spielen (Komplementfaktoren, Tumor-Nekrosefaktor).

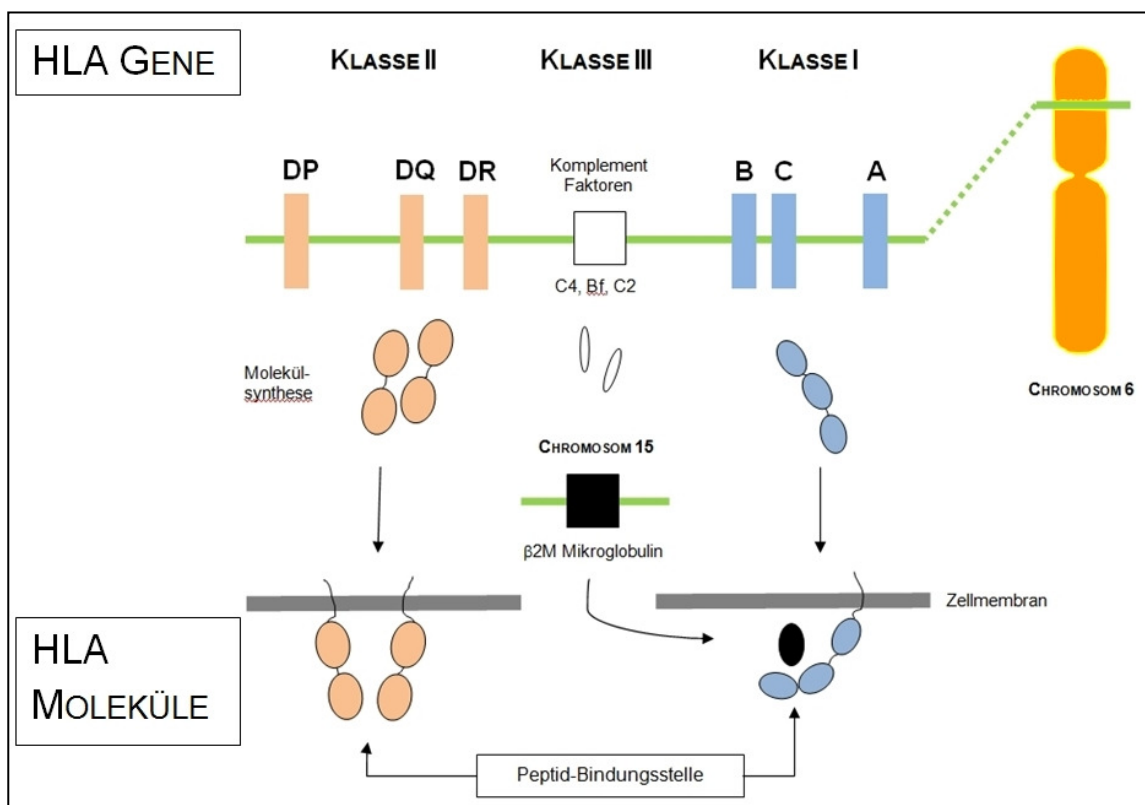


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Gene des HLA-Komplexes und der strukturellen Unterschiede der HLA-Klassen I und II

(1) Die auf dem Chromosom 6 lokalisierten HLA-Gene kodieren u.a. für die Moleküle der HLA-Antigen-Klassen I und II (im Bild: HLA-A, -B und -C als HLA-Gene der Klasse I; HLA-DR, -DQ und -DP als HLA-Gene der Klasse II) sowie für Komplementfaktoren (HLA-C4, -Bf und -C2 als HLA-Gene der Klasse III). (2) Eine Ausnahme bildet das so genannte β 2-Mikroglobulin, welches als integraler Bestandteil der HLA-Klasse I-Moleküle von Genen kodiert wird, welche auf dem Chromosom 15 lokalisiert sind. (3) Nach dem Schritt der Molekülsynthese werden die verschiedenen HLA-Moleküle durch die Zellmembran geschleust und auf der Zelloberfläche exprimiert. (4) Dort haben sie die Funktion, antigene Peptidfragmente den für die jeweilige HLA-Klasse spezifischen T-Lymphozyten (siehe Text) zu präsentieren, wobei diese Peptidfragmente an der so genannten Peptid-Bindungsstelle gebunden werden.

1.2.4 HLA-Polymorphismus

Alle HLA-Genorte zeichnen sich durch einen ausgeprägten Polymorphismus aus, wodurch eine große Anzahl an verschiedenen HLA-Phänotypen möglich ist. Insgesamt sind über 780 Allele bekannt. Die Zahl der theoretisch denkbaren Kombinationen und daraus resultierenden HLA-Genotypen würde diejenige der momentanen Weltbevölkerung (geschätzt $6,6 \times 10^9$) bei Weitem übersteigen. In ca. 60% der Fälle können dennoch HLA-identische Spender für SZT gefunden werden. Dies lässt sich damit erklären, dass die HLA-Allele eines Chromosoms en bloc miteinander gekoppelt vererbt werden und in sich eine geringe Rekombinationsfrequenz aufweisen. Kinder erhalten kodominant von jedem Elternteil eine haploide Erbinformation, den so genannten Haplotyp. Nach den Mendelschen Gesetzen folgt daraus eine Wahrscheinlichkeit von 0,25, dass zwei Geschwister in ihren Haplotypen übereinstimmen, sowie, dass Eltern und Kinder in der Regel nur haploidentisch sein können.

Weiterhin wurde beobachtet, dass bestimmte Haplotypen innerhalb einer Population wesentlich häufiger zu finden sind, als statistisch zu erwarten wäre (15). Dieses Phänomen wird als lineage disequilibrium (Kopplungsungleichgewicht) bezeichnet. Daraus ergibt sich aber auch, dass für Patienten mit seltenen Haplotypen meist kein Spender gefunden werden kann, es sei denn, ein Geschwisterspender ist vorhanden.

1.2.5 Klinische Relevanz des HLA-Systems

In der Transplantationsimmunologie spielt das HLA-System eine große Rolle. Die Auswahl eines geeigneten Spenders, wie z.B. bei einer SZT, richtet sich dabei nach der Übereinstimmung der HLA-Merkmale der Klassen I und II.

In den letzten Jahren zeigte sich durch verfeinerte molekulargenetische Untersuchungsmethoden bei der HLA-Typisierung, dass die Definition der HLA-Identität vom Auflösungsvermögen der angewandten Technik und auch von der Zahl der berücksichtigten HLA-Gene abhängig ist.

Durch möglichst weitreichende Typisierung konnte das Überleben bei Fremdspondertransplantationen verbessert werden (16-18). Dagegen nahm die transplantationsbedingte Mortalität (TRM, transplant related mortality) mit dem Grad des Mismatches zu (19). Wie viele Genorte berücksichtigt werden sollten und ob gewisse Mismatches zulässig sein könnten, ist noch nicht vollständig geklärt. Zur Zeit wird überwiegend die Bestimmung der Allele von HLA-A, -B, -C, -DRB1 und -DQB1 empfohlen (17;20). Insgesamt müssen also zehn Merkmale idealerweise übereinstimmen („ten out of ten“), wodurch die Zahl der zur Verfügung stehenden, als identisch geltenden Spender drastisch absinkt und nur etwa bei 30% für Transplantationen hämatopoetischer Stammzellen im Kindesalter liegt (21;22). Diesem Problem versucht man in den letzten Jahren zunehmend mit Graft-Manipulationsverfahren, wie z.B. der Positivanreicherung von Stammzellen zu begegnen, welche es ermöglichen, trotz HLA-Inkompatibilitäten eine Transplantation durchzuführen (22).

1.3 Graft versus Host Disease

1.3.1 Allgemeine Immunpathophysiologie der GvHD

Die GvH-Erkrankung geht mit einer erheblichen Morbidität und Mortalität einher und stellt ein zentrales Problem der allogenen Stammzelltransplantation dar. Sie wird unterteilt in eine akute (2-5 Wochen nach Transplantation) und eine chronische Form (100 Tage nach Transplantation). Effektoren sind in erster Linie reife T-Lymphozyten, d.h. CD3⁺/CD4⁺- und CD3⁺/CD8⁺-Lymphozyten, die in einen genotypisch verschiedenen Empfänger transferiert werden (23;24). Nach der Präsentation des Alloantigens erfolgt eine Aktivierung und klonale Proliferation derjenigen T-Zellen, die dieses Antigen erkennen können (25). Zudem existieren sowohl im Mausmodell, als auch beim Menschen unvollständig charakterisierte Minor Histocompatibility Antigens, die vermutlich nicht von HLA-Genen kodiert werden, jedoch ebenfalls für die Auslösung einer GvHD verantwortlich sein können (26). Infolge direkter Zellzytotoxizität sowie über Zytokinausschüttung unter Beteiligung von NK-Zellen (v.a. IL-1, IL-2 und TNF α) kommt es v.a. bei Epithelzellen zu einer Zellnekrose (satellite cell necrosis). Die akute Form der GvH-Erkrankung wird je nach Anzahl der betroffenen Organe und Stärke der Ausprägung klinisch in vier Schweregrade eingeteilt. Hauptangriffspunkte sind Haut, Leber und Darm. Beim chronischen Verlauf kann die Erkrankung in einer limitierten und einer extensiven Form auftreten, wobei die klinische Symptomatik verschiedenen Autoimmunerkrankungen nahe steht. Am häufigsten sind Haut (Erytheme, sklerodermieartige Veränderungen), Schleimhäute (Lichen planus), Leber (Hyperbilirubinämie), Lungen (obstruktiv/restriktive Veränderungen) und Augen (Sicca-Syndrom, Keratitis) beteiligt (27).

1.3.2 Risikofaktoren der GvHD

Der Grad der HLA-Inkompatibilität von Spender und Empfänger ist entscheidend für das Auftreten sowie das Ausmaß der GvHD. Bei unverwandten Spendern liegt die GvHD-Inzidenz dabei deutlich höher als bei Geschwister Spendern, selbst wenn ein komplettes Match vorliegt. Dies ist auf die Grenzen der HLA-Typisierung zurückzuführen, sowie auf unvollständig bekannte minor-Antigene, die bei Spendern außerhalb der Familie wohl stärker differieren (28). Weiterhin spielen auch die Geschlechtsdifferenz, das Alter von Patient und Spender, die Art der Konditionierung und Virusinfektionen (z.B. Herpesviren) als Risikofaktoren eine Rolle (29;30). Allgemein wird das GvHD-Risiko bei jungen Patienten und jungen Spendern als geringer angenommen, wenngleich mehrere pädiatrische Studien, in denen unmanipuliertes Knochenmark von als identisch geltenden Fremdspendern unter einer CSA/MTX-Prophylaxe verwendet wurde, erhebliche GvHD-Raten zeigten (31-34).

1.3.3 Vorbeugende Maßnahmen zur Vermeidung einer GvHD

Grundsätzlich muss immer eine Prophylaxe in Form einer medikamentösen immunsuppressiven Behandlung (Methotrexat, MTX; Cyclosporin A, CSA; und andere) durchgeführt werden (2). Ausgenommen sind syngene Transplantationen, bei denen eine GvHD nicht erwartet werden muss. Nebenwirkungen der Immunsuppression sind zum Teil erheblich und bestehen in Schleimhautschäden, Verstärkung einer Mucositis, Myelosuppression (MTX), Lebertoxizität (MTX, CSA) Nierentoxizität (CSA), pulmonalen Komplikationen (interstitielle Pneumonitis, diffuse alveoläre Hämorrhagien), sowie thrombotischen Mikroangiopathien (CSA). Zusätzlich werden bereits seit Jahren physikalische und immunologische Methoden eingesetzt, um T-Zellen aus dem Zellgemisch des Transplantats zu entfernen (z.B. E-Rosetting, Lektinagglutination, T-Zell-Antikörper). Je nach dem wie gründlich die Spender-

T-Zellen dadurch depletiert werden können, lassen sich GvH-Reaktionen mit unterschiedlichem Erfolg vermeiden. Durch Entwicklung neuer Techniken der Zellseparation wie der immunomagnetischen Positivanreicherung von Stammzellen (CD34, CD133) wurde eine hoch wirksame Prävention der GvHD möglich und es gelang dadurch in den letzten Jahren, große Mengen hochreiner Progenitorzellen auch von HLA-nichtidentischen Spendern ohne zusätzliche Immunsuppression erfolgreich zu transplantieren (35-37).

1.4 Natürliche Killerzellen

In den siebziger Jahren wurden die NK-Zellen als dritte eigenständige Lymphozytenpopulation neben B- und T-Zellen erkannt (38;39). Sie sind dem unspezifischen Immunsystem zuzurechnen und zeichnen sich morphologisch durch eine Vielzahl azurophiler Granula im Zytoplasma aus, die sie als LGL's (Large Granular Lymphocytes) ausweisen. Der Anteil der NK-Zellen an den Lymphozyten des peripheren Blutes liegt bei 5-25% und unterliegt einer ausgeprägten Tagesrhythmik (40). Außerdem wird er von zahlreichen Faktoren wie der körperlichen Aktivität, Stresssituationen, Infekten oder entzündlichen Reaktionen beeinflusst. Auch in lymphatischen Geweben, in der Milz, in der Leber und in anderen soliden Geweben finden sich NK-Zellen in unterschiedlicher Anzahl.

Allgemein wird angenommen, dass sich NK-Zellen sehr wahrscheinlich im Knochenmark aus $CD4^-/CD8^-$ Vorläuferzellen der T-Zell-Reihe differenzieren (41;42), da sie mit T-Zellen eine Vielzahl von Oberflächenmolekülen teilen und auch ähnliche Mechanismen der Target-Zell-Lyse besitzen (43;44). Neue Erkenntnisse weisen zudem darauf hin, dass auch sekundär lymphatische Gewebe wie Lymphknoten wichtige Orte der NK-Zell-Entwicklung und -Reifung darstellen (45). Die meisten NK-Zellen lassen sich durchflusszytometrisch mit folgenden Oberflächenmolekülen charakterisieren:

- CD2, ein Adhäsionsmolekül (75-kDa β -Untereinheit des IL2-Rezeptors)
- CD16, Bestandteil des niedrigaffinen FC-Rezeptors FC γ RIIIA, vermittelt Phagozytose und ADCC
- CD56, ein Adhäsionsmolekül, typischer Marker für humane NK-Zellen
- CD69, ein frühes Aktivierungsmolekül, das von aktivierten Lymphozyten exprimiert wird.

Weiterhin findet man auf Subpopulationen von NK-Zellen die Antigene CD8, CD25, CD38, CD71 und HLA-DR. Üblicherweise wird der Phänotyp von NK-Zellen als CD3⁻/CD16⁺/CD56⁺ identifiziert, auch wenn eine Unterfraktion der T-Zellen ebenfalls die CD16- und CD56-Oberflächenmerkmale aufweist.

Die initiale Bezeichnung der NK-Zellen erfolgte aufgrund ihrer Fähigkeit, bestimmte Tumoren, leukämische Blasten, Lymphome, sowie virusinfizierte Zellen ohne vorhergehende Sensibilisierung zu lysieren (39;46-48).

Mitte der achtziger Jahre entdeckte man, dass im Gegensatz zu T-Zellen, welche HLA-Antigene auf ihren Targetzellen benötigen, NK-Zellen vor allem effektiv gegen Tumor- oder Leukämiezellen mit stark erniedrigter oder fehlender HLA-Klasse I-Expression sind. Dieses Phänomen wurde erstmals 1986 von Klas Kärre als „Missing-self-Hypothese“ beschrieben und in späteren Studien bestätigt (46;49;50). Neben der Expression von HLA-Klasse I-Antigenen scheint auch die Präsentation bestimmter Signalpeptide innerhalb des HLA-Komplexes eine Rolle in der Erkennung als normale Zelle durch NK-Zellen zu haben (50). Die zytotoxische Aktivität wird durch das Zusammenwirken von inhibierenden und aktivierenden Rezeptoren, die auf der Zelloberfläche exprimiert werden, im Sinne eines Summationseffekts gesteuert. Hierbei überwiegt unter physiologischen Bedingungen der Einfluss der inhibitorischen Rezeptoren und sorgt dafür, dass als „normal“ erkannte Zellen nicht von NK-Zellen attackiert werden (51-54). Zusätzlich tragen Adhäsionsmoleküle und akzessorische Rezeptoren zur Zytolyse bei (55).

Zusammenfassend lassen sich die Aufgaben der NK-Zellen im Immunsystem in folgender Weise beschreiben:

- Frühe Abwehr von Viren, intrazellulären Bakterien und Parasiten (56;57)
Die antivirale NK-Aktivität erreicht dabei ihren Höhepunkt etwa am 3. Tag post infectionem und stellt damit die erste Front zellulärer Abwehrmechanismen dar. Erst ab dem 7. Tag treten zytotoxische T-Zellen in Aktion.
- Kontrolle aberranter Zellen, die Tumorantigene exprimieren oder ihre HLA-Klasse I-Expression reduzieren (niedrige oder fehlende NK-Zellaktivität ist im Tiermodell und beim Menschen mit der Entstehung von Tumoren bzw. progredientem Tumorwachstum assoziiert).
- Durch die Produktion von verschiedenen Zytokinen (u.a. IFN- γ , TNF- α) spielen NK-Zellen außerdem eine wichtige Rolle in der Regulation der Immunantwort.

1.4.1 NK-Zell-Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle

Die Aktivität von NK-Zellen wird durch verschiedene Rezeptoren reguliert (52;53;58) und resultiert aus dem Zusammenspiel von positiven Signalen der KAR (kill cell activating receptors) sowie kostimulatorischen Molekülen auf der einen Seite und inhibitorischen Interferenzen der KIR (kill cell inhibitory receptors) auf der anderen Seite (52;59;60). Die NK-Zell-Rezeptoren lassen sich in verschiedene Klassen unterteilen:

- „killer cell immunoglobulin-like receptors“, gehören zur Immunoglobulin Superfamily (IgSF)
- „C-type lectin-like receptors“ (CTLR)
- „natural cytotoxicity receptors“ (NCR)

Zu den Klassen der IgSF und CTLR gehören aktivierende ebenso wie inhibitorisch wirksame Rezeptoren.

1.4.1.1 Killer cell inhibitory receptors (KIR)

Gene, die für die Familie der „killer cell immunoglobulin-like receptors“ kodieren, befinden sich auf Chromosom 19. Die Unterteilung dieser Rezeptoren erfolgte bezüglich deren Anzahl an externen Ig-Domänen (2D oder 3D) und dem Vorhandensein eines langen (L) oder kurzen (S) zytoplasmatischen Teiles, welches mit der Funktion als inhibierender oder aktivierender Rezeptor korrespondiert (61). Inhibierende NK-Zell-Rezeptoren der Immunglobulin Superfamilie (Typ I Transmembran Proteine) sind in Abb. 1.2 beschrieben.

| Proteinbezeichnung | Molekulargewichtsklasse in kD | Charakterisiert durch | HLA-Liganden |
|----------------------|-------------------------------|-----------------------|--------------------------|
| p58.1 bzw. KIR2DL2/3 | 58 | anti CD158a | HLA-C 2,4,5,6 (62;63) |
| p58.2 bzw. KIR 2DL1 | 58 | anti CD158b | HLA-C 1,3,7,8 (62;63) |
| p70 bzw. KIR3DL1 | 70 | anti CD158e | HLA-Bw 4 (64) |
| p140 bzw. KIR3DL2 | 140 | anti CD158k | HLA-A 3,11 (65) |

Tab. 1.2: Gruppe der Ig-ähnlichen Rezeptormoleküle mit inhibitorischer Funktion.

Gene, die für die C-Typ-Lektin-Superfamilie (Typ II Transmembran Proteine) kodieren, befinden sich auf Chromosom 12 (66;67). Zu dieser Familie werden die Rezeptormoleküle CD94/NKG2-A gezählt, die spezifisch für Leaderproteine verschiedener HLA-Klasse I-Antigene (ausgenommen Bw4) sind, welche über HLA-E als spezifischem Liganden präsentiert werden. Dabei handelt es sich um ein Heterodimer, das aus zwei Glykoproteinen aufgebaut ist. Das CD94-Molekül ist mit einer von vier Untereinheiten des NKG2-Molekül über Disulfidbrücken verbunden. Bei NKG2A und B wirkt dieser Rezeptorkomplex inhibierend, bei NKG2C und -D aktivierend (68).

1.4.1.2 Killer cell activating receptors (KAR)

In den letzten Jahren wurden verschiedene aktivierende NK-Zell-Rezeptoren charakterisiert zu denen NKp30, NKp44, NKp46, NKG2C und NKG2D gehören. Abgesehen von NKG2D ist bislang nur wenig bekannt über die korrespondierenden HLA-Liganden der aktivierenden Rezeptoren mit Ausnahme der Erkenntnis, dass bei aktivierenden Rezeptoren die Bindung von HLA-Liganden wesentlich schwächer ist als die Bindung dieser Moleküle durch die entsprechenden inhibitorischen Rezeptoren (55;69;70). NKG2D wird von praktisch allen NK-Zellen, $\gamma\delta$ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen exprimiert und bildet zusammen mit dem Adapterprotein DAP10 einen aktivierenden Immunrezeptorkomplex (55;71). Durch Bindung mit seinem MHC-Klasse I verwandten Liganden auf infizierten oder maligne transformierten Zellen stimuliert NKG2A die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen sowie die Sekretion von Zytokinen (71;72). Die NCR NKp46 und NKp30 finden sich auf allen NK-Zellen, ob in aktiviertem oder ruhendem Zustand. NKp44 wird nur von aktivierten NK-Zellen exprimiert (73). Außerdem hat der für die ADCC verantwortliche Rezeptor CD16 als FC γ RIII-Untereinheit des Fc-Rezeptors eine NK-Zell aktivierende Funktion.

1.4.1.3 Adhäsionsmoleküle

Neben den inhibitorischen und aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren sind verschiedene Adhäsionsmoleküle mitbestimmend für die Interaktion der NK-Zellen mit anderen Zellen. So genannte „intercellular adhesion molecules“ (ICAM) und die „lymphocyte function-associated antigens“ (LFA) spielen beim ersten Kontakt zwischen NK-Zellen und ihren Targetzellen eine Rolle.

Einige der wesentlichen Adhäsionsmoleküle dieser beiden Gruppen sind in Tab. 1.2 aufgeführt.

| Bezeichnung | CD-Antigen | Funktion |
|-------------|------------|---|
| ICAM 1 | CD54 | Ligand für LFA 1 von zytotoxischen T-Zellen |
| ICAM 2 | CD102 | Ligand für Integrine, ermöglicht z.B. die Bindung von Lymphozyten an antigenpräsentierende Zellen |
| ICAM 3 | CD50 | Interaktion zwischen Lymphozyten und antigen- präsentierenden Zellen wie ICAM 2 |
| LFA 1 | CD11a/CD18 | wichtig für Interaktion zwischen NK-Zellen und CTLs mit ihren Targetzellen |
| LFA 2 | CD2 | bindet LFA 3 als Liganden und spielt eine Rolle bei der Zelladhärenz |
| LFA3 | CD58 | bindet an CD2 und wird u.a. auch auf B-Zellen, T-Zellen und Monozyten exprimiert |

Tab. 1.3: Adhäsionsmoleküle, die Einfluss auf die Interaktion von NK-Zellen mit Targetzellen nehmen

1.4.2 Mechanismen der NK-Zell-Lyse

Als wesentliche Mechanismen der NK-Zell-Lyse gelten das Perforin/Granzyme-System, der Fas/FasL-Mechanismus und das TRAIL-System (tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand) (74). Außerdem sind NK-Zellen als einzige Lymphozyten befähigt, sowohl natürlich als auch Antikörper-abhängige Zytotoxizität (antibody dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) auszuüben. Experimente mit perforindefizienten Mäusen zeigten, dass das Perforinsystem eine unverzichtbare Voraussetzung für eine effiziente Tumorlyse darstellt, während der Fas/FasL-Mechanismus nach Interleukin 2 Stimulation an Bedeutung gewinnt (75). Außerdem sind die Interleukine 2, 12, 18 und vor allem IL-15 potente Stimulatoren der zytotoxischen NK-Zell-Aktivität.

Weiterhin produzieren NK-Zellen selbst effektive Zytokine wie IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, IL-10, IL-13 und nehmen damit massiven Einfluss auf andere immun-kompetente Zellen wie T-Lymphozyten, Monozyten oder Granulozyten, um so die frühe Phase der natürlichen und adaptiven Immunantwort zu optimieren.

1.5 NK-Zell-Alloreaktivität

Anhand von Tierversuchen wurde zunächst gezeigt, dass nach Verabreichung allogener NK-Zellen eine gewünschte alloreaktive Aktivität gegenüber leukämischen Blasten (Graft versus Leukemia Effekt, GvL) beobachtet werden kann. Zudem konnte im Gegensatz zu T-Zellen keine gegen den Wirt gerichtete Immunreaktion im Sinne einer GvH-Reaktion nachgewiesen werden (76). In weiteren Versuchen stellte sich heraus, dass alloreaktive NK-Zellen einer GvHD-Ausbildung sogar vorbeugend entgegenwirken und somit zu einem besseren Engraftment des jeweiligen Transplantates führen (7;77-79).

Aversa beschrieb im Rahmen von haploidentischen Transplantationen ein unerwartet gutes, ereignisfreies Überleben bei adulten Patienten mit AML, obwohl zum Zeitpunkt der Transplantation teilweise keine Remission vorlag (4). Daraufhin entwickelten Velardi/Ruggeri et al das Konzept der NK-Alloreaktivität (siehe Abb. 1.2) (79).

Demnach können alloreaktive Klone entstehen, wenn Spender-NK-Zellen in die HLA-differente Umgebung des Empfängers gelangen und bestimmte, als dominant bezeichnete inhibierende Rezeptoren vom HLA-Typ des Empfängers nicht mehr gehemmt werden. Dieses Konzept des KIR-Ligand-Mismatches erlaubt es, eine NK-Zell-Alloreaktivität allein auf Grundlage der HLA-B und HLA-C Konstellation von Spender und Empfänger vorherzusagen. Berücksichtigt werden nur die KIRs CD158a, CD158b, CD158e und deren zugeordnete HLA-Liganden (vgl. Abb. 1.2).

Dieser Effekt der NK-Alloreaktivität bei haploidentischer SZT wurde zunächst bei akuter myeloischer Leukämie (AML) beobachtet (78-80). Dagegen konnte

bei adulten Patienten mit lymphatischer Leukämie keine NK-Alloreaktivität und auch kein klinischer Vorteil nachgewiesen werden (78). Jüngste experimentelle und klinische Untersuchungen, wie auch die Ergebnisse dieser Arbeit, weisen allerdings auf einen GvL-Effekt von NK-Zellen bei kindlicher ALL hin (8;81). Zudem ermutigen neue Erkenntnisse über das alloreaktive Verhalten von NK-Zellen bei allogener SZT, deren Einsatz als Effektoren einer adoptiven Immuntherapie.

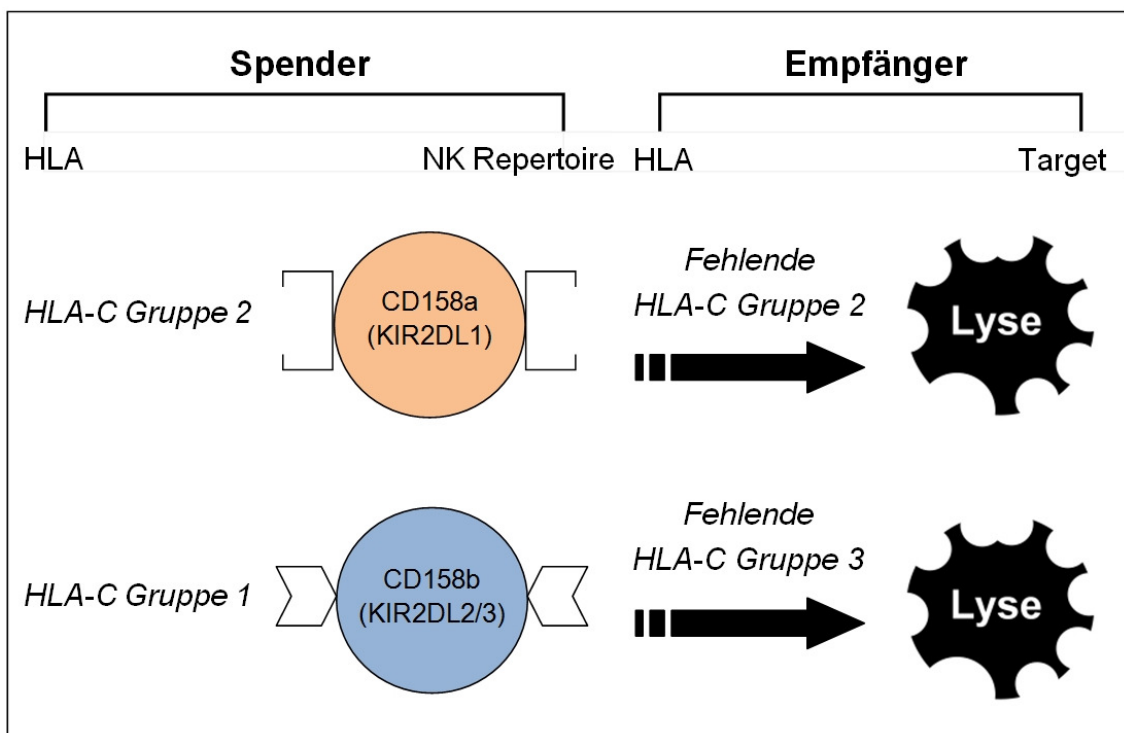


Abb. 1.2: Spender-vs-Empfänger NK-Zell-Alloreaktivität nach dem KIR-Ligand-Mismatch Konzept von Velardi/Ruggeri et al. Spender, die HLA-C Allele der Gruppe 2 exprimieren (Cw 2, 4, 5, 6) und NK-Zellen aufweisen, die inhibitorische KIR tragen, welche für HLA-C Allele der Gruppe 2 spezifisch sind, verhalten sich alloreaktiv gegenüber Zellen von Empfängern, die keine HLA-C Allele der Gruppe 2 exprimieren (die also homozygot für HLA-C Allele der Gruppe 1 sind). Spender, die HLA-C Allele der Gruppe 1 exprimieren (Cw 1, 3, 7, 8) und NK-Zellen aufweisen, die inhibitorische KIR tragen, welche für HLA-C Allele der Gruppe 1 spezifisch sind, verhalten sich alloreaktiv gegenüber Zellen von Empfängern, die keine HLA-C Allele der Gruppe 1 exprimieren (die also homozygot für HLA-C Allele der Gruppe 2 sind) (82).

1.6 Studienziele

Die experimentellen Untersuchungen dieser Arbeit hatten zunächst das Ziel, eine effiziente Methode der Generierung und Expansion von NK-Zell-Klonen zu etablieren. Mittels MACS-Technologie erfolgte die Anreicherung von CD56⁺- bzw. Depletion von CD3⁺-Zellen und in Zusammenarbeit mit Prof. Velardi et al (Perugia, Italien) die Erstellung eines Protokolls zur Klonierung der NK-Zellen aus Patienten- und Spenderblut.

Auf klonaler Ebene sollte daraufhin überprüft werden, ob alloreaktive NK-Zellen von gesunden Spendern, sowie von Patienten nach Transplantation identifizierbar sind. Nach der Definition des KIR-Ligand-Mismatch Konzepts von Velardi et al wurden NK-Zell-Klone von Spendern mit bekanntem HLA-Typ gegen Referenzzelllinien mit definierter HLA-Klasse I-Expression sowie gegen verschiedene kryokonservierte pädiatrische Prä-B-ALL Blasten auf Alloreaktivität mittels BATDA-Release-Assays ausgetestet. Dadurch sollte auch der prädiktive Wert des KIR-Ligand-Mismatch Konzepts hinsichtlich des Killings von kindlichen ALL Blasten der B-Zelllinie evaluiert werden.

Ferner verfolgte diese Studie das Ziel, NK-Zell-Klone von gesunden Spendern und Patienten mit besonders hoher bzw. niedriger zytotoxischer Aktivität gegenüber kindlichen Prä-B-ALL Blasten weitergehend zu analysieren und Erkenntnisse darüber zu gewinnen, wodurch sich diese Effektoren auszeichnen und welche weiteren Regulationsmechanismen eine Lyse dieser Targetzellen ermöglichen bzw. verhindern. Zur immunphänotypischen Charakterisierung der NK-Zell-Klone auf inhibierende und aktivierende Rezeptoren, sowie costimulatorische Oberflächen-/Adhäsionsmolekülen wurden qualitative 4-Farben-FACS-Analysen durchgeführt.

2 Material

2.1 Allgemeine Materialien

2.1.1 Geräte sowie Glas- und Plastikmaterial

| | |
|---|-------------------------------|
| Sterile Werkbank Hera safe | Heräus |
| Brutschrank Hera cell | Heräus |
| Kühlschrank, Gefrierschrank | Liebherr |
| Laborzentrifugen: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Rotixa 50 RS ▪ Rotixa RP | Hettich |
| Blutanalysegeräte: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Cellcounter Advia 120 ▪ Minos STE | Bayer Roche |
| Bestrahlungsgerät, <i>GammaCell 1000 Elite CEO120 (22x10¹² By 607 Ci, Caesium 137)</i> | MS Nordion, Ontario/Kanada |
| Beheizbares Wasserbad | Köttermann |
| Ultraschallentgaser Sonorex, Super RK 106 | Bandelin |
| Vortexer VF 2 | Janke & Kunkel |
| Schüttler, Titramax 100 | Heidolph |
| Drehschüttler | Snijders |
| Pipettiergerät Multipette Plus | Eppendorf |
| Pipettiergerät Fireboy | Tecnomara |
| Pipettiergerät Pipettboy Plus | Integra Bioscience |
| Sterile Plastikpipetten (1, 2, 5, 10, 25ml) | Costar |
| Verstellbare Pipetten <i>Pipetman, 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl</i> | Gilson |

| | |
|---|-----------------|
| Pipettenspitzen | Gilson |
| PPN – Röhrchen, steril, 15ml, 50ml | Greiner |
| Röhrchenständer | Nalgene |
| Reaktionsgefäße, steril, 1,5ml | Eppendorf |
| Zellkulturflaschen 50 ml, 250 ml | Costar, Greiner |
| Handschuhe | Safeskin |
| Desinfektionsspray | Braun |
| Spritzen, steril, 5 ml, 10 ml, 20 ml, 50 ml | Braun |
| Butterfly 21 | Abbott |
| Kanülen Sterican®, 20G, 22G, 24G | Braun |

2.1.2 Stammlösungen

Stammlösung A: Medium für Zellkultivierung und Zytotoxizitätsassay

- 500 ml RPMI 1640 Biochrom
- 50 ml Fetales Kälberserum (FCS),
inaktiviert (30 min. bei 56 °C) PAA Laboratories
- 5 ml L-Glutamin (200 mM) Biochrom
- 5 ml Penicillin (10000U) /
Streptomycin (10mg/ml) Biochrom
- 12,5 ml Hepes-Buffer 1M Biochrom

Stammlösung B: MACS – Puffer

- 500 ml Phosphat buffered saline (PBS) Gibco
- 10,6 ml EDTA (250 mM) Universitätsapotheke
- 10 ml Humanalbumin 20% DRK BW

Bei leicht geöffnetem Deckel 15 min lang ultraschallentgast.

Stammlösung C: FACS – Puffer

- 500 ml Phosphat buffered saline (PBS) Gibco
- 1,66 ml Bovine serum albumin (BSA), 30% Sigma
- 5 ml Natriumazid, 10% Sigma

2.2 Material für die Isolierung mononukleärer Zellen

| | |
|---|--|
| Peripheres Vollblut | Gesunde Spender, Patienten der Universitäts- kinderklinik Tübingen |
| Buffy Coats | Blutbank Tübingen |
| Heparin: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Vetren® 200 ▪ Liquemin® | Byk Gulden Roche |
| Bicoll Separating Solution, Ficoll | Seromed |
| Phosphat buffered saline (PBS) | Gibco |

2.3 Spezielle Materialien für die Zellzählung und Mikroskopie

| | |
|---|--------------|
| Neubauer Zählkammer | Brandt |
| Trypanblau (0,4%) | Sigma |
| Lichtmikroskop (Zellzahlbestimmung) | Zeiss |
| Inversionsmikroskop (Zellkulturbeobachtung) | Olympus |
| Objektträger (76 x 26 mm) | Langenbrinck |
| Deckgläser | Menzel |
| Zähluhr | Ivo |

2.4 Spezielle Materialien für die Zellanreicherung

| | |
|---|-----------------|
| Vario MACS (Magnet) | Miltenyi Biotec |
| MLC – 1 Handmagnet | Dynal |
| Separationssäule Typ LS ⁺ , CS | Miltenyi Biotec |
| Stammlösung B | siehe 2.1.2 |
| Nylon – Zellfilter (40µm) | Falcon |
| Polyglobin 5% | Bayer |
| CD3-Multisort Kit (Microbeads u. Reagentien) | Miltenyi Biotec |
| CD56-Multisort Kit (Microbeads u. Reagentien) | Miltenyi Biotec |
| Dynabeads M450, CD 3 | Dynal |

2.5 Spezielle Materialien für die NK-Zell-Klonierung

| | |
|-------------------------------------|----------------------|
| PHA – M | Sigma |
| Interleukin 2 (r-IL2) | Universitätsapotheke |
| Interleukin 15 | R&D Systems |
| Mikrotiterplatten, U-Form, 96-Loch | Costar |
| Mikrotiterplatten, 48-Loch, 24-Loch | Costar |
| Stammlösung A | siehe 2.1.2 |

2.6 Material für die Durchflusszytometrie

GERÄTE, LABORARTIKEL UND REAGENZIEN

| | |
|--|---|
| FACSCalibur | Becton Dickinson, Heidelberg |
| angeschlossene Hardware | Apple |
| Auswertungsprogramm CellQuest | Becton Dickinson, Heidelberg |
| Quifikit | Dako, Dänemark |
| Stammlösung C | siehe 2.1.2 |
| Analyseröhrchen <ul style="list-style-type: none"> ▪ 5 ml, Rundboden ▪ spitz | Becton Dickinson, Heidelberg Sarstedt, Nümbrecht |

MONOKLONALE ANTIKÖRPER

| ANTI-KÖRPER | SUBTYP | MARKIERUNG | HERSTELLER |
|--|-------------------|------------|------------------|
| Kontrollantikörper | IgG ₁ | FITC | Becton Dickinson |
| γ ₁ /γ ₂ Simultest | IgG _{2a} | PE | |
| G1 MOUSE | IgG ₁ | APC | Becton Dickinson |
| G2a Mouse | IgG _{2a} | PerCP | Becton Dickinson |
| CD 3 | IgG ₁ | PE | Becton Dickinson |
| CD 3 | IgG ₁ | FITC | Becton Dickinson |
| CD 3 | IgG ₁ | APC | Becton Dickinson |
| CD 3 | IgG ₁ | PerCP | Becton Dickinson |
| CD 56 | IgG ₁ | PE | Becton Dickinson |
| CD 56 | IgG ₁ | FITC | Becton Dickinson |
| CD 56 | IgG ₁ | APC | Becton Dickinson |
| CD 158a | IgG ₁ | PE | Becton Dickinson |
| CD 158b | IgG _{2b} | FITC | Becton Dickinson |
| CD 158e (NKB1) | IgG ₁ | APC | Becton Dickinson |

| | | | |
|--------|-------------------|------|------------------|
| CD 2 | IgG ₁ | PE | Becton Dickinson |
| CD 11a | IgG ₁ | FITC | Becton Dickinson |
| CD 50 | IgG _{2b} | FITC | Becton Dickinson |
| CD 54 | IgG ₁ | FITC | Becton Dickinson |
| CD 58 | gG _{2a} | FITC | Becton Dickinson |
| CD 94 | IgG ₁ | FITC | Becton Dickinson |
| CD 154 | IgG ₁ | FITC | Becton Dickinson |
| CD 16 | IgG ₁ | FITC | Becton Dickinson |
| CD 38 | IgG ₁ | FITC | Becton Dickinson |
| CD 85j | IgG _{2b} | PE | Beckman Coulter |
| NKG2A | IgG _{2b} | PE | Beckman Coulter |
| NKG2D | IgG ₁ | APC | R&D Systems |
| NKp30 | IgG ₁ | PE | Beckman Coulter |
| NKp44 | IgG ₁ | PE | Beckman Coulter |
| NKp46 | IgG ₁ | PE | Beckman Coulter |

2.7 Material für den Zytotoxizitätstest

| | |
|---|---------------------|
| Sonifier Cell Disruptor B-12 | Branson Sonic Power |
| Victor 1420 Multilabel | Counter Wallac |
| Angeschlossene Hardware | Compaq |
| Software Wallac 1420 Workstation | Wallac |
| Mikrotiterplatte, U – Form, F - Form | Greiner |
| BATDA – Ligand | Wallac |
| Europium – Lösung | Wallac |
| Lyse – Puffer | Wallac |
| Anti-HLA ABC – Antikörper (clone W6/32) Subtyp IgG _{2a} | Harlan Sera-Lab Lt. |

2.8 Zelllinien

| | |
|---|--------------------------|
| Erythroleukämische Zelllinie K562 | LGC Promochem, Wesel |
| EBV-transformierte B-Lymphoblastische Zelllinie LCL-721.221 | LGC Promochem, Wesel |
| B-LCL missing HLA-Bw4 (W00) | Velardi, Perugia/Italien |
| B-LCL missing HLA-Cw3 (WT47) | Velardi, Perugia/Italien |
| B-LCL missing HLA-Cw4 (LADA) | Velardi, Perugia/Italien |

2.9 Allgemeine Software

| | |
|----------------------|----------------------|
| Word 2007 | Microsoft |
| Excel 2007 | Microsoft |
| GraphPad Prism 4 | Statcon |
| SigmaPlot 10 | Statcon |
| Reference Manager 10 | Thomson ResearchSoft |

3 Methoden

3.1 Isolierung von peripheren mononukleären Zellen

3.1.1 Prinzip

Aus heparinisiertem, peripherem Vollblut freiwilliger Spender oder Buffy Coats (bereitgestellt von der Blutbank Tübingen) werden durch Dichtegradientenzentrifugation nach der von Böyum beschriebenen Methode mit Ficoll-Hypaque periphere mononukleäre Zellen (PMNC) gewonnen (83;84).

Aufgrund der Dichteunterschiede kommt es nach Zugabe von Ficoll-Hypaque (Dichte $d=1,077\text{g/ml}$) zu einer Auftrennung der unterschiedlichen zellulären Blutbestandteile. Thrombozyten und PMNC haben eine geringere Dichte als Ficoll-Hypaque und reichern sich in der so genannten Interphase (3. Schicht von unten) auf der Ficollschicht an, während z.B. Erythrozyten und Granulozyten eine höhere Dichte haben und sich deshalb unterhalb der Ficollschicht absetzen.

3.1.2 Dichtezentrifugation mit Ficoll-Hypaque® nach Böyum

- 1) Heparinisiertes Vollblut (10 I.E./ml) wird im Verhältnis 1:1 mit PBS gemischt (bei Buffy Coats im Verhältnis 1:3). In einem 50 ml Falconröhrchen wird zunächst 15 – 20 ml Ficoll-Hypaque vorgelegt und dann 30 – 35 ml der Blut-PBS-Mischung mit einer Pipette vorsichtig aufgeschichtet, so dass zwei Phasen entstehen.

- 2) Dichtegradientenzentrifugation der Röhrrchen 30 min bei Raumtemperatur mit 400g; Anlaufzeit 100s, Bremse 0. Mit einer sterilen Pipette wird die oberste Schicht, die das Plasma und die Thrombozyten enthält, entfernt.
- 3) Mit einer weiteren sterilen Pipette wird dann die Schicht, welche die PMNC enthält, vorsichtig abgesaugt und in ein steriles 50 ml Falconröhrrchen überführt.
- 4) Waschen der PMNC: Röhrrchen wird mit PBS aufgefüllt und bei 300g für 10 min zentrifugiert, anschließend wird der Überstand abgesaugt und das Zellpellet resuspendiert. Diese Schritte werden einmal wiederholt, und je nach weiterer Verwendung das Pellet am Schluss in Medium oder PBS resuspendiert und die Zellzahl manuell mit der Neubauer Zählkammer oder mit dem Advia-Gerät bestimmt.

3.2 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte zum einen mittels eines vollautomatischen Zählgerätes (Advia 120, Bayer, Leverkusen). Hierbei ist durch die Messung des von jeder Zelle ausgesandten Streulichts, sowie der Peroxidaseaktivität neben der Zellzahlbestimmung auch eine genauere Zelldifferenzierung möglich.

Weiterhin wurde die Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Zählkammer durchgeführt (Neubauer Improved Assistent Bright Line, Germany: Gesamtfläche: 0,025 mm², Tiefe 0,1 mm, vier Großquadrate mit je 16 Kleinquadraten). Die Zellsuspensionen werden hierzu mit Trypanblau (trypan blue solution 0,4%, sigma chemical co) im Verhältnis 1:1 verdünnt. Dabei kann die Vitalität der Zellen beurteilt werden, da tote Zellen aufgrund des Integritätsverlusts ihrer Membranbarriere mit Trypanblau angefärbt werden und bei mikroskopischer Betrachtung als schwarz-blaue, unregelmäßig begrenzte Punkte imponieren. Mit Hilfe eines Mikroskops (Olympus CX40LF200, Japan) können folglich alle vitalen Zellen in je vier Großquadraten ausgezählt werden. Die Zählung umfasst dabei mindestens 200 Zellen.

Die Zellzahlbestimmung nach Neubauer wurde vor allem bei zuvor kultivierten oder kryokonservierten Zellen angewandt, da in der Regel ein Teil der Zellen durch das Kultivieren bzw. Kryokonservieren morphologische Veränderungen aufwies und von dem automatischen Messgerät nicht mehr erfasst werden konnte.

3.3 Zellanreicherung mit dem MACS-System

3.3.1 Prinzip des MACS-Systems

Die Methode des „Magnetic-activated cell sorting“ erlaubt die Anreicherung oder Depletion einer bestimmten Zellpopulation mit Hilfe immunomagnetischer Substanzen. Mit kleinen Metallpartikeln (Eisenoxid) konjugierte Antikörper werden eingesetzt, um an spezifische Epitope, die für die entsprechende Zellsorte charakteristisch sind (z.B. CD3 für T-Zellen), zu binden.

Die markierten Zellen werden anschließend auf eine mit paramagnetischer Eisenmatrix gefüllten Trennsäule aufgetragen, die sich in einem Hochleistungs-Permanentmagneten befindet. Positiv markierte Zellen werden in der Trennsäule zurückgehalten, während die Negativfraktion als Durchlauf erscheint. Entfernt man danach die Säule aus dem Magnetfeld, lassen sich die markierten Zellen als Positivfraktion aus der Säule eluieren.

Bei der Anreicherung von NK-Zellen werden gegen CD56 gerichtete Antikörper eingesetzt. Hierbei handelt es sich um ein Adhäsionsmolekül (neural cell adhesion molecule, NCAM), das hauptsächlich von NK-Zellen, allerdings auch von einer bestimmten T-Zell-Subpopulation exprimiert wird.

