

Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen

Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik

Schwerpunkte: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie/Onkologie

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger

**NK-Zell-Subpopulationen und Vergleich der
zytotoxischen Aktivität CD 69⁺ und CD 69⁻ NK-Zellen
nach Anreicherung bzw. Depletion und nach
Kultivierung gegenüber ALL-Blasten**

Inaugural-Dissertation

**Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

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

vorgelegt von

Christiane Hildegard Renate Zwicker

aus

Konstanz

2012

Dekan:

Professor Dr. I. B. Authenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. P. Lang

2. Berichterstatter:

Professor Dr. W. Vogel

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Akute Lymphatische Leukämie im Kindesalter.....	1
1.2	Residuale Resterkrankung und Stammzelltransplantation.....	3
1.3	NK-Zellen verbessern die Tumorlyse nach Stammzelltransplantation	5
1.3.1	NK-Zell-vermittelte Zytolyse von Blasten.....	7
1.3.2	Interleukin-2 aktiviert NK-Zellen.....	9
1.3.3	Interleukin-15 aktiviert NK-Zellen.....	10
1.4	CD69 als Aktivierungs-Marker von NK-Zellen.....	11
1.5	Fragestellung.....	13
2	Material und Methoden.....	14
2.1	Material.....	14
2.1.1	Zellen.....	14
2.1.2	Chemikalien und Reagenzien.....	15
2.1.3	Zell-Kultur-Medien.....	16
2.1.4	Geräte.....	17
2.1.5	Laborzubehör.....	18
2.1.6	Immunologische Kits und MicroBeads.....	19
2.1.7	Antikörper.....	20
2.2	Methoden.....	21
2.2.1	Zellkulturen.....	21
2.2.1.1	Zelllinien.....	21

2.2.1.1.1 Hintergrund.....	21
2.2.1.1.2 Versorgung.....	22
2.2.1.2 Kultivierung von NK-Zellen.....	23
2.2.1.2.1 Hintergrund.....	23
2.2.1.2.2 Versorgung.....	23
2.2.1.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen.....	25
2.2.2 Bestimmung der Zellzahl.....	25
2.2.3 Isolierung peripherer mononukleärer Zellen mittels Dichtegradienten Zentrifugation.....	27
2.2.3.1 Hintergrund.....	27
2.2.3.2 Durchführung.....	27
2.2.4 Zellanreicherung mit dem MACS-System.....	28
2.2.4.1 Hintergrund.....	28
2.2.4.2 Durchführung.....	29
2.2.4.2.1 Anreicherung CD56 ⁺ Zellen aus Peripherblut mittels Magnet gekoppelter Antikörper als Voraussetzung für den CD 69 Assay.....	29
2.2.4.2.2 Drei Schritte zur Gewinnung CD 69 ⁺ und CD 69 ⁻ NK-Zellen.....	30
2.2.5 Durchflußzytometrie.....	33
2.2.5.1 Hintergrund.....	33
2.2.5.2 Durchführung.....	37
2.2.5.2.1 CD 69 Assay.....	37
2.2.5.2.2 Bestimmung der Absoluten Anzahl der NK-Zellen in der CD 69 ⁺ und der CD 69 ⁻ Fraktion.....	40
2.2.5.2.3 Berechnung der Ausbeute an CD 69 ⁺ und CD 69 ⁻ NK-Zellen.....	42

2.2.6	Zytotoxizitätstest.....	45
2.2.6.1	<i>Hintergrund</i>	45
2.2.6.2	<i>Durchführung</i>	47
2.2.7	Statistik.....	49
3	Ergebnisse	50
3.1	Die CD 56 ^{dim} /CD 16 ⁺ Subpopulation macht den größten Anteil der NK-Zellen im peripheren Blut gesunder Spender aus.....	50
3.2	Die Ausprägung von NK-Zell-Subpopulationen ändert sich Zytokin und Zielzell bedingt.....	52
3.2.1	Nach Aktivierung humaner NK-Zellen mit K562-Blasten ändern sich die Anteile der NK-Zell-Subpopulationen im zeitlichen Verlauf.....	52
3.2.2	Abnahme der CD 16 Expression auf NK-Zellen nach Stimulation mit K562.....	56
3.2.3	Die CD 16 Expression auf CD 56 ^{dim} NK-Zellen variiert in Abhängigkeit vom IL-15 und K562 Stimulus.....	58
3.2.4	Änderung der CD 16 und CD 56 Expression auf NK-Zellen in Abhängigkeit vom IL-2 und K562 Stimulus.....	61
3.2.5	Änderung der CD 16 und CD 56 Expression auf NK-Zellen in Abhängigkeit vom IL-2, IL-15 und K562 Stimulus.....	64
3.3	Erhöhte Expression des Aktivitätsrezeptors CD 69 ⁺ auf mit IL 2, IL 15 und K562 stimulierten NK-Zellen.....	67
3.3.1	Änderung der Anteile der einzelnen Subpopulationen an den CD 69 ⁺ NK-Zellen innerhalb von Stunden nach Aktivierung der NK-Zellen.....	70
3.3.1.1	Dynamik der Anteile CD 69 ⁺ NK-Zellen insgesamt und CD 69 ⁺ NK Zell-Subpopulationen nach Stimulation mit K562	