Zur Depletion von T-Zellen bzw. CD3 positiven Zellen aus einem Gemisch von PMNC werden gegen CD3 gerichtete Microbeads verwendet.

3.3.2 Anreicherung von NK-Zellen mit Miltenyi Microbeads

Die MACS-Positiv-Anreicherung von NK-Zellen wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

- 1) Isolierung von PMNC wie in 3.1.2 beschrieben. Das Zellpellet wird dann in Puffer (Stammlösung B) aufgenommen und die Zellen auf eine Dichte 100 Mio. Zellen/ml Puffer eingestellt.
- 2) Alle nun folgenden Arbeitsschritte werden auf Eis, bei ca. 4°C durchgeführt.
- 3) Inkubation mit 50 µl/ml Polyglobulin, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, für 10 min.
- 4) Inkubation mit CD56 Beads für 30 min auf einem Schüttler, wobei 20 µl Beads für 10^7 Zellen verwendet werden, bei einer Zelldichte von 100 Mio./ml, also 200 µl Beads für 1 ml Zellsuspension.
- 5) Waschen der Zellen mit entgastem Puffer bei 300g für 10 min.
- 6) Resuspension des Zellpellets in 7 ml entgastem Puffer.
- 7) Installieren einer Trennsäule (VS) im Vario MACS und spülen der Säule mit 10 ml entgastem Puffer.
- 8) Langsames Auftragen der Zellsuspension auf die Säule und vollständiger Durchlauf.
- 9) Spülung der Säule mit fünfmal 2 ml Puffer, um unmarkierte Zellen zu entfernen.
- 10) Entnahme der Säule aus dem Magnet, aufsetzen auf ein 15 ml Falconröhrchen, auffüllen mit 7 ml Puffer und diesen dann mit dem Stempel schnell und kräftig durch die Säule drücken, so dass die Zellen aus der Säule gespült werden.
- 11) Waschen der Zellen mit Puffer bei 300g für 10 min und resuspendieren in Puffer.
- 12) Zählen der Zellen in Neubauerkammer oder am Advia-Zählgerät.
- 13) Je nach weiterer Verwendung werden die Zellen auf eine bestimmte Zellzahl eingestellt und in Medium oder PBS aufgenommen.

3.3.3 Depletion von T-Zellen mit Miltenyi Microbeads

Aus einem Gemisch von PMNC kann mit der MACS-Methode auch effektiv eine spezifische Zellfraktion entfernt werden.

In dieser Arbeit erfolgte die Depletion von T-Zellen aus dem Zellgemisch der PMNC. Die Negativfraktion wurde zur Klonierung von NK-Zellen verwendet.

Die Durchführung entspricht dem unter 2.3.2 erläuterten Schema der Positiv-Anreicherung mit Ausnahme der Verwendung von gegen CD3 gerichteten Microbeads sowie einer Depletions-Trennsäule (CS). Vergleiche hierzu Abb. 3.1.

3.4 T-Zell-Depletion mit Dynabeads

3.4.1 Prinzip

Die immunomagnetische Zellisolierung mit Dynabeads M-450 CD3 ist eine schnelle und verlässliche Methode zur T-Zell-Depletion.

Dynabeads M-450 CD3 sind magnetisierbare Polystyren-Beads, an die der für CD3 spezifische monoklonale Primärantikörper gebunden ist. Dieser Antikörper vom Klon SPVT3b reagiert mit dem 19-29kD CD3 Antigen, das von allen ruhenden und aktivierten menschlichen T-Zellen exprimiert wird. Die mit den Beads markierten Zellen lassen sich dann mit einem Magneten von den unmarkierten Zellen trennen.

Die T-Zell-Depletion wurde zunächst nach der MACS-Anreicherung der CD56 positiven Zellen durchgeführt, die dafür bereits magnetisch markiert wurden. Die magnetischen Partikel der Dynabeads sind mit einem Durchmesser von 4,5 µm jedoch wesentlich größer als die der MACS-Beads mit einem Durchmesser von 150 nm, so dass für die Abtrennung der mit Dynabeads markierten Zellen ein schwächeres Magnetfeld ausreicht, das die mit MACS-Beads markierten Zellen nicht beeinflusst.

3.4.2 Durchführung

Die Durchführung erfolgte im Wesentlichen nach der Anleitung des Herstellers, jedoch wurden mehr Beads pro Targetzelle eingesetzt:

- 1) Waschen der CD56 positiven Zellen, Aufnahme in Puffer und Einstellen auf 20 Mio Zellen/ml.
- 2) Bestimmung der benötigten Menge der Dynabeads unter der Annahme, dass von den angereicherten Zellen noch ca. 20% CD3/CD56 doppelt positiv sind und ein Verhältnis von Beads zu Targetzellen von 20:1 erreicht werden soll.
- 3) Die Beads werden dreimal gewaschen, da diese als Suspension in einem Puffer vorliegen, der zytotoxisches Natriumazid enthält.
- 4) Zugabe von Dynabeads im Verhältnis 20:1 und Inkubation im Überkopfschüttler bei 4 °C für 30 min.
- 5) Röhrcen auf 7 ml Gesamtvolumen mit kaltem Puffer auffüllen.
- 6) Röhrcen für 2 min in den Magneten stellen und dann den Puffer, in dem sich die CD3 negativen Zellen befinden, vom Rand her vorsichtig mit einer Pasteurpipette abpipettieren und in ein anderes Röhrcen überführen.
- 7) Die im ursprünglichen Röhrcen verbliebenen Zellen und Beads werden nochmals in 7 ml kaltem Puffer resuspendiert und der vorhergehende Schritt noch einmal wiederholt, um die Ausbeute an CD3⁻/CD56⁺ Zellen zu erhöhen.
- 8) Die Zellen werden in der Neubauerkammer oder am Zählgerät gezählt.
- 9) Zellen werden gewaschen, in Medium aufgenommen und auf die gewünschte Zellzahl eingestellt.

3.5 Klonierung von Natürlichen Killerzellen

Tag 0 Aus 10-20 ml heparinisiertem Spenderblut werden entsprechend der Ficoll-Dichtezentrifugation PMNC gewonnen (siehe 3.1.2), mit RPMI 1640 zweimal gewaschen und anschließend in einer Konzentration von 1×10^6 /ml in Stammlösung A für 1-24 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Inkubationszeit dient der Adhäsion von dendritischen Zellen an die Plastikwand der Zellkulturflasche.

Vorbereitung von Feeder-Zellen:

Buffy Coats werden mit 30 Gy bestrahlt. Es folgt ebenfalls die Ficoll-Dichtezentrifugation zur Gewinnung der PMNC, die anschließend in Stammlösung A aufgenommen und auf eine Konzentration von $0,5 \times 10^6$ /ml eingestellt werden.

Von dieser Zellsuspension werden 100 µl in jedes Well von 96-Loch-Rundbodenplatten pipettiert, die über Nacht im Inkubator gelagert werden.

Tag 1 An diesem Tag erfolgt die T-Zell-Depletion nach MACS mit anti-CD3 MicroBeads (3.3). Die Depletion wird dabei an zwei konsekutiven CS-Trennsäulen durchgeführt, um möglichst eine T-Zell-Kontamination <0,1% zu erreichen. Mittels Durchflusszytometrie wird die Reinheit kontrolliert (siehe 3.8).

Nach erfolgreicher CD3-Depletion werden die Zellen in Stammlösung A mit 0,5 µg/ml PHA-M aufgenommen und eine Verdünnungsreihe erstellt. Bei gesunden Spendern können Klonierungsansätze von z.B. 0,75 bis zu 20 Zellen/Well durchgeführt werden. Im Fall von Spendern nach Transplantation werden zwischen 10 und 100 Zellen/Well angesetzt.

Nach entsprechender Verdünnung werden die Zellsuspensionen den am Vortag ausplattierten Feeder-Zellen in 100 µl Zellsuspension hinzugefügt.

Tag 2 Die Zellen haben sich mittlerweile auf den Boden der Wells abgesetzt und es wird vom Überstand die Hälfte des Inhaltes (i.d.R. 100 µl) abpipettiert und mit Stammlösung A sowie IL-2 ersetzt. Für IL-2 wird eine Well-Konzentration von 500U/ml angestrebt.

Tag 5-7 In diesem Zeitraum wird ein weiteres Mal vom Überstand die Hälfte des Well-Inhaltes abpipettiert und mit Stammlösung A sowie IL-2 ersetzt. Zusätzlich gibt man 50000 Feeder-Zellen in jedes Well.

Tag 12-14 Nach einer Woche wird erneut wie an Tag 2 die Hälfte des Mediums (Stammlösung A) durch frisches ausgetauscht.

Tag 14-20 Die Zellkulturen werden im Zeitraum von 2-3 Wochen nach Zellkulturansatz unter dem Lichtmikroskop beurteilt, bei entsprechendem Wachstum in zwei Wells aufgeteilt und wieder mit Medium, Feederzellen, IL-2 und von nun an auch mit IL-15 in einer Konzentration von 0,5 ng/ml versorgt. Kriterien für das Wachstum und die Vitalität einer Zellkultur in der Mikrotiterplatte sind die Vergrößerung des Zellpellets am Boden der Wells, der Farbumschlag des Mediums aufgrund der pH-Änderung sowie die Zytomorphologie unter lichtmikroskopischer Betrachtung der Zellen am Rand der Pellets.

Nach der ersten Teilung der Klone ins 2-Well-Stadium erfolgt die Versorgung der Zellkultur mit frischem Medium und Zytokinen in Abständen von 1-5 Tagen entsprechend der bereits erwähnten Kriterien. Feeder-Zellen werden i.d.R. alle 7 Tage dazugegeben. Als Feederzellen wurden zum einen bestrahlte PMNC aus Buffy Coats verwendet und zum anderen bestrahlte RPMI 8866, eine

B-lymphoblastische Zelllinie. RPMI 8866 werden in einer Konzentration von $1-2 \times 10^5$ /Well eingesetzt. Wenn die Klone das 4-Well-Stadium erreichen, erfolgt die Immunphänotypisierung mittels FACS-Analyse zum Ausschluss einer CD3-Kontamination sowie Bestimmung der KIR-Expression der NK-Klone und funktionelle Austestung mit Zytotoxizitätstests.

Die verbleibenden Zellen werden weiter versorgt und expandiert. Nach der dritten Teilung kann die Zellkultur in 48-Loch, später auch in 24-Loch Mikrotiterplatten fortgesetzt werden. Die Zellkonzentration sollte dabei 1×10^6 /ml betragen. Unter optimalen Bedingungen proliferiert die Zellkultur über einen Zeitraum von 4-6 Wochen.

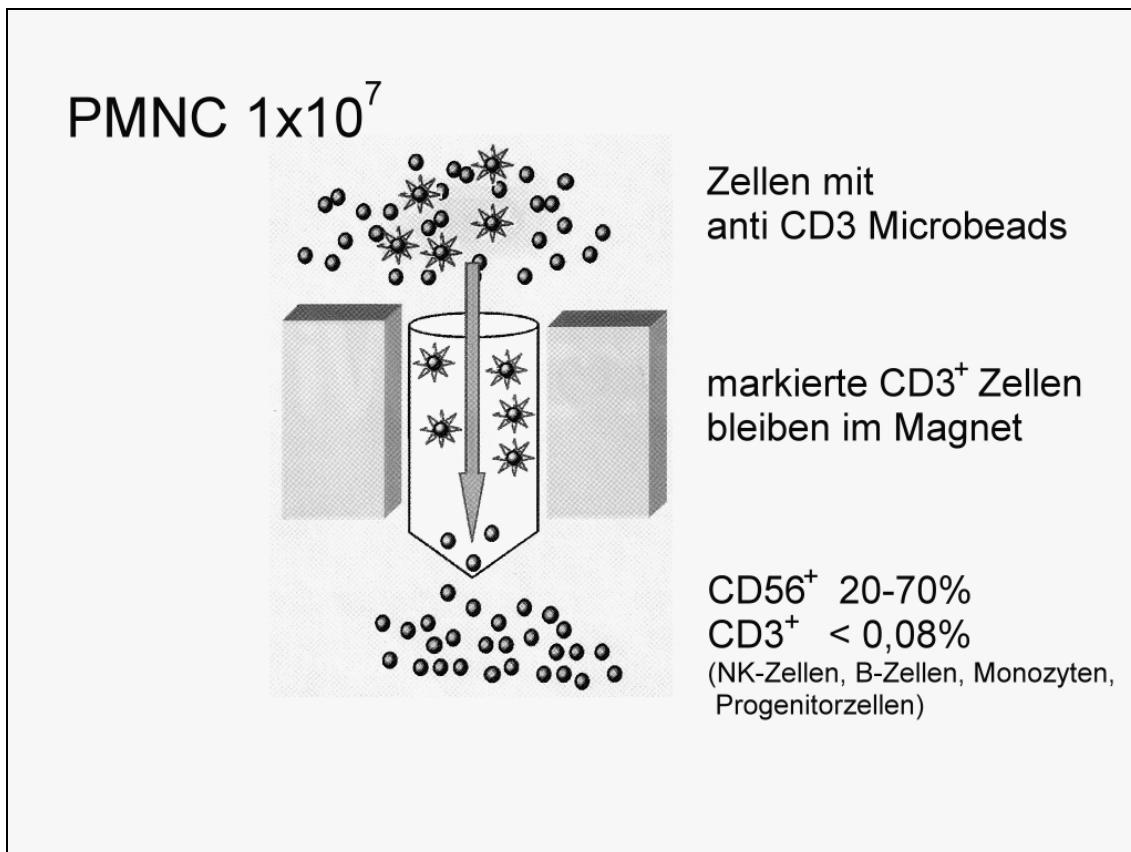


Abb. 3.1: Methode der Klonierung von NK-Zellen: Nach indirekter NK-Anreicherung mittels MACS CD3-Depletion (siehe Abbildung) erfolgt der Klonierungsansatz durch Titration mit initialen Zellzahlen von 0,75-20 Zellen/Well in 96-Loch-Mikrotiterplatten. Weiterhin werden die Zellen mit PHA stimuliert und während der Zellkultur mit IL-2, IL-15, bestrahlten allogenen Feederzellen, sowie frischem Nährmedium versorgt.

3.6 Zytotoxizitätstest

3.6.1 Prinzip des BATDA-Release

Bei der hier angewandten Methode des BATDA-release assay handelt es sich um einen nicht-radioaktiven Zytotoxizitätstest, der als Alternative zum klassischen ⁵¹Chromfreisetzungstest verwendet wurde.

Die Methode wurde weitgehend so verwendet, wie sie von K. Blomberg et al (85;86) veröffentlicht wurde und dient zur Bestimmung der Zytotoxizität von Lymphozyten gegenüber verschiedenen Targetzellen.

Das Prinzip des Tests beruht auf dem Nachweis eines intrazellulären fluoreszenzverstärkenden Liganden im Zellüberstand, der nur von lysierten Zellen freigesetzt wird. Dazu werden zuerst die Targetzellen mit dem fluoreszenzverstärkenden Liganden (BATDA) inkubiert, der als hydrophobe Verbindung die Zellmembran leicht passiert. Intrazellulär werden die Esterbindungen des Liganden hydrolysiert, so dass eine hydrophile Verbindung (TDA) entsteht, die die Zellmembran nicht mehr passieren kann. Die so markierten Targetzellen werden dann zusammen mit den Effektorzellen, z.B. T-Zellen oder NK-Zellen, inkubiert. Werden Targetzellen von den zytotoxischen Effektorzellen lysiert, tritt der hydrophile Ligand TDA in den Überstand über. Durch Zugabe von Europiumlösung lässt sich die Menge des freigesetzten Liganden über eine zeitverzögerte Fluoreszenz im Fluorometer messen, da er mit Europium einen stark fluoreszierenden und stabilen Chelatkomplex, EuTDA, bildet.

Die Zytotoxizität der Effektorzellen, ausgedrückt in einem prozentualen Anteil an lysierten Targetzellen, kann nur errechnet werden, indem das Ergebnis auf die Anzahl der maximal lysierbaren Zellen bezogen wird.

Im Test müssen deshalb folgende Werte zusätzlich bestimmt werden:

- Maximallyse:* Sie bezeichnet den Wert, der maximal erreicht werden kann, wenn alle Targetzellen lysiert werden.
- Spontanlyse:* Sie bezeichnet den Wert, der dadurch zustande kommt, dass Targetzellen ohne Einfluss von Effektorzellen absterben und den Liganden freisetzen.

Für die Berechnung der *spezifischen Lyse* in Prozent ergibt sich folgende Formel:

$$\text{Spezifische Lyse des Assays in \%} = \frac{\text{Messwert} - \text{Spontanlyse}}{\text{Maximallyse} - \text{Spontanlyse}} \times 100$$

3.6.2 BATDA-Markierung der Targetzellen

Für die Zytotoxizitätstests wurden folgende Targetzellen verwendet:

- die erythroleukämische Zelllinie K562
- Epstein-Barr Virus-transformierte B-lymphoblastische Zelllinien (LCL), die entweder keine HLA-Cw3 („missing Cw3“) oder HLA-Cw4 („missing Cw4“) verwandten Allele exprimieren
- HLA-freie LCL (LCL 721.221) und HLA-Cw-transfizierte LCL (HLA-Cw3, HLA-Cw4)
- kryokonservierte kindliche prä B-ALL Blasten von Patienten der Universitätskinderklinik Tübingen

Zur schonenden Behandlung der Zellen erfolgen alle Zentrifugationsschritte für 5 min bei 200g und Bremse 3. Außerdem wird während des gesamten Versuchsablaufs im Wasserbad auf 37°C erwärmtes Medium verwendet.

Die Targetzellen werden zunächst in einem 15 ml Falconröhrchen mit Medium auf 10^6 Zellen/ml eingestellt. Anschließend erfolgt die Zugabe des BATDA-

Liganden mit 2,5 µl/ml für die Zelllinien und 4 µl/ml für die Blasten. Während der Inkubation im Brutschrank (+37°C, 5% CO₂) für 30 min (Zelllinien) bzw. 60 min (Blasten) sollten die Zellen alle 10 min vorsichtig im Falconröhrchen gemischt werden. Um den BATDA-Liganden aus dem Überstand zu entfernen, werden nach der Inkubation die Targets mit Medium und oben erwähnten Zentrifugationseinstellungen fünfmal gewaschen.

Im Anschluss an den letzten Waschschrift wird die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer bestimmt und auf 50000/ml eingestellt (Blasten 200000/ml). Dies entspricht einer Konzentration von 5000 Targets/Well bei der Durchführung des Tests mit 100 µl Targetsuspension/Well. Durch die Zugabe von Trypanblau können tote Zellen identifiziert werden. Ist deren Anteil nach dem Waschen sehr groß, ist eine hohe Spontanlyse im Test zu erwarten, die das Testergebnis eventuell nicht auswertbar macht. Durch wiederholtes Waschen kann versucht werden, den Anteil toter Zellen zu vermindern.

Zusätzlich wird von jeder Targetzellpopulation eine Probe entnommen und separat zentrifugiert. Der Überstand hiervon wird zur Background-Bestimmung verwendet.

3.6.3 Vorbereitung der Effektorzellen

Bei den Effektorzellen handelt es sich um die in den Zellanreicherungen gewonnenen und in Zellkultur expandierten NK-Zellen bzw. NK-Zell-Klone.

Am Vortag wird den Effektoren frisches Medium sowie r-IL-2 zugegeben. Vor dem Versuchsansatz wird die Zellzahl und anschließend eine 1:2 Verdünnungsreihe über 3-4 Stufen hergestellt, die sich in ihrer Ausgangskonzentration auf die Targetzellkonzentration bezieht (5×10^4 Zellen/ml).

Je nach vorhandener Effektorenanzahl kann mit einem E/T-Verhältnis von 20:1, 10:1 oder 5:1 begonnen werden, was einer Effektorenkonzentration von 1×10^6 , $0,5 \times 10^6$ oder $0,25 \times 10^6$ entspricht. Durch die Verdünnungsreihe lässt sich verdeutlichen, dass die gemessene Zellyse auf die zugegebenen Effektorzellen zurückzuführen ist.

3.6.4 Durchführung des Zytotoxizitätstests

Der Test wird in einer Mikrotiterplatte mit 96 Rundboden-Kavitäten (Wells) angesetzt. In den ersten zwei Reihen werden Vierfach-Bestimmungen für Background, Spontanlyse und Maximallyse durchgeführt:

- 1) Background: 100 µl Targetzell-Überstand (siehe 3.5.2) und 100 µl Medium werden in 4 Wells angesetzt, bei Blasten 25 µl Überstand und 175 µl Medium.
- 2) Spontanlyse: 100 µl Targetzellen (25 µl bei Blasten) und 100 µl Medium (175 µl bei Blasten) werden in weiteren 4 Wells angesetzt.
- 3) Maximallyse: Dieser Ansatz wird zweimal auf unterschiedliche Weise angesetzt. In 4 Wells werden 100 µl Targetzellen mit 20 µl Lysepuffer und 80 µl Medium pipettiert (Blasten: 25 µl Targetzellen, 20 µl Lysepuffer, 155 µl Medium). Als zweiten Ansatz werden in 4 weiteren Wells 100 µl ultraschallzertrümmerter Targetzellen und 100 µl Medium (Blasten: 25 µl Targetzellen und 175 µl Medium) pipettiert.

In den folgenden Reihen werden Dreifach-Bestimmungen durchgeführt. Für jedes E/T-Verhältnis werden jeweils 3 x 100 µl Targetzellsuspension angesetzt (Blasten: 25 µl Targetzellen mit 75 µl Medium). Soll eine ADCC (antibody dependent cell-mediated cytotoxicity) durchgeführt werden, wird nun in die entsprechenden Wells der Antikörper zu den Targetzellen pipettiert und die Platte 30 min inkubiert. Die ADCC wurde nur für Blasten getestet, weshalb diese auch in einer höheren Konzentration verwendet wurden, um die Inkubation mit den Antikörpern in einem kleineren Volumen durchführen zu können. Die Antikörper werden in einer Konzentration von 1 µg/ml eingesetzt (= 0,2 µg/well). Um eine Lyse durch Komplement auszu-

schließen, muss für die ADCC noch eine zusätzliche Kontrolle aus 25 µl Targetzellen, Antikörper und 175 µl Medium angesetzt werden.

Zu den Targetzellen werden nun jeweils 100 µl Effektorzellen in entsprechender Verdünnung pipettiert. Wenn das Assay fertig pipettiert ist, wird die Platte für 2 min bei 100g mit Bremse 3 anzentrifugiert und für 2 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubationszeit wird die Platte nochmals zentrifugiert (100g, 5 min, Bremse 3), da für den Nachweis des Liganden nur Überstand verwendet wird.

In einer Flachbodenplatte wird nun eine entsprechende Anzahl an Wells mit 200 µl Europiumlösung und je 20 µl Überstand aus dem jeweiligen Well der Testansatzplatte beladen, mit Aluminiumfolie abgedeckt und für 20 min auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend kann das Ergebnis am Fluorometer gemessen und ausgewertet werden.

Die registrierten Counts werden entsprechend der Formel für die Spontanlyse (siehe 3.5.1) in Prozentzahlen umgerechnet, wobei aus den Dreifach- und Vierfach-Bestimmungen jeweils Mittelwerte gebildet werden. Um die Güte des Tests abzuschätzen, wird eine Spontanlyse des Assays (möglichst <30%) nach folgender Formel errechnet:

$$\text{Spontanlyse des Assays in \%} = \frac{\text{Spontanlyse} - \text{Background}}{\text{Maximallyse} - \text{Background}} \times 100$$

3.7 Immunphänotypisierung mit der Durchflusszytometrie

3.7.1 Prinzip

Die Durchflusszytometrie (FACS = fluorescence activated cell sorter) ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen und Zellpopulationen anhand zellspezifischer Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften.

Über eine Stahlkapillare wird durch Überdruck die jeweilige Zellsuspension in eine Messküvette eingebracht. Beim Eintreten in die Messkammer werden die Zellen durch eine sie umgebende Trägersubstanz stark beschleunigt, wodurch sich Aggregate auftrennen und die Einzelzellen sequentiell den Analysepunkt erreichen (hydrodynamische Fokussierung), an dem sie durch einen Laserstrahl geführt werden. Dabei werden Streuungseffekte der Zellen und Fluoreszenzen der verwendeten fluoreszierenden Antikörper gemessen.

Beim Phänomen der Lichtstreuung spielen Faktoren wie die Zellgröße, Oberflächenbeschaffenheit und intrazelluläre Bestandteile eine Rolle. Die Messung der Lichtstreuung erfolgt dabei mit Hilfe von Photodetektoren, den sogenannten Photomultipliern. Dabei gibt es zwei Parameter, die in einem zweidimensionalen Diagramm wiedergegeben werden:

Vorwärtsstreulicht (forward light scatter = FSC; x-Achse) entlang des einfallenden Lichtstrahls, welches ein Maß für die Zellgröße ist, und das dazu im rechten Winkel gestreute *Seitwärtsstreulicht* (sideward light scatter = SSC; y-Achse), welches von der intrazellulären Granularität abhängt.

In der Darstellung Seitwärtsstreulicht gegen Vorwärtsstreulicht für Vollblut gibt es eine charakteristische Aufteilung der Zellen, in der Lymphozyten von Monozyten und Granulozyten unterschieden werden können.

Eine immunologische Phänotypisierung der Zellen kann durch Markierung mit monoklonalen Antikörpern, die mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind,

erfolgen. Die Farbstoffe absorbieren dabei die Lichtenergie des Messlasers. Durch diese Energie werden Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben und emittieren beim Rücksprung auf das Ausgangsniveau ein Photon. Die Fluoreszenzenergie des Photons ist geringer als die Absorptionsenergie, das abgestrahlte Licht ist langwelliger als das anregende Licht.

Die Fluoreszenzintensität ist direkt proportional zur Anzahl der Bindungsstellen einer Zelle, die mit Farbstoff-gekoppelten Antikörpern besetzt sind. Da die meisten Zellen auch ohne Anfärbung eine gewisse Autofluoreszenz zeigen, muss immer eine Kontrolle der Zellen gemessen werden, um damit festzulegen, ab welcher Fluoreszenzintensität die Zellen als positiv gelten, d.h. die Fluoreszenz auf den gebundenen Antikörper und den entsprechenden Farbstoff zurückgeführt werden kann.

Bei der Verwendung von unterschiedlich markierten Antikörpern können mehrere Antigene auf einer Zelle gleichzeitig nachgewiesen werden. Dies setzt neben einer gemeinsamen Anregbarkeit der Farbstoffe bei einer bestimmten Wellenlänge voraus, dass die Gipfel der einzelnen Emissionsmaxima deutlich unterschiedlich sind und so mit verschiedenen Detektoren getrennt voneinander in bestimmten Kanälen gemessen werden können. Für diesen Zweck ausgerüstete FACS-Geräte besitzen mehrere Laser mit unterschiedlicher Wellenlänge, so dass sich das Spektrum der gleichzeitig einsetzbaren Farbstoffe deutlich erweitert.

Häufig verwendete Farbstoffe sind z.B. Fluoresceinisothiocyanat (FITC; Emissionsmaximum bei 520 nm), Phycoerythin (PE; Emissionsmaximum bei 680 nm), Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP, Emissionsmaximum bei 680 nm) oder Allophycocyanin (APC, Emissionsmaximum bei 660 nm).

3.7.2 Immunfluoreszenzfärbung

- 1) Die zu untersuchenden Zellen, z.B. isolierte mononukleäre Zellen oder leukämische Blasten, werden auf 1 Mio/ml eingestellt.
- 2) Jeweils 10 µl der fluoreszierenden monoklonalen Antikörper werden in den gewünschten Kombinationen in Röhrchen vorgelegt.
- 3) In jedes dieser Röhrchen werden 100 µl der Zellsuspension pipettiert.
- 4) Die Proben werden geschüttelt (Vortexer) und für 30 min im Kühlschrank unter Lichtabschluss inkubiert.
- 5) Die Röhrchen werden mit Stammlösung C aufgefüllt, abzentrifugiert (400g, 10 min, 10 °C) und dekantiert.
- 6) Die gefärbten Zellen werden resuspendiert und unter Lichtabschluss im Kühlschrank bis zur Messung, die spätestens einen Tag nach der Färbung erfolgen sollte, aufbewahrt.

3.7.3 Messung und Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung

Die Messung erfolgte mit dem Durchflusszytometer FACSCalibur, die Auswertung mit der zugehörigen Software CellQuest. Ausgehend von Routineeinstellungen werden die genauen Messeinstellungen anhand der Kontrollen durchgeführt:

- 1) Die Verstärkerspannungen für FSC und SSC werden so eingestellt, dass in der Darstellung SSC gegen FSC (SSC: y-Achse, FSC: x-Achse) die übliche Zellverteilung zustande kommt. Um die Zielpopulation, die Lymphozyten, kann in dieser Darstellung ein so genanntes Gate gesetzt werden; dies erlaubt die Darstellung nur dieser Zellen hinsichtlich ihrer Fluoreszenz in einem weiteren Diagramm.

- 2) Anhand der Kontrollfärbung werden nun die Verstärkerspannungen der verschiedenen Messkanäle so eingestellt, dass sich die Zellen im jeweiligen Kanal zwischen 10^0 und 10^1 der Fluoreszenzskala befinden.
- 3) Nach der Geräteeinstellung erfolgt die Messung der Proben. Zur Auswertung wird wieder ein Gate auf die Lymphozytenpopulation gesetzt; diese Zellen werden dann in einem weiteren Diagramm hinsichtlich ihrer Fluoreszenz dargestellt, wobei immer zwei Kanäle gegeneinander dargestellt werden, z.B. FITC gegen PE. Zur statistischen Auswertung wird in dieses Diagramm ein Quadrant gesetzt, der es erlaubt, Zellen als doppelt negativ, einfach positiv oder doppelt positiv zu definieren. Die absoluten und relativen Häufigkeiten dieser verschiedenen Zellen werden von der Software automatisch berechnet.

3.8 Zellkultur

3.8.1 Kultivierung der Zelllinien

Bei allen Arbeitsschritten muss unbedingt steril gearbeitet werden. Die Zelllinie K562 sowie die EBV-transformierten B-lymphoblastischen Zelllinien (LCL) wurden als Suspensionskulturen in Stammlösung A bei 37°C und 5%iger CO₂-Atmosphäre im Brutschrank geführt. Den Zustand der Zellkulturen hinsichtlich Proliferation und Vitalität beurteilt man durch Betrachtung der Zellen unter dem Lichtmikroskop. Erscheint die Morphologie der Zellen ungleichmäßig und ausgefranst, sind die Zellen stark granuliert, kommt es durch Veränderung des pH-Wertes zu einem rotvioletten oder gelblichen Farbumschlag oder ist die Zelldichte zu groß, so muss ein Teil des alten Mediums samt Zellen aus der Kulturflasche verworfen und durch frisches Medium ersetzt werden. Auf diese Weise werden toxische Stoffwechselprodukte entfernt, Nährstoffe zugeführt und wieder optimale Wachstumsbedingungen hergestellt. Die Versorgung der Zellkulturen ist i.d.R. alle 2-3 Tage notwendig, sowie einen Tag vor jedem Zytotoxizitätstest, um für den Test eine hohe Vitalität der Zellen und damit eine möglichst geringe Spontanlyse (siehe 3.6.4) zu erreichen.

3.8.2 Kryokonservierung von Zellen

Als Targetzellen wurden ebenfalls B-ALL Blasten von Patienten verwendet, die in laboreigenen Stickstofftanks kryokonserviert gelagert wurden. Für den Zytotoxizitätstest werden die Blasten am selben Tag dem Stickstofftank entnommen und aufgetaut. Nach dem Auftauen werden die Blasten zweimal mit Stammlösung A 7 min lang bei 300g gewaschen und können dann für den Zytotoxizitätstest verwendet werden.

Zur Versorgung der NK-Klon-Kulturen wurden auch Feeder-Zellen kryokonserviert gelagert und bei Bedarf aufgetaut und verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Klonierung und Expansion von NK-Zellen

Das Ziel der Generierung und Expansion von NK-Klonen war es, alloreaktives Verhalten von NK-Zellen auf klonaler Ebene zu untersuchen. Dazu wurde aus Vollblut freiwilliger, gesunder Spender, pädiatrischer Patienten nach allogener SZT, sowie aus Buffy Coats der Blutbank Tübingen über einen Ficoll-Gradienten PMNC isoliert. Anschließend wurden zwei unterschiedliche Verfahren angewandt, um ein Zellgemisch zu erhalten, aus dem sich effizient NK-Klone generieren lassen.

Bei der Zwei-Stufen-NK-Anreicherung wurden die PMNC mit dem MACS-System (Zell-Separation mittels Antikörper-konjugierter magnetischer Microbeads und hohen Feldgradienten) nach CD56⁺ Zellen angereichert. Als zweiter Schritt folgte eine T-Zell-Depletion mit Dynabeads, die gegen den Marker CD3 gerichtet sind. Mittels durchflusszytometrischer Untersuchung wurde der prozentuale Anteil der jeweiligen Zellen an der Gesamtzahl der Lymphozyten im Differentialblutbild ermittelt, um damit die Zahl der unterschiedlichen Zellen zu berechnen. Nach den einzelnen Anreicherungs- bzw. Depletionsschritten wurde dazu eine FACS-Analyse durchgeführt.

Zum anderen wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Velardi, Perugia (Italien), deren Protokoll etabliert. Hier werden mit dem MACS-System lediglich CD3 positive Zellen aus den PMNC depletiert. Zurück bleibt ein Zellgemisch, das hauptsächlich aus NK-Zellen, B-Zellen, Monozyten und Progenitorzellen besteht.

Im Folgenden sollen zunächst die Ergebnisse der Methoden zur Anreicherung von NK-Zellen bzw. Depletion von T-Zellen dargestellt werden. Anschließend folgt vergleichend die Effizienz bei der Generierung von NK-Klonen.

4.1.1 NK-Zell-Anreicherung mit dem MACS-System

Für die Anreicherung von NK-Zellen mit dem MACS-System dienten PMNC, die über eine Ficoll-Dichtezentrifugation aus Buffy Coats gewonnen wurden.

Der Anteil der NK-Zellen betrug bei drei Versuchen in der Ausgangszellzahl durchschnittlich $19,04 \pm 10,98\%$, der der T-Zellen $53,65 \pm 5,66\%$ (Tab. 4.1).

Tab. 4.1: Zusammensetzung der Lymphozyten vor MACS-Anreicherung

| Versuch | Zellzahl der Lymphozyten $\times 10^8$ | CD56 ⁺ , CD3 ⁻ | | CD3 ⁺ | |
|-------------------|--|--------------------------------------|--------------|------------------|--------------|
| | | in % | in Millionen | in % | in Millionen |
| 1 | 6,7 | 14,56 | 97,55 | 53,33 | 357,31 |
| 2 | 3 | 31,56 | 94,68 | 48,15 | 144,45 |
| 3 | 5,46 | 11,01 | 60,11 | 59,46 | 324,65 |
| Mittelwert | 5,05 | 19,04 | 84,11 | 53,65 | 275,5 |
| SD | 1,88 | 10,98 | 20,84 | 5,66 | 114,6 |

Tab. 4.2: Zusammensetzung der Lymphozyten nach MACS-Anreicherung

| Versuch | Zellzahl der Lymphozyten $\times 10^6$ | CD56 ⁺ , CD3 ⁻ | | CD3 ⁺ | |
|-------------------|--|--------------------------------------|--------------|------------------|--------------|
| | | in % | in Millionen | in % | in Millionen |
| 1 | 11,44 | 84,46 | 9,66 | 10,52 | 1,2 |
| 2 | 14,42 | 92,09 | 13,28 | 7,66 | 1,1 |
| 3 | 15,36 | 80,18 | 12,32 | 15,39 | 2,36 |
| Mittelwert | 13,74 | 85,58 | 11,75 | 11,19 | 1,55 |
| SD | 2,05 | 6,03 | 1,88 | 3,91 | 0,7 |

4.1.2 Depletion von T-Zellen mit Dynabeads

Zur Reduktion des Anteils an T-Zellen nach MACS-Anreicherung und Erhöhung der Reinheit der NK-Zellen, folgte im Anschluss eine Depletion CD3 positiver Zellen mit Dynabeads (Tab. 4.3).

Tab. 4.3: Zusammensetzung der Lymphozyten nach T-Zell-Depletion

| Versuch | Zellzahl der Lymphozyten x 10 ⁶ | CD56 ⁺ , CD3 ⁻ | | CD3 ⁺ | |
|-------------------|--|--------------------------------------|--------------|------------------|---------------|
| | | in % | in Millionen | in % | in Millionen |
| 1 | 8,16 | 89,5 | 7,3 | 0,1 | 0,008 |
| 2 | 7,6 | 99,53 | 7,56 | 0,03 | 0,005 |
| 3 | 8,96 | 94,88 | 8,5 | 0,05 | 0,004 |
| Mittelwert | 8,24 | 94,64 | 7,79 | 0,06 | 0,0056 |
| SD | 0,68 | 5,02 | 0,63 | 0,04 | 0,002 |

Insgesamt ergab sich bei der Zwei-Stufen-NK-Anreicherung eine Reinheit von durchschnittlich $94,64 \pm 5,02\%$, mit einer T-Zell-Kontamination von $0,06 \pm 0,04\%$. Während der Anteil der CD56⁺ Zellen im Vergleich zu den Ausgangszellen um den Faktor 4,97 erhöht werden konnte, gelang eine T-Zell-Depletion um den Faktor $1,12 \times 10^{-3}$.

4.1.3 Depletion von T-Zellen mit dem MACS-System

Bei dem zweiten Ansatz zur Generierung von NK-Klonen wurde Vollblut von gesunden Spendern sowie pädiatrischen Patienten nach SZT verwendet. Ziel dieses Verfahrens war hauptsächlich, den prozentualen Anteil von CD3⁺ Zellen <0,1% zu verringern. Zunächst wurden ebenfalls PMNC durch Ficoll-Dichtezentrifugation gewonnen und anschließend mit dem MACS-System durch gegen CD3 gerichtete Microbeads von T-Zellen depletiert. Nach der Ficoll-Dichtezentrifugation betrug die Zellzahl der PMNC durchschnittlich $25,63 \pm 11,37 \times 10^6$, nach der MACS CD3 Depletion $3,23 \pm 1,88 \times 10^6$. Durch die

einmalige Depletion von CD3⁺ Zellen mit dem MACS-System konnte der prozentuale Anteil von T-Zellen auf $0,05 \pm 0,04\%$ reduziert werden. Der Anteil von NK-Zellen betrug durchschnittlich $37,83 \pm 22,65\%$.

Tab. 4.4: Zusammensetzung der Lymphozyten nach T-Zell-Depletion mit MACS-Microbeads

| Versuch | Zellzahl der Lymphozyten x 10 ⁶ | CD56 ⁺ , CD3 ⁻ | | CD3 ⁺ | |
|-------------------|--|--------------------------------------|-------------|------------------|-------------|
| | | in % | in Tausend | in % | in Tausend |
| 1 | 5,5 | 9,22 | 510 | 0,05 | 2,8 |
| 2 | 1,9 | 7,08 | 134,52 | 0,07 | 1,33 |
| 3 | 1,5 | 79,01 | 1185,15 | 0,15 | 2,25 |
| 4 | 2 | 10,27 | 205,4 | 0,02 | 0,3 |
| 5 | 1 | 73,64 | 736,4 | 0,05 | 0,5 |
| 6 | 2,45 | 37,33 | 914,6 | 0,09 | 2,21 |
| 7 | 6,57 | 48,16 | 3164,11 | 0,07 | 4,6 |
| 8 | 1,31 | 42,48 | 556,49 | 0,04 | 0,52 |
| 9 | 0,87 | 17,75 | 154,43 | 0,01 | 0,09 |
| 10 | 3,11 | 33,96 | 123,16 | 0,06 | 1,87 |
| 11 | 3,97 | 56,39 | 2238,68 | 0,02 | 0,79 |
| 12 | 3,42 | 50,27 | 1719,23 | 0,01 | 0,34 |
| 13 | 6,08 | 46,07 | 2801,06 | 0,01 | 0,61 |
| 14 | 4,03 | 41,44 | 1670,03 | 0,08 | 3,22 |
| 15 | 4,8 | 14,31 | 686,88 | 0,02 | 0,96 |
| Minimum | 0,87 | 7,08 | 123,2 | 0,01 | 0,09 |
| Median | 3,11 | 41,44 | 736,4 | 0,05 | 0,96 |
| Maximum | 6,57 | 79,01 | 3164 | 0,15 | 4,6 |
| Mittelwert | 3,23 | 37,83 | 1120 | 0,05 | 1,49 |
| SD | 1,88 | 22,65 | 990 | 0,039 | 1,3 |

4.1.4 Klonierungseffizienz

Im Anschluss an die Zwei-Stufen-NK-Anreicherung bzw. Depletion von T-Zellen wurden die Zellen wie im Methodenteil beschrieben in komplettes Medium aufgenommen und in unterschiedlichen Konzentrationen in 96-Loch Mikrotiterplatten ausplattiert, mit Phytohämagglutinin (PHA) stimuliert und mit Feederzellen, IL-2 und später auch IL-15 kultiviert. Bei den Feederzellen handelte es sich um bestrahlte PMNC, welche aus Buffy Coats über die Ficoll-Dichtezentrifugation gewonnen wurden.

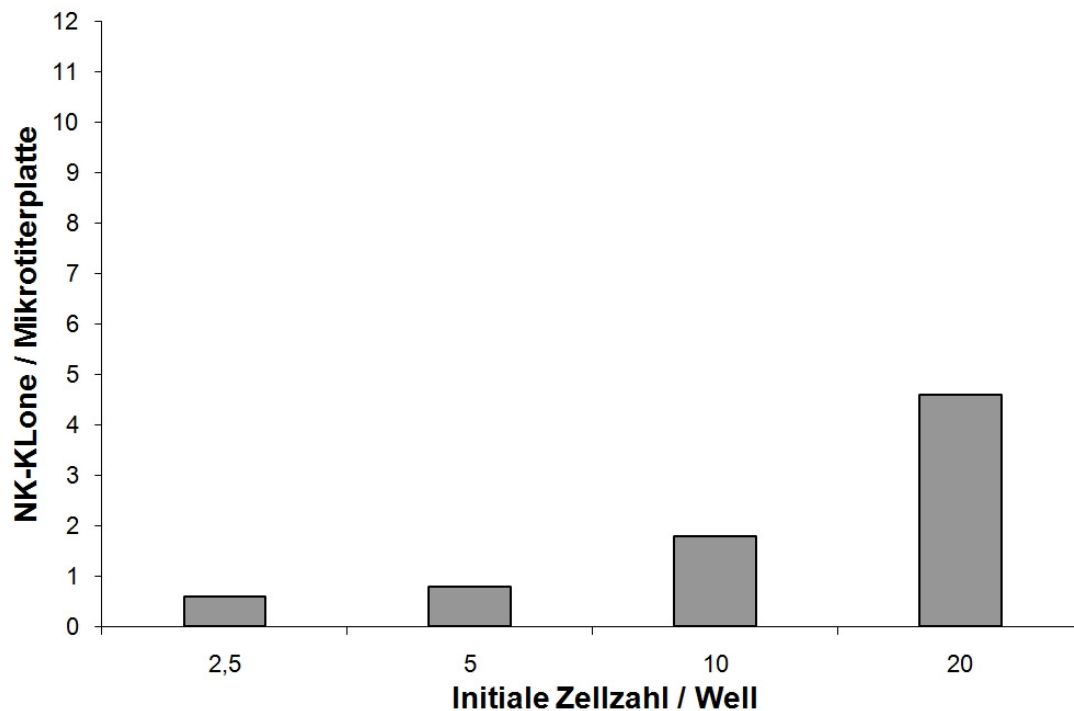
Um möglichst klonales Wachstum von NK-Zellen zu erreichen, wurden bei gesunden Spendern initial Zellkonzentrationen bis zu 0,75 Zellen pro Well verwendet.

Bei der Generierung von Klonen nach der Zwei-Stufen-NK-Anreicherung wurden in drei Versuchen initiale Zellkonzentrationen von 2,5, 5, 10 und 20 pro Kavität (Well) verwendet. Für jede Titrationsstufe wurden jeweils 6 Rundbodenplatten (96 Loch) angesetzt. Die Ergebnisse sind als Klonausbeute pro Mikrotiterplatte bis 23 Tage nach Zellkulturansatz dargestellt (Abb.4.1, Tab. 4.5).

Tab. 4.5: Anzahl NK-Klone/96-Loch Mikrotiterplatte bis Tag 23 nach Zellkulturansatz bei Zwei-Stufen-NK-Anreicherung

| Initiale Zellzahl/ well | 2,5 | 5 | 10 | 20 |
|--------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Versuche [n] | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Minimum | 0,33 | 0,33 | 1,5 | 3,5 |
| Median | 0,67 | 1 | 1,67 | 4,33 |
| Maximum | 0,83 | 1,17 | 2,12 | 5,83 |
| Mittelwert | 0,61 | 0,83 | 1,76 | 4,55 |
| SD | 0,26 | 0,44 | 0,32 | 1,18 |

Abb. 4.1: Klonierungseffizienz bis 23 Tage nach Zellkulturansatz bei Zwei-Stufen-NK-Anreicherung



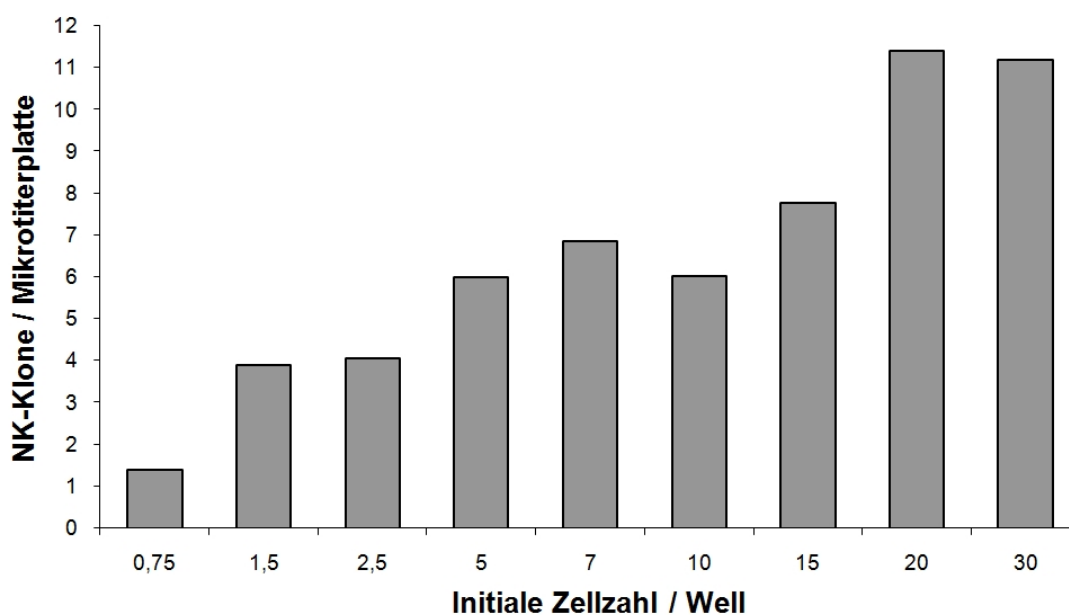
Im Vergleich dazu konnte die Klonausbeute beim Verfahren der CD3-Depletion deutlich gesteigert werden (Abb.4.2, Tab. 4.6):

Bei Klonierungsansätzen mit

- 2,5 Zellen / Well um das 7,6-fache
- 5 Zellen / Well um das 7,2-fache
- 10 Zellen / Well um das 3,4-fache
- 20 Zellen / Well um das 2,5-fache.

Selbst Versuche mit 0,75 und 1,5 Zellen pro Well ergaben eine gute NK-Klon-Ausbeute. Für die einzelnen Titrationsstufen wurden wiederum zwischen 5 und 10, teilweise auch 20 Mikrotiterplatten angesetzt.

Abb. 4.2: Klonierungseffizienz bis 23 Tage nach Zellkulturansatz bei MACS CD3-Depletion

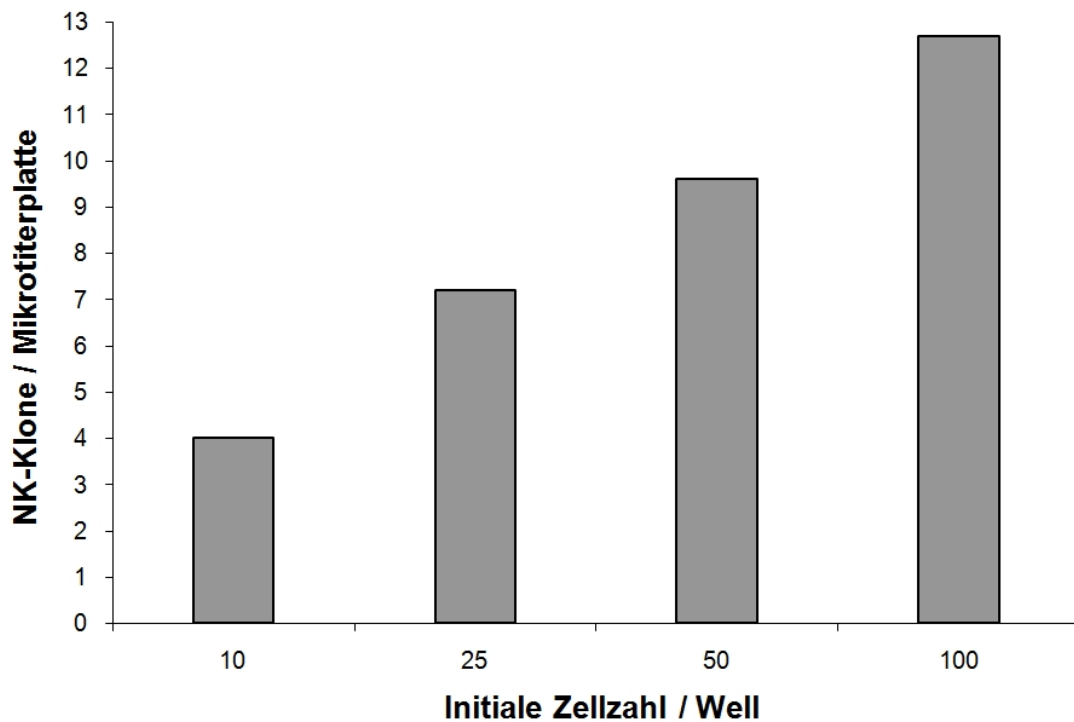


| Initiale Zellzahl/ well | 0,75 | 1,5 | 2,5 | 5 | 7 | 10 | 15 | 20 | 30 |
|--------------------------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|
| Versuche [n] | 1 | 1 | 8 | 8 | 2 | 5 | 2 | 3 | 2 |
| Minimum | | | 1,43 | 3 | 6,3 | 5 | 7,65 | 8,14 | 10,4 |
| Median | | | 4 | 5,22 | 6,85 | 5,86 | 7,78 | 10,14 | 11,2 |
| Maximum | | | 7,9 | 11,8 | 7,4 | 7,25 | 7,9 | 16 | 12 |
| Mittelwert | 1,4 | 3,9 | 4,01 | 6,01 | 6,85 | 6,04 | 7,78 | 11,43 | 11,2 |
| SD | | | 2,28 | 3,11 | 0,78 | 0,96 | 0,18 | 4,09 | 1,13 |

Tab. 4.6: Anzahl NK-Klone/96-Loch Mikrotiterplatte bis Tag 23 nach Zellkulturansatz bei MACS CD3-Depletion

Weiterhin wurde auch mit Blut von pädiatrischen Patienten mit Prä-B-ALL nach allogener Transplantation Klonierungsansätze durchgeführt. Dabei wurden Titrationsstufen von 10, 25, 50 und 100 Zellen pro well verwendet (Abb. 4.3, Tab. 4.7).

Abb. 4.3: Klonierungseffizienz bis 21 Tage nach Zellkulturansatz bei pädiatrischen Patienten mit Prä-B-ALL nach SZT



| INITIALE ZELLZAHL/ WELL | 10 | 25 | 50 | 100 |
|-------------------------|----|-----|-------|-------|
| VERSUCHE [N] | 2 | 1 | 3 | 2 |
| MITTELWERT | 4 | 7,2 | > 9,6 | >12,7 |

Tab. 4.7: Anzahl NK-Klone/96-well Mikrotiterplatte bis Tag 21 nach Zellkulturansatz bei pädiatrischen Patienten mit Prä-B-ALL nach SZT

4.1.5 Expansion der NK-Klone

Ziel der Expansion der NK-Klone war es, genügend Zellen zur Verfügung zu stellen, um zum einen durchflusszytometrisch Oberflächenmerkmale der NK-Zellen zu analysieren und zum anderen Zytotoxizitätstests gegen Laborzelllinien sowie kryokonservierte kindliche Prä-B-ALL Blasten durchzuführen, um damit eine Aussage über die zytotoxische Potenz dieser Zellpopulationen treffen zu können.

Außerdem sollte der Frage nachgegangen werden, ob identifizierte alloreaktive NK-Klone in größerem Maßstab nutzbar gemacht werden können, indem von Spendern solche NK-Klone angereichert und expandiert werden, die eine besonders hohe Aktivität gegenüber leukämischen Blasten zeigen.

Unabhängig von der Methode zur Anreicherung von NK-Zellen bzw. Depletion von T-Zellen konnte durch die Zellkultivierung mit IL-2, IL-15 und bestrahlten Feederzellen eine Expansion bis über 4×10^6 Zellen erreicht werden.

Der Einsatz von bestrahlten RPMI 8866 als Feederzellen brachte im Vergleich zu allogenen PMNC aus Buffy Coats keine Steigerung der Expansion und war zudem mit einer kürzeren Überlebenszeit der Zellkultur assoziiert. Durchschnittlich betrug der Zeitraum einer expandierenden Zellkultur 30 Tage.

4.2 Expression inhibitorischer Rezeptoren auf NK-Klonen

4.2.1 Ermittlung des KIR-Phänotyps

Durch Zellkultivierung expandierte NK-Klone wurden auf relevante Faktoren analysiert, welche die zytotoxische Aktivität gegenüber Prä-B-ALL Blasten beeinflussen könnten. Eine wesentliche Rolle spielen dabei die inhibitorischen NK-Rezeptoren (KIR), unter denen im Rahmen des von Velardi et al aufgestellten Konzepts der KIR-Ligand-Inkompatibilität CD158a, CD158b und CD158e die größte Bedeutung beigemessen wird.

NK-Klone von drei Buffy Coats und fünf gesunden Spendern wurden mit 4-Farben-FACS-Analyse auf deren Expression von CD158a, CD158b, CD158e, sowie CD56 und CD3 (zum Ausschluss von T-Zell bzw. NK-T-Zell-Populationen) untersucht.

In Abb. 4.4 wird beispielhaft in jeder Spalte der Dot Plots ein NK-Klon dargestellt. NK-Zellen ohne Expression eines der drei KIRs wurden als „KIR negativ“ (KIR^- bzw. $CD158a^-/b^-/e^-$, Spalte 1) deklariert. NK-Klone mit Expression nur eines KIR wurden als „KIR einfach positiv“ (entsprechend $CD158a^+$, $CD158b^+$ oder $CD158e^+$, Spalte 2 und 3) und Klone mit Expression von zwei oder allen drei KIRs als „KIR mehrfach positiv“ bzw. „>1 KIR“ bezeichnet.

Bei dieser Definition werden andere inhibitorische Rezeptoren auf den NK-Zellen nicht berücksichtigt.

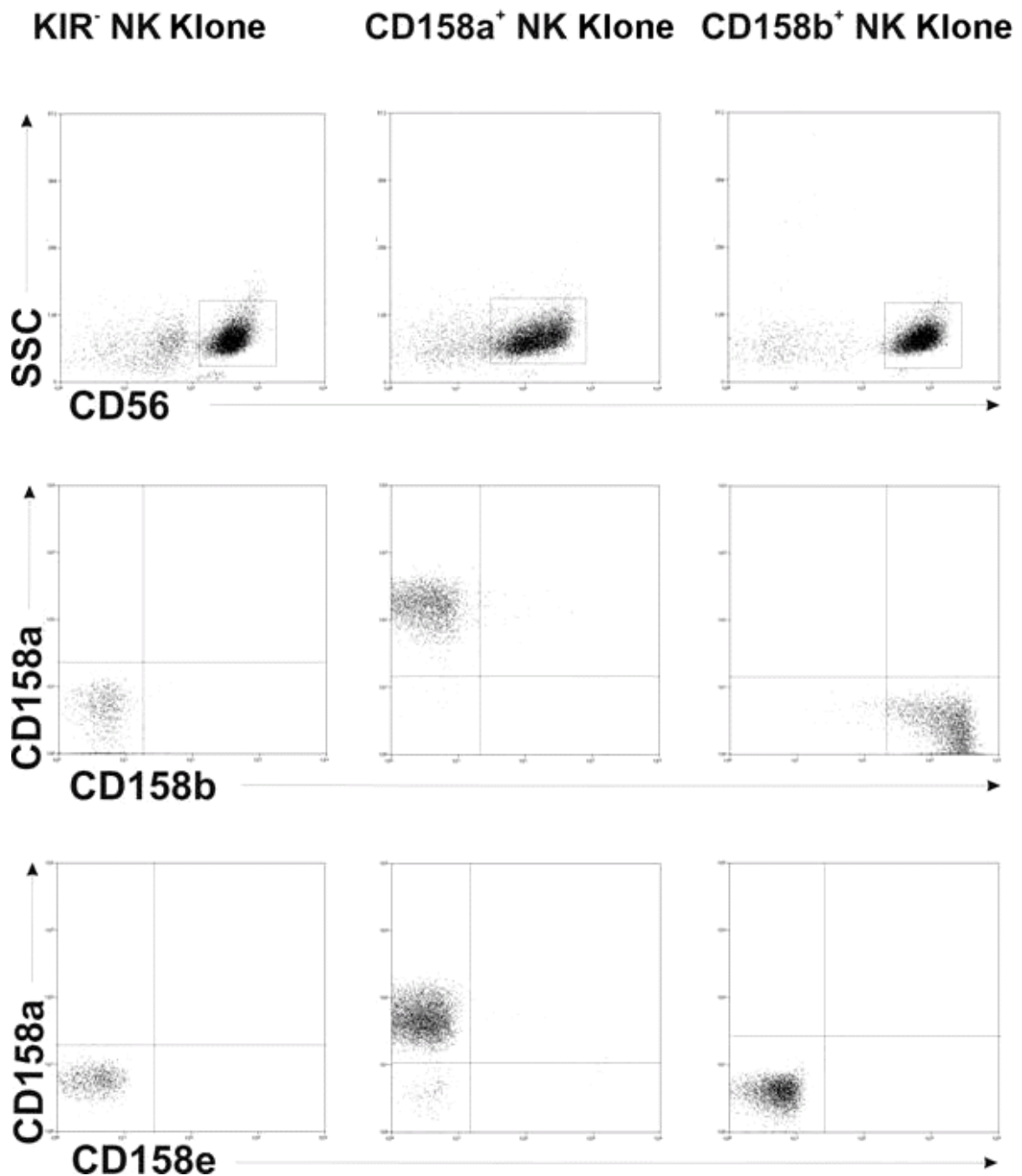


Abb. 4.4: Ermittlung der unterschiedlichen KIR-Expression auf NK-Klonen. Jede Spalte der Dot Plots entspricht einem NK-Klon. Als KIR⁻ wurden diejenigen NK-Klone bezeichnet, die keinen der drei für das KIR-Ligand-Mismatch Konzept relevanten Rezeptoren exprimierten. Andere inhibitorische Rezeptoren auf den NK-Zellen wurden dabei nicht berücksichtigt.

4.2.2 KIR-Expression in Abhängigkeit vom Spender-HLA-Typ

Alle gesunden Spender, aus deren Blut NK-Klone generiert wurden, gehörten ausschließlich entweder der HLA-Cw3 (n=5) oder der HLA-Cw4 (n=3) Gruppe an. Außerdem exprimierten alle Spender Allele der HLA-Bw4 Gruppe.

Mit der 4-Farben-Durchflusszytometrie ließ sich wie beschrieben die unterschiedliche Expression der Immunglobulin-ähnlichen Rezeptoren CD158a, CD158b und CD158e für jede einzelne Zelle bzw. jeden NK-Klon analysieren (siehe Abb. 4.4).

In Tab. 4.8 werden die unterschiedlichen Verteilungsmuster (KIR-Phänotypen) der NK-Klone aller Spender sowie in Abhängigkeit der HLA-Cw Gruppe der Spender dargestellt. Die statistische Auswertung mittels Chi Square Test bezieht sich für jede Zeile auf die Häufigkeit des jeweiligen Phänotyps in der HLA-Cw3 bzw. Cw4 Gruppe.

| | Spender gesamt [n=379] NK-Klone | HLA-Cw3 ⁺ Spender [n=214] NK-Klone | HLA-Cw4 ⁺ Spender [n=165] NK-Klone | Statistische Aussagekraft ^A |
|---|--|--|--|---|
| CD158a⁻ /b⁻ /e⁻ | 123 (33%) | 100 (47%) | 26 (16%) | p = <0.001 |
| CD158a⁺ | 41 (11%) | 11 (5%) | 30 (18%) | p = <0.001 |
| CD158b⁺ | 70 (18%) | 59 (28%) | 11 (7%) | p = <0.001 |
| CD158e⁺ | 27 (7%) | 2 (1%) | 25 (15%) | p = <0.001 |
| CD158a⁺ /b⁺ | 40 (11%) | 20 (9%) | 20 (12%) | p = 0.383 |
| CD158a⁺ /e⁺ | 34 (9%) | 4 (2%) | 30 (18%) | p = <0.001 |
| CD158b⁺ /e⁺ | 23 (6%) | 13 (6%) | 10 (6%) | p = 0.995 |
| CD158a⁺ /b⁺ /e⁺ | 18 (5%) | 5 (2%) | 13 (8%) | p = 0.12 |

^A Chi Square Test

Tab. 4.8: KIR-Verteilungsmuster der NK-Klone und statistische Signifikanz durch Chi SquareTest

Ein Drittel der gesamten NK-Klone exprimierten keinen der drei KIRs und wurde somit als KIR⁻ bzw. CD158a⁻ /b⁻ /e⁻ deklariert. Ein weiteres Drittel der Klone war einfach positiv für einen der drei KIRs und das verbleibende Drittel verteilte sich auf NK-Klone, die zwei oder alle drei KIRs exprimierten (siehe Tab. 4.8 und Abb. 4.5).

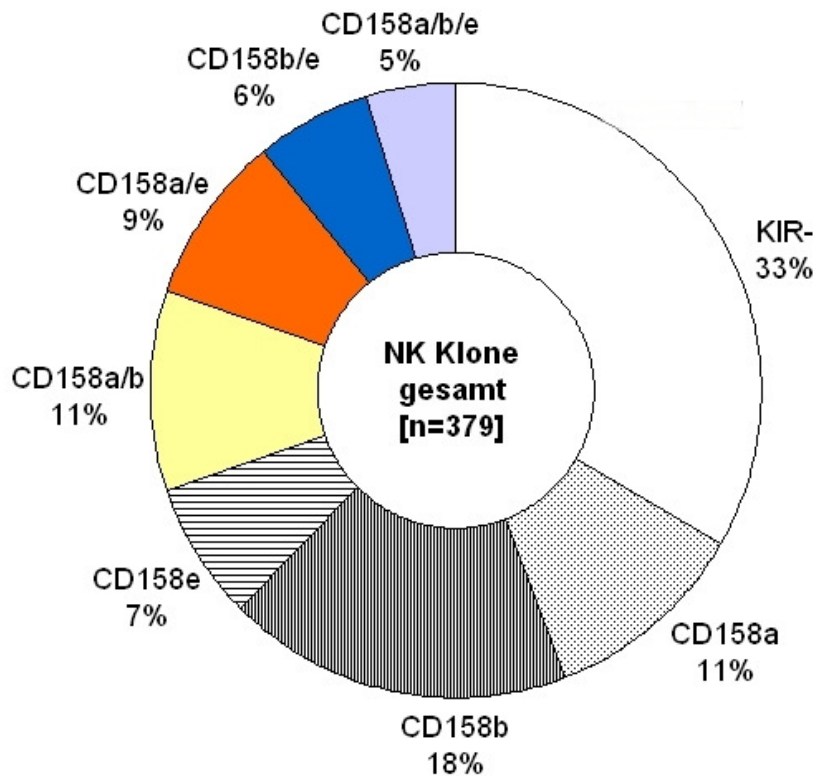


Abb. 4.5: KIR-Verteilungsmuster der NK-Klone aller gesunder Spender [n=379] mit Angabe der Häufigkeit in Prozent

Die Häufigkeit der KIR⁻ NK-Klone war bei den Spendern der HLA-Cw3 Gruppe signifikant höher.

Das Auftreten von CD158a oder CD158b einfach positiven NK-Klonen korrelierte mit dem Spender-HLA-Typ: HLA-Cw3⁺ Spender hatten eine signifikant höhere Anzahl an NK-Klonen mit Expression des für die eigene HLA-Gruppe spezifischen Rezeptors CD158b (59 CD158b⁺ NK-Klone von insgesamt 214) als NK-Klone mit CD158a (11 CD158a⁺ NK-Klone von insgesamt 214;

$p = <0.001$), welche durch die eigene HLA-Cw Gruppe nicht inhibiert werden (siehe Abb. 4.6).

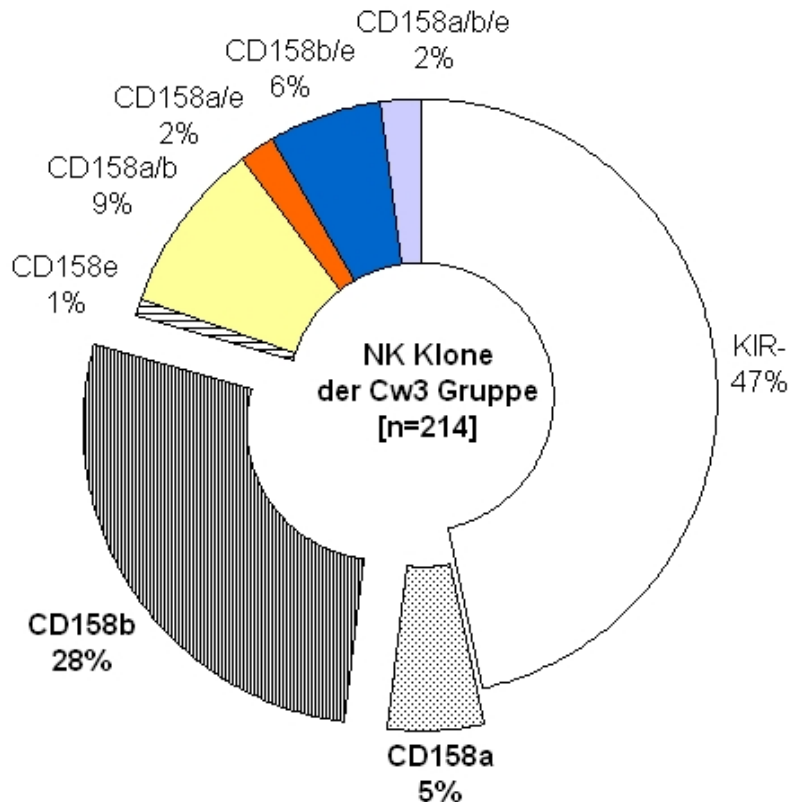


Abb. 4.6: KIR-Verteilungsmuster der NK-Klone von Spendern der HLA-Cw3 Gruppe [n=214] mit Angabe der Häufigkeit in Prozent

Umgekehrt verhielt es sich bei den NK-Klonen der HLA-Cw4⁺ Spender: Hier ließen sich signifikant mehr NK-Klone mit einfacher KIR-Expression von CD158a generieren (30 CD158a⁺ NK-Klone von insgesamt 165) als Klone mit dem Rezeptor CD158b (11 CD158b⁺ NK-Klone von insgesamt 165; $p = <0.001$), der die eigene HLA-Gruppe nicht binden und somit kein inhibitorisches Signal auslösen kann (siehe Abb. 4.7).

Obwohl alle Spender der HLA-Bw4 Gruppe angehörten, zeigte sich zwischen den NK-Klonen der HLA-Cw3⁺ und HLA-Cw4⁺ Spendern auch hier ein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit der für CD158e einfach positiven NK-Klone. HLA-Cw4⁺ Spender generierten eine größere Anzahl CD158e⁺

NK-Klone (25 CD158e⁺ NK-Klone von insgesamt 165) als HLA-Cw3⁺ Spender (2 CD158e⁺ NK-Klone von insgesamt 214; $p = <0.001$).

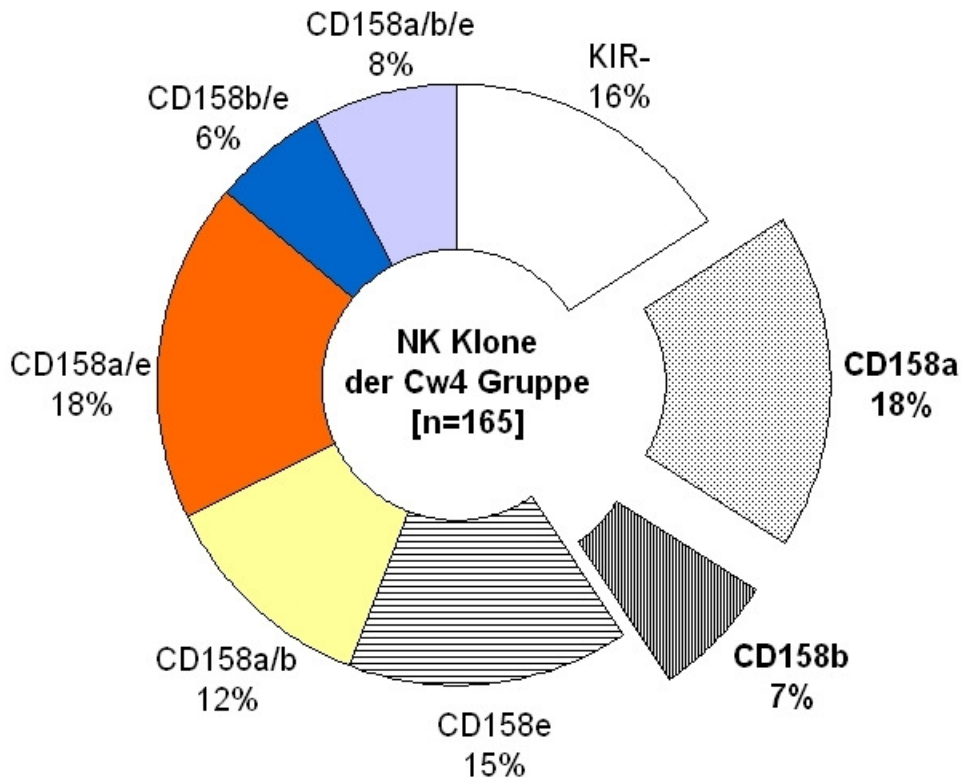


Abb. 4.7: KIR-Verteilungsmuster der NK-Klone von Spendern der HLA-Cw4 Gruppe [n=165] mit Angabe der Häufigkeit in Prozent

Weiterhin wird in Tab. 4.9 und in den Abb. 4.8-4.10 die Häufigkeit der jeweiligen KIRs auf NK-Klonen dargestellt. NK-Klone mit Expression von beispielsweise CD158a und CD158b (CD158a⁺ /b⁺ NK-Klone) wurden also jeweils der Gruppe CD158a⁺ sowie CD158b⁺ zugeordnet.

Für die KIR⁻ NK-Klone (CD158a⁻ /b⁻ /e⁻) ergeben sich folglich dieselben Ergebnisse wie bei der Auswertung nach den verschiedenen KIR-Phänotypen. Bezüglich der drei untersuchten KIRs zeigten sich bei Analyse aller NK-Klone zusammen keine signifikanten Unterschiede in der Häufigkeit der Expression (Abb. 4.8). Bei den NK-Klonen der HLA-Cw3⁺ Spendern ließ sich allerdings wieder eine wesentlich häufigere Expression von CD158b (97 von 214 NK-Klonen) als von CD158a (40 von 214 NK-Klonen) nachweisen (Abb. 4.9).

Umgekehrt verhielt es sich bei NK-Klonen der HLA-Cw4⁺ Spender, bei denen der KIR CD158a (93 von 165 NK-Klonen) signifikant häufiger als CD158b (54 von 165 NK-Klonen) exprimiert wurde (Abb. 4.10). Auch NK-Klone mit CD158e waren wiederum häufiger in der HLA-Cw4⁺ Spendergruppe vertreten (78 von 165 NK-Klonen) als bei den HLA-Cw3⁺ Spendern (24 von 214 NK-Klonen).

| | Spender gesamt [n=379] NK-Klone | HLA-Cw3 ⁺ Spender [n=214] NK-Klone | HLA-Cw4 ⁺ Spender [n=165] NK-Klone |
|---|--|--|--|
| CD158a ⁻ /b ⁻ /e ⁻ | 126 | 100 | 26 |
| CD158a ⁺ | 133 | 40 | 93 |
| CD158b ⁺ | 151 | 97 | 54 |
| CD158e ⁺ | 102 | 24 | 78 |

Tab. 4.9: Häufigkeit der Expression inhibitorischer Rezeptoren in Abhängigkeit vom Spender-HLA-Typ

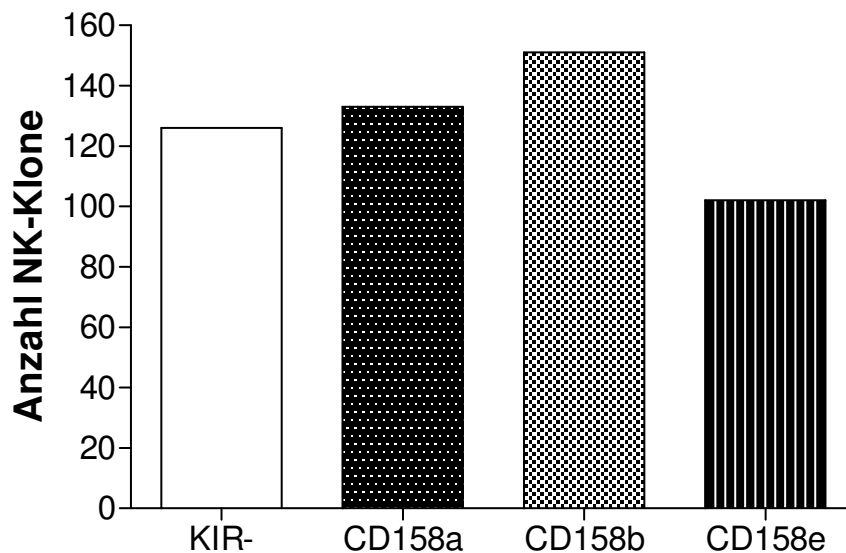


Abb. 4.8 Häufigkeit der Expression inhibitorischer Rezeptoren auf NK-Klonen aller gesunder Spender [n=379]

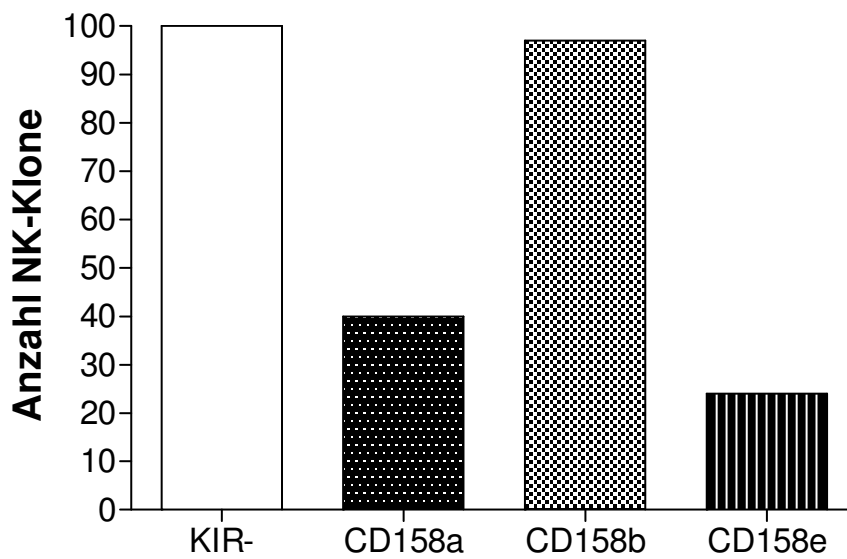


Abb. 4.9: Häufigkeit der Expression inhibitorischer Rezeptoren auf NK-Klonen von Spendern der HLA-Cw3 Gruppe [n=214]

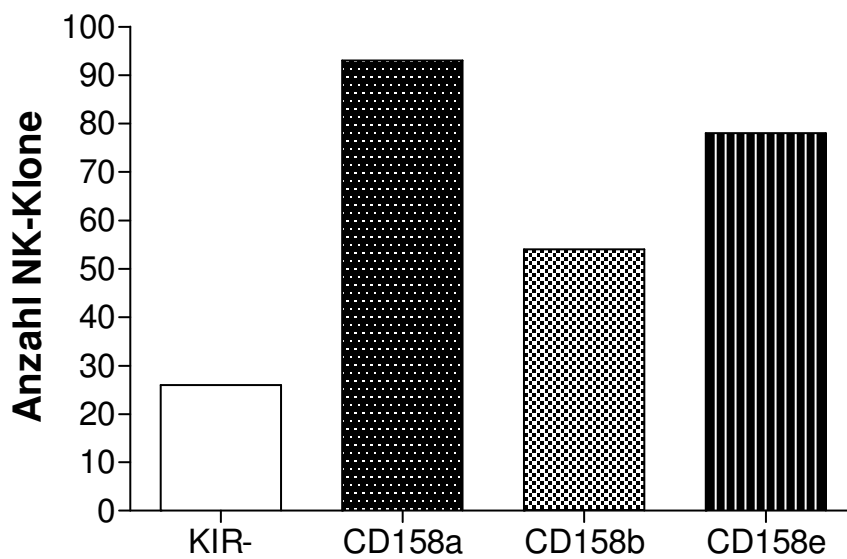


Abb. 4.10: Häufigkeit der Expression inhibitorischer Rezeptoren auf NK-Klonen von Spendern der HLA-Cw4 Gruppe [n=165]

Insgesamt ließ sich also feststellen, dass bei allen Spendern ganz überwiegend derjenige KIR exprimiert wurde, der jeweils den eigenen HLA-Typ erkannte und davon gehemmt wurde.

4.3 Zytotoxische Aktivität von NK-Klonen gegenüber HLA-Cw transfizierten B-LCL 721.221

Nach der Generierung und Expansion von NK-Klonen stand zunächst im Vordergrund, Alloreaktivität von NK-Zellen gegenüber spezifischen Laborzelllinien auf der Grundlage des KIR-Ligand-Mismatch Konzepts von Velardi et al nachzuweisen. NK-Klone wurden aus drei Buffy Coats der Blutbank Tübingen generiert, von denen zwei der HLA-Cw3 Gruppe und einer der HLA-Cw4 Gruppe angehörten. Die Zytotoxizitätstests wurden in einem Effektor/Target-Verhältnis von 5:1 gegen folgende Targetzelllinien durchgeführt:

- LCL 721.221, eine Epstein-Bar Virus transformierte Zelllinie, die keine HLA-Klasse I-Moleküle exprimiert
- Cw3 Transfektanten (LCL-Cw3), entsprechen den mit dem HLA-Cw3 Allel transfizierten LCL 721.221
- Cw4 Transfektanten (LCL-Cw4), entsprechen den mit dem HLA-Cw4 Allel transfizierten LCL 721.221
- K562, eine erythroleukämische Zelllinie, die als gut lysierbares Target für NK-Zellen gilt und somit als Positivkontrolle für die Aktivität der NK-Klone verwendet wurde.

Zunächst wurde die zytotoxische Aktivität der NK-Klone gegenüber den Zelllinien im Hinblick auf die HLA-Cw Konstellation von Effektor- und Targetzellen analysiert. Alle NK-Klone, gleich welcher HLA-Cw Gruppe, zeigten gegenüber der erythroleukämischen Zelllinie K562, die als Positivkontrolle diente, eine gute funktionelle Aktivität. Die nicht transfizierte Zelllinie LCL 721.221 wurde dagegen von einem Großteil der Klone schlecht lysiert.

NK-Klone von HLA-Cw3⁺ Spendern [n=30] zeigten mit einer mittleren spezifischen Lyse von 58,5% ± 22,6 gegenüber den mit Cw4 transfizierten LCL

eine höhere Aktivität als gegenüber den mit Cw3 transfizierten LCL, bei denen die mittlere Lyse $36,8\% \pm 20,2$ betrug (s. Tab. 4.11 und Abb. 4.10). Somit konnte bei den NK-Klonen von HLA-Cw3⁺ Spendern ein HLA-spezifisches Killing nachgewiesen werden (gepaarter T-Test: $p < 0.0001$).

Zytotoxizität von HLA-Cw3 NK-Klonen

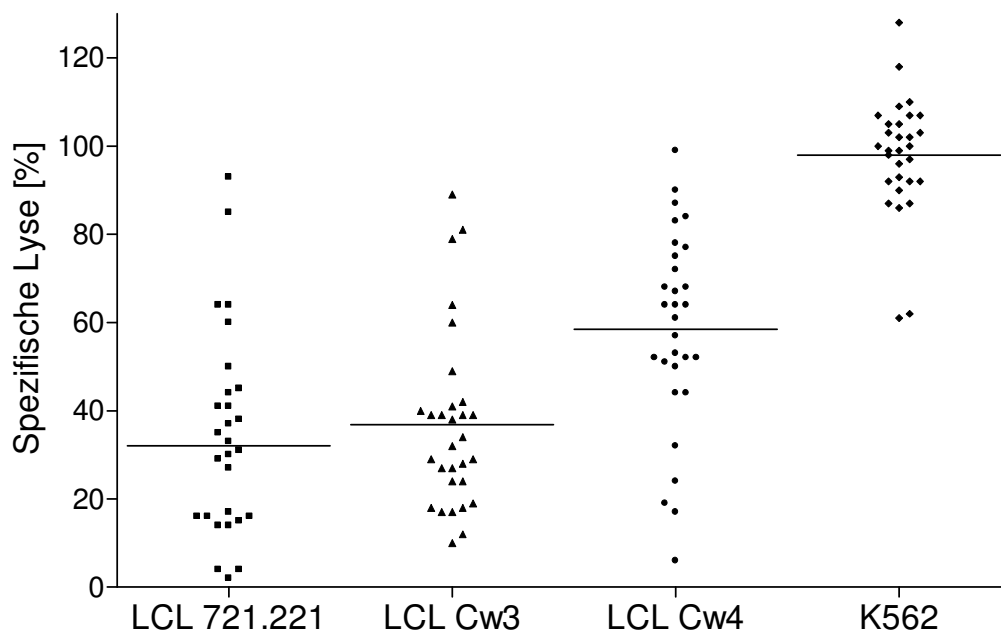


Abb. 4.11: NK-Klone von HLA-Cw3⁺ Spendern [n=30] vs. LCL-Zelllinien und K562

| Targetzellen | LCL 721.221 | LCL Cw3 | LCL Cw4 | K562 |
|-------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Minimum | -2 | 10 | 6 | 61 |
| Median | 30,5 | 33 | 62,5 | 99,5 |
| Maximum | 93 | 89 | 99 | 128 |
| Mittelwert | 32,1 | 36,8 | 58,5 | 97,9 |
| SD | 24,2 | 20,2 | 22,6 | 13,5 |

Tab. 4.10: Spezifische Lyse [%] der NK-Klone von HLA-Cw3⁺ Spendern [n=30]

Bei den NK-Klonen der HLA-Cw4 Gruppe [n=47] zeigte sich dagegen kein HLA-spezifisches Killing. Wiederum wurden die mit Cw4 transfizierten LCL besser lysiert (mittlere spezifische Lyse 70,4% ± 26,4), obwohl diese der gleichen HLA-Cw Gruppe wie die NK-Klone angehörten und somit eine Inhibition zu erwarten gewesen wäre. Die zytotoxische Aktivität gegenüber den LCL-Cw3 war signifikant geringer (gepaarter T-Test: 0,0012) (s. Tab. 4.12 und Abb. 4.11).

Zytotoxizität von HLA-Cw4 NK-Klonen

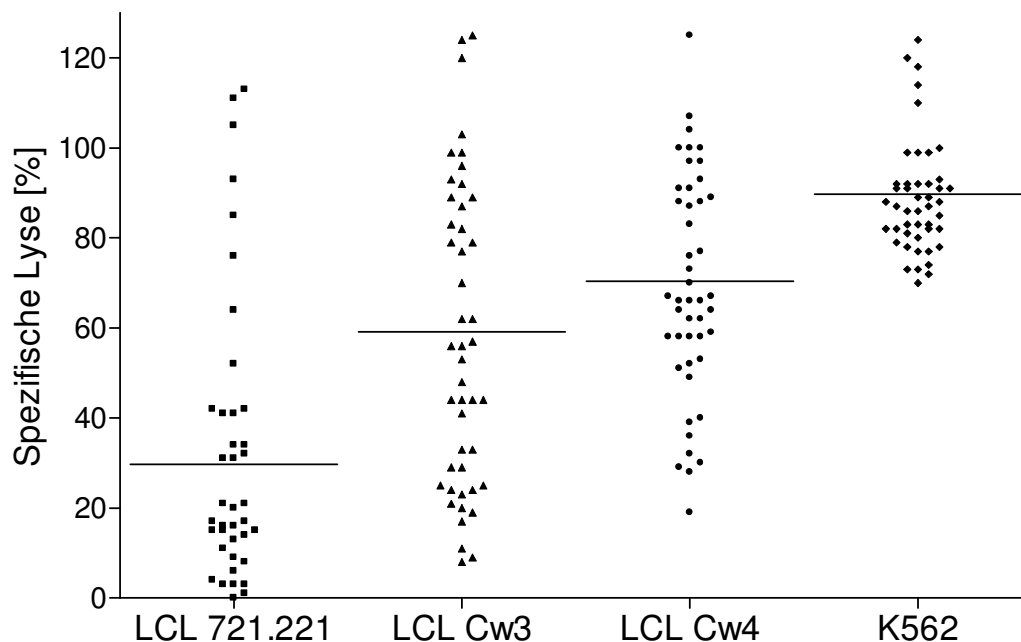


Abb. 4.12: NK-Klone von HLA-Cw4⁺ Spendern [n=47] versus LCL-Zelllinien und K562

| Targetzellen | LCL 721.221 | LCL Cw3 | LCL Cw4 | K562 |
|-------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Minimum | -6 | 8 | 19 | 70 |
| Median | 16 | 56 | 66 | 87 |
| Maximum | 144 | 134 | 140 | 135 |
| Mittelwert | 29,7 | 59,2 | 70,4 | 89,7 |
| SD | 36,1 | 34,9 | 26,4 | 14,1 |

Tab. 4.11: Spezifische Lyse [%] der NK-Klone von HLA-Cw4⁺ Spendern [n=47]

Weiterhin wurde bei allen NK-Klonen mittels 4-Farben FACS-Analyse der KIR-Phänotyp hinsichtlich der nach dem Mismatch-Konzept relevanten KIRs CD158a, CD158b und CD158e ermittelt.

In Abb. 4.13 und Tab. 4.12 wird die Auswertung der zytotoxischen Aktivität aller Klone der drei Buffy Coats [n=77] entsprechend ihrer KIR-Expression gegenüber den vier Targetzelllinien dargestellt.

NK-Klone, die ausschließlich den KIR CD158a exprimierten [n=9], welcher Liganden der HLA-Cw4 Gruppe bindet, zeigten im Mittel eine hohe zytotoxische Aktivität sowohl gegenüber LCL-Cw3 (mittlere Lyse $78,2\% \pm 43,7$) als auch gegenüber LCL-Cw4 (mittlere Lyse $71,9\% \pm 27,6$). Der Unterschied im Killing von LCL-Cw3 und LCL-Cw4 entspricht der Prädiktion des KIR-Ligand-Mismatch Konzepts, ist allerdings statistisch nicht signifikant (gepaarter T-Test: $p = 0.4289$).

Bei ausschließlicher Expression von CD158b [n=17], welcher Liganden der HLA-Cw3 Gruppe bindet, war ein signifikantes KIR-spezifisches Killing (gepaarter T-Test: $p = 0.0002$) festzustellen, d.h. die zytotoxische Aktivität gegenüber LCL-Cw4 war höher (mittlere Lyse $50,8\% \pm 26,1$) als die gegenüber LCL-Cw3 (mittlere Lyse $29,4\% \pm 12,4$).

KIR negative (entsprechend CD158a⁻/b⁻/e⁻) [n=17] und CD158e einfach positive [n=5] NK-Klone, welche keine entsprechenden HLA-Liganden auf den Targets binden konnten, zeigten im Mittel hohe Lysewerte gegenüber beiden transfizierten Zelllinien. Im Vergleich dazu war die zytotoxische Aktivität bei NK-Klonen mit Expression von mehr als einem KIR [n=30] geringer.

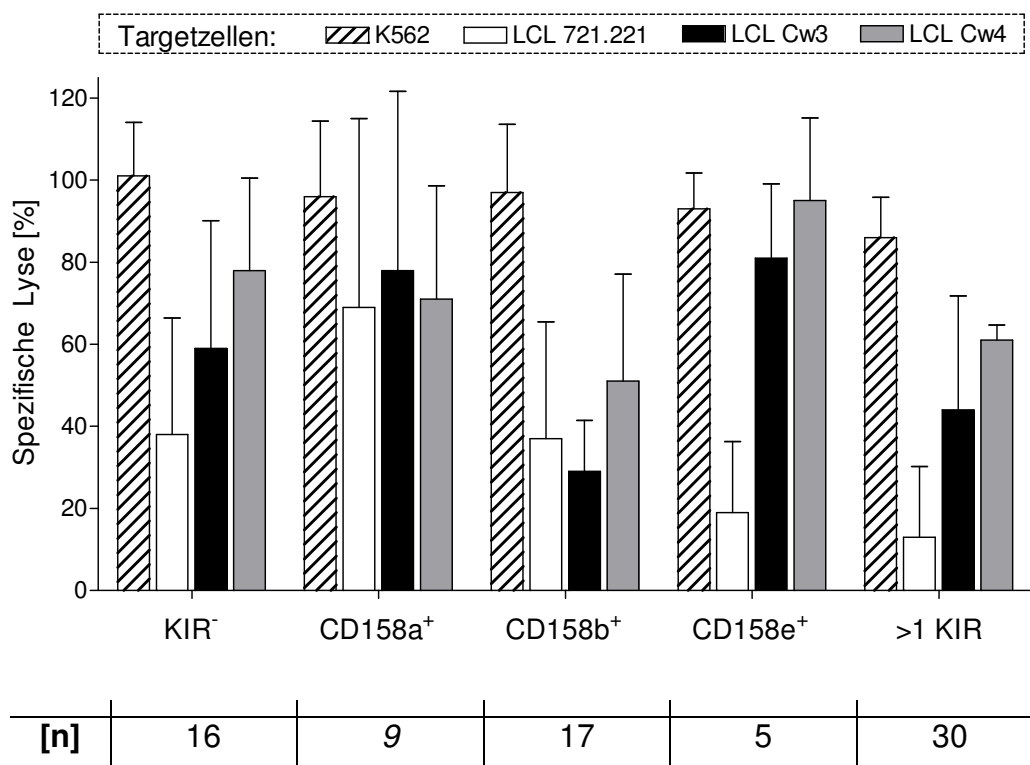


Abb. 4.13: Zytotoxische Aktivität entsprechend dem KIR-Phänotyp der NK-Klone [$n_{\text{gesamt}}=77$]

| | KIR ⁻ | CD158a ⁺ | CD158b ⁺ | CD158e ⁺ | >1 KIR |
|--------------------|------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-------------|
| K562 | 101 | 96 | 97 | 93 | 86 |
| <i>SD</i> | <i>13,1</i> | <i>18,4</i> | <i>16,6</i> | <i>8,7</i> | <i>9,8</i> |
| LCL 721.221 | 38 | 69 | 37 | 19 | 13 |
| <i>SD</i> | <i>28,4</i> | <i>46</i> | <i>28,5</i> | <i>17,3</i> | <i>17,2</i> |
| LCL Cw3 | 59 | 78 | 29 | 81 | 44 |
| <i>SD</i> | <i>31,1</i> | <i>43,7</i> | <i>12,4</i> | <i>18,1</i> | <i>27,8</i> |
| LCL Cw4 | 78 | 71 | 51 | 95 | 61 |
| <i>SD</i> | <i>22,5</i> | <i>27,6</i> | <i>26,1</i> | <i>20,2</i> | <i>3,7</i> |

Tab. 4.12: NK-Klone entsprechend ihrem KIR-Phänotyp versus K562 und LCL Zelllinien. Darstellung der mittleren spezifischen Lyse [%] und Standardabweichung.

4.4 Zytotoxische Aktivität von NK-Klonen gegenüber B-LCL missing HLA-Cw Zelllinien

In einem weiteren Testansatz zur Untersuchung des KIR-Ligand-Mismatch Konzepts von Velardi et al wurden von vier gesunden Spendern (Spender 4-7) NK-Klone generiert. Jeweils zwei der Spender gehörten der HLA-Cw3 bzw. der HLA-Cw4 Gruppe an. Alle exprimierten außerdem Bw4 verwandte Allele.

Als Targetzellen wurden dieses Mal Epstein-Barr Virus-transformierte B-lymphoblastische Zelllinien verwendet, bei denen entweder HLA-Cw4 oder HLA-Cw3 Allele fehlten, um zu bestimmen, ob NK-Klone ein alloreaktives Killing entsprechend einer KIR-Ligand Inkompatibilität zeigen würden.

Demnach wurde angenommen, dass HLA-Cw4⁺ NK-Klone LCL-Targetzellen mit fehlendem HLA-Cw4 Allel (LCL missing HLA-Cw4) aufgrund des ausbleibenden inhibitorischen Signals lysieren. HLA-Cw3⁺ NK-Klone lysieren dagegen LCL-Targetzellen mit fehlendem HLA-Cw3 Allel (LCL missing HLA-Cw3).

In Abb. 4.14 und Tab. 4.13 wird die zytotoxische Aktivität von HLA-Cw4⁺ NK-Klonen dargestellt: LCL mit fehlendem inhibitorischem Ligand (HLA-Cw4, entsprechend LCL missing HLA-Cw4) wurden signifikant besser lysiert ($p = < 0.0001$) als LCL missing HLA-Cw3.

Abb. 4.15 und Tab. 4.14 zeigen die Ergebnisse der HLA-Cw3⁺ NK-Klone: LCL mit fehlendem inhibitorischem Ligand (HLA-Cw3, entsprechend LCL missing HLA-Cw3) wurden wiederum signifikant besser lysiert ($p = < 0.0001$) als LCL missing HLA-Cw4.

Das reziproke Verhalten der NK-Klone entspricht einem HLA-spezifischen Killing, so dass bei Verwendung dieser Targetzellen das KIR-Ligand-Mismatch Konzept anwendbar war.

Die statistische Signifikanz wurde mit gepaartem T-Test ermittelt, da jeder NK-Klon gegen beide Zelllinien ausgetestet wurde.

Zytotoxizität von HLA-Cw4 NK-Klonen vs. LCL missing HLA-Cw Zelllinien

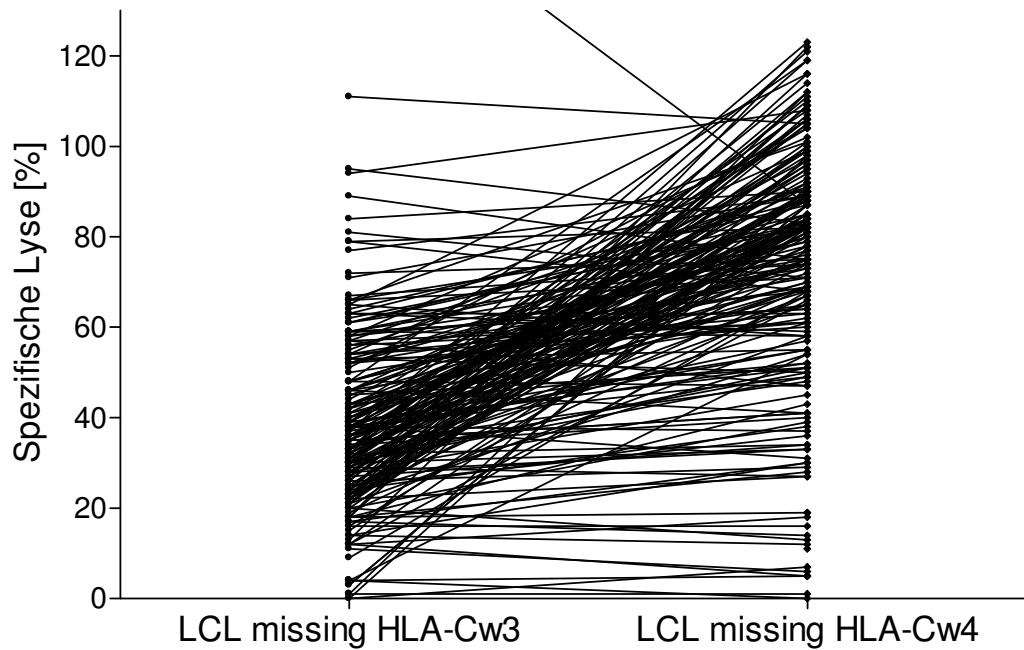


Abb. 4.14: NK-Klone von gesunden Spendern der HLA-Cw4 Gruppe [n=215] versus LCL-Targetzelllinien mit fehlender HLA-Cw3 bzw. Cw4 Expression

| Targetzellen | LCL missing HLA-Cw3 | LCL missing HLA-Cw4 |
|-------------------|---------------------|---------------------|
| Minimum | -8 | -2 |
| Median | 35 | 78 |
| Maximum | 133 | 123 |
| Mittelwert | 37,25 | 72,02 |
| SD | 20,79 | 27,99 |

Tab. 4.13: Ergebnisse der zytotoxischen Aktivität von HLA-Cw4⁺ NK-Klonen. LCL mit fehlendem inhibitorischem Ligand (HLA-Cw4) wurden signifikant besser lysiert als LCL missing HLA-Cw3 ($p = > 0.0001$ – gepaarter T-Test).

Zytotoxizität von HLA-Cw3 NK-Klonen vs. LCL missing HLA-Cw Zelllinien

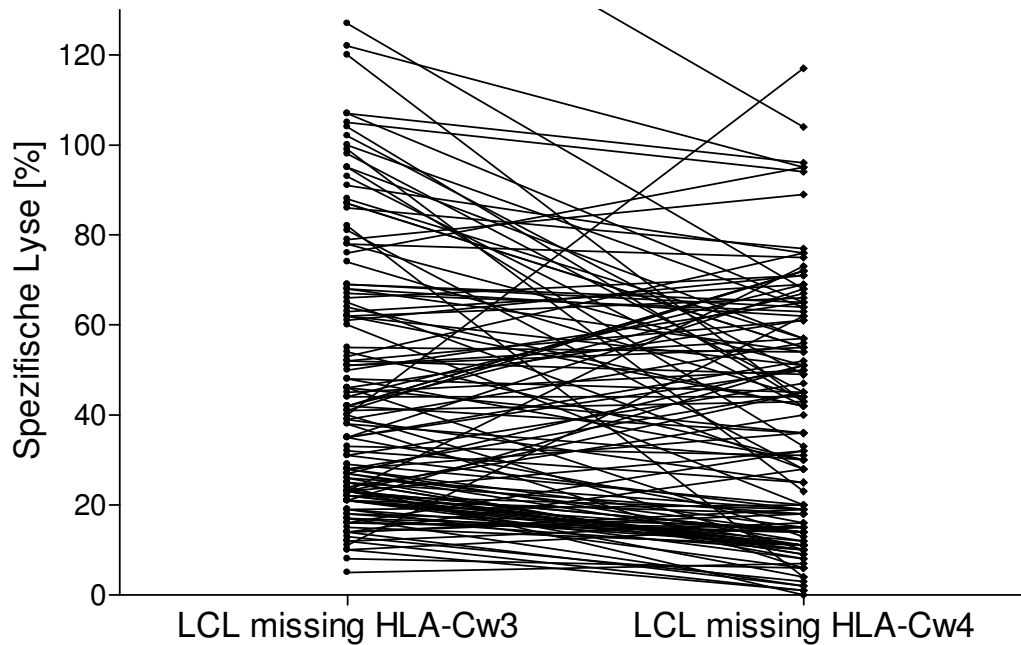


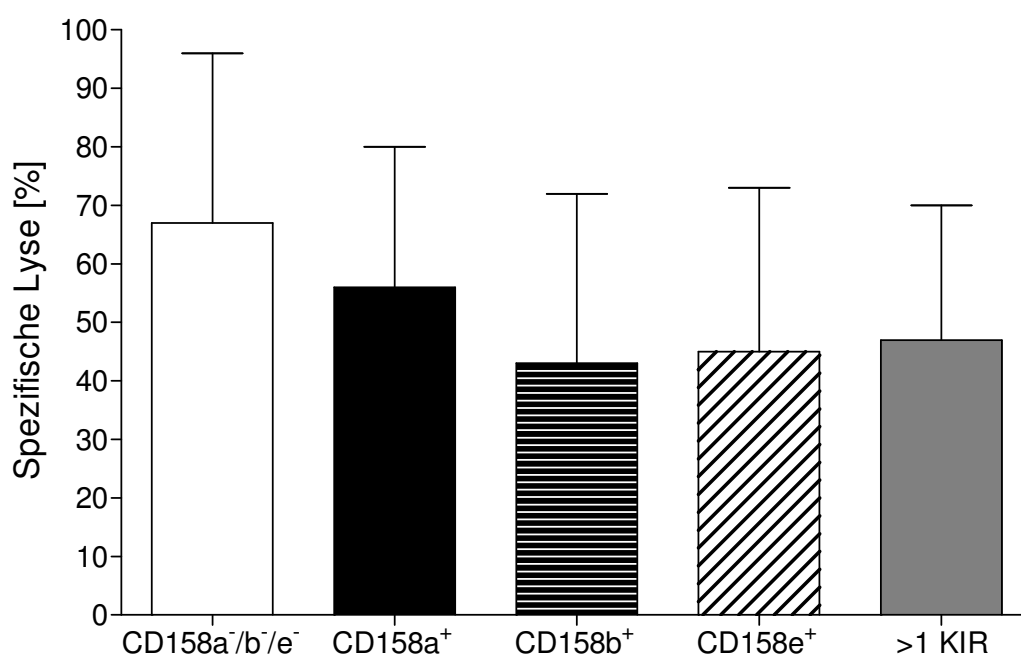
Abb. 4.15: NK-Klone von gesunden Spendern der HLA-Cw3 Gruppe [n=136] versus LCL-Targetzelllinien mit fehlender HLA-Cw3 bzw. Cw4 Expression

| Targetzellen | LCL missing HLA-Cw3 | LCL missing HLA-Cw4 |
|-------------------|---------------------|---------------------|
| Minimum | 5 | -2 |
| Median | 38,5 | 34,5 |
| Maximum | 160 | 117 |
| Mittelwert | 46,18 | 37,61 |
| SD | 30,75 | 27,01 |

Tab. 4.14: Die mittlere spezifische Lyse durch die HLA-Cw3⁺ NK-Klone zeigt einen geringeren Unterschied im Vergleich zu den HLA-Cw4⁺ NK-Klonen, trotzdem werden LCL mit fehlendem inhibitorischem Ligand (HLA-Cw3) signifikant besser lysiert als LCL missing HLA-Cw4 ($p = > 0.0001$ – gepaarter T-Test.)

Weiterhin wurde ein großer Teil der NK-Klone [n=179] der vier gesunden Spender mittels 4-Farben-FACS auf deren KIR-Phänotyp untersucht, um zu analysieren, ob sich ein spezifisches Killing entsprechend des KIR-Besatzes zeigen würde. In den Abbildungen 4.16 und 4.17 wird die zytotoxische NK-Aktivität entsprechend dem KIR-Phänotyp dargestellt.

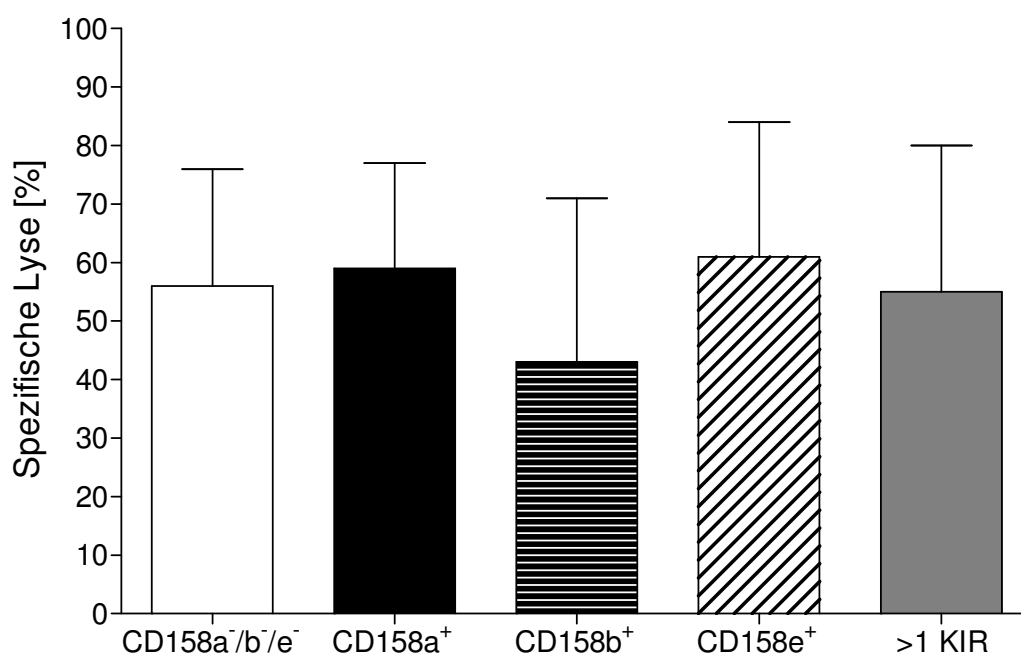
Abb. 4.16: Zytotoxische Aktivität der NK-Klone aller vier Spender [n=179] nach Einteilung entsprechend ihres KIR-Phänotyps vs. LCL missing HLA Cw3



| NK-Klone vs. LCL m. Cw3 | KIR ⁻ | CD158a ⁺ | CD158b ⁺ | CD158e ⁺ | >1 KIR |
|----------------------------|------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-------------|
| [n] | 47 | 26 | 29 | 19 | 58 |
| Minimum | 11 | 16 | 12 | -8 | 0 |
| Median | 63 | 54 | 38 | 46 | 45,5 |
| Maximum | 160 | 111 | 122 | 133 | 107 |
| Mittelwert | 67 | 56,4 | 43,3 | 44,9 | 47,4 |
| SD | 28,9 | 23,8 | 29,5 | 28,1 | 22,6 |

Tab. 4.15: Spezifische Lyse [%] von NK-Klonen entsprechend ihrem KIR-Phänotyp versus LCL missing HLA-Cw3

Abb. 4.17: Zytotoxische Aktivität der NK-Klone aller vier Spender [n=179] nach Einteilung entsprechend ihres KIR-Phänotyps vs. LCL missing HLA-Cw4



| NK-Klone vs. LCL m. Cw4 | KIR ⁻ | CD158a ⁺ | CD158b ⁺ | CD158e ⁺ | >1 KIR |
|----------------------------|------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-------------|
| [n] | 47 | 26 | 29 | 19 | 58 |
| Minimum | -1 | 16 | 4 | 19 | 6 |
| Median | 56 | 61 | 40 | 70 | 58 |
| Maximum | 104 | 105 | 117 | 102 | 101 |
| Mittelwert | 55,9 | 58,5 | 42,6 | 60,7 | 54,7 |
| SD | 20,1 | 18,5 | 28,4 | 23,3 | 25,2 |

Tab. 4.16: Spezifische Lyse [%] von NK-Klonen entsprechend ihrem KIR-Phänotyp versus LCL missing HLA-Cw4

KIR einfach positive NK-Klone zeigten hierbei keine signifikant unterschiedliche Aktivität gegenüber den Targetzelllinien, ebenso wie KIR negative bzw. mehrfach positive NK-Klone.

Somit war festzustellen, dass die NK-Klone, bei Beurteilung des HLA-Typs ihrer jeweiligen Spender ohne Berücksichtigung der FACS-Analyse ein HLA-

spezifisches Killing gegenüber den LCL-Zelllinien zeigten, bei Analyse der KIR-Expression sich allerdings keine ihrem KIR entsprechende HLA-spezifische Aktivität nachweisen ließ.

4.5 Zytotoxische Aktivität von NK-Klonen gegenüber Prä-B-ALL Blasten einer 4-jährigen Patientin (Patient 1)

Im Weiteren wurde begonnen, NK-Klone auf Alloreaktivität gegenüber kryokonservierten kindlichen Prä-B-ALL Blasten zu untersuchen. Für einen Großteil der Versuche dienten die von einer Knochenmarkpunktion gewonnenen und kryokonservierten Prä-B-ALL Blasten einer 4-jährigen Patientin (Patient 1, siehe Anhang 8.1).

15 NK-Klone von drei Buffy Coats wurden in einem ersten Testansatz in einem Effektor/Target-Verhältnis von 5:1, 2,5:1 und 1,25:1 gegen die Blasten ausgetestet. Die Targetzellen exprimierten Allele der HLA-Cw3 und Bw4-Gruppe. Zwei der drei Spender-Buffy-Coats exprimierten ebenfalls Allele der HLA Cw3 Gruppe (Spender 1 und 3) und ein weiterer Allele der HLA Cw4 Gruppe.

Bei 47% der NK-Klone ließ sich bei einem Effektor-Target-Verhältnis von 5:1 eine effektive Lyse der Blasten nachweisen (>40% spezifische Lyse). Die mittlere spezifische Lyse betrug $38,9 \pm 19,1\%$.

Die Auswertung nach der HLA-Cw-Gruppenzugehörigkeit der NK-Klone zeigte dabei kein HLA-spezifisches Killing gegenüber den Prä-B-ALL Blasten (Abb. 4.18 und Tab. 4.17).

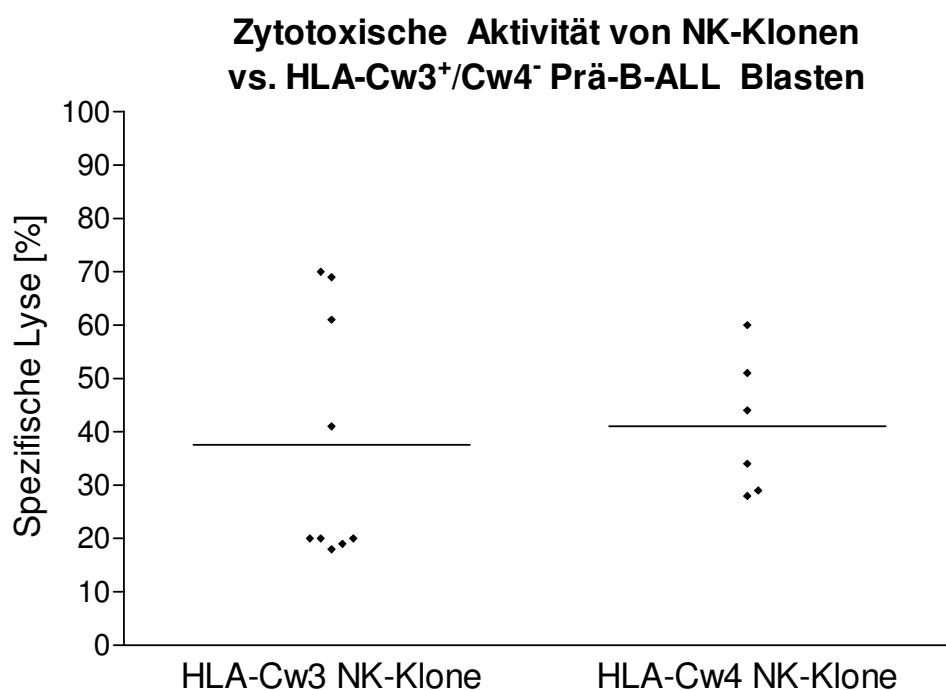


Abb. 4.18: Buffy Coat NK-Klone unterschiedlicher HLA-Cw Gruppe vs. kindliche Prä-B-ALL Blasten der HLA-Cw3 Gruppe (Patient 1)

| Vs. HLA-Cw3 ⁺ /Cw4 ⁻ Prä-B-ALL Blasten | HLA-Cw3 NK-Klone | HLA-Cw4 NK-Klone |
|---|------------------|------------------|
| [n] | 9 | 6 |
| Minimum | 18 | 28 |
| Median | 20 | 39 |
| Maximum | 70 | 60 |
| Mittelwert | 37,56 | 41 |
| SD | 23,06 | 12,9 |

Tab. 4.17: Bei den NK-Klonen der unterschiedlichen HLA-Cw Gruppen zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der mittleren spezifischen Lyse ($p = 0.75$, ungepaarter T-Test).

In Abb. 4.19 ist die zytotoxische Aktivität der NK-Klone in abnehmendem Effektor-Target-Verhältnis dargestellt. Durch 4-Farben-FACS Analyse wurde außerdem der KIR-Phänotyp ermittelt. Dabei ließ sich bei Klonen ohne Expression einer der drei für das Mismatch Konzept wesentlichen KIRs (entsprechend als KIR⁻ bezeichnet) meist eine höhere spezifische Aktivität beobachten als bei Klonen mit Expression mehrerer KIRs bzw. Expression des KIR CD158b, welcher Liganden der HLA-Cw3 Gruppe bindet und somit ein inhibitorisches Signal auslöst.

Zytotoxische Aktivität der NK-Klone in drei Titrationsstufen und Darstellung des KIR-Phänotyps

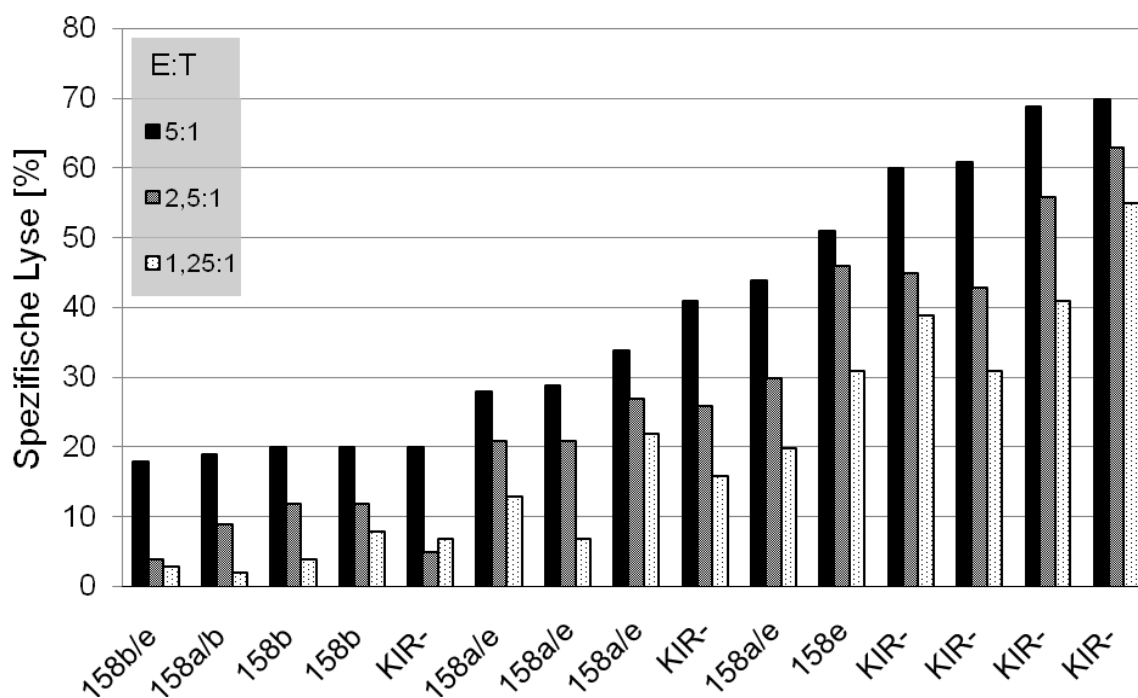


Abb. 4.19: Spezifische Lyse der NK-Klone [n=15] vs. HLA-Cw3⁺ /Cw4⁻ /Bw4⁺ Prä-B-ALL Blasten (Patient1) in abnehmendem Effektor-Target-Verhältnis. KIR⁻ NK-Klone (entsprechend CD158a⁻/b⁻/e⁻) zeigten im Vergleich zu mehrfach KIR positiven bzw. 158b⁺ NK-Klonen eine stärkere zytotoxische Aktivität.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde die alloreaktive Aktivität von 98 NK-Klonen gesunder Spender mit vier Targetzellen gescreent.

Die Klone wurden dabei von NK-Zellen der Spender 5 und 7 generiert, welche beide der HLA-Cw3 Gruppe angehörten und ebenfalls HLA-Bw4 verwandte Allele exprimierten (siehe 8.1). Als Targetzellen dienten neben den HLA-Cw3⁺/Cw4⁻/Bw4⁺ Prä-B-ALL Blasten (Patient 1) die LCL missing HLA-Cw3 und LCL missing HLA-Cw4 Zelllinien zur Auswertung des prädiktiven Wertes des „Missing self-Konzepts“ bei der Lyse von leukämischen Blasten, sowie die erythroleukämische Zelllinie K562 als Positivkontrolle für die NK-Zell-Aktivität, um funktionell inaktive Klone auszuschließen (mittlere spezifische Lyse 104% ± 11% SD, Abb. 4.20D).

In Abbildung 4.20 sind die Ergebnisse aufsteigend nach der spezifischen Lyse gegenüber den Blasten dargestellt und direkt übereinander angeordnet.

Die mittlere spezifische Lyse der Prä-B-ALL Blasten betrug 54,2% ± 20% SD (Abb. 4.20A). Eine Mehrheit von 79% der getesteten NK-Klone lysierte die Blasten dabei effektiv (> 40% spezifische Lyse). Darüber hinaus wurde die korrespondierende zytotoxische Aktivität der Klone gegenüber den Zelllinien LCL missing Cw3 (Abb. 4.20C) bzw. LCL missing Cw4 (Abb. 4.20B) analysiert. Es wird ersichtlich, dass weder ein signifikanter Unterschied noch eine Korrelation zwischen der lytischen Aktivität gegen Blasten und dem Killing von LCL Targetzellen mit fehlendem HLA-Cw4 oder HLA-Cw3 nachgewiesen werden konnte.

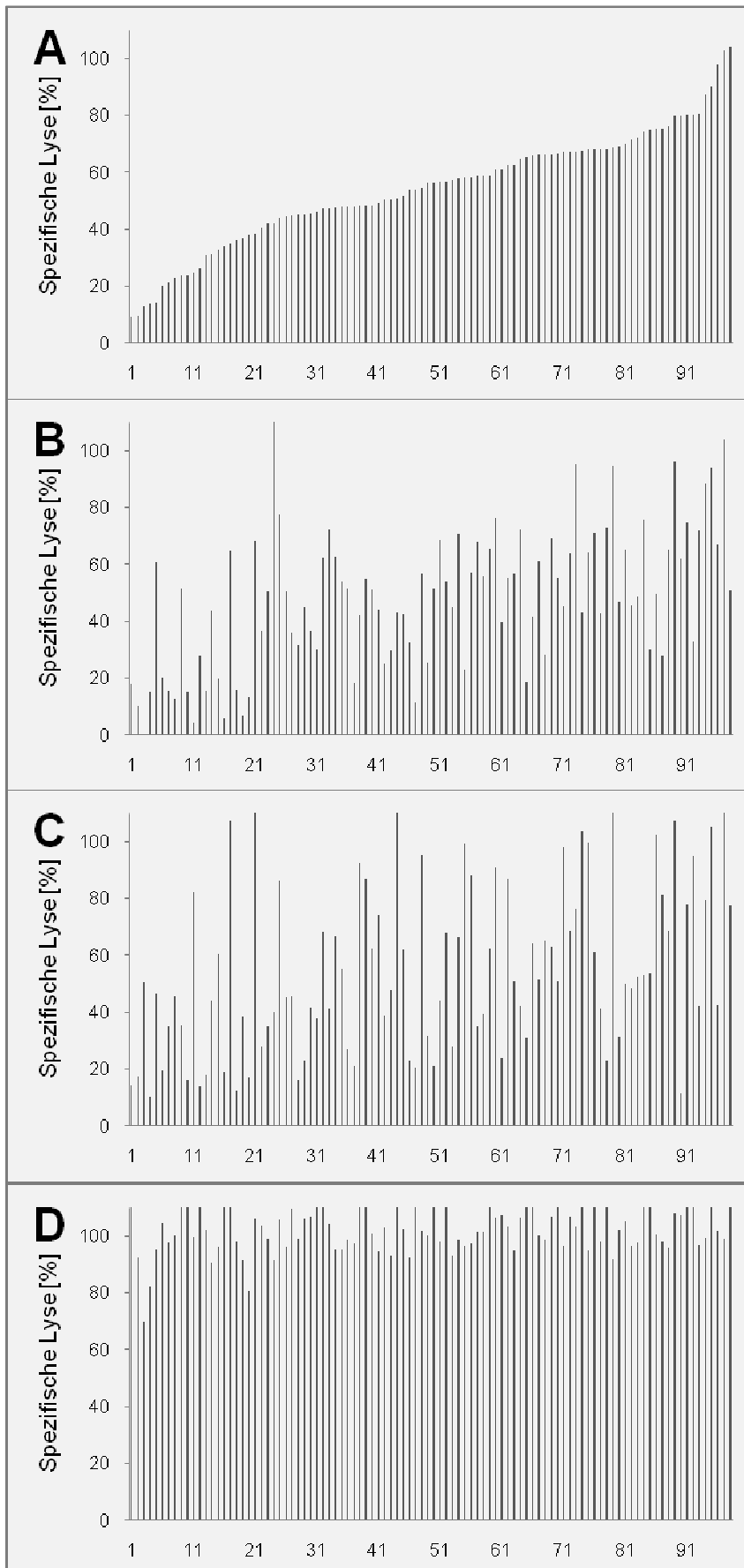


Abb. 4.20:
Screening der allo-
reaktiven Aktivität
von 98 NK-Klonen
zweier gesunder
Spender mit vier
Targetzellen.

Die Anordnung ent-
spricht der zuneh-
menden zytotoxi-
schen Aktivität der
NK-Klone gegen-
über den Prä-B-ALL
Blasten (Bild A).
In Diagramm B und
C ist die Aktivität
der entsprechenden
Klone gegenüber
den Zelllinien LCL
missing Cw4 und
LCL missing Cw3
dargestellt.

Als Positivkontrolle
für die NK-Aktivität
diente die erythro-
leukämische Zell-
linie K562 (Bild D).

4.6 Zytotoxische Aktivität aller gegenüber kindlichen Prä-B-ALL Blasten getesteten NK-Klone gesunder Spender

In diesem Kapitel soll die Auswertung aller gegen kindliche Prä-B-ALL Blasten getesteten NK-Klone von gesunden Spendern aufgeführt werden.

Insgesamt wurden 385 Klone von sieben Spendern (Spender 1-7, siehe 8.1) gegenüber den kryokonservierten Prä-B-ALL Blasten von vier pädiatrischen Patienten (Patient 1-4, siehe 8.1) durch Zytotoxizitätstests in einem Effektor/Target-Verhältnis von 5:1 ausgetestet. Die Auswertung ist unterteilt nach verschiedenen Gesichtspunkten:

- 1) Abhängigkeit der NK-Zell Suszeptibilität von der quantitativen HLA-Klasse I-Expression der Prä-B-ALL Blasten
- 2) Abhängigkeit der NK-Zell-Aktivität von der HLA-Klasse I-Zugehörigkeit der Spender
- 3) Abhängigkeit der NK-Zell-Aktivität vom KIR-Phänotyp
- 4) Auswertung der NK-Zell-Aktivität gegenüber einzelnen Blastenpopulationen entsprechend KIR-Phänotyp und HLA-Typ der Spender
- 5) Zytotoxische Aktivität der mehrfach KIR positiven NK-Klone

4.6.1 NK-Zell-Lyse der Prä-B-ALL Blasten in Korrelation mit der quantitativen HLA-Klasse I-Expression der Blasten

In dieser Arbeit vorausgegangenen Untersuchungen der gleichen Arbeitsgruppe (87) konnte festgestellt werden, dass die quantitative HLA-Klasse I-Expression der kryokonservierten Prä-B-ALL Blasten von Patient 1 und 2 gegenüber gesunden CD19⁺ B-Zellen (258'735 HLA-Klasse I-Moleküle/Zelle) deutlich vermindert (<136'000 Moleküle/Zelle) und die von Patient 3 und 4 erhöht war (>355'000 Moleküle/Zelle).

Bei der funktionellen Austestung der NK-Klone gegenüber den verschiedenen Prä-B-ALL Blasten wurde ersichtlich (Tabelle 4.18, Abbildung 4.21), dass die lytische Aktivität der NK-Klone gegenüber den Blasten mit verminderter HLA-Klasse I-Expression signifikant größer war. 66,85% der NK-Klone bei Patient 1 und 25,81% der NK-Klone bei Patient 2 zeigten ein effektives Killing der Blasten (>40% spezifische Lyse). Dagegen waren bei denen mit erhöhter HLA-Klasse I-Expression kaum NK-Klone mit effektiver zytotoxischer Aktivität nachweisbar. Zusammengefasst, betrug die mittlere spezifische Lyse der NK-Klone gegenüber den Blasten [n=2] mit verminderter HLA-Klasse I-Expression 46,30% ± 23,86% SD im Vergleich zu 10,77% ± 9,99% SD gegenüber den Blasten [n=2] mit erhöhter HLA-Klasse I-Expression (siehe Abb. 4.22).

| Patient Nr. | 1 | 2 | 3 | 4 |
|-------------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
| [n] | 181 | 62 | 79 | 63 |
| Minimum | 6 | 4 | -1 | 0 |
| Median | 50 | 26 | 11 | 6 |
| Maximum | 110 | 105 | 69 | 35 |
| Mittelwert | 50,37 | 34,42 | 13,89 | 6,86 |
| SD | 22,03 | 25,19 | 11,65 | 5,23 |

Tab. 4.18: Ergebnisse (spezifische Lyse [%]) der 385 ausgetesteten NK-Klone vs. den kindlichen Prä-B-ALL Blasten im Überblick. Siehe oberes Diagramm der Abb. 4.21.

Zytotoxizität vs. kindlichen Prä-B-ALL Blasten und Korrelation zu HLA I-Expression der Blasten

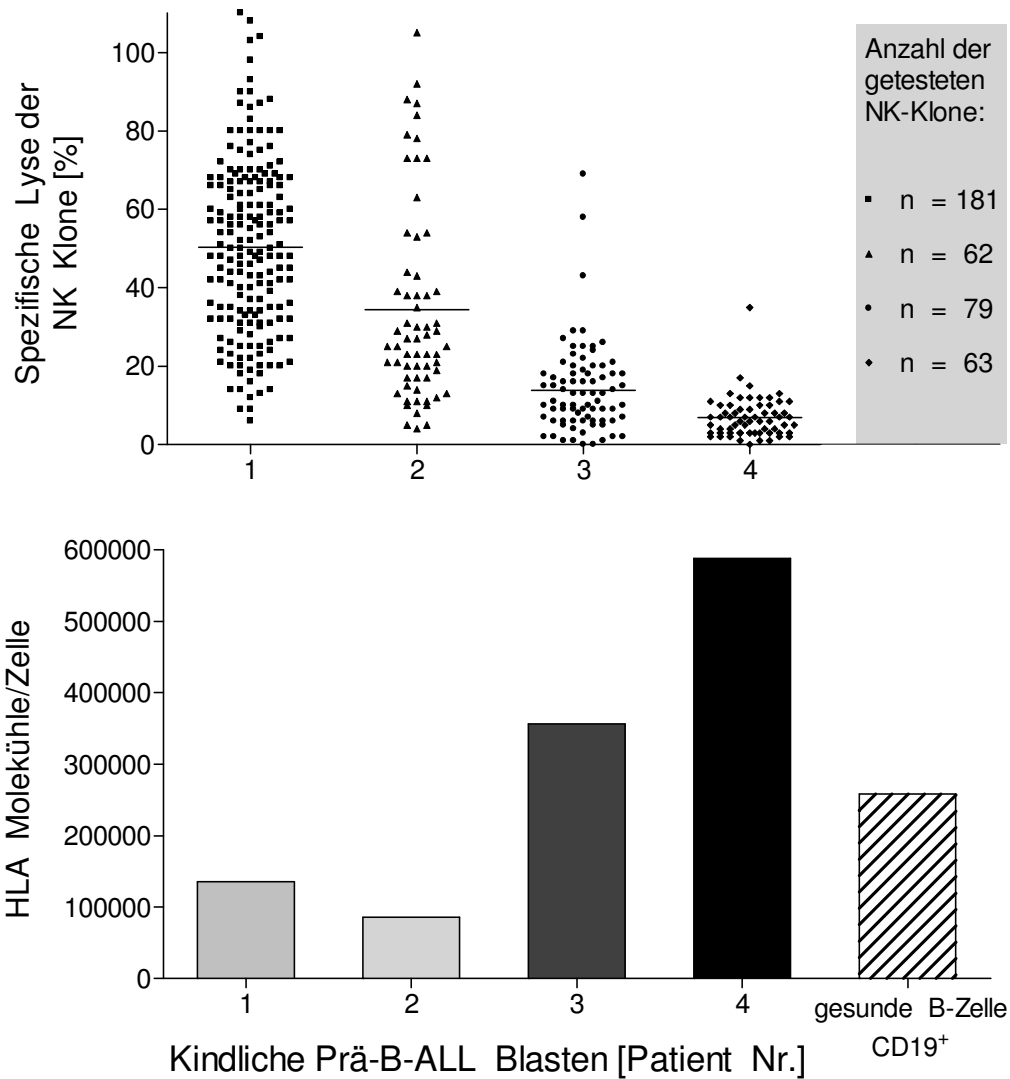


Abb. 4.21: Das obere Scatter-plot-Diagramm zeigt die lytische Aktivität der 385 getesteten NK-Klone, sieben gesunder Spender, gegenüber kindlichen Prä-B-ALL Blasten von vier Patienten. Im unteren Balkendiagramm ist die quantitative HLA-Klasse I-Expression der entsprechenden Blasten dargestellt, sowie als Referenz von gesunden CD19⁺ B-Zellen.

Killing der Blasten mit erhöhter bzw. erniedrigter HLA-Klasse I-Expression

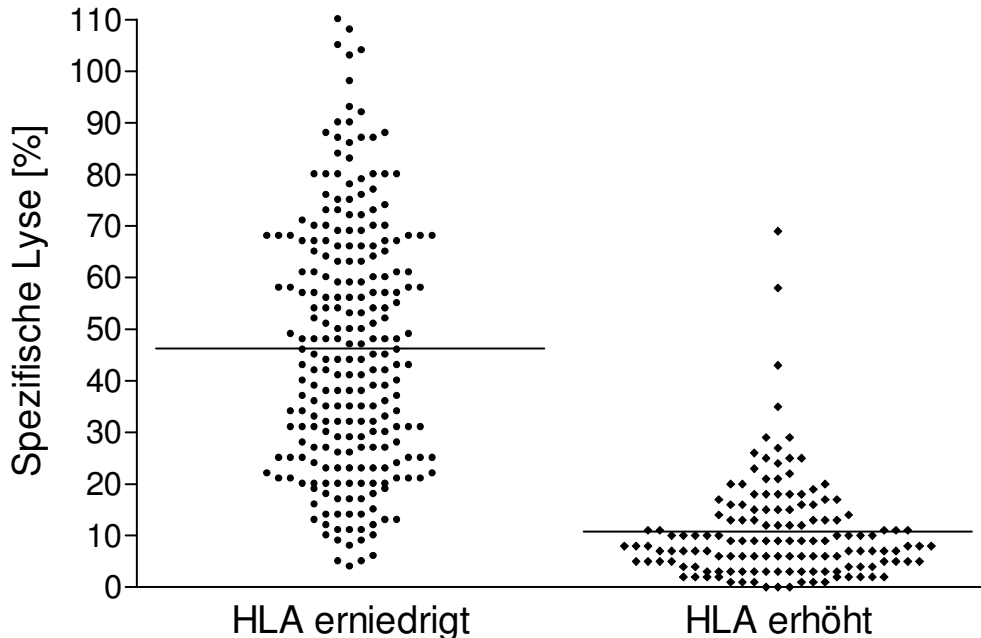
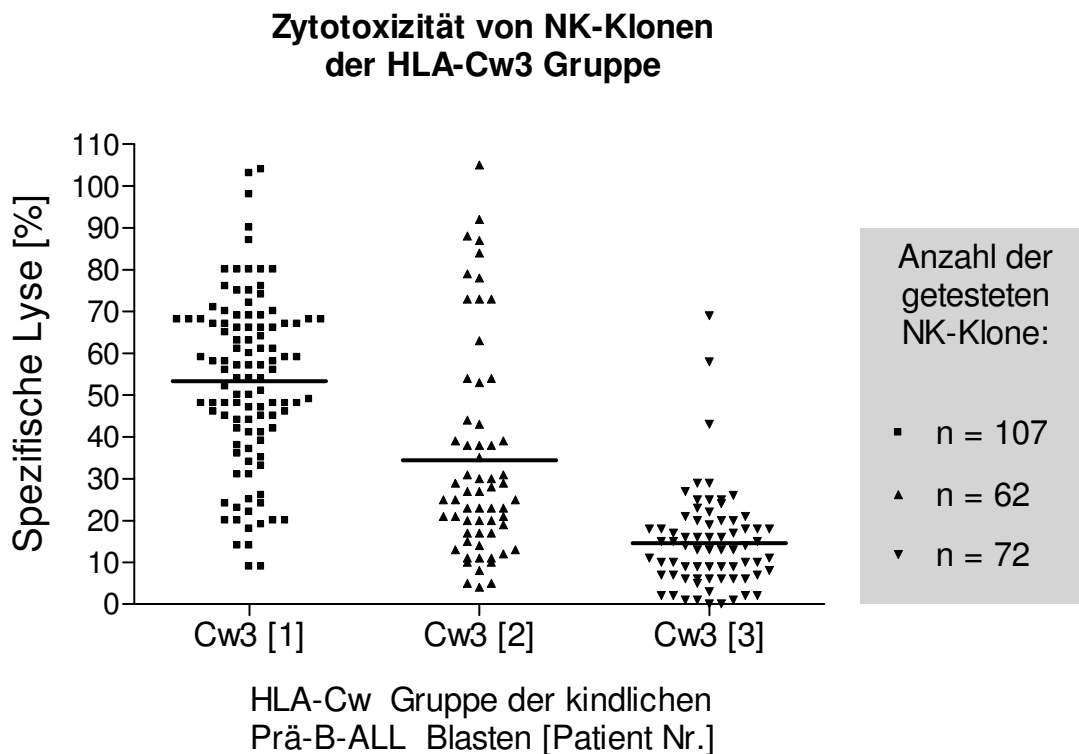


Abb. 4.22: Die mittlere spezifische Lyse der Blasten mit verminderter HLA-Klasse I-Expression (Patient 1 und 2) betrug $46,30\% \pm 23,86\%$ SD im Vergleich zu $10,77\% \pm 9,99\%$ SD bei den Blasten mit erhöhter HLA-Klasse I-Expression (Patient 3 und 4). Statistische Signifikanz: $p < 0.0001$ (ungepaarter T-Test).

4.6.2 NK-Zell-Lyse der Prä-B-ALL Blasten entsprechend der HLA-Klasse I-Zugehörigkeit der Spender

Um das von Velardi et al entwickelte Konzept des KIR-Ligand-Mismatches bei pädiatrischen Prä-B-ALL Blasten auf klonaler Ebene zu evaluieren, wurden wie erwähnt Spender und pädiatrische Patienten ausgewählt, die entweder der HLA-Cw3 oder HLA-Cw4 Gruppe angehörten. Ausgenommen davon sind die Prä-B-ALL Blasten von Patient 4, welche HLA-Cw3 und zugleich HLA-Cw4 verwandte Allele exprimierten.

In der Abb. 4.23 und 4.24 soll der Einfluss des Spender HLA-Typs auf die Lyse von Prä-B-ALL Blasten analysiert werden.

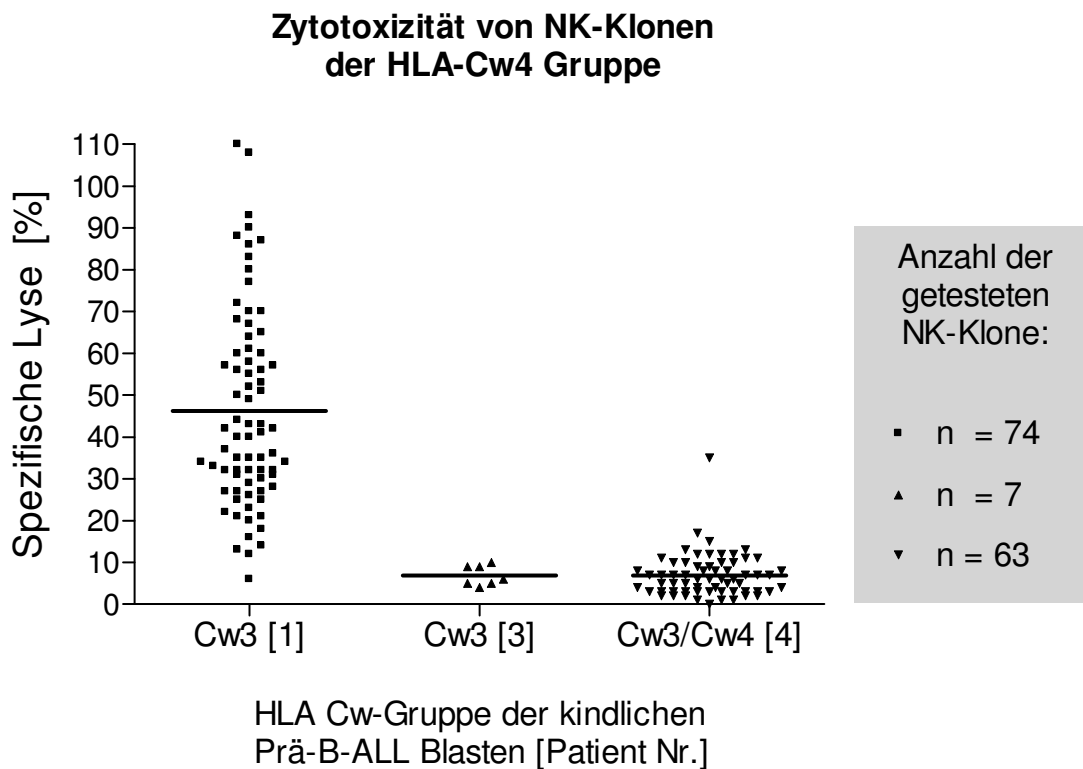


| Patient Nr. | 1 | 2 | 3 |
|-------------------------|--------------|--------------|--------------|
| Mittlere spez. Lyse [%] | 53,25 | 34,42 | 14,57 |
| SD | 20,45 | 25,19 | 11,97 |

Abb. 4.23: Zytotoxische Aktivität aller NK-Klone der HLA-Cw3 Gruppe [$n_{\text{gesamt}} = 241$] gegenüber Prä-B-ALL Blasten der gleichen HLA-Cw Gruppe.

Bei gleicher HLA-Cw Gruppe von Spender und Empfänger wäre nach dem Mismatch Konzept eine Hemmung zu erwarten gewesen (Patient 1,2,3 in Abb. 4.23 und Patient 4 in Abb. 4.24) und bei unterschiedlicher HLA-Expression eine gesteigerte Aktivität. Die Austestung der NK-Klone zeigte aber keinen signifikanten Unterschied zwischen Klonen der Cw3 und der Cw4 Gruppe.

Klone von HLA-Cw3 Spendern hatten gegenüber den Targets der gleichen HLA-Gruppe sogar eine leicht höhere Aktivität als Klone von HLA-Cw4 Spendern (vgl. Patient 1 und 3). Unabhängig von ihrer HLA-Cw Gruppe, zeigten die NK-Klone wiederum eine höhere lytische Aktivität, die gegen Prä-B-ALL Blasten mit niedriger HLA-Klasse I-Expression (Patient 1 und 2) ausgetestet wurden.



| Patient Nr. | 1 | 3 | 4 |
|-------------------------|--------------|-------------|-------------|
| Mittlere spez. Lyse [%] | 46,20 | 6,86 | 6,86 |
| SD | 23,66 | 2,41 | 5,29 |

Abb. 4.24: Zytotoxische Aktivität aller NK-Klone der HLA-Cw4 Gruppe [$n_{\text{gesamt}} = 144$] gegenüber Prä-B-ALL Blasten der anderen HLA-Gruppe bzw. der gleichen bei Patient 4.

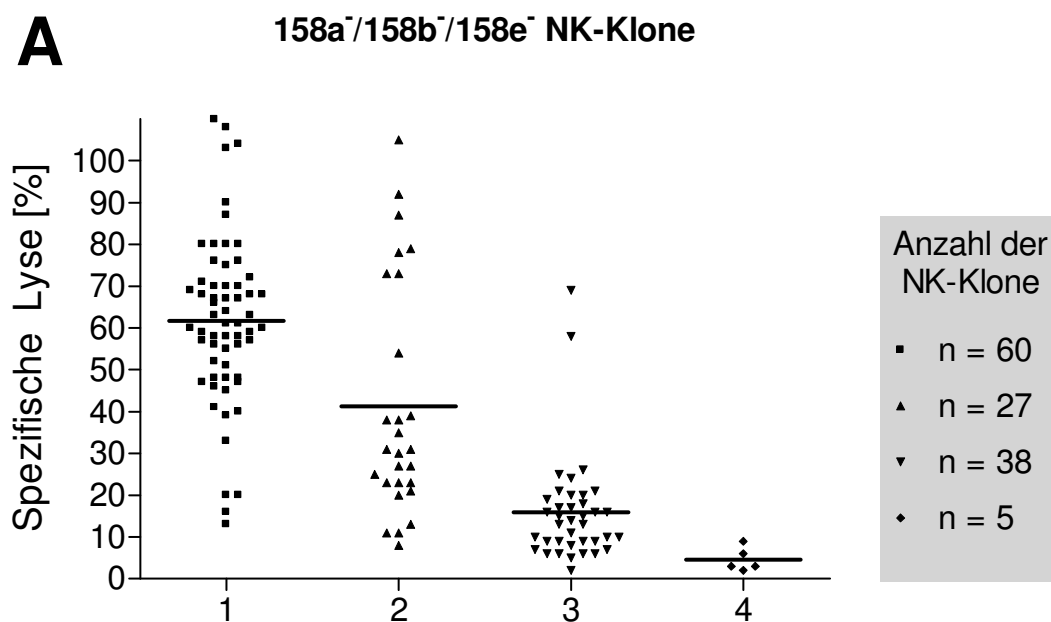
4.6.3 NK-Zell-Lyse der Prä-B-ALL Blasten entsprechend des KIR-Phänotyps der NK-Klone

Weiterhin wurden die NK-Klone mittels 4-Farben-FACS-Analyse auf ihre Expression von KIRs untersucht. Wie unter 4.2 beschrieben, wurden die Rezeptoren CD158a, CD158b und CD158e berücksichtigt und diesbezüglich komplett negative bis zu 3-fach KIR-positive NK-Klone identifiziert.

In den Diagrammen A-E der Abb. 4.25 werden jeweils die unterschiedlichen KIR-Phänotypen der NK-Klone ausgewertet. Die KIR mehrfach positiven Klone werden unter 4.6.5 nochmals differenzierter analysiert.

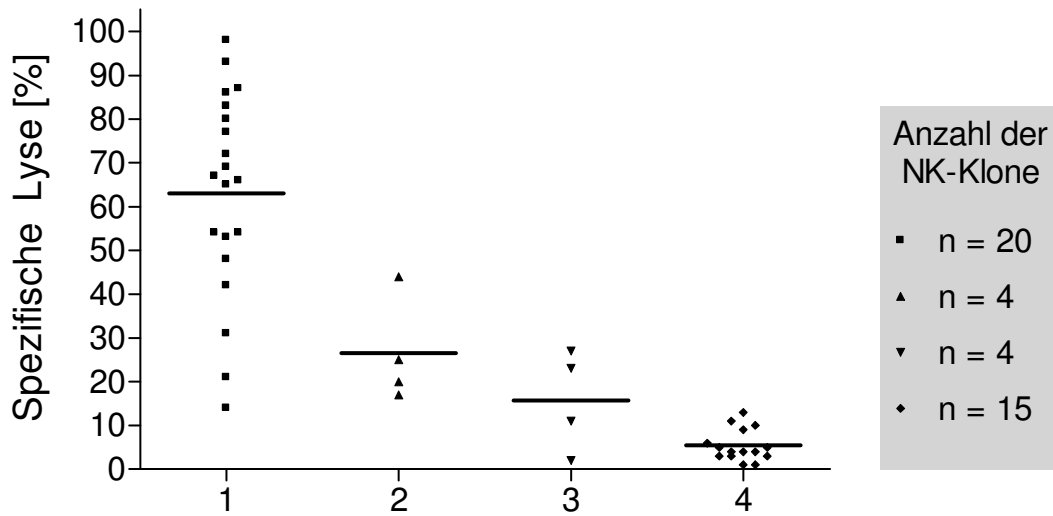
Bei allen Phänotypen zeigt sich gegenüber den Prä-B-ALL Blasten der vier Patienten ein ähnliches Muster der zytotoxischen Aktivität. So ist festzustellen, dass die mittlere spezifische Lyse der Blasten von Patient 1 hin zu Patient 4 deutlich abnimmt.

Abb. 4.25A-E: Darstellung der zytotoxischen NK-Aktivität versus den Prä-B-ALL Blasten entsprechend dem KIR-Phänotyp der NK-Klone. Die Diagramme A-E zeigen die durch 4-Farben-FACS-Analyse identifizierten Phänotypen.



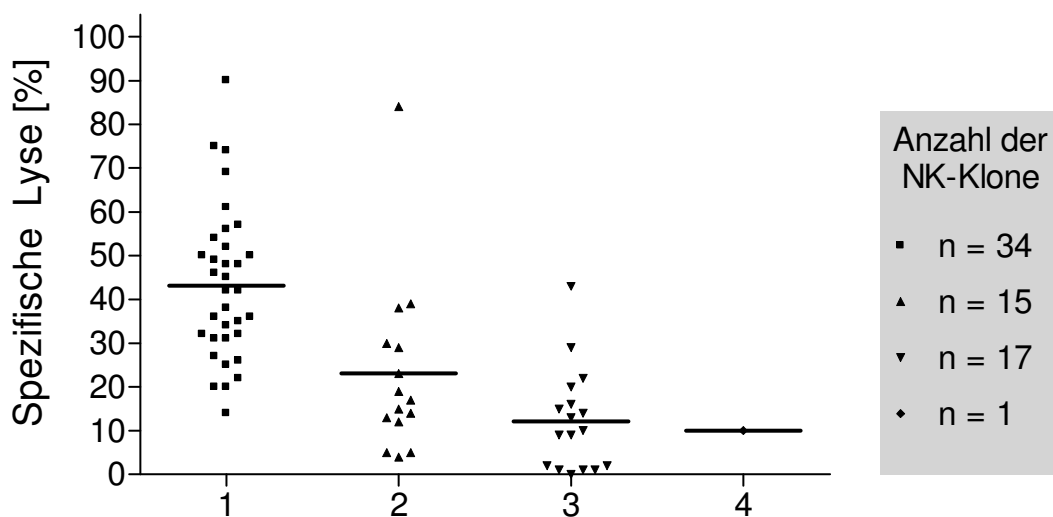
| Patient Nr. | 1 | 2 | 3 | 4 |
|-------------------------|--------------|-------------|--------------|-------------|
| Mittlere spez. Lyse [%] | 61,68 | 41,3 | 15,87 | 4,60 |
| SD | 20,23 | 27,98 | 12,63 | 2,88 |

B **158a⁺/158b⁻/158e⁻ NK-Klone**



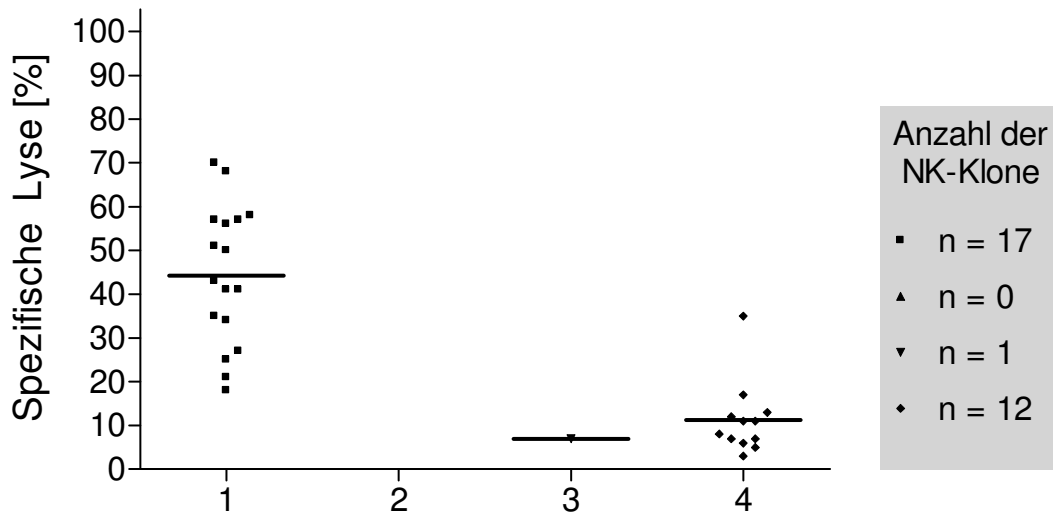
| Patient Nr. | 1 | 2 | 3 | 4 |
|-------------------------|-----------|--------------|--------------|-------------|
| Mittlere spez. Lyse [%] | 63 | 26,50 | 15,75 | 5,47 |
| SD | 23,37 | 12,12 | 11,41 | 3,64 |

C **158a⁻/158b⁺/158e⁻ NK-Klone**



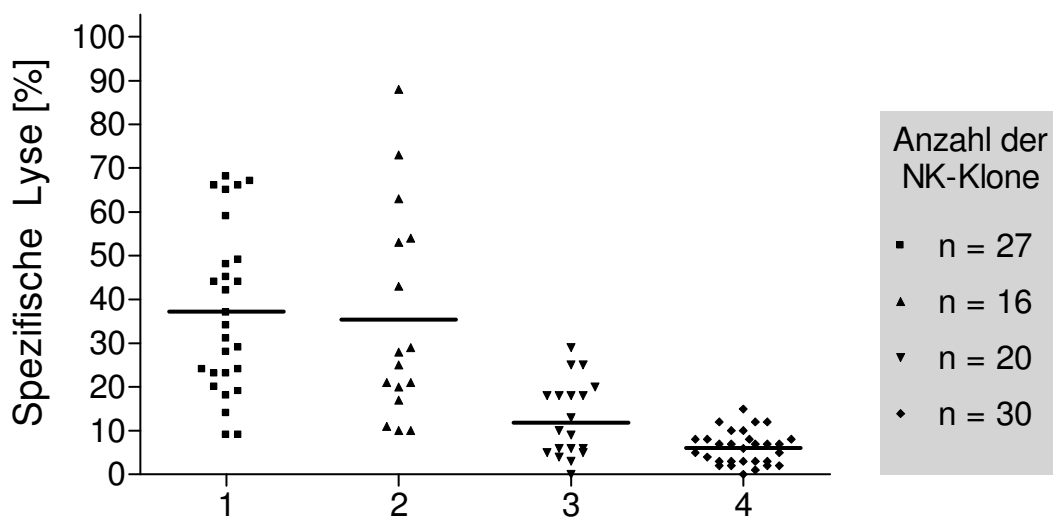
| Patient Nr. | 1 | 2 | 3 | 4 |
|-------------------------|--------------|--------------|--------------|-----------|
| Mittlere spez. Lyse [%] | 43,15 | 23,13 | 12,18 | 10 |
| SD | 17,38 | 20,20 | 11,65 | - |

D 158a⁻/158b⁻/158e⁺ NK-Klone



| Patient Nr. | 1 | 2 | 3 | 4 |
|-------------------------|--------------|---|----------|--------------|
| Mittlere spez. Lyse [%] | 44,24 | - | 7 | 11,25 |
| SD | 15,95 | - | - | 8,43 |

E > 1 KIR⁺ NK-Klone

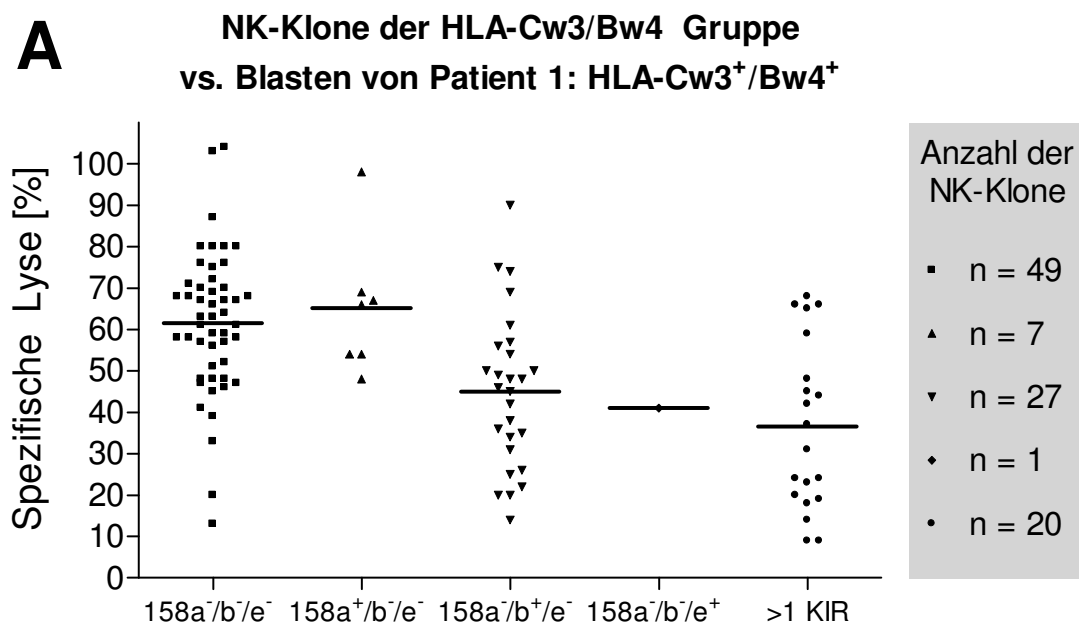


| Patient Nr. | 1 | 2 | 3 | 4 |
|-------------------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
| Mittlere spez. Lyse [%] | 37,22 | 35,38 | 11,85 | 6,07 |
| SD | 18,86 | 24,13 | 8,92 | 3,80 |

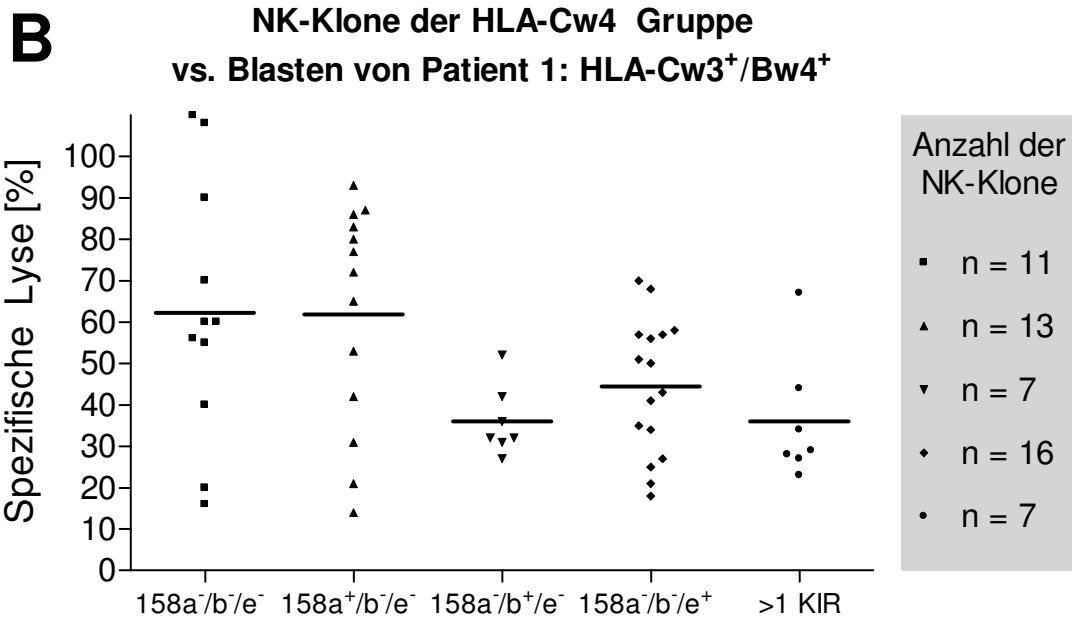
4.6.4 Zytotoxische NK-Aktivität gegenüber den einzelnen Prä-B-ALL Blasten entsprechend dem KIR-Phänotyp der NK-Klone und dem HLA-Typ der Spender

In dieser Darstellung der Ergebnisse steht die Frage im Vordergrund, ob bei den NK-Klonen, die gegen Prä-B-ALL Blasten eines Patienten ausgetestet wurden, zwischen den KIR-Phänotypen signifikante Unterschiede der zytotoxischen Aktivität im Sinne des KIR-Ligand-Mismatch Konzepts auftreten. Dabei werden in jedem Diagramm NK-Klone einer HLA-Cw Gruppe mit ihren unterschiedlichen KIR-Phänotypen versus einem der vier Targets dargestellt. Prä-B-ALL Blasten der Patienten 2 und 4 wurden mit NK-Klonen nur einer HLA-Cw Gruppe getestet.

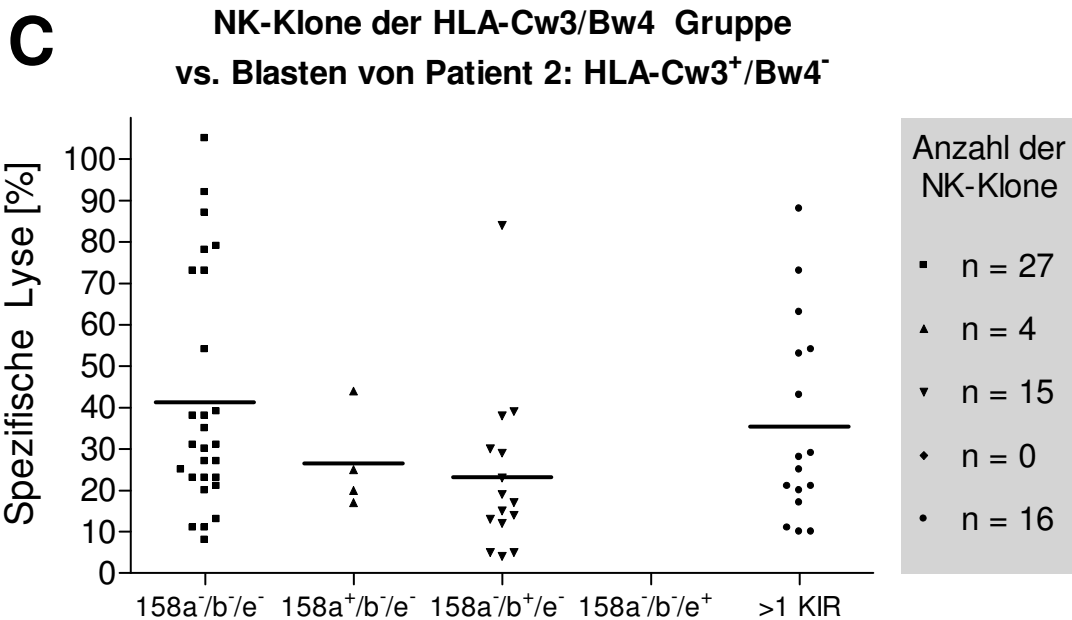
Abb. 4.26A-F: Die Diagramme zeigen die zytotoxische Aktivität der unterschiedlichen KIR-Phänotypen von NK-Klonen der gleichen HLA-Cw Gruppe gegenüber den einzelnen Prä-B-ALL Blasten.



| NK-Klon Phänotyp | KIR ⁻ | CD158a ⁺ | CD158b ⁺ | CD 158e ⁺ | >1 KIR |
|-------------------------|------------------|---------------------|---------------------|----------------------|--------------|
| Mittlere spez. Lyse [%] | 61,55 | 65,14 | 45 | 41 | 36,55 |
| SD | 17,33 | 16,54 | 18,69 | - | 20,27 |

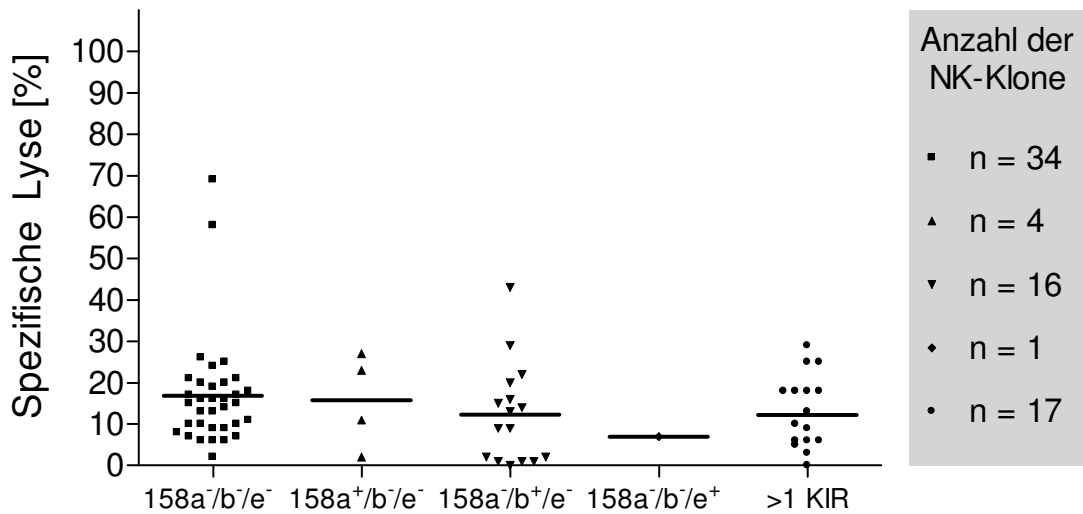


| NK-Klon Phänotyp | KIR ⁻ | CD158a ⁺ | CD158b ⁺ | CD 158e ⁺ | >1 KIR |
|-------------------------|------------------|---------------------|---------------------|----------------------|--------------|
| Mittlere spez. Lyse [%] | 62,27 | 61,85 | 36 | 44,44 | 36,00 |
| SD | 31,18 | 26,91 | 8,47 | 16,45 | 15,23 |



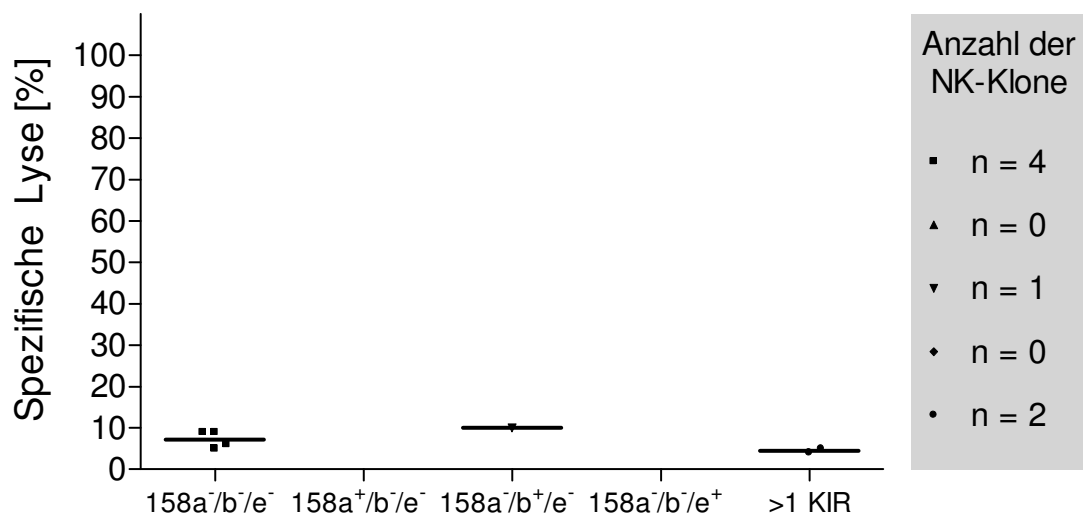
| NK-Klon Phänotyp | KIR ⁻ | CD158a ⁺ | CD158b ⁺ | CD 158e ⁺ | >1 KIR |
|-------------------------|------------------|---------------------|---------------------|----------------------|--------------|
| Mittlere spez. Lyse [%] | 41,30 | 26,50 | 23,13 | - | 35,38 |
| SD | 27,98 | 12,12 | 20,20 | - | 24,13 |

D NK-Klone der HLA-Cw3/Bw4 Gruppe vs. Blasten von Patient 3: HLA-Cw3⁺/Bw4⁺

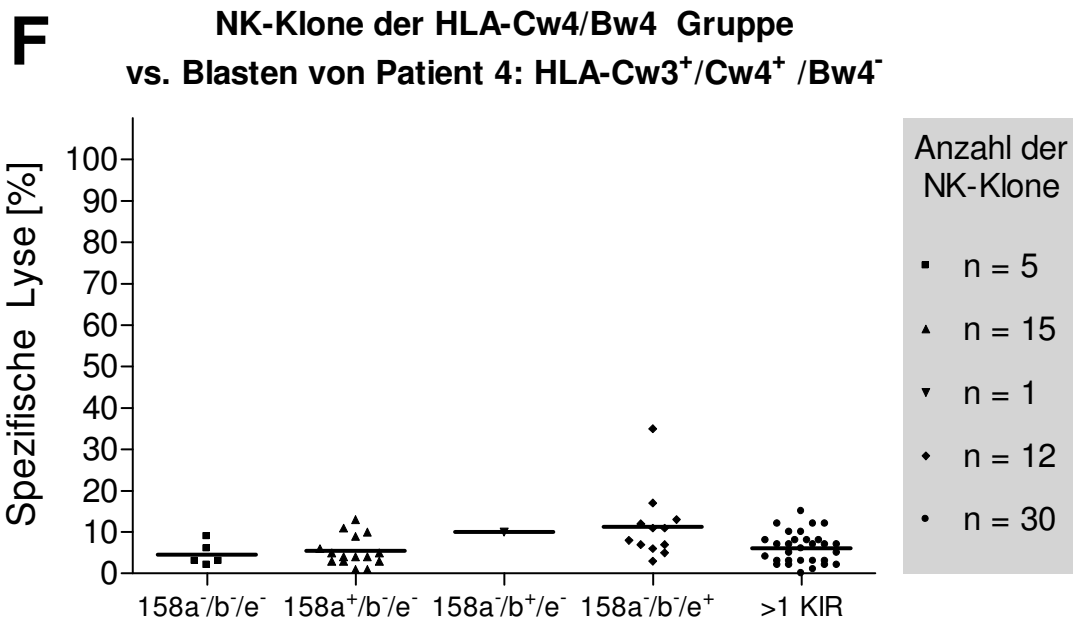


| NK-Klon Phänotyp | KIR ⁻ | CD158a ⁺ | CD158b ⁺ | CD 158e ⁺ | >1 KIR |
|-------------------------|------------------|---------------------|---------------------|----------------------|--------------|
| Mittlere spez. Lyse [%] | 16,88 | 15,75 | 12,31 | 7 | 12,24 |
| SD | 13,33 | 11,41 | 12,02 | - | 9,13 |

E NK-Klone der HLA-Cw4/Bw4 Gruppe vs. Blasten von Patient 3: HLA-Cw3⁺/Bw4⁺



| NK-Klon Phänotyp | KIR ⁻ | CD158a ⁺ | CD158b ⁺ | CD 158e ⁺ | >1 KIR |
|-------------------------|------------------|---------------------|---------------------|----------------------|-------------|
| Mittlere spez. Lyse [%] | 7,25 | - | 10 | - | 4,50 |
| SD | 2,06 | - | - | - | 0,71 |



| NK-Klon Phänotyp | KIR ⁻ | CD158a ⁺ | CD158b ⁺ | CD 158e ⁺ | >1 KIR |
|-------------------------|------------------|---------------------|---------------------|----------------------|-------------|
| Mittlere spez. Lyse [%] | 4,60 | 5,47 | 10 | 11,25 | 6,07 |
| SD | 2,88 | 3,64 | - | 8,43 | 3,80 |

NK-Klone, die gegen Prä-B-ALL Blasten von Patient 1 ausgetestet wurden (Abb. 4.26A+B), zeigten in Abhängigkeit der verschiedenen KIR-Phänotypen signifikante Unterschiede in ihrer zytotoxischen Aktivität. KIR negative Klone übten unabhängig ihres Spender HLA-Typs im Mittel ein signifikant stärkeres Killing aus als Klone mit Expression eines KIR (CD158b und CD158e), dessen Ligand von der Targetzelle exprimiert wurde ($p = <0.001$ bei HLA-Cw3 Spendern, $p = <0.05$ bei HLA-Cw4 Spendern, ungepaarter T-Test).

NK-Klone, die nur den KIR CD158a exprimierten, welcher bei Patient 1 (HLA-Cw3) keinen entsprechenden Liganden binden konnte, wurden in ihrer zytotoxischen Aktivität nicht inhibiert im Vergleich zu CD158b⁺ NK-Klonen, welche Liganden auf den Targetzellen binden konnten. Die Unterschiede der mittleren spezifischen Lyse sind signifikant ($p = 0.01$ bei HLA-Cw3 Spendern, $p = 0.02$ bei HLA-Cw4 Spendern, ungepaarter T-Test).

Es ließ sich also beobachten, dass gegenüber den Prä-B-ALL Blasten von Patient 1 KIR negative NK-Klone und KIR einfach positive NK-Klone mit

Rezeptor-Ligand-Mismatch die höchste zytotoxische Aktivität aufwiesen, wohingegen NK-Klone mit Rezeptoren, die HLA-Cw Liganden auf den Targetzellen erkennen konnten, überwiegend inhibiert wurden.

Bei den NK-Klonen, welche gegen die Prä-B-ALL Blasten von Patient 2 ausgetestet wurden (Abb. 4.26C), stellten sich die Unterschiede nicht so ausgeprägt dar wie bei Patient 1. KIR negative NK-Klone zeigten wiederum eine signifikant höhere Aktivität als KIR einfach positive NK-Klone (CD158b) mit Ligand auf den Targetzellen (HLA-Cw3) ($p = 0.03$, ungepaarter T-Test).

KIR einfach positive NK-Klone (CD158a), die keine Liganden erkennen konnten, übten in diesem Fall aber kein stärkeres Killing aus, und unter den KIR mehrfach positiven NK-Klonen kam es bei einem Drittel der Klone zu einer effektiven Lyse ($> 40\%$) der Blasten.

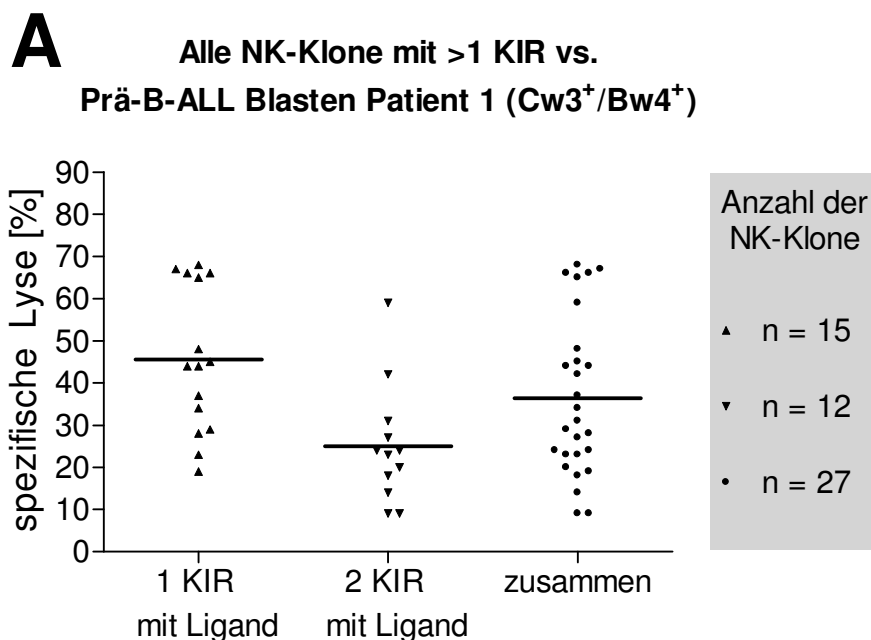
Wie in den Diagrammen E-F ersichtlich wird, zeigten sich bzgl. der spezifischen Aktivität der NK-Klone gegenüber den Prä-B-ALL Blasten von Patient 3 bzw. 4 keine bedeutenswerten Unterschiede mehr.

4.6.5 Zytotoxische Aktivität der mehrfach KIR⁺ NK-Klone

NK-Klone, die auf ihrer Oberfläche verschiedene KIRs exprimierten, konnten folgende Phänotypen aufweisen: CD158a⁺/b⁺/e⁻, CD158a⁺/b⁻/e⁺, CD158a⁻/b⁺/e⁺ und CD158a⁺/b⁺/e⁺.

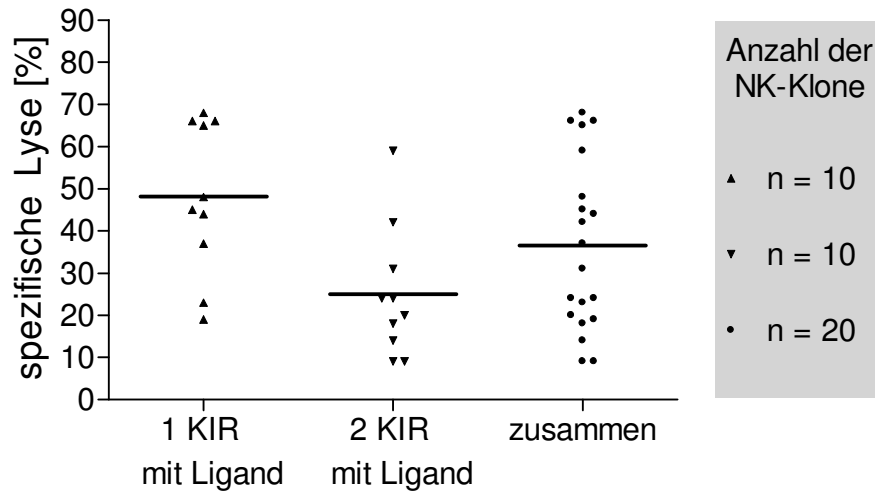
In den Abbildungen 4.27A-C und 4.28 wird gegenüber den Prä-B-ALL Blasten von Patient 1 bzw. 3 die Aktivität der NK-Klone, die auf ihrer Oberfläche nur einen inhibitorischen Rezeptor mit Ligand auf den Targetzellen exprimierten, mit denen verglichen, die zwei Rezeptoren mit entsprechendem Ligand auf den Targetzellen trugen. In beiden Fällen handelt es sich bei den inhibitorischen Rezeptoren um CD158b (Ligand: HLA Cw3) und CD158e (Ligand: HLA-Bw4).

Abb. 4.27A-C: Zytotoxische Aktivität von NK-Klonen mit Expression von einem bzw. zwei inhibitorischen Rezeptoren, die Liganden auf den Targetzellen von Patient 1 binden konnten.



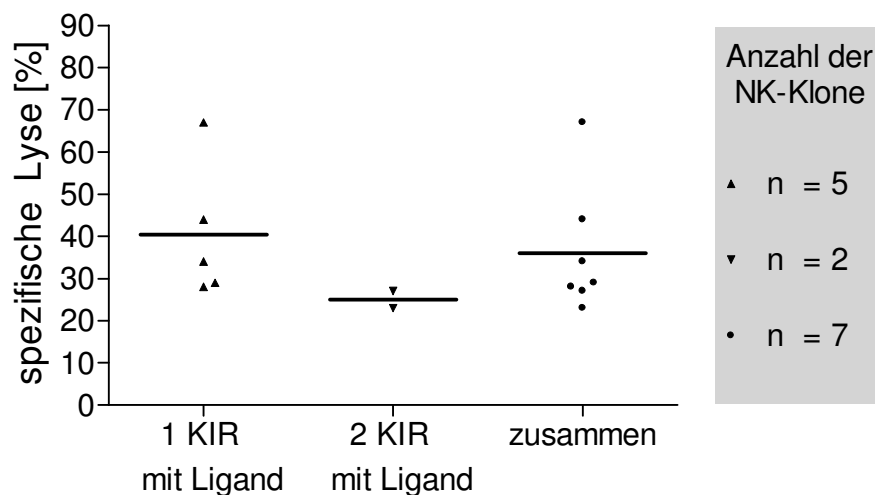
| Alle NK-Klone | 1 KIR mit Ligand | 2 KIR mit Ligand | zusammen |
|-------------------------|------------------|------------------|--------------|
| Mittlere spez. Lyse [%] | 47,43 | 25,00 | 36,41 |
| SD | 16,26 | 14,14 | 18,81 |

B Cw3 NK-Klone mit >1 KIR vs. Prä-B-ALL Blasten Patient 1 (Cw3⁺/Bw4⁺)



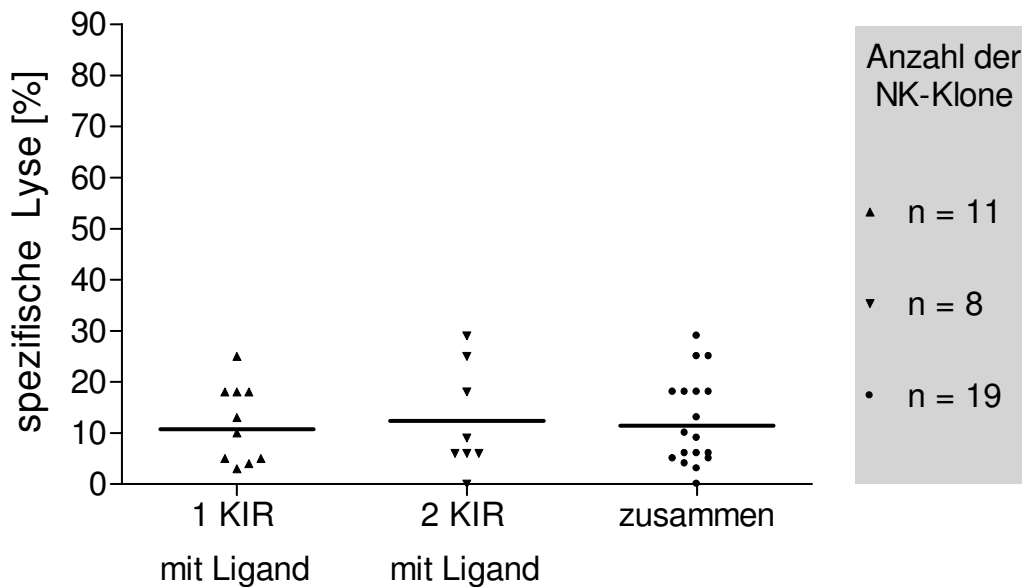
| Cw3 NK-Klone | 1 KIR mit Ligand | 2 KIR mit Ligand | zusammen |
|-------------------------|------------------|------------------|--------------|
| Mittlere spez. Lyse [%] | 48,10 | 25,00 | 36,55 |
| SD | 18,10 | 15,60 | 20,27 |

C Cw4 NK-Klone mit >1 KIR vs. Prä-B-ALL Blasten Patient 1 (Cw3⁺/Bw4⁺)



| Cw4 NK-Klone | 1 KIR mit Ligand | 2 KIR mit Ligand | zusammen |
|-------------------------|------------------|------------------|--------------|
| Mittlere spez. Lyse [%] | 40,40 | 25,00 | 36,00 |
| SD | 16,16 | 2,828 | 15,23 |

**NK-Klone mit >1 KIR vs.
Prä-B-ALL Blasten Patient 3 (Cw3⁺/Bw4⁺)**



| NK-Klone mit >1 KIR | 1 KIR mit Ligand | 2 KIR mit Ligand | zusammen |
|-------------------------|------------------|------------------|--------------|
| Mittlere spez. Lyse [%] | 10,73 | 12,38 | 11,42 |
| SD | 8,22 | 10,38 | 8,95 |

Abb. 4.28: Zytotoxische Aktivität von NK-Klonen mit Expression von einem bzw. zwei inhibitorischen Rezeptoren, die Liganden auf den Targetzellen von Patient 3 binden konnten.

Festzustellen ist, dass gegenüber den Prä-B-ALL Blasten von Patient 1 NK-Klone in ihrer antileukämischen Aktivität am stärksten inhibiert wurden, wenn sie zwei KIRs mit entsprechendem Ligand auf den Targetzellen exprimierten ($p = 0.004$, ungepaarter T-Test; Abb. 4.27A).

Dagegen zeigte sich bei den NK-Klonen, die gegen Prä-B-ALL Blasten von Patient 3 getestet wurden, kein signifikanter Unterschied. Hier wurden NK-Klone, die nur einen KIR mit passendem Ligand auf der Targetzelle trugen, nicht weniger stark inhibiert als NK-Klone mit Expression von zwei KIRs.

4.7 Zytotoxische Aktivität von NK-Klonen haploident transplantiertes pädiatrischer Patienten

Untersuchungen der letzten Jahre konnten eine antileukämische Aktivität und klinische Relevanz von alloreaktiven NK-Zellen bei akuter myeloischer Leukämie (AML) nachweisen, wohingegen sich bei adulten Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) nur wenige Blasten als empfindliche Targets für eine NK-Zell Lyse zeigten.

Es stellte sich die Frage, ob dies auch für pädiatrische ALL-Blasten zutrifft. Somit wurden bei dieser Arbeit auch NK-Klone von transplantierten Patienten angelegt und gegenüber pädiatrischen B-Zell Vorläufer Blasten ausgetestet.

Von einem haploident transplantierten Patienten (Spender 8) wurden NK-Klone generiert und gegen dessen autologe Prä-B-ALL Blasten sowie gleichzeitig gegen die Velardi-Referenzzelllinien B-LCL missing HLA-Cw3, Cw4 und Bw4 ausgetestet (n=14).

Bei der Mutter, die als Stammzellspender diente, wurde keine HLA-Cw-Typisierung durchgeführt, so dass eine Aussage bzgl. der Alloreaktivität aufgrund HLA-Cw-Mismatch nicht gemacht werden kann.

Dennoch ist von Bedeutung, dass NK-Klone identifiziert werden konnten, welche die eigenen Blasten effektiv lysierten. Die Aktivität gegenüber den Referenzzelllinien fiel unterschiedlich aus und zeigte keine Korrelation mit der lytischen Aktivität gegenüber den Prä-B-ALL Blasten (Abb. 4.29).

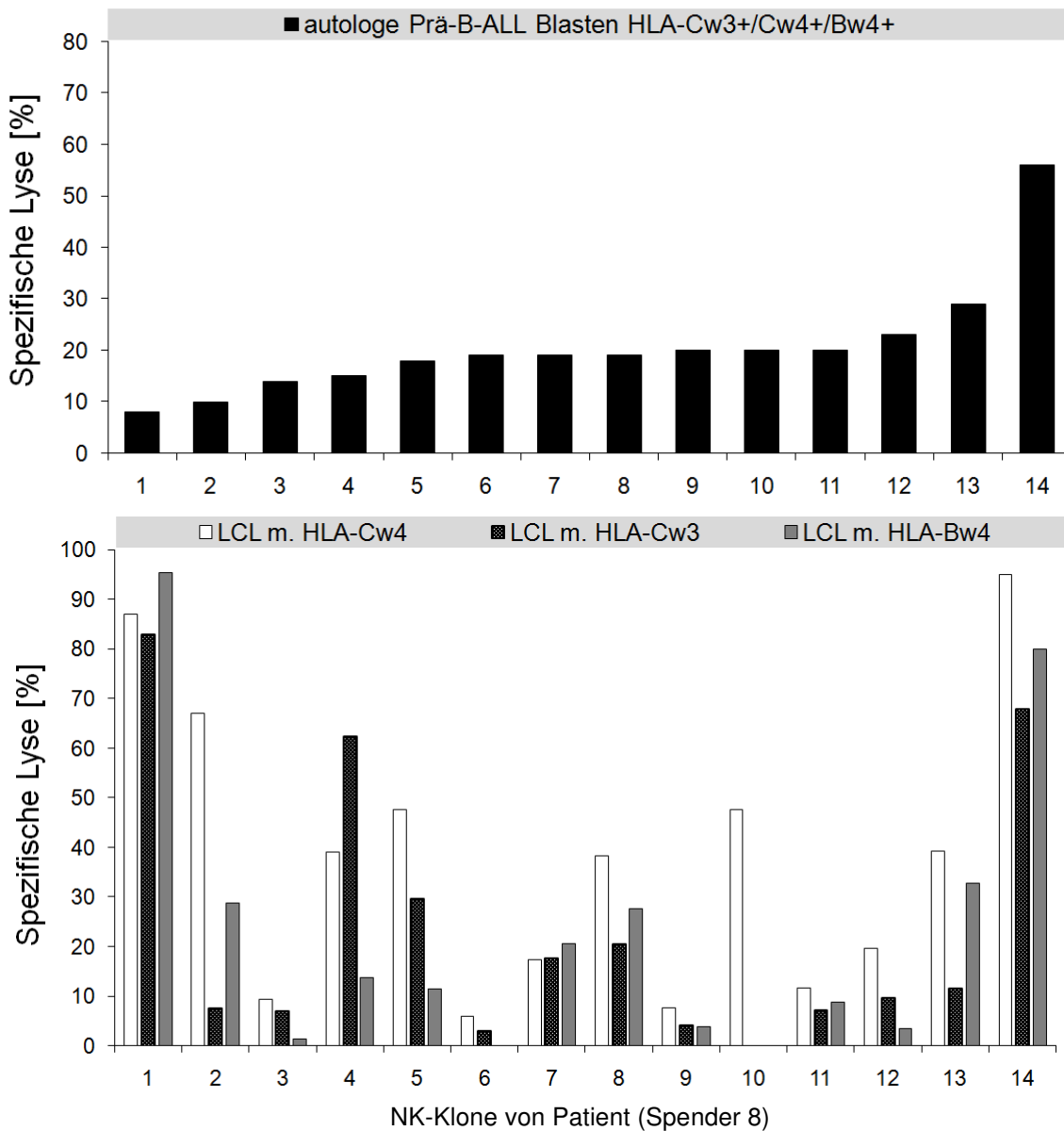


Abb. 4.29: NK-Klone eines haploident transplantierten Patienten (Spender 8). Austestung vs. autologe Prä-B-ALL Blasten (Patient 5, obere Abb.) und vs. B-LCL missing HLA-Cw/-Bw Zelllinien (untere Abb.)

Abb. 4.30A-C zeigt die zytotoxische Aktivität von 26 NK-Klonen eines weiteren pädiatrischen Patienten (Spender 9) nach Transplantation. Da keine autologen Blasten verfügbar waren, wurden diese Klone ersatzweise gegen vergleichbare allogene leukämische Prä-B-ALL Blasten von Patient 2 und 3 sowie gegen die B-LCL missing HLA-Cw Referenzlinien ausgetestet.

Als Positivkontrolle für die NK-Aktivität diene als viertes Target die erythro-leukämische Zelllinie K562 (Abb. 4.30A-C).

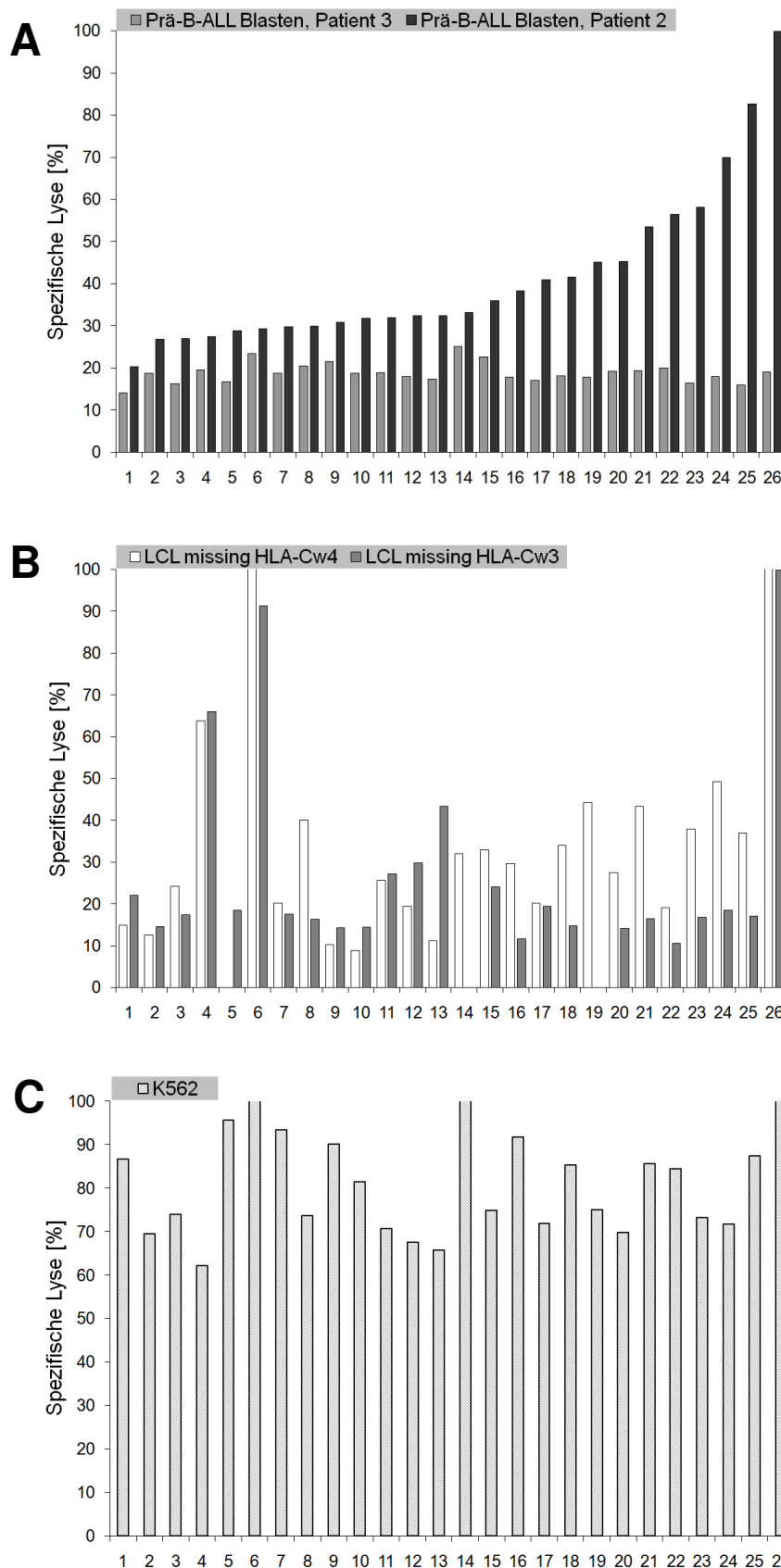


Abb. 4.30:

Screening der allo-reaktiven Aktivität von 26 NK-Klonen einer haploiden transplantierten pädiatrischen Patientin (Spender 7, HLA-Cw3⁺/Cw4⁺/Bw4⁺) mit Prä-B-ALL Blasten von Patient 2 (HLA-Cw3⁺/Cw4⁻/Bw4⁻) und Patient 3 (HLA-Cw3⁺/Cw4⁻/Bw4⁺) (Abb. A), den B-LCL missing HLA-Cw Referenzzelllinien (Abb. B) und als Positivkontrolle für die NK-Aktivität der erythro-leukämischen Zelllinie K562 (Abb. C).

Die NK-Klone sind aufsteigend entsprechend der zytotoxischen Aktivität gegenüber den Blasten von Patient 2 angeordnet.

| Prä-B-ALL Blasten | Patient 2 | Patient 3 |
|--------------------------------|------------------|------------------|
| Minimum | 20 | 14 |
| Median | 32,50 | 16 |
| Maximum | 100 | 25 |
| Mittlere spez. Lyse [%] | 41,42 | 18,73 |
| SD | 18,82 | 2,37 |

Tab. 4.19: Spezifische Lyse [%] der NK-Klone von Spender 9 nach haploidenter Transplantation versus Blasten von Patient 2 und 3 (vgl. Abb. 3.30A)

Bei 38,5% der NK-Klone war gegenüber den Prä-B-ALL Blasten von Patient 2 ein effektives Killing nachweisbar. Die Aktivität gegenüber den Blasten von Patient 3 fiel dagegen signifikant geringer aus ($p = <0.0001$) und es fanden sich keine Klone, welche die Blasten effektiv lysieren konnten.

Die NK-Klone zeigten unterschiedlich starke Aktivität gegen K562 (mittlere Lyse $83,5 \pm 18,04\%SD$), sowie zum Teil auch Alloreaktivität gegenüber den B-LCL missing HLA-Cw Referenzlinien, welche allerdings nicht dem „Missing-self“-Konzept entsprach. LCL missing HLA-Cw4 (mittlere spez. Lyse $34,04 \pm 32\%SD$) wurde dabei besser lysiert als LCL missing HLA-Cw3 (mittlere spez. Lyse $24,31 \pm 25,51\%SD$; $p = 0.03$, gepaarter T-Test), obwohl die umgekehrte Konstellation zu erwarten gewesen wäre, da der Spender-HLA-Typ der NK-Klone der HLA-Cw3 Gruppe entsprach. Eine Korrelation zwischen der lytischen Aktivität gegen Blasten und dem Killing von LCL-Targetzellen war wiederum nicht feststellbar.

In Abb. 4.31 und 4.32 erfolgt die Analyse der NK-Aktivität entsprechend der KIR-Expression der Klone. Dabei lässt sich wie zuvor bei Klonen gesunder Spender (s. 4.6.3) feststellen, dass Blasten von Patient 2 (niedrige HLA-Expression) durch KIR negative NK-Klone besser lysiert wurden als durch NK-Klone mit KIR-Besatz. Bei den Prä-B-ALL Blasten von Patient 3 (hohe HLA-Expression) sind dagegen keine Unterschiede der NK-Aktivität in Korrelation mit dem KIR-Phänotyp nachweisbar.

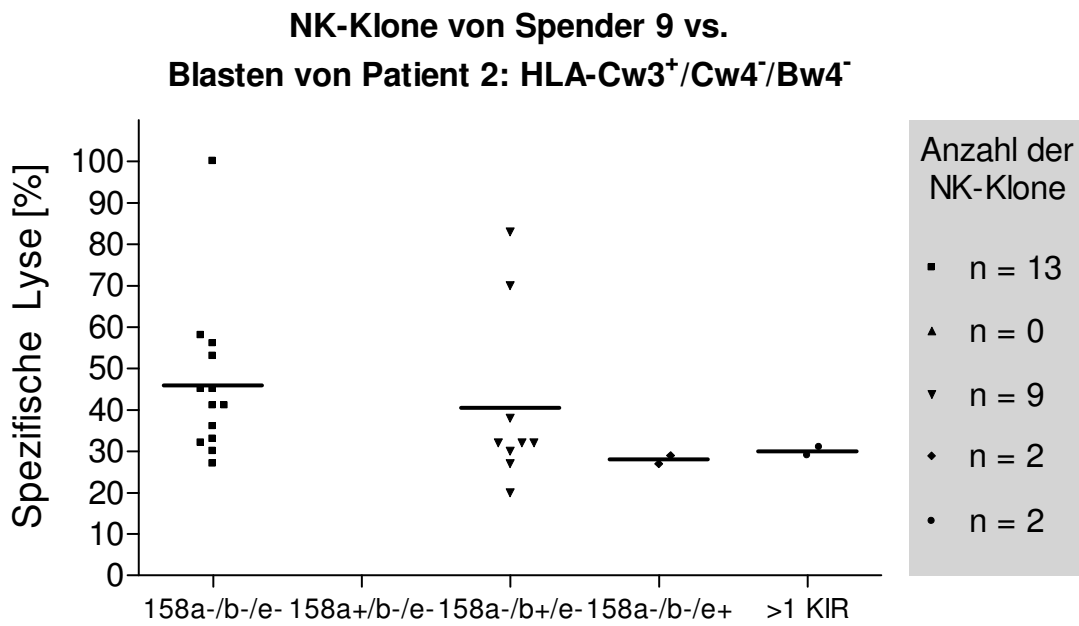


Abb. 4.31: Aktivität von NK-Klonen post haploidenter Transplantation entsprechend ihrem KIR-Phänotyp vs. Prä-B-ALL Blasten von Patient 2.

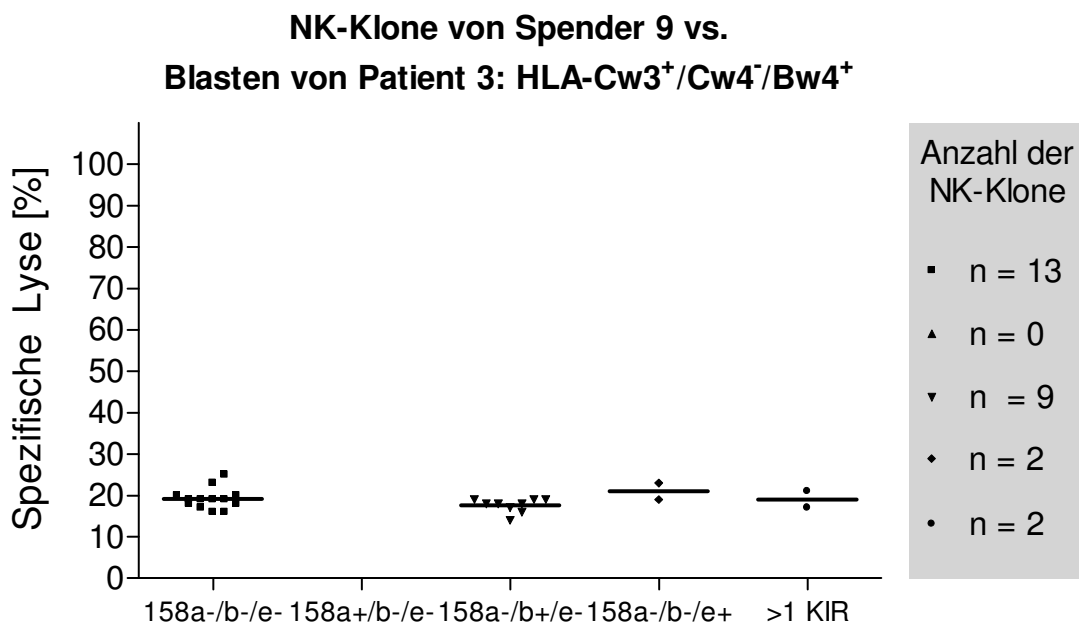


Abb. 4.32: Aktivität von NK-Klonen post haploidenter Transplantation entsprechend ihrem KIR-Phänotyp vs. Prä-B-ALL Blasten von Patient 3.

4.8 Steigerung der NK-Zell-Zytotoxizität

Zur Steigerung der Zytotoxizität von NK-Klonen mit niedriger Aktivität gegen leukämische Blasten wurde zum einen das Verfahren der HLA-Maskierung durch den monoklonalen Antikörper W6/32 und zum anderen das Verfahren der ADCC unter Einsatz verschiedener anti-CD19 Antikörper angewandt.

4.8.1 HLA-Maskierung

Bei NK-Klonen, welche die Blasten von Patient 1 nicht effektiv lysieren konnten, wurde durch die Maskierung der HLA-Klasse I-Moleküle durch den monoklonalen Antikörper W6/32 eine Steigerung der spezifischen Lyse um 27% im Mittel erzielt. In Abb. 4.33 werden fünf getestete Klone mit ihrer entsprechenden KIR-Expression dargestellt. Diese trugen in den meisten Fällen inhibitorische Rezeptoren (CD158b oder CD158e), welche durch Maskierung der HLA-Moleküle keine Liganden auf den Targets binden konnten.

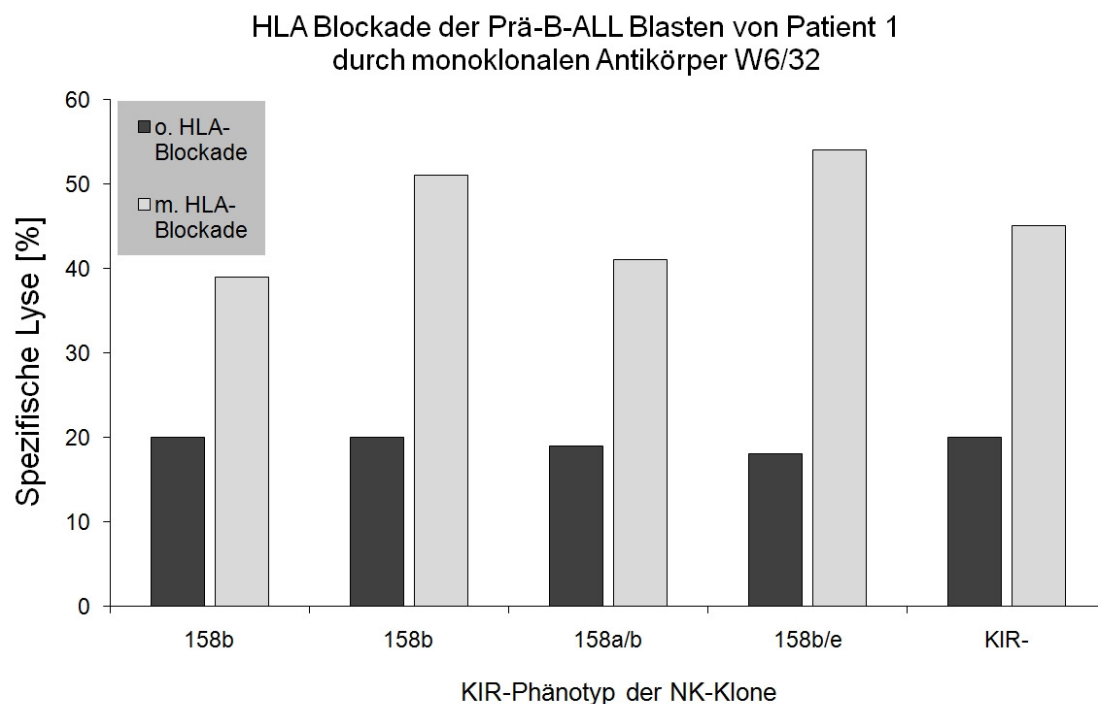


Abb. 4.33: Zytotoxizität von NK-Klonen vor und nach HLA-Blockade der Targetzellen

Abb. 4.34 zeigt die signifikante Steigerung ($p = <0.001$) der NK-Zytotoxizität durch HLA-Maskierung der Prä-B-ALL Blasten in den verschiedenen Titrationsstufen des E:T-Verhältnisses.

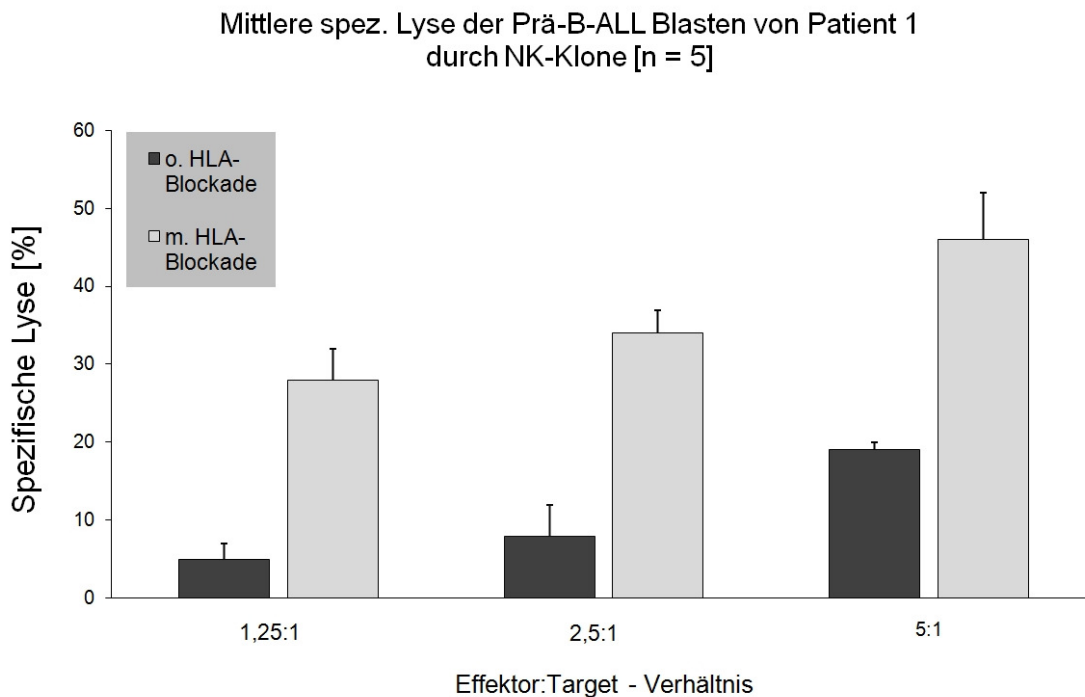


Abb. 4.34: Darstellung der Zytotoxizitätssteigerung von NK-Klonen durch HLA-Maskierung der Blasten in 3 E:T-Titrationsstufen.

4.8.2 ADCC

Eine weitere Möglichkeit zur Steigerung der spezifischen NK-Aktivität stellt die ADCC dar. Dabei wurden zwei verschiedene Antikörper gegen CD19, ein Markerantigen für Leukämien der B-Zelllinie, getestet.

Neun NK-Klone wurden in einem ersten Versuch (Abb. 4.35) gegen Prä-B-ALL Blasten von Patient 1 ohne Antikörper, mit einem CD19 Antikörper aus verschiedenen Maushybridomen, sowie als Positivkontrolle gegen K562 getestet. Bei den NK-Klonen, die eine relativ niedrige Aktivität zeigten, konnte keine bedeutsame Steigerung der spezifischen Lyse beobachtet werden.

NK-Klone [n=9] vs. Prä-B-ALL Blasten von Patient 1

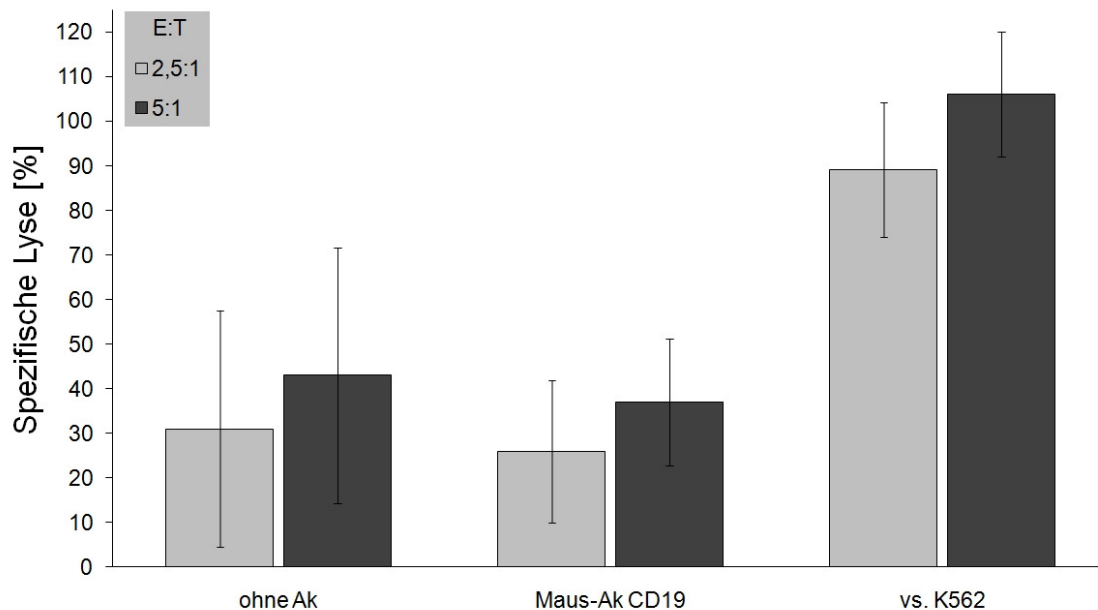


Abb. 4.35: ADCC mit anti-CD19 Ak aus Maushybridomen im Vergleich mit NK-Zytotoxizität ohne Antikörper und als Referenz gegenüber K562

In einem weiteren Versuch mit acht NK-Klonen (Abb. 4.36), wurde die Aktivität der NK-Zellen zusätzlich gegenüber Blasten mit maskierten HLA-Klasse I-Molekülen (durch den Antikörper W6/32, siehe 4.8.3) analysiert, sowie gegenüber Blasten, die mit einem chimären anti-CD19 Antikörper mit humanem Fc-Anteil inkubiert wurden.

Bei den anti-CD19 Maus-Antikörpern konnte wiederum keine ADCC-Kapazität festgestellt werden. Die chimären anti-CD19 Antikörper zeigten dagegen eine signifikante Steigerung der spezifischen Lyse ($p = 0.007$, gepaarter T-Test) im Vergleich zu NK-Klonen, die ohne Ausnutzung der ADCC getestet wurden.

Bei Maskierung der HLA-Moleküle auf den Targets durch den Antikörper W6/32 ließ sich eine weitere Steigerung der spezifischen Lyse beobachten. Im Vergleich zur Austestung der NK-Klone ohne den Einsatz von Antikörpern betrug diese im Mittel 24%.

NK-Klone [n=8] vs. Prä-B-ALL Blasten von Patient 1

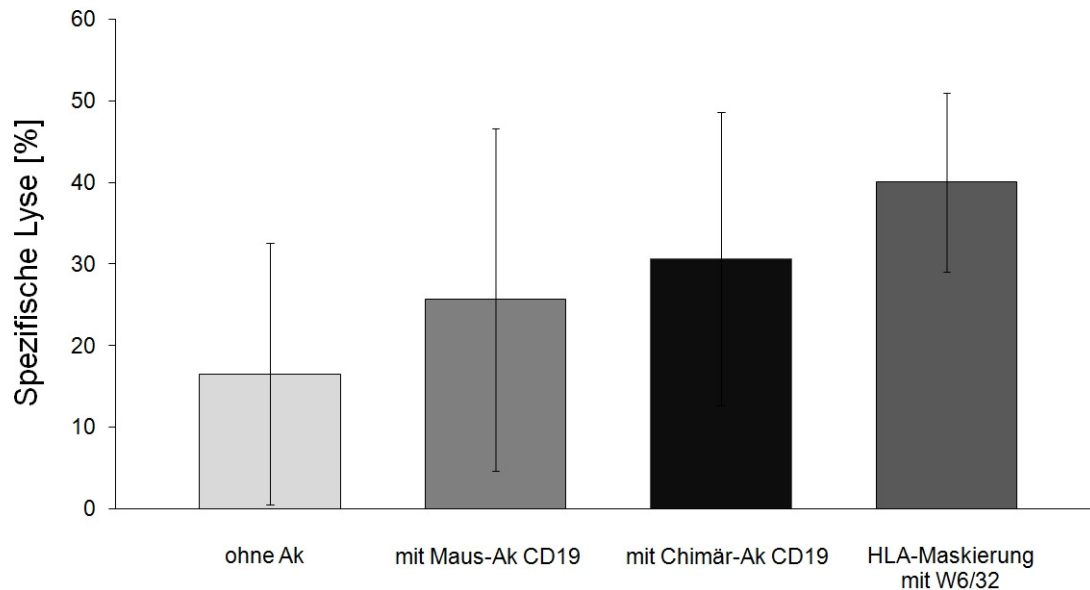


Abb. 4.36: Vergleich der Zytotoxizitätssteigerung bei ADCC mit Maus-Antikörper, chimärem Antikörper, sowie bei HLA-Maskierung mit W6/32

4.9 Weitere Charakterisierung von NK-Klonen mit sehr hoher oder sehr niedriger antileukämischer Aktivität

NK-Klone, die bei funktioneller Austestung gegenüber Prä-B-ALL Blasten eine ausgeprägt hohe oder sehr geringe Aktivität zeigten, wurden vergleichend weiter untersucht, um zusätzliche Einflussfaktoren auf die NK-Alloreaktivität zu identifizieren.

Es erfolgte eine erweiterte immunphänotypische Charakterisierung der NK-Zellen auf KIRs, C-type Lectin Rezeptoren sowie costimulierende Rezeptoren und Adhäsionsmolekülen. In Abb. 4.37 sind zehn ausgewählte NK-Klone von gesunden Spendern dargestellt, die sich zuvor bei Austestung gegenüber HLA-Cw3⁺/Cw4⁻/Bw4⁺ Prä-B-ALL Blasten von Patient 1 entweder durch eine hohe bzw. niedrige lytische Aktivität auszeichneten.

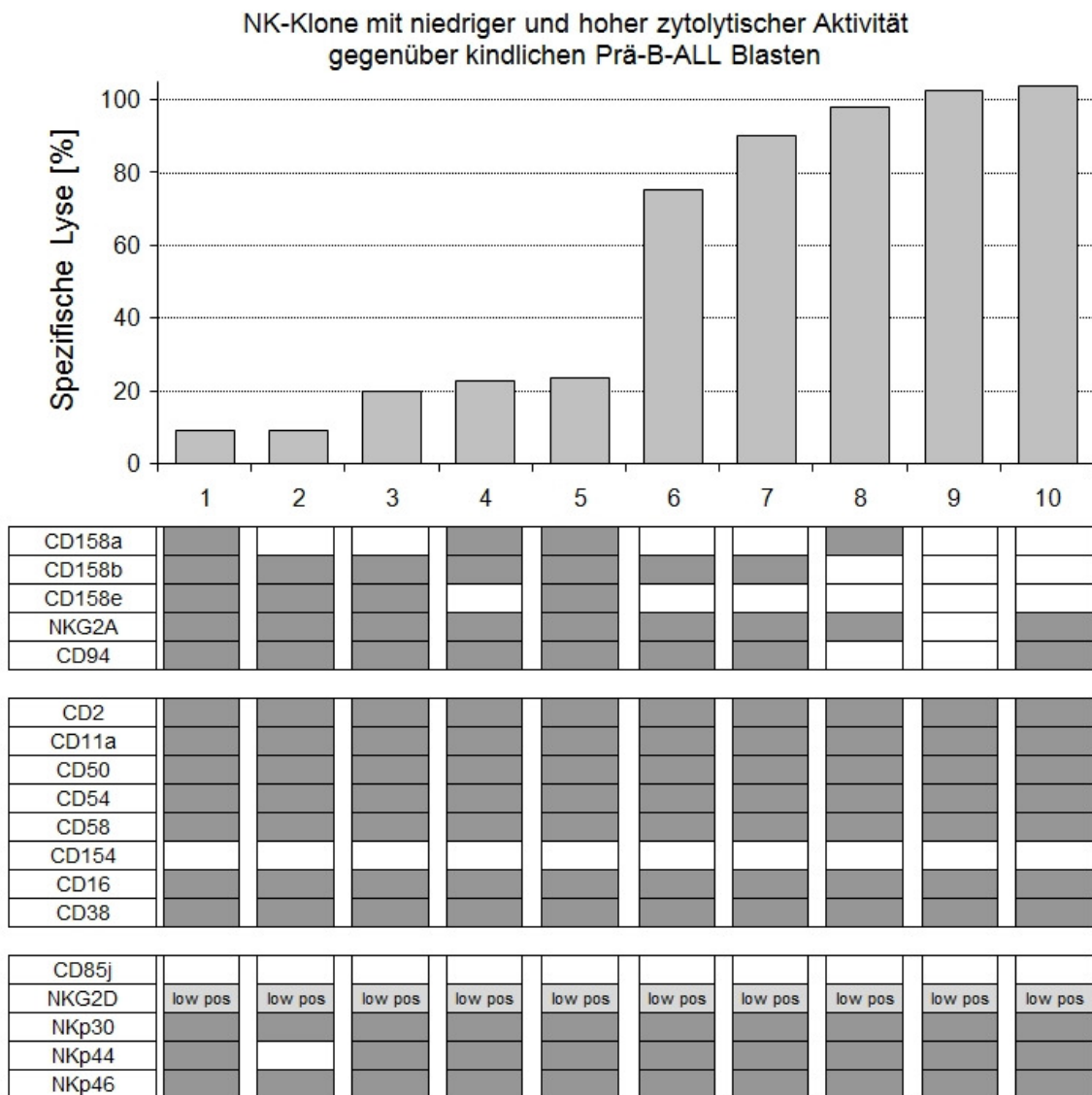


Abb. 4.37: Das Diagramm zeigt zehn ausgewählte NK-Klone, von gesunden Spendern mit entweder ausgeprägt hoher oder sehr niedriger zytolytischer Aktivität gegenüber Prä-B-ALL Blasten von Patient 1. In der Tabelle wird die korrespondierende phänotypische Expression der Zelloberflächenmarker dieser NK-Klone dargestellt. Dunkel unterlegte Felder entsprechen dem Vorhandensein des Markers, leere Felder dem Nichtvorhandensein.

Bezüglich der phänotypischen Expression von Adhäsionsmolekülen und aktivierenden Rezeptoren waren keine bedeutsamen Unterschiede zwischen NK-Klonen mit hoher oder niedriger antileukämischer Aktivität festzustellen.

Dagegen zeigte sich beim KIR-Expressionsmuster, dass NK-Klone mit hoher Aktivität keinen oder nur einen KIR exprimierten, wohingegen sich bei NK-Klonen mit niedriger Aktivität mehrere inhibitorische Rezeptoren auf der Zelloberfläche nachweisen ließen.

5 Diskussion

Die Stammzelltransplantation wurde in den vergangenen Jahren zu einer etablierten Methode zur Behandlung von Hochrisikoleukämien bei Kindern, sowie von Rezidiven. Durch Verfahren der T-Zell Depletion konnte bei Transplantationen mit unverwandten oder nicht HLA-identen Spendern die Gefahr einer GvHD und die damit assoziierte Mortalität deutlich reduziert werden. Allerdings blieb das Auftreten von Rezidiven ein wesentliches Problem nach erfolgreicher Transplantation. Eine zelluläre Immuntherapie nach SZT ist diesbezüglich eine Möglichkeit, die assoziierten Komplikationen zu verringern bzw. zu therapieren. Studien der letzten Jahre konnten dabei für myeloische (78;79) und kürzlich auch für lymphatische Leukämien (8;81) zeigen, dass NK-Zellen potente antileukämische Effektoren darstellen und eine vielversprechende alternative Strategie der adoptiven Immuntherapie bieten.

Diese Arbeit verfolgte das Ziel, alloreaktives Verhalten von NK-Zellen gegenüber kindlichen Prä-B-ALL Blasten auf klonaler Ebene zu analysieren und dabei den Einfluss der KIR-Expression auf die spezifische NK-Aktivität gegenüber den leukämischen Blasten zu untersuchen.

Hierfür wurde zunächst ein Protokoll zur effektiven Klonierung von NK-Zellen gesunder Spender sowie von Patienten nach SZT etabliert. Auf Grundlage des Konzepts der NK-Alloreaktivität von Velardi et al (78) erfolgte anschließend die phänotypische Charakterisierung der NK-Klone mittels FACS-Analyse, sowie die funktionelle Austestung der Klone mit verschiedenen HLA-Klasse I-spezifischen Referenzzelllinien, sowie kryokonservierten Prä-B-ALL Blasten. Damit sollte der Frage nachgegangen werden, ob sich durch Berücksichtigung des KIR-Phänotyps entsprechend dem KIR-Ligand-Mismatch Konzept ein HLA-spezifisches Killing von Vorläuferleukämien der B-Zelllinie vorhersagen lässt. Zudem wurden diejenigen NK-Klone mit sehr guter oder sehr schlechter Aktivität weiterführend untersucht, um zusätzliche Effektoren-bezogene Einflussfaktoren der NK-Alloreaktivität zu identifizieren.

5.1 Methodenkritik

5.1.1 Immunomagnetische Anreicherung von NK-Zellen

Die Anreicherung von NK-Zellen erfolgte aus peripherem Vollblut von gesunden Spendern und Patienten sowie aus Buffy Coats gesunder freiwilliger Spender, die aus der Blutbank Tübingen bezogen wurden. Die Technik beruht auf Antikörper-konjugierten magnetischen Mikropartikeln, die mit entsprechenden Antigenen auf Zelloberflächen spezifische Bindungen eingehen und dadurch die jeweiligen Zellpopulationen in einem starken Magnetfeld auf Trennsäulen zurückhalten können (MACS-System, magnet activated cell sorting). Dies bildet die Grundlage, beliebige Zellpopulationen voneinander zu trennen, bzw. bestimmte Populationen stark anzureichern. Bei der Zwei-Stufen-NK-Zell-Anreicherung mit MACS und Dynabeads ist eine Reinheit der Zellen bis zu > 99% möglich (88;89). Dabei sollen die Vitalität, das Proliferationsverhalten sowie die Zytotoxizität der NK-Zellen durch die Markierung und Separation nicht beeinflusst werden (8;90;91). Beim ersten Schritt der NK-Zell-Anreicherung mit dem MACS-System wurden CD56⁺ T-Zellen mit angereichert. Um diese Zellpopulation zu eliminieren, erfolgte als zweiter Schritt die Depletion mit Dynabeads. Diese Antikörper sind mit einem wesentlich größeren magnetischen Anteil versehen, so dass es möglich war, die damit markierten Zellen in einem schwachen Magnetfeld zu entfernen, das die mit MACS-Beads markierten Zellen nicht beeinflusst. Die zusätzlich notwendigen Waschschriffe durch diesen zweiten Teil der Anreicherung gingen allerdings mit einem Verlust von NK-Zellen einher.

In dieser Studie konnte bei den durchgeführten Zwei-Stufen-NK-Anreicherungen im Mittel eine Reinheit von 94,94% ± 5,02% SD erzielt werden, welche etwas niedriger liegt als in einer vorausgehenden Forschungsarbeit der gleichen Arbeitsgruppe (87). Allerdings wurde nur eine geringe Anzahl an Versuchen mit dieser Methode durchgeführt (n=3).

Der darauf folgende Ansatz zur Gewinnung einer Zellsuspension zur Generierung von NK-Klonen bestand in der indirekten Anreicherung von NK-Zellen durch alleinige Depletion der CD3⁺ Zellen mit MACS-Microbeads. B-Zellen, Monozyten, aber auch NK-Zell-Progenitoren blieben dabei in der Zellsuspension erhalten. Für CD56⁺/CD3⁻ Zellen konnten Reinheiten von bis zu 70% erreicht werden (Mittelwert 37,83% ± 22,65% SD, n = 15). Für den Anteil von CD3⁺ Zellen sollte ein Wert <0,1% erreicht werden, um in der anschließenden Zellkultur ein Wachstum von T- bzw. NK/T-Zellpopulationen zu vermeiden. Das Einhalten dieses Grenzwertes gelang bei 14 von 15 Versuchsansätzen. Im Mittel betrug der prozentuale Anteil an verbliebenen CD3⁺ Zellen nach MACS-Depletion 0,05% ± 0,039% SD.

5.1.2 Generierung von NK-Klonen

Zur Untersuchung von NK-Zellen auf klonaler Ebene wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Velardi, Perugia/Italien, deren Protokoll zur effizienten NK-Klonierung etabliert (78). Wie beschrieben wurden NK-Zellen direkt bzw. indirekt angereichert und nach Erstellung einer Verdünnungsreihe in niedrigen Konzentrationen von 0,75-20 Zellen pro Kavität in 96-Loch-Mikrotiterplatten ausplattiert.

Die Aktivierung der Lymphozyten erfolgte mit Phytohämagglutinin (PHA) und die Zellkultur mit 10%FCS-RPMI Medium, den Interleukinen 2 und 15, sowie bestrahlten allogenen Feederzellen. Der Einfluss von IL-2 und IL-15 auf die Zellreifung, Proliferation, Differenzierung sowie zytotoxische Aktivität von NK-Zellen wurde in anderen Studien bereits hinreichend beschrieben und evaluiert (45;92-95). Ein Problem bei der Generierung von NK-Klonen stellt die Kontamination mit CD3⁺ Zellen und konsekutivem Wachstum von T-Zell bzw. NK/T-Zell Populationen dar. Aus diesem Grund wurde versucht bei der NK-Anreicherung unter dem Grenzwert von 0,1% CD3⁺ Zellen zu bleiben. Vor bzw. nach der funktionellen Austestung der Zellpopulationen wurde weiterhin mittels FACS Analyse ein Wachstum von CD3⁺ Zellen ausgeschlossen.

5.1.3 Zytotoxizitätstests

Zur quantitativen Bestimmung der Targetzelllyse durch Effektorzellen wurde der BATDA-release-assay verwendet. Hier handelt es sich um einen von Blomberg et al beschriebenen und inzwischen gut etablierten Zytotoxizitätstest (85;86), bei dem es sich im Gegensatz zu dem weitverbreiteten ⁵¹Chromfreisetzungstest um eine nicht-radioaktive Methode handelt. Die Vorteile sind in der einfacheren Handhabung, sowie der schnelleren Durchführung zu sehen. Dabei wird die Qualität der Messergebnisse von der spontanen Freisetzung des TDA-Europium-Komplexes (Spontanlyse) beeinträchtigt. Ist der Unterschied zwischen Spontan- und Maximallyse zu gering, müssen Tests wiederholt werden, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Die Spontanlyserate zeigt sich dabei zunächst abhängig vom Zustand der Targetzellen, kann aber auch Targetzell-spezifisch variieren. Von Bedeutung ist deshalb ein schonender Umgang mit den Targetzellen, um die Spontanlyserate unter einem Wert von 30% zu halten. Dieser Grenzwert konnte in den durchgeführten Zytotoxizitätstests bis auf wenige Ausnahmen eingehalten werden.

5.1.4 Durchflusszytometrie

In dieser Studie wurde die Methode der 4-Farben-FACS-Analyse zur immunologischen und morphologischen Phänotypisierung von mononukleären Zellen verwendet. Diese Methode erlaubt die Untersuchung einer großen Zellzahl auf verschiedene Oberflächenantigene in kurzer Zeit und ist in der diagnostischen Routine, sowie wissenschaftlichen Arbeit fest etabliert.

Die Anfärbung der Zellen mit den Farbstoffen FITC, PE, PerCP, sowie APC erfolgte nach standardisierten Protokollen.

5.2 Klonierungseffizienz und Expansion von NK-Klonen

Um antileukämische NK-Aktivität auf klonaler Ebene zu analysieren, sollte eine Methode etabliert werden, welche eine möglichst effiziente Generierung von NK-Populationen erlaubt, die sich von jeweils einer NK-Zelle ableiten und somit den gleichen Phänotyp an Oberflächenmolekülen aufweisen. Zur Gewinnung von NK-Zellen dienten wie beschrieben zwei immunomagnetische Anreicherungsverfahren:

- 1) die Zwei-Stufen-NK-Anreicherung mit MACS (CD56-Anreicherung) und Dynal-Beads (CD3-Depletion)
- 2) und die CD3-Depletion mit MACS-Microbeads

Festzustellen war, dass trotz der niedrigeren Reinheit von CD56⁺ Zellen nach dem indirekten NK-Anreicherungsverfahren durch Depletion von CD3⁺ Zellen, die Ausbeute an NK-Klonen signifikant größer war als nach der Zwei-Stufen-NK-Anreicherung.

Abhängig von der Anzahl ausplattierter Zellen pro Kavität zu Beginn des Kulturansatzes zeigte sich eine Steigerung der Klonierungseffizienz um das 2,5-7,6-fache. Als mögliche Erklärung wäre zum einen die niedrigere Belastung der Zellen durch die schnellere Durchführung des indirekten Anreicherungsverfahrens zu nennen. Zum anderen bleiben beim Depletionsverfahren unreife NK-Zellen sowie NK-Progenitoren in der Zellsuspension erhalten, die sich im Gegensatz zu den reifen NK-Zellen bei der CD56-Positivanreicherung durch eine höhere Proliferationsrate auszeichnen und im Verlauf der Kultivierung und Zytokinstimulation weiter differenzieren und ausreifen könnten.

Die Expansion von gewachsenen NK-Klonen zeigte sich dagegen nicht abhängig von der Methode der NK-Anreicherung. Wie in anderen Studien konnte eine signifikante Expansion der NK-Populationen während den ersten drei Wochen nach Beginn der Zellkultur beobachtet werden (96;97).

Durch Zellkultur in RPMI Medium mit 10% FCS und der regelmäßigen Gabe von IL-2, IL-15, sowie bestrahlten allogenen Feederzellen konnten die NK-Populationen über einen Zeitraum von 30 Tagen um das 4×10^6 -fache expandiert werden. Dies war ausreichend, um wie beabsichtigt die NK-Klone durchflusszytometrisch zu charakterisieren und gegenüber verschiedenen Targetzellen funktionell auszutesten.

Jüngste Untersuchungen von Morris et al weisen darauf hin, dass die Verwendung von SCGM (stem cell growth medium) anstelle von RPMI-Medium bei der Generierung und Expansion von NK-Klonen Vorteile besitzt (98). So konnte im Vergleich der Kulturmedien eine 4-5-fache Zunahme der proliferierenden NK-Klone beobachtet werden. Auch die Verwendung von bestrahlten allogenen PBMC als Feederzellen zeigte im Vergleich zu bisherigen Klonierungsprotokollen, die bestrahlte EBV-LCL Zelllinien verwenden, eine Steigerung der Expansion von NK-Klonen. Dies deckt sich mit den Beobachtungen in dieser Arbeit, da es auch hier unter Verwendung von allogenen PMNC als Feederzellen zu einer länger expandierenden Zellkultur als unter Verwendung der RPMI 8866 Zelllinie kam.

5.3 KIR-Phänotypen der generierten NK-Klone

Funktionelle Untersuchungen von NK-Klonen und die Analyse ihrer Expression von Rezeptoren zeigten, dass NK-Zellen durch inhibitorische Rezeptoren, die autologe HLA-Klasse I-Liganden binden, davon abgehalten werden, gesunde autologe Zellen zu töten (46). Solche Beobachtungen führten zur Aufstellung der Hypothese, dass reife periphere NK-Zellen zumindest einen inhibitorischen NK-Rezeptor für die autologe HLA-Klasse I exprimieren müssen, um Autoaktivität zu verhindern („at-least-one Hypothese“) (99;100).

Obwohl HLA- und KIR-Gene unabhängig voneinander vererbt werden, besitzen die meisten Menschen ein vollständiges Repertoire an Genen für KIRs (killer cell inhibitory receptors), die NK-Zellen inhibieren, wenn sie einen der drei HLA-Klasse I-Liganden binden (HLA-C Allele der Gruppe 1 entsprechen Cw1, 3, 7, 8, 13; HLA-C Allele der Gruppe 2 entsprechen Cw2, 4, 5, 6, 15 und HLA-Bw4 Allele). Gene, die für den Rezeptor CD158b kodieren, welcher Allele der HLA-C-Gruppe 1 bindet, finden sich beim Menschen zu 100%; Gene für CD158a, welcher Allele der HLA-C-Gruppe 2 bindet, zu 97%, und Gene für CD158e, spezifisch für Allele der HLA-Bw4 Gruppe, zu 90% (101-103).

Im Verlauf der Entwicklung des NK-Zell-Rezeptorenrepertoires bestimmt der HLA-Klasse I-Genotyp, welche KIRs als inhibitorische Rezeptoren für die eigene HLA-Klasse I benutzt werden. NK-Zellen ohne inhibitorischen KIR für die eigene HLA-Klasse I exprimieren den inhibitorischen Heterodimer CD94/NKG2A. Diese NK-Zellen sollen nicht alloreaktiv sein, da HLA-E, der Ligand dieses Rezeptors, von Zellen aller Menschen exprimiert wird (10;104). Folglich bestimmt die Expression von Genen für CD94/NKG2A und KIR, sowie der HLA-Klasse I-Genotyp das NK-Zell-Repertoire eines jeden Menschen (99;102;105;106). Da KIRs klonal verteilt sind, ist jede Zelle im Repertoire unterschiedlich besetzt und tritt in unterschiedlicher Häufigkeit auf.

Shilling et al konnte bei einer Studie an 85 Geschwisterpaaren von 36 Familien feststellen, dass der HLA-Klasse I-Genotyp modulatorischen Einfluss auf die Häufigkeit von NK-Zellen mit Expression eines bestimmten KIR nimmt (105). Die Wechselwirkung eines inhibitorischen KIR-Rezeptors mit seinem entsprechenden HLA-Liganden kann dabei zu einer Zunahme der peripheren NK-Zellen mit Expression dieses Rezeptors führen. Bei Untersuchungen in der Japanischen Bevölkerung zeigten Personen der HLA-Cw-1 Gruppe eine höhere Frequenz von NK-Zellen, die den entsprechenden KIR CD158b exprimierten; ebenso verhielt es sich bei Personen der HLA-Cw-2 Gruppe und der HLA-Bw4-Gruppe.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie, bei der 379 NK-Klone von acht gesunden Spendern durch FACS-Analyse ihres KIR-Phänotyps bzgl. den

Rezeptoren CD158a, CD158b und CD158e untersucht wurden, stimmen mit diesen Beobachtungen überein:

Alle Spender gehörten jeweils nur einer HLA-Cw Gruppe an und es zeigte sich eine signifikant größere Häufigkeit an Klonen mit Expression eines inhibitorischen KIR, der die eigene HLA-Klasse I erkennen kann.

Hinsichtlich der Expression von CD158e war kein Unterschied zwischen den Spendern zu erwarten, da alle die Allele der HLA-Bw4 Gruppe exprimierten. Dennoch ließen sich ausgeprägte Unterschiede in der Häufigkeit an NK-Klonen, die den inhibitorischen KIR CD158e trugen, beobachten. Wie bereits erwähnt, fehlt einem gewissen Prozentsatz (ca. 10%) der Menschen Gene, die für diesen KIR kodieren. Dies wäre eine hypothetische Erklärung, da die Spender nur hinsichtlich ihrer HLA-Gruppe, nicht aber auf ihr Repertoire an KIR-Genen untersucht wurden. Außerdem wurde von Pando et al festgestellt, dass es bei den Allelen für CD158e einen gewissen Anteil an Varianten gibt, welche die Expression des Rezeptors an der Zelloberfläche teilweise verhindern. Andere führen dazu, dass die entsprechenden NK-Zellen in niedriger Häufigkeit auftreten (107).

Insgesamt konnte durch die durchflusszytometrische Phänotypisierung hinsichtlich der drei wichtigsten inhibitorischen KIRs (CD158a, CD158b und CD158e) nach dem Konzept der NK-Alloreaktivität von Velardi der modulatorische Einfluss des HLA-Genotyps auf die Häufigkeit von NK-Klonen mit entsprechendem KIR-Besatz gezeigt werden. Diese Tatsache gewinnt an Bedeutung bei der Suche nach einem Spender für allogene SZT. Ruggeri et al sowie Leung et al zeigten, dass Spender, die mit ihren Empfängern bzgl. der HLA-C Gruppe Mismatches hatten, eine ausgeprägte Häufigkeit an NK-Zellen besaßen, die sich gegenüber den Targetzellen des Empfängers alloreaktiv verhielten (79;81). Die hochauflösende HLA-Typisierung hat sich diesbezüglich als guter Prädiktor für NK-Alloreaktivität bei allogener SZT gezeigt, wobei der HLA-Typ offensichtlich über die Zahl der Klone mit entsprechendem KIR, welcher beim Empfänger mit Mismatch keinen Liganden findet, Einfluss nimmt (108).

5.4 Alloreaktivität gegenüber Referenzzelllinien

Von Velardi/Ruggeri et al wurde das Konzept des KIR-Ligand-Mismatches entwickelt, das es erlaubt, eine NK-Alloreaktivität allein auf Grundlage der HLA-B und HLA-C Konstellation von Spender und Empfänger vorherzusagen. Dieses Konzept beruht auf dem Fehlen von HLA-C und -B Allelen beim Empfänger, welche beim Spender vorhanden sind und dessen NK-Zellen hemmen. Berücksichtigt werden nur die KIRs CD158a, CD158b und CD158e, sowie deren zugeordnete HLA-Liganden (79).

Auf der Grundlage dieses Konzepts sollte Alloreaktivität von generierten NK-Klonen zunächst gegenüber Referenzzelllinien durch funktionelle Austestung mit Zytotoxizitätstests nachgewiesen werden. Die Frage war, ob es durch Berücksichtigung des HLA-Typs von Effektor- und Targetzelle und des KIR-Phänotyps der NK-Klone möglich ist, HLA-spezifisches bzw. KIR-spezifisches Killing von B-LCL Zelllinien vorherzusagen und weiterhin, ob sich diese NK-Klone auch gegenüber kindlichen B-ALL Blasten als alloreaktive Effektoren zeigen.

Als Referenzzelllinien dienten B-LCL, die mit Allelen nur einer HLA-Cw Gruppe transfiziert wurden und folglich nur diese exprimierten (HLA-Cw3 und HLA-Cw4 Transfektanten von LCL 721.221), und B-LCL, denen die Expression von Allelen einer HLA-Cw Gruppe fehlten (B-LCL missing HLA-Cw3 und missing HLA-Cw4, zur Verfügung gestellt von A. Velardi, Perugia/Italien). Die Vitalität der Effektoren wurde bei den Versuchen durch gleichzeitige Austestung gegen die erythroleukämische Zelllinie K562, welche als Standard-Target für NK-Zellen gilt, bestimmt. Die mittlere spezifische Lyse lag hierbei zwischen 86% und 100%.

5.4.1 B-LCL Transfektanten

77 NK-Klone von Spendern, die jeweils nur einer HLA-Cw-Gruppe angehörten, wurden gegen B-LCL 721.221, sowie mit HLA-Cw3 Allelen bzw. HLA-Cw4 Allelen transfizierten B-LCL 721.221 funktionell ausgetestet. Dabei zeigte sich die geringste zytotoxische Aktivität der NK-Zellen gegenüber der nicht transfizierten Ausgangszelllinie LCL 721.221, die theoretisch keine HLA-Klasse I-Antigene exprimieren sollte. In einer anderen Studie der Tübinger Arbeitsgruppe wurde gegenüber dieser Zelllinie ebenfalls eine geringe NK-Aktivität beobachtet. Durch Färbung mit dem HLA-Klasse I-bindenden Antikörper W6/32 wurde allerdings festgestellt, dass der eingesetzte LCL 721.221-Klon entgegen den Erwartungen HLA-Klasse I-Antigene exprimierte (109). Dies wäre eine mögliche Erklärung für die unerwartete Hemmung der NK-Aktivität bei der vorliegenden Untersuchung.

Bei NK-Klonen von Spendern, die der HLA-Cw3 Gruppe angehörten, konnte entsprechend dem Mismatch-Konzept eine HLA-spezifische Aktivität nachgewiesen werden: Das Killing der mit den Allelen der anderen HLA-Gruppe (HLA-Cw4) transfizierten B-LCL war durch die ausbleibende Inhibition signifikant größer als gegenüber Transfektanten mit der gleichen HLA-Gruppe (HLA-Cw3) (gepaarter T-Test: $p < 0.0001$).

Bei NK-Klonen von Spendern der HLA-Cw4 Gruppe wäre das entgegengesetzte Aktivitätsmuster zu erwarten gewesen. Allerdings wurden wiederum die LCL-Cw4 stärker lysiert als die mit Allelen der anderen HLA-Gruppe transfizierten LCL-Cw3 (gepaarter T-Test: $p = 0.0012$). Dennoch ist die mittlere spezifische Lyse der Cw3-Transfektanten durch HLA-Cw4⁺ NK-Klone mit 59,2% signifikant höher als die mittlere Lyse durch HLA-Cw3⁺ NK-Klone mit 36,8%.

Im direkten Vergleich der Spendergruppen zeigte sich also bezüglich dem Killing der LCL-Cw3 Zelllinie bei Klonen der anderen HLA-Cw Gruppe erwartungsgemäß ein signifikant stärkeres Killing als bei Klonen der gleichen HLA-Gruppe.

Die Frage bleibt, aus welchem Grund die HLA-Cw4 Transfektanten auch von NK-Klonen der gleichen HLA-Gruppe effektiv lysiert wurden und sich so innerhalb der HLA-Cw4⁺ Spendergruppe kein HLA-spezifisches Killing zeigte.

Mittels FACS-Analyse wurden alle NK-Klone auf ihre Expression der drei relevanten KIRs untersucht und dabei komplett negative bis zu dreifach KIR positive NK-Klone identifiziert. Wiederum zeigten alle Klone die niedrigste Aktivität gegenüber den LCL 721.221 und die höchste gegenüber LCL-Cw4 Transfektanten, gleich welchen KIR-Phänotyp sie exprimierten.

Einfach positive NK-Klone mit Expression des KIR CD158a zeigten im Vergleich der Transfektanten eine diskret stärkere Aktivität gegenüber den LCL-Cw3, die keine entsprechenden HLA-Liganden trugen. Der Unterschied im Killing beider Zelllinien entsprach der Prädiktion des KIR-Ligand-Mismatch Konzepts, war allerdings statistisch nicht signifikant (gepaarter T-Test: $p = 0.4289$). Dagegen konnte bei einfach positiven NK-Klonen mit CD158b ein signifikantes KIR-spezifisches Killing beobachtet werden (gepaarter T-Test: $p = 0.0002$), bei dem die Transfektanten, welche den entsprechenden HLA-Ligand trugen (LCL-Cw3), zu einer Inhibition führten und die Transfektanten ohne HLA-Ligand (LCL-Cw4) gut lysiert wurden.

KIR negative (entsprechend CD158a⁻/b⁻/e⁻) und CD158e einfach positive NK-Klone, welche keine entsprechenden Rezeptoren für die HLA-Liganden auf den Targets exprimierten, zeigten im Mittel hohe Lysewerte gegenüber beiden transfizierten Zelllinien, was dem KIR-Ligand-Mismatch Konzept entspricht und durch eine fehlende Inhibition erklärbar ist.

Insgesamt war festzustellen, dass bei funktioneller Austestung der NK-Klone gegenüber den HLA-Cw3 und HLA-Cw4 Transfektanten teilweise – aber nicht durchgängig – ein HLA- und KIR-spezifisches Killing nach dem KIR-Ligand-Mismatch Konzept nachgewiesen werden konnte. Eine mögliche Ursache dafür ist, wie erwähnt, in der hohen Suszeptibilität der HLA-Cw4 Transfektanten zu sehen, welche evtl. durch einen mangelhaften Zustand der Zelllinie bedingt gewesen sein könnte. Dies lässt sich allerdings durch gute Spontanlysen der

durchgeführten Tests ausschließen. Da die Transfektanten auf ihre HLA-Expression nicht überprüft wurden, könnte eine weitere Erklärung eine abweichenden HLA-Expression der Targetzellen sein, wie sie auch für die LCL 721.221 festgestellt wurde.

5.4.2 B-LCL missing HLA-Cw Zelllinien

Diese von Velardi (Perugia/Italien) zur Verfügung gestellten Referenzzelllinien exprimieren keine HLA-Cw3 bzw. HLA-Cw4 Antigene, so dass sich NK-Zellen, die auf den Targets keinen entsprechenden HLA-Liganden finden, aufgrund der „missing self“-Theorie alloreaktiv verhalten sollten (46).

215 NK-Klone von Spendern der HLA-Cw4 Gruppe und 136 NK-Klone von Spendern der HLA-Cw3 Gruppe wurden gegenüber diesen Targetzellen funktionell ausgetestet. Dabei ließ sich, wenn die Klone nur hinsichtlich des HLA-Typs ihres jeweiligen Spenders beurteilt wurden, ein HLA-spezifisches Killing nachweisen: NK-Klone zeigten gegenüber den Targets mit ihrem fehlenden HLA-Ligand ein signifikant stärkeres Killing als gegenüber den Targets, die Antigene der gleichen HLA-Cw Gruppe exprimierten. Statistische Signifikanz wurde mit gepaartem T-Test ermittelt, da jeder NK-Klon gegen beide Zelllinien parallel ausgetestet wurde (jeweils $p < 0.0001$).

Bei Analyse der NK-Aktivität entsprechend des KIR-Phänotyps der Klone konnte allerdings kein spezifisches Killing nachgewiesen werden. Einfach positive NK-Klone ebenso wie KIR negative und mehrfach positive NK-Klone zeigten keine signifikant unterschiedliche Aktivität gegenüber den „Missing HLA-Cw“ Zelllinien.

Somit war festzustellen, dass die NK-Klone, bei Beurteilung des HLA-Typs ihrer jeweiligen Spender ohne Berücksichtigung der FACS-Analyse ein HLA-spezifisches Killing gegenüber den LCL-Zelllinien zeigten, bei Analyse der KIR-Expression sich allerdings keine ihrem KIR-Besatz entsprechende HLA-spezifische Aktivität nachweisen ließ. Der Frage, ob das Killing dieser Zelllinien

einen prädiktiven Wert für die lytische Aktivität der NK-Klone gegenüber kindlichen ALL Blasten hat, wurde in Versuchen nachgegangen, bei denen Klone parallel gegen ALL Blasten und die Referenzzelllinien ausgetestet wurden (siehe 4.5 und 4.7). Dabei konnten NK-Klone identifiziert werden, die ALL Blasten effektiv lysierten. Im Vergleich mit den Referenzzelllinien zeigte sich aber weder ein signifikanter Unterschied noch eine Korrelation bezüglich der lytischen Aktivität der NK-Klone. Das Killing dieser Zelllinien hatte also keinen prädiktiven Wert für die NK-Aktivität gegenüber den kindlichen ALL Blasten. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass das Konzept der Alloreaktivität auf Grundlage des KIR-Ligand-Mismatch mit den drei wesentlichen inhibitorischen KIRs CD158a, CD158b und CD158e gegenüber pädiatrischen ALL-Blasten nicht ausreichend ist und weitere Einflussfaktoren auf die NK-Aktivität eine Rolle spielen.

5.5 Alloreaktivität gegenüber Prä-B-ALL Blasten

Die Effektivität und klinische Relevanz von NK-Zell vermittelter Zytotoxizität gegenüber lymphatischen Leukämieblasten ist Gegenstand aktueller und kontroverser Diskussion. Während bei Blasten der akuten myeloischen Leukämie (AML) eine signifikante Verminderung der Rezidivrate nach allogener SZT im Erwachsenenalter nachgewiesen werden konnte, zeigte sich in vitro dagegen, dass nur wenige Blasten bei akuter lymphatischer Leukämie (ALL) im Erwachsenenalter gut lysierbare Targets für eine NK-Zell vermittelte Lyse darstellen und somit kein relevanter Vorteil durch das Konzept der KIR-Ligand-Inkompatibilität, wie von Velardi et al beschrieben, beobachtet werden konnte (78-80;110;111). Dennoch lieferten jüngste experimentelle und klinische Studien Hinweise auf GvL-Aktivität von NK-Zellen im Rahmen von kindlicher ALL (8;81). In dieser Studienarbeit lag der Schwerpunkt auf der Untersuchung der Effektorfunktion von NK-Zellen gegenüber der häufigsten pädiatrischen

malignen Erkrankung, der akuten lymphatischen B-Zell Leukämie, die sich von der adulten Leukämie in ihrem klinischen Verlauf, sowie möglicherweise auch in ihrer Biologie unterscheidet. Auf klonaler Ebene wurde gegenüber kindlichen Prä-B-ALL Blasten von vier Patienten das Auftreten antileukämisch aktiver NK-Zellen untersucht und wodurch sich NK-Zellen als gute oder schlechte Effektoren auszeichnen, bzw. welche weiteren Regulationsmechanismen Einfluss auf die Lyse der Targetzellen nehmen (siehe auch 5.6). Bei der funktionellen und phänotypischen Untersuchung von insgesamt 385 NK-Klonen von sieben Spendern gegenüber den kindliche Prä-B-ALL Blasten konnten in dieser Arbeit folgende Beobachtungen gemacht werden:

- 1) Kindliche Prä-B-ALL Blasten mit verminderter HLA-Klasse I-Expression konnten von einem relevanten Anteil der NK-Klone gesunder Spender effektiv lysiert werden, wohingegen Blasten mit erhöhter HLA-Klasse I-Expression keine empfänglichen Targetzellen für eine NK-Zell vermittelte Lyse darstellten.
- 2) NK-Klone, die keinen der drei für das KIR-Ligand-Mismatch Konzept relevanten Rezeptoren exprimierten, zeigten eine signifikant höhere antileukämische Aktivität.
- 3) NK-Klone, die einen KIR exprimierten, welcher eine spezifische Bindung mit dem korrespondierenden Liganden auf der Targetzelle (HLA-C) eingehen konnte, wurden inhibiert. Folglich waren NK-Klone mit hoher lytischer Aktivität phänotypisch als KIR⁻ (CD158a⁻/b⁻/e⁻) charakterisiert oder exprimierten einen KIR, der keinen Liganden auf der Targetzelle binden konnte.
- 4) Der prädiktive Wert des KIR-Expressionsusters bezüglich der antileukämischen NK-Aktivität gegenüber den ALL Blasten gewann mit abnehmender HLA-I Expression der Targetzellen an Bedeutung.
- 5) Alloreaktive NK-Klone von Patienten nach haploidentischer Transplantation konnten identifiziert werden, welche die autologen Prä-B-ALL-Blasten bzw. entsprechende allogene Blasten effektiv lysierten.

In den 90er Jahren wurde bereits ausführlich die Bedeutung der HLA-Klasse I-Expression für die NK-Suszeptibilität diskutiert und beschrieben (50;112;113) und auch in den vorliegenden Versuchen wurde durch HLA-Maskierung mit dem monoklonalen Antikörper W6/32 der Einfluss von HLA-Molekülen auf die Empfindlichkeit von Targetzellen gegenüber NK-Zellen demonstriert. Zuletzt konnte von Pfeiffer et al durch die Untersuchung von B-ALL Blasten verschiedener pädiatrischer Patienten eine deutliche Korrelation zwischen der Intensität von HLA-Klasse I-Expression und dem Grad der NK-Suszeptibilität der Targetzellen nachgewiesen werden (87;114). Die These wurde formuliert, dass die inhibitorischen Rezeptoren für HLA-Klasse I-Allele die NK-Zytotoxizität eher abschwächen, als diese vollständig zu inhibieren, und dass sich die Menge an exprimierten HLA-Molekülen auf den Targetzellen proportional zum Ausmaß der NK-Inhibition verhält (55).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit decken sich mit diesen Beobachtungen darin, dass sich die Intensität der HLA-Klasse I-Expression auf kindlichen Prä-B-ALL Blasten als ein wesentlicher und dominanter Faktor der NK-Suszeptibilität darstellte und erst mit abnehmender HLA-Expression der unterschiedliche KIR-Phänotyp der NK-Zellen Einfluss auf deren antileukämische Aktivität nahm.

NK-Klone ohne Expression einer der drei KIRs bzw. Expression eines KIR ohne entsprechenden HLA-Liganden zeigten dabei wie beschrieben die stärkste antileukämische Aktivität. Solche NK-Populationen wurden nicht nur im Rahmen der Klonierung in vitro beobachtet, sondern auch in der Entwicklung und Reifung von NK-Zellen aus ihren hämatopoetischen Vorläuferzellen in vivo (45). Unter anderem konnte gezeigt werden, dass nach Transplantation von hochangereicherten CD34⁺ Zellen, NK-Zellen aus Progenitoren heranreifen, die während den ersten drei Monaten nach und nach ein spezifisches KIR-Expressionsmuster erwerben (81). In dieser Phase des Rezeptorenerwerbes nach allogener SZT exprimieren Subpopulationen von NK-Zellen keine KIRs und könnten sich aufgrund dessen gegenüber kindlichen B-ALL Blasten - wie bei NK-Klonen gesunder Spender in dieser Arbeit beobachtet - alloreaktiv verhalten.

In Untersuchungen der letzten Jahre wurden solche NK-Populationen, die keine KIRs exprimierten, allerdings auch als funktionell unreif bzw. inaktiv beschrieben (115-117). Auch Cooley et al verweist in einer aktuellen Studie an gesunden Spendern auf eine NK-Subpopulation, welche weder inhibitorische KIRs noch NKG2A exprimieren. Diese NK-Zellen ohne inhibitorische Rezeptoren für die autologe HLA-Klasse I verhielten sich ebenfalls funktionell unreif mit niedriger zytotoxischer Aktivität und IFN- γ Produktion (118). Andererseits konnte nachgewiesen werden, dass der Zustand der funktionellen Inaktivität bei diesen NK-Zellen nicht permanent ist, sondern durch die Interaktion mit proinflammatorischen Zytokinen beeinflusst werden kann (116;119;120).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich NK-Zellen mit fehlenden inhibitorischen KIRs in der allogenen Situation funktionell aktiv verhalten können und sich im Vergleich zu NK-Zellen mit KIRs, die einen korrelierenden HLA-Liganden auf den Targetzellen binden können, als die potenteren Effektoren auszeichneten. Dementsprechend ließ sich auch nachweisen, dass NK-Klone mit Expression mehrerer KIRs, die einen Liganden binden konnten, signifikant stärker inhibiert wurden als NK-Klone, die nur einen KIR exprimierten, welcher eine spezifische Bindung zu einem Liganden auf der Targetzelle eingehen konnte ($p = 0.004$, ungepaarter T-Test).

Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass eine antileukämische Aktivität nach allogener Transplantation durchaus mit den vom Spender abstammenden NK-Zellen korrelieren, die einen KIR-Phänotyp ohne entsprechenden HLA-Liganden aufweisen, da diese NK-Zellen nicht durch die HLA-Umgebung des Empfängers inhibiert werden.

Dies gewinnt Bedeutung bei der Auswahl eines Spenders für eine SZT bzw. beim Einsatz von NK-Zellen als adoptive Immuntherapie. Von Vorteil wäre ein Spender, der die Bedingungen erfüllt, welche die Entwicklung solcher alloreaktiver NK-Zellen im Empfängerorganismus begünstigen.

Allerdings muss wie erwähnt berücksichtigt werden, dass die ausgetesteten NK-Klone in der Phase der Kultivierung und Expansion mit hohen Konzentrationen von IL-2 und auch IL-15 stimuliert wurden und sich somit

anders verhalten könnten, als NK-Zellen in vivo. Weiterhin ist festzustellen, dass das Konzept der Alloreaktivität auf Grundlage der drei wichtigsten KIRs gegenüber pädiatrischen B-ALL Blasten den komplexen Mechanismus der NK-Zell-Lyse und Alloreaktivität stark vereinfacht und andere wesentliche Einflussfaktoren nicht berücksichtigt werden.

In den vergangenen Jahren wurde eine große Zahl an aktivierenden und inhibitorischen Rezeptoren, Adhäsionsmolekülen und Liganden identifiziert, die Einfluss auf das Verhalten der NK-Zellen nehmen. In dieser Arbeit als KIR negativ oder KIR einfach positiv deklarierte NK-Klone exprimieren durchaus weitere Rezeptoren, welche die lytische Aktivität dieser Zellen regulieren, ebenso wie aktivierende Isoformen der KIRs, welche bei den Untersuchungen zunächst nicht berücksichtigt wurden. Hier ist möglicherweise ein Grund zu sehen für die große Streubreite der lytischen Aktivität der NK-Populationen mit identischem KIR-Phänotyp. Weiterführende Untersuchungen an NK-Klonen auch von Patientenspendern sind nötig, um NK-Zell-abhängige ebenso wie Targetzell-abhängige Einflussfaktoren auf die NK-Alloreaktivität zu identifizieren.

Zusammenfassend ergeben sich durch die Untersuchungen dieser Arbeit zusätzliche Erkenntnisse hinsichtlich der potentiellen GvL-Aktivität allogener NK-Zellen gegenüber pädiatrischen B-ALL Blasten. Im Gegensatz zu den Beobachtungen von Ruggeri et al, die bei adulten Patienten mit ALL auf klonaler Ebene keine NK-Aktivität und auch keine klinische Relevanz des NK-Systems fanden, konnte gezeigt werden, dass verschiedene NK-Klone durchaus in der Lage waren, Prä-B-ALL Blasten effektiv zu lysieren und dass eine verminderte Expression inhibitorischer KIRs bzw. die Expression von KIRs ohne entsprechenden Ligand auf den Targetzellen die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen beeinflussen. Die Analyse der unterschiedlichen KIR-Expression der NK-Klone korrelierte mit deren lytischer Aktivität gegenüber den Leukämieblasten und war unter Berücksichtigung der HLA-Klasse I-Expression der Targetzellen von prädiktiver Bedeutung.

5.6 Good Killer und Bad Killer

Die Bindung von NK-Zellen an Targetzellen erfolgt mittels Adhäsionsmolekülen (CAMs), welche eine Voraussetzung für deren Lyse darstellen und über die Bindung auch stimulatorische Signale zur Aktivierung der Effektorzellen liefern (121). Nach Adhäsion der Targetzelle wird die NK-Aktivität durch ein Zusammenspiel an Signalen von verschiedenen aktivierenden, costimulatorischen und inhibitorischen Rezeptoren reguliert (55).

Die Untersuchung der NK-Alloreaktivität gegenüber den Referenzzelllinien und den verschiedenen kindlichen Prä-B-ALL Blasten erfolgte auf Grundlage des KIR-Ligand-Mismatch Konzepts von Velardi et al, welches aber durch die starke Vereinfachung des komplexen Regulationsmechanismus der NK-Aktivität keine ausreichende Erklärung für das z.T. unterschiedliche Verhalten der NK-Zellen lieferte.

Durch ein erweitertes durchflusszytometrisches Screening sollte der Frage nachgegangen werden, was „Goodkiller“-Klone von „Badkiller“-Klonen unterscheidet, um so weitere Effektoren-bezogene Einflussfaktoren auf die NK-Aktivität gegenüber B-ALL Blasten zu identifizieren.

Dabei zeigten sich bezüglich der Expression der untersuchten Adhäsionsmoleküle und aktivierender, sowie costimulierender Rezeptoren keine signifikanten Unterschiede. Nur beim KIR-Phänotyp war wiederum eine Korrelation zu beobachten zwischen mehrfacher Expression von KIRs und schlechter Aktivität (Bad Killer), sowie Expression nur eines oder gar keines KIR und guter Aktivität (Good Killer).

Über die Bedeutung und den Einfluss von Adhäsionsmolekülen, sowie costimulatorischer Moleküle und aktivierender Rezeptoren wurde bereits in den vergangenen Jahren kontrovers diskutiert und verschiedene Studien kamen z.T. zu heterogenen Ergebnissen, was u.a. dadurch erklärbar ist, dass für unterschiedliche Targetzellen verschiedene Signale eine wichtige Bedeutung für die NK-Suszeptibilität haben. Von Pfeiffer wurde wie bereits erwähnt auf die

dominante Rolle der HLA-Klasse I-Expression bzgl. der NK-Suszeptibilität bei Prä-B-ALL Blasten hingewiesen (114) und Romanski et al machte durch Untersuchungen mit der NK-Zelllinie NK-92 die Beobachtung, dass bei der Resistenz von ALL Blasten gegenüber NK-Zellen ein Zusammenhang mit der verminderten Expression von Liganden für aktivierende NCRs besteht (111). Zuletzt wurde die „Missing-self“ Hypothese (46) als Grundlage der NK-Aktivität deshalb dahingehend modifiziert, dass NK-Zellen solche Zellen angreifen, bei denen die Expression von HLA-Klasse I-Molekülen vermindert ist oder die vermehrt Liganden für aktivierende NK-Rezeptoren exprimieren (55).

Bei der vorliegenden Untersuchung ist einschränkend zu sagen, dass der Einfluss der untersuchten Moleküle nicht direkt z.B. durch Blockade mit einem Antikörper untersucht wurde, sondern lediglich, ob eine Korrelation zwischen der spezifischen Lysierbarkeit der Blasten durch NK-Klone und die durchflusszytometrisch bestimmte Expression verschiedener Moleküle auf den Effektoren vorliegt. Targetzellbezogene Faktoren und auch aktivierende Isoformen der KIRs auf den NK-Zellen wurden nicht berücksichtigt.

Es konnte aber durch dieses erweiterte Screening auf klonaler Ebene belegt werden, dass die Expression von KIRs und die KIR-Ligand-Inkompatibilität bei der kindlichen Prä-B-ALL Relevanz besitzt und wesentlichen Einfluss auf die Alloreaktivität von NK-Zellen gegenüber leukämischen Blasten nimmt.

5.7 Steigerung der NK-Zell-Zytotoxizität

Die Inkubation der Targetzellen mit dem monoklonalen Antikörper W6/32 führte ebenso wie bei Inkubation mit einem chimären anti-CD19 Antikörper mit humanem Fc-Anteil zu einer Steigerung der antileukämischen Aktivität, selbst bei NK-Klonen, die bei initialer Austestung keine effektive Targetzelllyse zeigten.

Während der Einsatz des Antikörpers W6/32 zu einer Maskierung der HLA-Klasse I-Moleküle auf der Targetzelle führt und somit keine Inhibierung der NK-Zellen durch KIRs erfolgen kann, wurde durch den Einsatz des anti-CD19 Antikörpers der Einfluss der ADCC auf die NK-Aktivität getestet.

Verantwortlich für den Mechanismus der ADCC ist der niedrigaffine Fc-Rezeptor Fc γ RIII (CD16) der NK-Zellen, welcher mit einem entsprechenden Antikörper beladene Targetzellen binden und zu einer Lyse führen kann, auch bei einer eventuell vorhandenen KIR-Hemmung durch HLA-Expression.

Dabei zeigte sich in den durchgeführten Untersuchungen, dass der humanisierte chimäre CD19-Antikörper dem Maus-anti-human CD19 Antikörper überlegen war und höhere Targetzelllysen auch gegenüber B-ALL Blasten mit hoher HLA-Expression und damit geringer NK-Suszeptibilität ermöglichte.

Diese Beobachtungen stehen in Einklang mit weiteren Forschungsergebnissen der Tübinger Arbeitsgruppe in den letzten Jahren, bei denen verschiedene anti-CD19 und anti-CD20 Antikörper in vitro gegenüber Blasten von Leukämien der B-Zelllinie ausgetestet wurden und sich dabei der humanisierte CD19 Antikörper gegenüber verschiedenen anti-CD19 und anti-CD20 Antikörpern aus Maushybridomen als deutlich überlegen herausstellte (122). Durch den Einsatz dieses Antikörpers kann unter Ausnutzung der ADCC die Lyse von leukämischen Blasten effektiv gesteigert werden und auch über HLA-Klasse I-Moleküle vermittelte Einflüsse inhibitorischer Rezeptoren überwunden werden.

Die Verwendung des humanisierten CD19 Antikörpers könnte somit in Kombination mit NK-Zell-Gabe und Zytokinstimulation eine Möglichkeit der Immuntherapie bei Leukämien der B-Zell-Reihe darstellen und unmittelbar nach Transplantation als Baustein für die Behandlung einer „Minimal residual disease“ (MRD) und somit zur Verringerung des Risikos eines Rezidivs eingesetzt werden. Weiterführende Studien sind diesbezüglich nötig, um den Einfluss und die Rolle der ADCC als Therapieoption bei lymphatischen Leukämien im Kindesalter in vivo zu evaluieren.

5.8 Perspektiven für die klinische Anwendung von alloreaktiven NK-Zellen

Infektionen, das Auftreten eines Rezidivs, Transplantatabstoßung, sowie die Ausbildung einer GvHD sind weiterhin ernst zu nehmende Komplikationen einer allogenen Stammzelltransplantation. Bei der kindlichen ALL stellt das Rezidiv eine Haupttodesursache dar. Daher wird nach Möglichkeiten der adoptiven Immuntherapie bei SZT geforscht, welche eine Prävention bzw. Therapie dieser Komplikationen bieten.

Auf T-Zellen basierende Donor leukocyte infusions (DLI) stellen bei HLA-nicht-identischen Spendern ein massives und äußerst schlecht kalkulierbares GvHD-Risiko dar (5;123). Zudem erwies sich ihr Nutzen bei lymphatischen Leukämien als begrenzt.

Eine Alternative besteht in der Infusion von aufgereinigten Spender NK-Zellen. Im Gegensatz zu T-Zellen verursachen NK-Zellen keine GvHD, sondern führen über die Eliminierung antigenpräsentierender Zellen beim Empfänger sogar zu einer Verringerung des GvHD-Risikos (79;124).

Untersuchungen von Leung et al am Mausmodell zeigten, dass aufgereinigte Spender NK-Zellen, die zur adoptiven Immuntherapie eingesetzt wurden, ausgeprägte proliferative sowie antileukämische Eigenschaften besaßen ohne dabei aber eine GvHD zu verursachen (8). Ebenso konnte Miller et al bei AML Patienten beobachten, dass sich NK-Zellen haploidenter Spender erfolgreich transferieren ließen und es sowohl zu einer in vivo Expansion der NK-Zellen, als auch zu einem positiven Effekt bzgl. der Remissionsrate unter den Patienten kam (9).

In dieser Arbeit konnte auf klonaler Ebene gezeigt werden, dass sich auch gegenüber kindlichen Prä-B-ALL Blasten NK-Zellen mit hoher spezifischer Aktivität identifizieren und in vitro expandieren lassen. Dabei zeichneten sich

v.a. NK-Klone mit KIR negativem oder KIR-Ligand inkompatiblen Phänotyp als potente Effektoren aus. Solche NK-Populationen könnten als adoptive Immuntherapie zu einem frühen Zeitpunkt nach einer Stammzelltransplantation dienen oder aber auch im Rahmen von Konditionierungsprotokollen eingesetzt werden, um den GvL Effekt und das Engraftment der Stammzellen zu unterstützen, sowie einer T-Zell vermittelten GvHD vorzubeugen (125;126).

6 Zusammenfassung

In den vergangenen Jahren gewann das NK-Zell-System im Rahmen der allogenen SZT zunehmend an Bedeutung. Bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) konnte zunächst gezeigt werden, dass NK-Alloreaktivität im Sinne eines Killerzell-Immunoglobulin-Rezeptor(KIR)-Ligand Mismatch zu einer deutlichen Verminderung der Rezidivrate nach haploidenter SZT führte. Ein vergleichbarer vorteilhafter Effekt konnte dagegen bei lymphatischen Leukämien im Erwachsenenalter nicht beobachtet werden (78;79). Dies wurde damit begründet, dass ALL Blasten keine empfindlichen Targets für NK-Zellen darstellen. Allerdings geben neue experimentelle und klinische Untersuchungen Hinweise auf antileukämische Aktivität (GvL) von NK-Zellen gegenüber pädiatrischen B-ALL Blasten (8;81).

Diese Arbeit verfolgte das Ziel, auf klonaler Ebene Populationen von NK-Zellen zu identifizieren, die sich gegenüber Prä-B-ALL Blasten (der häufigsten malignen Erkrankung im Kindesalter und der Adoleszenz) alloreaktiv verhalten und hinsichtlich relevanter Einflussfaktoren auf die antileukämische Aktivität zu untersuchen.

Zunächst wurde ein Protokoll zur effizienten Klonierung und Expansion von NK-Zellen aus Blut von gesunden Spendern sowie pädiatrischen ALL-Patienten nach allogener SZT etabliert. Das indirekte NK-Anreicherungsverfahren der CD3-Depletion mit MACS-Microbeads erbrachte dabei eine bis zu 7,6-fache Steigerung der Klonausbeute im Vergleich zur Zwei-Stufen-NK-Anreicherung.

In der Zellkultur wurde unter Stimulation mit PHA, den Zytokinen IL-2 und IL-15, sowie durch Einsatz von bestrahlten allogenen PMNC als Feederzellen in einem Zeitraum von 30 Tagen eine Expansion bis über das 4×10^6 -fache erreicht.

Dies erlaubte die immunphänotypische Charakterisierung sowie funktionelle Untersuchung einer großen Anzahl von NK-Klonen gesunder Spender und Patienten nach SZT.

Auf der Grundlage des Konzepts der NK-Alloreaktivität von Velardi et al (78;127) wurden Spender ausgewählt, die entweder der HLA-Cw3 oder HLA-Cw4 Gruppe angehörten. Alle Spender trugen Allele der HLA-Bw4 Gruppe. Durchflusszytometrisch wurden die relevanten KIRs CD158a, CD158b und CD158e bestimmt. Dabei zeigte sich, dass bei allen Spendern ganz überwiegend derjenige KIR auf den NK-Klonen exprimiert wurde, der jeweils den eigenen HLA-Typ erkennt und davon gehemmt wird.

Zur Evaluierung des Mismatch Konzepts wurden NK-Klone zunächst gegen HLA-Cw transfizierte LCL 721.221, sowie gegen von Velardi et al zur Verfügung gestellte Referenzzelllinien (B-LCL missing Cw3, missing Cw4, missing Bw4) ausgetestet. Während es bei Verwendung der Transfektanten zu heterogenen Ergebnissen kam, konnte bei den B-LCL missing HLA-Cw Zelllinien ein HLA-spezifisches Killing nachgewiesen werden ($p = <0.0001$).

Dies ließ sich wiederum bei den Versuchen gegenüber kryokonservierten Prä-B-ALL Blasten nicht beobachten. Die Aktivität der NK-Klone war unabhängig von ihrem Spender HLA-Typ und auch das alloreaktive Verhaltensmuster gegenüber den Referenzzelllinien besaß keinen prädiktiven Wert für die Zyotoxizität gegenüber den Blasten.

Es konnte aber auf klonaler Ebene belegt werden, dass sowohl bei gesunden Spendern, als auch bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation NK-Zellen existierten, welche die kindlichen Prä-B-ALL Blasten effektiv lysierten.

In den durchgeführten Versuchen wurde eine Korrelation der unterschiedlichen antileukämischen NK-Aktivität mit dem KIR-Expressionsmuster der Klone aufgezeigt. NK-Klone mit hoher zytotoxischer Aktivität waren hauptsächlich dadurch gekennzeichnet, dass sie entweder keinen der drei KIRs exprimierten oder nur einen KIR, welcher den HLA-Liganden der Targetzelle nicht binden konnte. Entsprechend zeigte sich bei NK-Klonen mit Expression von einem oder mehreren KIRs mit korrespondierendem HLA-Ligand auf den Targets eine zunehmende Inhibition der antileukämischen Aktivität.

Weiterhin konnte festgestellt werden, dass der Einfluss des KIR-Phänotyps auf das alloreaktive Verhalten der NK-Zellen mit dem Ausmaß der Expression von HLA-Klasse I-Molekülen auf den Targetzellen in Zusammenhang steht.

Verminderte HLA-Klasse I-Level der Prä-B-ALL Blasten führten zu einer erhöhten NK-Suszeptibilität und zu einem größeren Einfluss der unterschiedlichen KIR-Expressionsmuster auf die NK-Aktivität.

Schließlich wurde ein erweitertes durchflusszytometrisches Screening von NK-Klonen mit sehr hoher und sehr niedriger Aktivität durchgeführt, um den Einfluss von Adhäsionsmolekülen, aktivierenden und costimulatorischen, sowie weiteren inhibitorischen Rezeptoren zu untersuchen. Zwischen beiden Gruppen waren keine wesentlichen Unterschiede festzustellen, was den vorherrschenden Einfluss der KIR-Expression auf die Lyse der Prä-B-ALL Blasten unterstützte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen auf klonaler Ebene das Vorkommen antileukämischer NK-Zellen gegenüber kindlichen Prä-B-ALL Blasten und weisen darauf hin, dass das KIR-Expressionsmuster Einfluss auf deren lytische Aktivität nimmt und eine Vorhersage für alloreaktives Verhalten ermöglicht.

Dies ist von Bedeutung für das weitere Verständnis der NK-Zell vermittelten Graft versus Leukemia (GvL) Reaktion bei allogener SZT von Kindern mit B-Zell Leukämien, ebenso wie für den alternativen Einsatz von alloreaktiven NK-Zellen im Rahmen einer adoptiven Immuntherapie.

7 Literaturverzeichnis

1. Ottinger, H. D., Muller, C. R., Goldmann, S. F., Albert, E., Arnold, R., Beelen, D. W., Blasczyk, R., Bunjes, D., Casper, J., Ebell, W., Ehninger, G., Eiermann, T., Einsele, H., Fauser, A., Ferencik, S., Finke, J., Hertenstein, B., Heyll, A., Klingebiel, T., Knipper, A., Kremens, B., Kolb, H. J., Kolbe, K., Lenartz, E., Lindemann, M., Muller, C. A., Mytilineos, J., Niederwieser, D., Runde, V., Sayer, H., Schaefer, U. W., Schmitz, N., Schroder, S., Schulze-Rath, R., Schwerdtfeger, R., Siegert, W., Thiele, B., Zander, A. R., and Grosse-Wilde, H. Second German Consensus on Immunogenetic Donor Search for Allogeneic Transplantation of Hematopoietic Stem Cells. *Ann.Hematol.* 2001;80(12):706-14.
2. Anasetti, C., Beatty, P. G., Storb, R., Martin, P. J., Mori, M., Sanders, J. E., Thomas, E. D., and Hansen, J. A. Effect of HLA Incompatibility on Graft-Versus-Host Disease, Relapse, and Survival After Marrow Transplantation for Patients With Leukemia or Lymphoma. *Hum.Immunol.* 1990;29(2):79-91.
3. Sullivan, K. M., Deeg, H. J., Sanders, J., Klosterman, A., Amos, D., Shulman, H., Sale, G., Martin, P., Witherspoon, R., Appelbaum, F., and . Hyperacute Graft-v-Host Disease in Patients Not Given Immunosuppression After Allogeneic Marrow Transplantation. *Blood* 1986;67(4):1172-5.
4. Aversa, F., Tabilio, A., Terenzi, A., Velardi, A., Falzetti, F., Giannoni, C., Iacucci, R., Zei, T., Martelli, M. P., Gambelunghe, C., and . Successful Engraftment of T-Cell-Depleted Haploidentical "Three-Loci" Incompatible Transplants in Leukemia Patients by Addition of Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor-Mobilized Peripheral Blood Progenitor Cells to Bone Marrow Inoculum. *Blood* 1-12-1994;84(11):3948-55.
5. Aversa, F., Tabilio, A., Velardi, A., Cunningham, I., Terenzi, A., Falzetti, F., Ruggeri, L., Barbabietola, G., Aristei, C., Latini, P., Reisner, Y., and Martelli, M. F. Treatment of High-Risk Acute Leukemia With T-Cell-Depleted Stem Cells From Related Donors With One Fully Mismatched HLA Haplotype. *N.Engl.J.Med.* 22-10-1998;339(17):1186-93.
6. Handgretinger, R., Schumm, M., Lang, P., Greil, J., Reiter, A., Bader, P., Niethammer, D., and Klingebiel, T. Transplantation of Megadoses of Purified Haploidentical Stem Cells. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 30-4-1999;872:351-61.

7. Handgretinger, R., Klingebiel, T., Lang, P., Schumm, M., Neu, S., Geiselhart, A., Bader, P., Schlegel, P. G., Greil, J., Stachel, D., Herzog, R. J., and Niethammer, D. Megadose Transplantation of Purified Peripheral Blood CD34(+) Progenitor Cells From HLA-Mismatched Parental Donors in Children. *Bone Marrow Transplant.* 2001;27(8):777-83.
8. Leung, W., Iyengar, R., Leimig, T., Holladay, M. S., Houston, J., and Handgretinger, R. Phenotype and Function of Human Natural Killer Cells Purified by Using a Clinical-Scale Immunomagnetic Method. *Cancer Immunol.Immunother.* 2005;54(4):389-94.
9. Miller, J. S., Soignier, Y., Panoskaltsis-Mortari, A., McNearney, S. A., Yun, G. H., Fautsch, S. K., McKenna, D., Le, C., Defor, T. E., Burns, L. J., Orchard, P. J., Blazar, B. R., Wagner, J. E., Slungaard, A., Weisdorf, D. J., Okazaki, I. J., and McGlave, P. B. Successful Adoptive Transfer and in Vivo Expansion of Human Haploidentical NK Cells in Patients With Cancer. *Blood* 15-4-2005;105(8):3051-7.
10. Farag, S. S., Fehniger, T. A., Ruggeri, L., Velardi, A., and Caligiuri, M. A. Natural Killer Cell Receptors: New Biology and Insights into the Graft-Versus-Leukemia Effect. *Blood* 15-9-2002;100(6):1935-47.
11. Rammensee, H. G. Chemistry of Peptides Associated With MHC Class I and Class II Molecules. *Curr.Opin.Immunol.* 1995;7(1):85-96.
12. Janeway CA and Travers P, *ImmunologieSpektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; 2002.*
13. Bodmer, J. G., Marsh, S. G., Albert, E. D., Bodmer, W. F., Bontrop, R. E., Charron, D., Dupont, B., Erlich, H. A., Fauchet, R., Mach, B., Mayr, W. R., Parham, P., Sasazuki, T., Schreuder, G. M., Strominger, J. L., Svejgaard, A., and Terasaki, P. I. Nomenclature for Factors of the HLA System, 1996. *Tissue Antigens* 1997;49(3 Pt 2):297-321.
14. Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., Stern, L. J., Urban, R. G., Strominger, J. L., and Wiley, D. C. Three-Dimensional Structure of the Human Class II Histocompatibility Antigen HLA-DR1. *Nature* 1-7-1993;364(6432):33-9.
15. Begovich, A. B., McClure, G. R., Suraj, V. C., Helmuth, R. C., Fildes, N., Bugawan, T. L., Erlich, H. A., and Klitz, W. Polymorphism, Recombination, and Linkage Disequilibrium Within the HLA Class II Region. *J.Immunol.* 1-1-1992;148(1):249-58.

16. Giebel, S., Giorgiani, G., Martinetti, M., Zecca, M., Maccario, R., Salvaneschi, L., Holowiecki, J., and Locatelli, F. Low Incidence of Severe Acute Graft-Versus-Host Disease in Children Given Haematopoietic Stem Cell Transplantation From Unrelated Donors Prospectively Matched for HLA Class I and II Alleles With High-Resolution Molecular Typing. *Bone Marrow Transplant.* 2003;31(11):987-93.
17. Mickelson, E. M., Petersdorf, E. W., and Hansen, J. A. HLA Matching and Hematopoietic Cell Transplant Outcome. *Clin.Transpl.* 2002;263-71.
18. Shaw, B. E., Madrigal, J. A., and Potter, M. Improving the Outcome of Unrelated Donor Stem Cell Transplantation by Molecular Matching. *Blood Rev.* 2001;15(4):167-74.
19. Szydlo, R., Goldman, J. M., Klein, J. P., Gale, R. P., Ash, R. C., Bach, F. H., Bradley, B. A., Casper, J. T., Flomenberg, N., Gajewski, J. L., Gluckman, E., Henslee-Downey, P. J., Hows, J. M., Jacobsen, N., Kolb, H. J., Lowenberg, B., Masaoka, T., Rowlings, P. A., Sondel, P. M., van Bekkum, D. W., van Rood, J. J., Vowels, M. R., Zhang, M. J., and Horowitz, M. M. Results of Allogeneic Bone Marrow Transplants for Leukemia Using Donors Other Than HLA-Identical Siblings. *J.Clin.Oncol.* 1997;15(5):1767-77.
20. El Kassar, N., Legouvello, S., Joseph, C. M., Salesses, P., Rieux, C., Cordonnier, C., Vernant, J. P., Farcet, J. P., Bierling, P., and Kuentz, M. High Resolution HLA Class I and II Typing and CTLp Frequency in Unrelated Donor Transplantation: a Single-Institution Retrospective Study of 69 BMTs. *Bone Marrow Transplant.* 2001;27(1):35-43.
21. Tiercy, J. M., Villard, J., and Roosnek, E. Selection of Unrelated Bone Marrow Donors by Serology, Molecular Typing and Cellular Assays. *Transpl.Immunol.* 2002;10(2-3):215-21.
22. Lang, P.; Greil, J.; Bader, P.; Schumm, M.; Handgretinger, R.; Klingebiel, T.; Schlegel, P. G.; Beck, J. F.; Scheel-Walter, H.; Niethammer, D. Bearbeitung und Transplantation hämatopoetischer Stammzellen. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 10[153], 954-964. 2004.
23. Sprent, J., Schaefer, M., and Korngold, R. Role of T Cell Subsets in Lethal Graft-Versus-Host Disease (GVHD) Directed to Class I Versus Class II H-2 Differences. II. Protective Effects of L3T4+ Cells in Anti-Class II GVHD. *J.Immunol.* 15-4-1990;144(8):2946-54.

24. Nathenson, S. G., Geliebter, J., Pfaffenbach, G. M., and Zeff, R. A. Murine Major Histocompatibility Complex Class-I Mutants: Molecular Analysis and Structure-Function Implications. *Annu.Rev.Immunol.* 1986;4:471-502.
25. Ferrara, J. L. and Deeg, H. J. Graft-Versus-Host Disease. *N.Engl.J.Med.* 7-3-1991;324(10):667-74.
26. Schmaltz, C., Alpdogan, O., Horndasch, K. J., Muriglan, S. J., Kappel, B. J., Teshima, T., Ferrara, J. L., Burakoff, S. J., and van den Brink, M. R. Differential Use of Fas Ligand and Perforin Cytotoxic Pathways by Donor T Cells in Graft-Versus-Host Disease and Graft-Versus-Leukemia Effect. *Blood* 1-5-2001;97(9):2886-95.
27. Vogelsang, G. B. How I Treat Chronic Graft-Versus-Host Disease. *Blood* 1-3-2001;97(5):1196-201.
28. Martin, P. J. Increased Disparity for Minor Histocompatibility Antigens As a Potential Cause of Increased GVHD Risk in Marrow Transplantation From Unrelated Donors Compared With Related Donors. *Bone Marrow Transplant.* 1991;8(3):217-23.
29. Klingemann, H. G., Storb, R., Fefer, A., Deeg, H. J., Appelbaum, F. R., Buckner, C. D., Cheever, M. A., Greenberg, P. D., Stewart, P. S., Sullivan, K. M., and . Bone Marrow Transplantation in Patients Aged 45 Years and Older. *Blood* 1986;67(3):770-6.
30. Gratama, J. W., Zwaan, F. E., Stijnen, T., Weijers, T. F., Weiland, H. T., D'Amaro, J., Hekker, A. C., The, T. H., de Gast, G. C., and Vossen, J. M. Herpes-Virus Immunity and Acute Graft-Versus-Host Disease. *Lancet* 28-2-1987;1(8531):471-4.
31. Bunin, N., Carston, M., Wall, D., Adams, R., Casper, J., Kamani, N., and King, R. Unrelated Marrow Transplantation for Children With Acute Lymphoblastic Leukemia in Second Remission. *Blood* 1-5-2002;99(9):3151-7.
32. Rocha, V., Cornish, J., Sievers, E. L., Filipovich, A., Locatelli, F., Peters, C., Remberger, M., Michel, G., Arcese, W., Dallorso, S., Tiedemann, K., Busca, A., Chan, K. W., Kato, S., Ortega, J., Vowels, M., Zander, A., Souillet, G., Oakill, A., Woolfrey, A., Pay, A. L., Green, A., Garnier, F., Ionescu, I., Wernet, P., Sirchia, G., Rubinstein, P., Chevret, S., and Gluckman, E. Comparison of Outcomes of Unrelated Bone Marrow and Umbilical Cord Blood Transplants in Children With Acute Leukemia. *Blood* 15-5-2001;97(10):2962-71.

33. Locatelli, F., Zecca, M., Messina, C., Rondelli, R., Lanino, E., Sacchi, N., Uderzo, C., Fagioli, F., Conter, V., Bonetti, F., Favre, C., Porta, F., Giorgiani, G., and Pession, A. Improvement Over Time in Outcome for Children With Acute Lymphoblastic Leukemia in Second Remission Given Hematopoietic Stem Cell Transplantation From Unrelated Donors. *Leukemia* 2002;16(11):2228-37.
34. Balduzzi, A., Gooley, T., Anasetti, C., Sanders, J. E., Martin, P. J., Petersdorf, E. W., Appelbaum, F. R., Buckner, C. D., Matthews, D., Storb, R., Sullivan, K. M., and Hansen, J. A. Unrelated Donor Marrow Transplantation in Children. *Blood* 15-10-1995;86(8):3247-56.
35. Lang, P., Handgretinger, R., Niethammer, D., Schlegel, P. G., Schumm, M., Greil, J., Bader, P., Engel, C., Scheel-Walter, H., Eyrich, M., and Klingebiel, T. Transplantation of Highly Purified CD34+ Progenitor Cells From Unrelated Donors in Pediatric Leukemia. *Blood* 15-2-2003;101(4):1630-6.
36. Lang, P., Klingebiel, T., Bader, P., Greil, J., Schumm, M., Schlegel, P. G., Eyrich, M., Mueller-Wehrich, S., Niethammer, D., and Handgretinger, R. Transplantation of Highly Purified Peripheral-Blood CD34+ Progenitor Cells From Related and Unrelated Donors in Children With Nonmalignant Diseases. *Bone Marrow Transplant.* 2004;33(1):25-32.
37. Lang, P., Bader, P., Schumm, M., Feuchtinger, T., Einsele, H., Fuhrer, M., Weinstock, C., Handgretinger, R., Kuci, S., Martin, D., Niethammer, D., and Greil, J. Transplantation of a Combination of CD133+ and CD34+ Selected Progenitor Cells From Alternative Donors. *Br.J.Haematol.* 2004;124(1):72-9.
38. Herberman, R. B., Nunn, M. E., Holden, H. T., and Lavrin, D. H. Natural Cytotoxic Reactivity of Mouse Lymphoid Cells Against Syngeneic and Allogeneic Tumors. II. Characterization of Effector Cells. *Int.J.Cancer* 15-8-1975;16(2):230-9.
39. Kiessling, R., Klein, E., and Wigzell, H. "Natural" Killer Cells in the Mouse. I. Cytotoxic Cells With Specificity for Mouse Moloney Leukemia Cells. Specificity and Distribution According to Genotype. *Eur.J.Immunol.* 1975;5(2):112-7.
40. Bourin, P., Mansour, I., Doinel, C., Roue, R., Rouger, P., and Levi, F. Circadian Rhythms of Circulating NK Cells in Healthy and Human Immunodeficiency Virus-Infected Men. *Chronobiol.Int.* 1993;10(4):298-305.

41. Rodewald, H. R., Moingeon, P., Lucich, J. L., Dosiou, C., Lopez, P., and Reinherz, E. L. A Population of Early Fetal Thymocytes Expressing Fc Gamma RII/III Contains Precursors of T Lymphocytes and Natural Killer Cells. *Cell* 3-4-1992;69(1):139-50.
42. Lanier, L. L., Spits, H., and Phillips, J. H. The Developmental Relationship Between NK Cells and T Cells. *Immunol.Today* 1992;13(10):392-5.
43. Sanchez, M. J., Muench, M. O., Roncarolo, M. G., Lanier, L. L., and Phillips, J. H. Identification of a Common T/Natural Killer Cell Progenitor in Human Fetal Thymus. *J.Exp.Med.* 1-8-1994;180(2):569-76.
44. Spits, H., Lanier, L. L., and Phillips, J. H. Development of Human T and Natural Killer Cells. *Blood* 15-5-1995;85(10):2654-70.
45. Freud, A. G. and Caligiuri, M. A. Human Natural Killer Cell Development. *Immunol.Rev.* 2006;214:56-72.
46. Ljunggren, H. G. and Karre, K. In Search of the 'Missing Self': MHC Molecules and NK Cell Recognition. *Immunol.Today* 1990;11(7):237-44.
47. Trinchieri, G. Biology of Natural Killer Cells. *Adv.Immunol.* 1989;47:187-376.
48. Lanier, L. L., Phillips, J. H., Hackett, J., Jr., Tutt, M., and Kumar, V. Natural Killer Cells: Definition of a Cell Type Rather Than a Function. *J.Immunol.* 1-11-1986;137(9):2735-9.
49. Karre, K., Ljunggren, H. G., Piontek, G., and Kiessling, R. Selective Rejection of H-2-Deficient Lymphoma Variants Suggests Alternative Immune Defence Strategy. *Nature* 20-2-1986;319(6055):675-8.
50. Karre, K. Express Yourself or Die: Peptides, MHC Molecules, and NK Cells. *Science* 17-2-1995;267(5200):978-9.
51. Delves, P. J. and Roitt, I. M. The Immune System. First of Two Parts. *N.Engl.J.Med.* 6-7-2000;343(1):37-49.
52. Lanier, L. L. NK Cell Receptors. *Annu.Rev.Immunol.* 1998;16:359-93.
53. Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Biassoni, R., Mingari, M. C., and Moretta, L. Receptors for HLA Class-I Molecules in Human Natural Killer Cells. *Annu.Rev.Immunol.* 1996;14:619-48.

54. Moretta, A., Biassoni, R., Bottino, C., Pende, D., Vitale, M., Poggi, A., Mingari, M. C., and Moretta, L. Major Histocompatibility Complex Class I-Specific Receptors on Human Natural Killer and T Lymphocytes. *Immunol.Rev.* 1997;155:105-17.
55. Lanier, L. L. NK Cell Recognition. *Annu.Rev.Immunol.* 2005;23:225-74.
56. French, A. R. and Yokoyama, W. M. Natural Killer Cells and Viral Infections. *Curr.Opin.Immunol.* 2003;15(1):45-51.
57. Morrison, B. E., Park, S. J., Mooney, J. M., and Mehrad, B. Chemokine-Mediated Recruitment of NK Cells Is a Critical Host Defense Mechanism in Invasive Aspergillosis. *J.Clin.Invest* 2003;112(12):1862-70.
58. Yokoyama, W. M. and Seaman, W. E. The Ly-49 and NKR-P1 Gene Families Encoding Lectin-Like Receptors on Natural Killer Cells: the NK Gene Complex. *Annu.Rev.Immunol.* 1993;11:613-35.
59. Bakker, A. B., Wu, J., Phillips, J. H., and Lanier, L. L. NK Cell Activation: Distinct Stimulatory Pathways Counterbalancing Inhibitory Signals. *Hum.Immunol.* 2000;61(1):18-27.
60. Reyburn, H., Mandelboim, O., Vales-Gomez, M., Sheu, E. G., Pazmany, L., Davis, D. M., and Strominger, J. L. Human NK Cells: Their Ligands, Receptors and Functions. *Immunol.Rev.* 1997;155:119-25.
61. Martin, A. M., Freitas, E. M., Witt, C. S., and Christiansen, F. T. The Genomic Organization and Evolution of the Natural Killer Immunoglobulin-Like Receptor (KIR) Gene Cluster. *Immunogenetics* 2000;51(4-5):268-80.
62. Colonna, M., Brooks, E. G., Falco, M., Ferrara, G. B., and Strominger, J. L. Generation of Allospecific Natural Killer Cells by Stimulation Across a Polymorphism of HLA-C. *Science* 21-5-1993;260(5111):1121-4.
63. Moretta, A., Vitale, M., Bottino, C., Orengo, A. M., Morelli, L., Augugliaro, R., Barbaresi, M., Ciccone, E., and Moretta, L. P58 Molecules As Putative Receptors for Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I Molecules in Human Natural Killer (NK) Cells. Anti-P58 Antibodies Reconstitute Lysis of MHC Class I-Protected Cells in NK Clones Displaying Different Specificities. *J.Exp.Med.* 1-8-1993;178(2):597-604.

64. Gumperz, J. E., Litwin, V., Phillips, J. H., Lanier, L. L., and Parham, P. The Bw4 Public Epitope of HLA-B Molecules Confers Reactivity With Natural Killer Cell Clones That Express NKB1, a Putative HLA Receptor. *J.Exp.Med.* 1-3-1995;181(3):1133-44.
65. Dohring, C., Scheidegger, D., Samaridis, J., Cella, M., and Colonna, M. A Human Killer Inhibitory Receptor Specific for HLA-A1,2. *J.Immunol.* 1-5-1996;156(9):3098-101.
66. Chang, C., Rodriguez, A., Carretero, M., Lopez-Botet, M., Phillips, J. H., and Lanier, L. L. Molecular Characterization of Human CD94: a Type II Membrane Glycoprotein Related to the C-Type Lectin Superfamily. *Eur.J.Immunol.* 1995;25(9):2433-7.
67. Lazetic, S., Chang, C., Houchins, J. P., Lanier, L. L., and Phillips, J. H. Human Natural Killer Cell Receptors Involved in MHC Class I Recognition Are Disulfide-Linked Heterodimers of CD94 and NKG2 Subunits. *J.Immunol.* 1-12-1996;157(11):4741-5.
68. Braud, V. M., Allan, D. S., O'Callaghan, C. A., Soderstrom, K., D'Andrea, A., Ogg, G. S., Lazetic, S., Young, N. T., Bell, J. I., Phillips, J. H., Lanier, L. L., and McMichael, A. J. HLA-E Binds to Natural Killer Cell Receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 19-2-1998;391(6669):795-9.
69. Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Cantoni, C., Mingari, M. C., Biassoni, R., and Moretta, L. Activating Receptors and Coreceptors Involved in Human Natural Killer Cell-Mediated Cytolysis. *Annu.Rev.Immunol.* 2001;19:197-223.
70. Borrego, F., Kabat, J., Kim, D. K., Lieto, L., Maasho, K., Pena, J., Solana, R., and Coligan, J. E. Structure and Function of Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I Specific Receptors Expressed on Human Natural Killer (NK) Cells. *Mol.Immunol.* 2002;38(9):637-60.
71. Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L., and Spies, T. Activation of NK Cells and T Cells by NKG2D, a Receptor for Stress-Inducible MICA. *Science* 30-7-1999;285(5428):727-9.
72. Cosman, D., Mullberg, J., Sutherland, C. L., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W., Kubin, M., and Chalupny, N. J. ULBPs, Novel MHC Class I-Related Molecules, Bind to CMV Glycoprotein UL16 and Stimulate NK Cytotoxicity Through the NKG2D Receptor. *Immunity.* 2001;14(2):123-33.

73. Vitale, M., Bottino, C., Sivori, S., Sanseverino, L., Castriconi, R., Marcenaro, E., Augugliaro, R., Moretta, L., and Moretta, A. NKp44, a Novel Triggering Surface Molecule Specifically Expressed by Activated Natural Killer Cells, Is Involved in Non-Major Histocompatibility Complex-Restricted Tumor Cell Lysis. *J.Exp.Med.* 15-6-1998;187(12):2065-72.
74. Lee, R. K., Spielman, J., Zhao, D. Y., Olsen, K. J., and Podack, E. R. Perforin, Fas Ligand, and Tumor Necrosis Factor Are the Major Cytotoxic Molecules Used by Lymphokine-Activated Killer Cells. *J.Immunol.* 1-9-1996;157(5):1919-25.
75. Bradley, M., Zeytun, A., Rafi-Janajreh, A., Nagarkatti, P. S., and Nagarkatti, M. Role of Spontaneous and Interleukin-2-Induced Natural Killer Cell Activity in the Cytotoxicity and Rejection of Fas+ and Fas- Tumor Cells. *Blood* 1-12-1998;92(11):4248-55.
76. Zeis, M., Uharek, L., Glass, B., Gaska, T., Gassmann, W., and Mueller-Ruchholtz, W. Induction of Graft-Versus-Leukemia (GVL) Activity in Murine Leukemia Models After IL-2 Pretreatment of Syngeneic and Allogeneic Bone Marrow Grafts. *Bone Marrow Transplant.* 1994;14(5):711-5.
77. Asai, O., Longo, D. L., Tian, Z. G., Hornung, R. L., Taub, D. D., Ruscetti, F. W., and Murphy, W. J. Suppression of Graft-Versus-Host Disease and Amplification of Graft-Versus-Tumor Effects by Activated Natural Killer Cells After Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *J.Clin.Invest* 1-5-1998;101(9):1835-42.
78. Ruggeri, L., Capanni, M., Casucci, M., Volpi, I., Tosti, A., Perruccio, K., Urbani, E., Negrin, R. S., Martelli, M. F., and Velardi, A. Role of Natural Killer Cell Alloreactivity in HLA-Mismatched Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Blood* 1-7-1999;94(1):333-9.
79. Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W. D., Tosti, A., Posati, S., Rogaia, D., Frassoni, F., Aversa, F., Martelli, M. F., and Velardi, A. Effectiveness of Donor Natural Killer Cell Alloreactivity in Mismatched Hematopoietic Transplants. *Science* 15-3-2002;295(5562):2097-100.
80. Beelen, D. W., Ottinger, H. D., Ferencik, S., Elmaagacli, A. H., Peceny, R., Trenscher, R., and Grosse-Wilde, H. Genotypic Inhibitory Killer Immunoglobulin-Like Receptor Ligand Incompatibility Enhances the Long-Term Antileukemic Effect of Unmodified Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Patients With Myeloid Leukemias. *Blood* 15-3-2005;105(6):2594-600.

81. Leung, W., Iyengar, R., Turner, V., Lang, P., Bader, P., Conn, P., Niethammer, D., and Handgretinger, R. Determinants of Antileukemia Effects of Allogeneic NK Cells. *J.Immunol.* 1-1-2004;172(1):644-50.
82. Ruggeri, L., Capanni, M., Mancusi, A., Aversa, F., Martelli, M. F., and Velardi, A. Natural Killer Cells As a Therapeutic Tool in Mismatched Transplantation. *Best.Pract.Res.Clin.Haematol.* 2004;17(3):427-38.
83. Boyum, A. Isolation of Mononuclear Cells and Granulocytes From Human Blood. Isolation of Monuclear Cells by One Centrifugation, and of Granulocytes by Combining Centrifugation and Sedimentation at 1 g. *Scand.J.Clin.Lab Invest Suppl* 1968;97:77-89.
84. Boyum, A. Separation of Lymphocytes, Lymphocyte Subgroups and Monocytes: a Review. *Lymphology* 1977;10(2):71-6.
85. Blomberg, K., Granberg, C., Hemmila, I., and Lovgren, T. Europium-Labelled Target Cells in an Assay of Natural Killer Cell Activity. II. A Novel Non-Radioactive Method Based on Time-Resolved Fluorescence. Significance and Specificity of the Method. *J.Immunol.Methods* 21-8-1986;92(1):117-23.
86. Blomberg, K., Granberg, C., Hemmila, I., and Lovgren, T. Europium-Labelled Target Cells in an Assay of Natural Killer Cell Activity. I. A Novel Non-Radioactive Method Based on Time-Resolved Fluorescence. *J.Immunol.Methods* 12-2-1986;86(2):225-9.
87. Pfeiffer, M. M. Anreicherung von T-Zell-depletierten NK-Zellen und deren zytotoxische Aktivität gegenüber ALL-Blasten in Abhängigkeit der HLA-Klasse I-Expression. Dissertation der Universitätskinderklinik Tübingen . 2004.
88. Geiselhart, A., Neu, S., Buchholz, F., Lang, P., Niethammer, D., and Handgretinger, R. Positive Selection of CD56+ Lymphocytes by Magnetic Cell Sorting. *Nat.Immun.* 1996;15(5):227-33.
89. Molday, R. S., Yen, S. P., and Rembaum, A. Application of Magnetic Microspheres in Labelling and Separation of Cells. *Nature* 4-8-1977;268(5619):437-8.
90. Miltenyi, S., Muller, W., Weichel, W., and Radbruch, A. High Gradient Magnetic Cell Separation With MACS. *Cytometry* 1990;11(2):231-8.

91. Pflueger, E., Mueller, E. A., and Anderer, F. A. Preservation of Cytotoxic Function During Multi-Cycle Immunomagnetic Cell Separations of Human NK Cells Using a New Type of Magnetic Bead. *J.Immunol.Methods* 25-5-1990;129(2):165-73.
92. Carson, W. and Caligiuri, M. A. Interleukin-15 As a Potential Regulator of the Innate Immune Response. *Braz.J.Med.Biol.Res.* 1998;31(1):1-9.
93. Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint, Basile G., De Coene, C., Selz, F., Le Deist, F., and Fischer, A. Role of Interleukin-2 (IL-2), IL-7, and IL-15 in Natural Killer Cell Differentiation From Cord Blood Hematopoietic Progenitor Cells and From Gamma c Transduced Severe Combined Immunodeficiency X1 Bone Marrow Cells. *Blood* 15-11-1996;88(10):3901-9.
94. Gardiner, C. M. and Reen, D. J. Differential Cytokine Regulation of Natural Killer Cell-Mediated Necrotic and Apoptotic Cytotoxicity. *Immunology* 1998;93(4):511-7.
95. Mingari, M. C., Vitale, C., Cantoni, C., Bellomo, R., Ponte, M., Schiavetti, F., Bertone, S., Moretta, A., and Moretta, L. Interleukin-15-Induced Maturation of Human Natural Killer Cells From Early Thymic Precursors: Selective Expression of CD94/NKG2-A As the Only HLA Class I-Specific Inhibitory Receptor. *Eur.J.Immunol.* 1997;27(6):1374-80.
96. Carlens, S., Gilljam, M., Chambers, B. J., Aschan, J., Guven, H., Ljunggren, H. G., Christensson, B., and Dilber, M. S. A New Method for in Vitro Expansion of Cytotoxic Human CD3-CD56+ Natural Killer Cells. *Hum.Immunol.* 2001;62(10):1092-8.
97. Klingemann, H. G. and Martinson, J. Ex Vivo Expansion of Natural Killer Cells for Clinical Applications. *Cytotherapy.* 2004;6(1):15-22.
98. Morris, R. J., Chong, L. K., Wilkinson, G. W., and Wang, E. C. A High-Efficiency System of Natural Killer Cell Cloning. *J.Immunol.Methods* 20-12-2005;307(1-2):24-33.
99. Valiante, N. M., Uhrberg, M., Shilling, H. G., Lienert-Weidenbach, K., Arnett, K. L., D'Andrea, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L., and Parham, P. Functionally and Structurally Distinct NK Cell Receptor Repertoires in the Peripheral Blood of Two Human Donors. *Immunity.* 1997;7(6):739-51.
100. Raulet, D. H., Vance, R. E., and McMahon, C. W. Regulation of the Natural Killer Cell Receptor Repertoire. *Annu.Rev.Immunol.* 2001;19:291-330.

101. Parham, P. MHC Class I Molecules and KIRs in Human History, Health and Survival. *Nat.Rev.Immunol.* 2005;5(3):201-14.
102. Uhrberg, M., Valiante, N. M., Shum, B. P., Shilling, H. G., Lienert-Weidenbach, K., Corliss, B., Tyan, D., Lanier, L. L., and Parham, P. Human Diversity in Killer Cell Inhibitory Receptor Genes. *Immunity.* 1997;7(6):753-63.
103. Vilches, C. and Parham, P. KIR: Diverse, Rapidly Evolving Receptors of Innate and Adaptive Immunity. *Annu.Rev.Immunol.* 2002;20:217-51.
104. Velardi, A., Ruggeri, L., Alessandro, Moretta, and Moretta, L. NK Cells: a Lesson From Mismatched Hematopoietic Transplantation. *Trends Immunol.* 2002;23(9):438-44.
105. Shilling, H. G., Young, N., Guethlein, L. A., Cheng, N. W., Gardiner, C. M., Tyan, D., and Parham, P. Genetic Control of Human NK Cell Repertoire. *J.Immunol.* 1-7-2002;169(1):239-47.
106. Yawata, M., Yawata, N., Draghi, M., Little, A. M., Partheniou, F., and Parham, P. Roles for HLA and KIR Polymorphisms in Natural Killer Cell Repertoire Selection and Modulation of Effector Function. *J.Exp.Med.* 20-3-2006;203(3):633-45.
107. Pando, M. J., Gardiner, C. M., Gleimer, M., McQueen, K. L., and Parham, P. The Protein Made From a Common Allele of KIR3DL1 (3DL1*004) Is Poorly Expressed at Cell Surfaces Due to Substitution at Positions 86 in Ig Domain 0 and 182 in Ig Domain 1. *J.Immunol.* 15-12-2003;171(12):6640-9.
108. Ruggeri, L., Aversa, F., Martelli, M. F., and Velardi, A. Allogeneic Hematopoietic Transplantation and Natural Killer Cell Recognition of Missing Self. *Immunol.Rev.* 2006;214:202-18.
109. Röhm, S. C. Untersuchungen zur Funktion von CD158b⁺ Natürlichen Killerzellen: Isolierung, Zytotoxizität und Zytokinproduktion. Dissertation der Universitätskinderklinik Tübingen . 2003.
110. Archimbaud, E., Thomas, X., Campos, L., Magaud, J. P., Fiere, D., and Dore, J. F. Susceptibility of Adult Acute Lymphoblastic Leukemia Blasts to Lysis by Lymphokine-Activated Killer Cells. *Leukemia* 1991;5(11):967-71.
111. Romanski, A., Bug, G., Becker, S., Kampfmann, M., Seifried, E., Hoelzer, D., Ottmann, O. G., and Tonn, T. Mechanisms of Resistance to Natural Killer Cell-Mediated Cytotoxicity in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Exp.Hematol.* 2005;33(3):344-52.

112. Liao, N. S., Bix, M., Zijlstra, M., Jaenisch, R., and Raulet, D. MHC Class I Deficiency: Susceptibility to Natural Killer (NK) Cells and Impaired NK Activity. *Science* 12-7-1991;253(5016):199-202.
113. Shimizu, Y. and DeMars, R. Demonstration by Class I Gene Transfer That Reduced Susceptibility of Human Cells to Natural Killer Cell-Mediated Lysis Is Inversely Correlated With HLA Class I Antigen Expression. *Eur.J.Immunol.* 1989;19(3):447-51.
114. Pfeiffer, M., Schumm, M., Feuchtinger, T., Dietz, K., Handgretinger, R., and Lang, P. Intensity of HLA Class I Expression and KIR-Mismatch Determine NK-Cell Mediated Lysis of Leukaemic Blasts From Children With Acute Lymphatic Leukaemia. *Br.J.Haematol.* 2007;138(1):97-100.
115. Fernandez, N. C., Treiner, E., Vance, R. E., Jamieson, A. M., Lemieux, S., and Raulet, D. H. A Subset of Natural Killer Cells Achieves Self-Tolerance Without Expressing Inhibitory Receptors Specific for Self-MHC Molecules. *Blood* 1-6-2005;105(11):4416-23.
116. Kim, S., Poursine-Laurent, J., Truscott, S. M., Lybarger, L., Song, Y. J., Yang, L., French, A. R., Sunwoo, J. B., Lemieux, S., Hansen, T. H., and Yokoyama, W. M. Licensing of Natural Killer Cells by Host Major Histocompatibility Complex Class I Molecules. *Nature* 4-8-2005;436(7051):709-13.
117. MacDonald, H. R. NK Cell Tolerance: Revisiting the Central Dogma. *Nat.Immunol.* 2005;6(9):868-9.
118. Cooley, S., Xiao, F., Pitt, M., Gleason, M., McCullar, V., Bergemann, T. L., McQueen, K. L., Guethlein, L. A., Parham, P., and Miller, J. S. A Subpopulation of Human Peripheral Blood NK Cells That Lacks Inhibitory Receptors for Self-MHC Is Developmentally Immature. *Blood* 15-7-2007;110(2):578-86.
119. Leung, W., Handgretinger, R., Iyengar, R., Turner, V., Holladay, M. S., and Hale, G. A. Inhibitory KIR-HLA Receptor-Ligand Mismatch in Autologous Haematopoietic Stem Cell Transplantation for Solid Tumour and Lymphoma. *Br.J.Cancer* 14-8-2007;97(4):539-42.
120. Biron, C. A., Nguyen, K. B., Pien, G. C., Cousens, L. P., and Salazar-Mather, T. P. Natural Killer Cells in Antiviral Defense: Function and Regulation by Innate Cytokines. *Annu.Rev.Immunol.* 1999;17:189-220.
121. Maki, G., Krystal, G., Dougherty, G., Takei, F., and Klingemann, H. G. Induction of Sensitivity to NK-Mediated Cytotoxicity by TNF-Alpha Treatment: Possible Role of ICAM-3 and CD44. *Leukemia* 1998;12(10):1565-72.

122. Lang, P., Barbin, K., Feuchtinger, T., Greil, J., Peipp, M., Zunino, S. J., Pfeiffer, M., Handgretinger, R., Niethammer, D., and Fey, G. H. Chimeric CD19 Antibody Mediates Cytotoxic Activity Against Leukemic Blasts With Effector Cells From Pediatric Patients Who Received T-Cell-Depleted Allografts. *Blood* 15-5-2004;103(10):3982-5.
123. Lewalle, P., Triffet, A., Delforge, A., Crombez, P., Selleslag, D., De Muynck, H., Bron, D., and Martiat, P. Donor Lymphocyte Infusions in Adult Haploidentical Transplant: a Dose Finding Study. *Bone Marrow Transplant.* 2003;31(1):39-44.
124. Yamasaki, S., Henzan, H., Ohno, Y., Yamanaka, T., Iino, T., Ito, Y., Kuroiwa, M., Maeda, M., Kawano, N., Kinukawa, N., Miyamoto, T., Nagafuji, K., Shimoda, K., Inaba, S., Hayashi, S., Taniguchi, S., Shibuya, T., Gondo, H., Otsuka, T., and Harada, M. Influence of Transplanted Dose of CD56+ Cells on Development of Graft-Versus-Host Disease in Patients Receiving G-CSF-Mobilized Peripheral Blood Progenitor Cells From HLA-Identical Sibling Donors. *Bone Marrow Transplant.* 2003;32(5):505-10.
125. Passweg, J. R., Tichelli, A., Meyer-Monard, S., Heim, D., Stern, M., Kuhne, T., Favre, G., and Gratwohl, A. Purified Donor NK-Lymphocyte Infusion to Consolidate Engraftment After Haploidentical Stem Cell Transplantation. *Leukemia* 2004;18(11):1835-8.
126. Siegler, U., Kalberer, C. P., Nowbakht, P., Sendelov, S., Meyer-Monard, S., and Wodnar-Filipowicz, A. Activated Natural Killer Cells From Patients With Acute Myeloid Leukemia Are Cytotoxic Against Autologous Leukemic Blasts in NOD/SCID Mice. *Leukemia* 2005;19(12):2215-22.
127. Ruggeri, L., Mancusi, A., Capanni, M., Urbani, E., Carotti, A., Aloisi, T., Stern, M., Pende, D., Ferruccio, K., Burchielli, E., Topini, F., Bianchi, E., Aversa, F., Martelli, M. F., and Velardi, A. Donor Natural Killer Cell Allorecognition of Missing Self in Haploidentical Hematopoietic Transplantation for Acute Myeloid Leukemia: Challenging Its Predictive Value. *Blood* 1-7-2007;110(1):433-40.

8 Anhang

8.1 HLA-Genotypen der Spender und Prä-B-ALL Blasten

| GESUNDE SPENDER | HLA-B ALLELE | KORRESPONDIERENDER KIR | HLA-C ALLELE | KORRESPONDIERENDER KIR |
|--------------------------|---------------------|-------------------------------|---------------------|-------------------------------|
| Spender 1 | B05 B63 | CD 158e | Cw3 Cw8 | CD 158b |
| Spender 2 | B47 | CD 158e | Cw4 Cw5 | CD 158a |
| Spender 3 | B62 B18 | CD 158e | Cw3 Cw7 | CD 158b |
| Spender 4 | B35 B51 | CD 158e | Cw0401 Cw1510 | CD 158a |
| Spender 5 | B07 B58 | CD 158e | Cw0302 Cw0702 | CD 158b |
| Spender 6 | B51 B62 | CD 158e | Cw4 | CD 158a |
| Spender 7 | B44 | CD 158e | Cw0304 Cw0702 | CD 158b |
| SPENDER POST SZT | | | | |
| Spender 8 | B40 B57 | CD 158e | nicht getestet | |
| Spender 9 | B18 B44 | CD 158e | Cw4 Cw7 | CD 158a CD 158b |
| PRÄ-B-ALL BLASTEN | | | | |
| Patient 1 | B40 B51 | CD 158e | Cw0304 Cw1402 | CD 158b |
| Patient 2 | B08 B62 | | Cw3 Cw7 | CD 158b |
| Patient 3 | B51 B55 | CD 158e | Cw3 Cw14 | CD 158b |
| Patient 4 | B41 B15 | | Cw0304 Cw1701 | CD 158a CD 158b |
| Patient 5 | B56 B57 | CD 158e | Cw1 Cw0602 | CD 158a CD 158b |

8.2 Abbildungsverzeichnis

| | | |
|------------|---|----|
| Abb. 1.1: | Darstellung der Gene des HLA-Komplexes und der strukturellen Unterschiede der HLA-Klassen I und II | 6 |
| Abb. 1.2: | Spender-vs-Empfänger NK-Zell-Alloreaktivität nach dem KIR-Ligand-Mismatch Konzept von Velardi et al..... | 18 |
| Abb. 3.1: | Methode der Klonierung von NK-Zellen. | 35 |
| Abb. 4.1: | Klonierungseffizienz bis 23 Tage nach Zellkulturansatz bei Zwei-Stufen-NK-Anreicherung | 51 |
| Abb. 4.2: | Klonierungseffizienz bis 23 Tage nach Zellkulturansatz bei MACS CD3-Depletion | 52 |
| Abb. 4.3: | Klonierungseffizienz bis 21 Tage nach Zellkulturansatz bei pädiatrischen Patienten mit Prä-B-ALL nach SZT | 53 |
| Abb. 4.4: | Ermittlung der unterschiedlichen KIR-Expression auf NK-Klonen..... | 56 |
| Abb. 4.5: | KIR-Verteilungsmuster der NK-Klone aller gesunder Spender [n=379] | 58 |
| Abb. 4.6: | KIR-Verteilungsmuster der NK-Klone von Spendern der HLA-Cw3 Gruppe [n=214]..... | 59 |
| Abb. 4.7: | KIR-Verteilungsmuster der NK-Klone von Spendern der HLA-Cw4 Gruppe [n=165]..... | 60 |
| Abb. 4.8 | Häufigkeit der Expression inhibitorischer Rezeptoren auf NK-Klonen aller gesunder Spender [n=379] | 61 |
| Abb. 4.9: | Häufigkeit der Expression inhibitorischer Rezeptoren auf NK-Klonen von Spendern der HLA-Cw3 Gruppe [n=214]..... | 62 |
| Abb. 4.10: | Häufigkeit der Expression inhibitorischer Rezeptoren auf NK-Klonen von Spendern der HLA-Cw4 Gruppe [n=165]..... | 62 |
| Abb. 4.11: | NK-Klone von HLA-Cw3 ⁺ Spendern [n=30] vs. LCL-Zelllinien und K562..... | 64 |
| Abb. 4.12: | NK-Klone von HLA-Cw4 ⁺ Spendern [n=47] vs. LCL-Zelllinien und K562..... | 65 |

| | | |
|---------------|---|----|
| Abb. 4.13: | Zytotoxische Aktivität entsprechend dem KIR-Phänotyp der NK-Klone [$n_{\text{gesamt}}=77$] | 67 |
| Abb. 4.14: | NK-Klone von gesunden Spendern der HLA-Cw4 Gruppe [$n=215$] vs. LCL-Targetzelllinien mit fehlender HLA-Cw3 bzw. Cw4 Expression | 69 |
| Abb. 4.15: | NK-Klone von gesunden Spendern der HLA-Cw3 Gruppe [$n=136$] vs. LCL-Targetzelllinien mit fehlender HLA-Cw3 bzw. Cw4 Expression | 70 |
| Abb. 4.16: | Zytotoxische Aktivität der NK-Klone aller vier Spender [$n=179$] nach Einteilung entsprechend ihres KIR-Phänotyps vs. LCL missing HLA Cw3 | 71 |
| Abb. 4.17: | Zytotoxische Aktivität der NK-Klone aller vier Spender [$n=179$] nach Einteilung entsprechend ihres KIR-Phänotyps vs. LCL missing HLA-Cw4 | 72 |
| Abb. 4.18: | Buffy Coat NK-Klone unterschiedlicher HLA-Cw Gruppe vs. kindliche Prä-B-ALL Blasten der HLA-Cw3 Gruppe (Pat.1) | 74 |
| Abb. 4.19: | Spezifische Lyse der NK-Klone [$n=15$] vs. HLA-Cw3 ⁺ /Cw4 ⁻ /Bw4 ⁺ Prä-B-ALL Blasten (Pat. 1) | 75 |
| Abb. 4.20A-D: | Screening der alloreaktiven Aktivität von 98 NK-Klonen zweier gesunder Spender mit vier Targetzellen | 77 |
| Abb. 4.21: | Zytotoxizität vs. kindliche Prä-B-ALL Blasten und Korrelation mit quantitativer HLA-Klasse I-Expression der Blasten | 80 |
| Abb. 4.22: | Killing der Blasten mit erhöhter bzw. erniedrigter HLA-Klasse I-Expression | 81 |
| Abb. 4.23: | Zytotoxische Aktivität aller NK-Klone der HLA-Cw3 Gruppe [$n_{\text{gesamt}} = 241$] gegenüber Prä-B-ALL Blasten der gleichen HLA-Cw Gruppe | 82 |
| Abb. 4.24: | Zytotoxische Aktivität aller NK-Klone der HLA-Cw4 Gruppe [$n_{\text{gesamt}} = 144$] gegenüber Prä-B-ALL Blasten der anderen HLA-Gruppe bzw. der gleichen bei Patient 4 | 83 |

| | |
|--|-----|
| Abb. 4.25A-E: Darstellung der zytotoxischen NK-Aktivität vs. den Prä-B-ALL Blasten entsprechend dem KIR-Phänotyp der NK-Klone | 84 |
| Abb. 4.26A-F: Zytotoxische Aktivität der unterschiedlichen KIR-Phänotypen von NK-Klonen der gleichen HLA-Cw Gruppe vs. den einzelnen Prä-B-ALL Blasten. | 87 |
| Abb. 4.27A-C: Zytotoxische Aktivität von NK-Klonen mit Expression von einem bzw. zwei inhibitorischen Rezeptoren, die Liganden auf den Targetzellen von Patient 1 binden konnten. | 92 |
| Abb. 4.28: Zytotoxische Aktivität von NK-Klonen mit Expression von einem bzw. zwei inhibitorischen Rezeptoren, die Liganden auf den Targetzellen von Patient 3 binden konnten. | 94 |
| Abb. 4.29: NK-Klone eines haploident transplantierten Patienten (Spender 8). Austestung vs. autologe Prä-B-ALL Blasten und vs. B-LCL missing HLA-Cw/-Bw Zelllinien..... | 96 |
| Abb. 4.30: Screening der alloreaktiven Aktivität von 26 NK-Klonen einer haploident transplantierten pädiatrischen Patientin..... | 97 |
| Abb. 4.31: Aktivität von NK-Klonen post haploidenter Transplantation entsprechend ihrem KIR-Phänotyp vs. Prä-B-ALL Blasten von Patient 2. | 99 |
| Abb. 4.32: Aktivität von NK-Klonen post haploidenter Transplantation entsprechend ihrem KIR-Phänotyp vs. Prä-B-ALL Blasten von Patient 3. | 99 |
| Abb. 4.33: Zytotoxizität von NK-Klonen vor und nach HLA-Blockade der Targetzellen | 100 |
| Abb. 4.34: Zytotoxizitätssteigerung von NK-Klonen durch HLA-Maskierung der Blasten in 3 E:T-Titrationsstufen. | 101 |
| Abb. 4.35: ADCC mit anti-CD19 Ak aus Maushybridomen im Vergleich mit NK-Zytotoxizität ohne Antikörper und als Referenz gegenüber K562 | 102 |

| | | |
|------------|--|-----|
| Abb. 4.36: | Vergleich der Zytotoxizitätssteigerung bei ADCC mit Maus-Antikörper, chimärem Antikörper, sowie bei HLA-Maskierung mit W6/32 | 103 |
| Abb. 4.37: | Screening von NK-Klonen mit niedriger oder hoher zytolytischer Aktivität gegenüber .Prä-B-ALL Blasten | 104 |

8.3 Tabellenverzeichnis

| | | |
|------------|---|----|
| Tab. 1.1: | Maligne hämatologische Erkrankungen, die mit allogener SZT kurativ behandelt werden können..... | 2 |
| Tab. 1.2: | Gruppe der Ig-ähnlichen Rezeptormoleküle mit inhibitorischer Funktion. | 14 |
| Tab. 1.3: | Adhäsionsmoleküle, die Einfluss auf die Interaktion von NK-Zellen mit Targetzellen nehmen..... | 16 |
| Tab. 4.1: | Lymphozytenzusammensetzung vor MACS-Anreicherung..... | 47 |
| Tab. 4.2: | Lymphozytenzusammensetzung nach MACS-Anreicherung .. | 47 |
| Tab. 4.3: | Lymphozytenzusammensetzung nach T-Zell-Depletion | 48 |
| Tab. 4.4: | Lymphozytenzusammensetzung nach T-Zell-Depletion mit MACS-Microbeads | 49 |
| Tab. 4.5: | Anzahl NK-Klone/96-Loch Mikrotiterplatte bis Tag 23 nach Zellkulturansatz bei Zwei-Stufen-NK-Anreicherung | 50 |
| Tab. 4.6: | Anzahl NK-Klone/96-Loch Mikrotiterplatte bis Tag 23 nach Zellkulturansatz bei MACS CD3-Depletion | 52 |
| Tab. 4.7: | Anzahl NK-Klone/96-well Mikrotiterplatte bis Tag 21 nach Zellkulturansatz bei pädiatrischen Patienten mit Prä-B-ALL nach SZT..... | 53 |
| Tab. 4.8: | KIR-Verteilungsmuster der NK-Klone und statistische Signifikanz durch Chi SquareTest..... | 57 |
| Tab. 4.9: | Häufigkeit der Expression inhibitorischer Rezeptoren in Abhängigkeit vom Spender-HLA-Typ..... | 61 |
| Tab. 4.10: | Spezifische Lyse [%] der NK-Klone von HLA-Cw3 ⁺ Spendern [n=30] | 64 |
| Tab. 4.11: | Spezifische Lyse [%] der NK-Klone von HLA-Cw4 ⁺ Spendern [n=47] | 65 |
| Tab. 4.12: | NK-Klone entsprechend ihrem KIR-Phänotyp vs. K562 und LCL Zelllinien | 67 |
| Tab. 4.13: | Zytotoxischen Aktivität von HLA-Cw4 ⁺ NK-Klonen..... | 69 |

| | | |
|------------|---|----|
| Tab. 4.14: | NK-Klone von gesunden Spendern der HLA-Cw3 Gruppe [n=136] vs. LCL-Targetzelllinien mit fehlender HLA-Cw3 bzw. Cw4 Expression..... | 70 |
| Tab. 4.15: | Spezifische Lyse [%] von NK-Klonen entsprechend ihrem KIR-Phänotyp vs. LCL missing HLA-Cw3 | 71 |
| Tab. 4.16: | Spezifische Lyse [%] von NK-Klonen entsprechend ihrem KIR-Phänotyp vs. LCL missing HLA-Cw4 | 72 |
| Tab. 4.17: | NK-Klone unterschiedlicher HLA-Cw Gruppe vs. kindliche Prä-B-ALL Blasten der HLA-Cw3 Gruppe | 74 |
| Tab. 4.18: | Spezifische Lyse [%] der 385 ausgetesteten NK-Klone vs. kindliche Prä-B-ALL Blasten im Überblick | 79 |
| Tab. 4.19: | Spezifische Lyse [%] der NK-Klone von Spender 9 nach haploidenter Transplantation vs. Blasten von Patient 2 und 3 | 98 |

8.4 Abkürzungen

| | |
|-------------|---|
| ADCC | Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity |
| APCs | Antigen Presenting Cells |
| CAM | Cellular Adhesion Molecule |
| CTLs | Cytotoxic T-Lymphocytes |
| EBV | Ebstein-Barr-Virus |
| FACS | Flourescence-Activated Cell Sorting |
| FCS | Fetal Calf Serum |
| GvHD | Graft versus Host Disease |
| GvL | Graft versus Leukemia |
| HLA | Human Leucocyte Antigen |
| IgSF | Immunoglobulin Superfamily |
| IL-2; IL-15 | Interleukin 2; Interleukin 15 |
| KAR | Killer Cell Activating Receptor |
| KIR | Killer Cell Inhibitory Receptor |
| KIR | Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor |
| MACS | Magnetic Activated Cell Sorting |
| MNC | Mononuklear Cells |
| MRD | Minimal Residual Disease |
| NK-Klon | Natürlicher Killerzell-Klon |
| NK-Zellen | Natürliche Killerzellen |
| PHA-M | Phytohemagglutinin-M |
| PMNC | Peripheral Mononuclear Cells |
| SD | Standard Deviation |
| SZT | Stammzelltransplantation |

9 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. R. Handgretinger für die Aufnahme in sein Institut. Bei Herrn PD Dr. Peter Lang bedanke ich mich herzlich für die Überlassung des interessanten Themas für meine Dissertation, die gute, geduldige und kompetente Betreuung, zahlreiche Hilfestellungen und wertvolle Ratschläge. Ebenfalls gilt mein Dank Herrn Dr. Tobias Feuchtinger für die engagierte Betreuung dieser Studie, Einweisung in Labortechniken und rege Diskussionsbereitschaft.

Ein herzliches Dankeschön geht an alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des KMT-Labors sowie des hämatologischen Labors der Universitätskinderklinik Tübingen für die ausgesprochen freundliche und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre und die zahlreichen gemeinsamen Stunden an den Stickstoffbänken.

Für wertvolle Ratschläge und hilfreiche Unterstützung dieser Studie bedanke ich mich außerdem bei Herrn Dr. Matthias Pfeiffer und Dr. Michael Schumm. Erwähnen möchte ich auch das fruchtbare und harmonische Zusammenarbeiten mit den Doktoranden des KMT-Labors, das ich sehr geschätzt habe.

Von Herzen danke ich auch Frau Tina Arnold und Frau Monika Beck für konstruktive Kritik und Korrektur bei der Fertigstellung des Manuskriptes.

Meinen Eltern danke ich, dass sie mir vertrauensvoll den Weg bereitet haben.

10 Lebenslauf

SCHULBILDUNG

| | |
|-------------|---|
| 1984 - 1988 | Grundschule Kohlberg, Kreis Esslingen |
| 1988 - 1997 | Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium Metzingen, Kreis Reutlingen Allgemeine Hochschulreife |

ZIVILDIENTST

| | |
|-------------|--|
| 1997 - 1998 | Rettungsdienst/Krankentransport, DRK Nürtingen |
|-------------|--|

HOCHSCHULBILDUNG

| | |
|-------------|--|
| 1999 - 2006 | Eberhard-Karls-Universität Tübingen Ärztl. Vorprüfung: 03/2001 1. Staatsexamen: 03/2002 2. Staatsexamen: 09/2005 3. Staatsexamen: 15.11.2006 |
|-------------|--|

FAMULATUREN

| | |
|-------------------|---|
| Aug. - Sept. 2001 | Abteilung Innere Medizin Diakonissenkrankenhaus, Karlsruhe |
| Aug. - Sept. 2003 | Allgemein-/Viszeral-/Kinderchirurgie Gemeinschaftspraxis Fuhrer, Reutlingen |
| Sept. 2003 | Abteilung Geburtshilfe/Gynäkologie Klinik Hallerwiese, Nürnberg |
| Feb. - Apr. 2004 | Dept. of Pediatrics, Dept. of Surgery Tenwek Hospital, Kenya |
| Apr. - Okt. 2004 | Dept. of Obstetrics and Gynecology, Dept. of Surgery Kagando Hospital, Uganda |
| WS 2004/2005 | Famulus im Kursus der Makroskopischen Anatomie, Universität Tübingen |

PRAKTISCHES JAHR

| | |
|---------------------|--|
| Okt. '05 - Feb. '06 | Dept. of Surgery, Tenwek Hospital/Moy University, Kenia/Ostafrika |
| Feb. – Juni 2006 | Abteilung Innere Medizin, Diakonie-Klinikum Stuttgart |
| Juni - Sept. 2006 | Abteilung Gynäkologie/Geburtshilfe Frauenklinik Bad Cannstatt |