3.3.1.2	Dynamik der Anteile CD 69 ⁺ NK-Zellen insgesamt und CD 69 ⁺ NK-Zell-Subpopulationen nach Stimulation mit IL-15 und K562.....	72
3.3.1.3	Dynamik der Anteile CD 69 ⁺ NK-Zellen insgesamt und CD 69 ⁺ NK-Zell-Subpopulationen nach Stimulation mit IL-2 und K562.....	76
3.3.1.4	Dynamik der Anteile CD 69 ⁺ NK-Zellen insgesamt und CD 69 ⁺ NK-Zell-Subpopulationen nach Stimulation mit IL-2, IL-15 und K562.....	79
3.3.2	Das Maximum des Anteils CD 69 ⁺ NK-Zellen ist abhängig von primären Stimuli mit Interleukinen und sekundärem Stimulus mit K562-Blasten.....	83
3.3.3	Unterschiede der maximalen CD 69 Expression innerhalb einzelner NK-Zell-Subpopulationen abhängig vom Stimulus mit IL-2, IL-15 und K562.....	85
3.4	Änderung der zytotoxischen Aktivität CD 69 separierter NK-Zellen gegen SEM-K2 und K562 nach polyklonaler Expansion der NK-Zellen.....	89
3.4.1	Nach Kultivierung höhere zytotoxische Aktivität ursprünglich CD 69 ⁺ NK-Zellen gegen SEM-K2-Blasten als ursprünglich CD 69 ⁻ NK-Zellen.....	90
3.5	Höhere Lyse kindlicher ALL-Blasten durch CD 69 ⁺ als durch CD 69 ⁻ NK-Zellen und Angleichung der zytotoxischen Aktivität der NK-Zell-Gruppen nach Kultivierung.....	93
3.5.1	Nach CD 69 Separation ist die Zytotoxische Aktivität CD 69 ⁺ NK-Zellen gegen ALL-Blasten höher als gegen K562-Blasten.....	93
3.5.2	CD 69 Expression auf ALL-Blasten der kindlichen Patienten.....	97
3.6	Erhöhung der CD 56 Expression nach Kultivierung von NK-Zellen.....	98
3.6.1	Die CD 56 Expression CD 69 separierter NK-Zellen nach Aktivierung mit IL-15 und SEM-K2-Blasten erhöht sich nach Kultivierung.....	98
3.6.2	Die CD 56 Expression CD 69 separierter NK-Zellen nach Aktivierung mit IL-15 und ALL-Blasten kindlicher Spender erhöht sich nach Kultivierung.....	101
3.7	Der Anteil CD 69 ⁺ NK-Zellen ist nach Kultivierung von NK Zellen hoch...	105

3.7.1	Der Anteil CD 69 ⁺ NK-Zellen CD 69 separierter NK-Zellen nach Aktivierung mit IL-15 und SEM-K2-Blasten ist nach Kultivierung hoch.....	106
3.7.2	Der Anteil CD 69 ⁺ NK-Zellen CD 69 separierter NK-Zellen nach Aktivierung mit IL-15 und ALL-Blasten erhöht sich nach Kultivierung....	107
4	Diskussion.....	110
4.1	Methodenkritik.....	110
4.2	Definition von NK-Zell-Subpopulation.....	113
4.3	Die Rolle des Aktivitätsmarkers CD 69.....	115
4.4	Die erhöhte zytotoxische Aktivität CD 69 ⁺ NK-Zellen gegen ALL-Blasten zeigt, dass sich NK-Zellen auf ihr Target einstellen können.....	116
4.5	CD 69 auf der Oberfläche von Patientenblasten – ein prognostischer Marker ?.....	118
4.6	Vermehrte CD 56 Expression als Zeichen expandierender NK-Zellen.....	118
4.7	Ausblick.....	119
5	Zusammenfassung.....	120
6	Literaturverzeichnis.....	122
7	Anhang	
7.1	Abbildungsverzeichnis.....	128
7.2	Tabellenverzeichnis.....	135

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADCC	antibody dependent cellular cytotoxicity
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
AUL	akute unklassifizierbare Leukämie
BADTA	bis(acetoxymethyl) 2,2':6',2"-terpyridin-6,6"-dicarboxylat
c-ALL	common acute lymphatic leukaemia
CD	Cluster of Differentiation
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CML	chronisch myeloische Leukämie
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTV-1	NK-Zell resistente akute lymphatische Leukämiezelllinie
Cw	HLA-Cw Serotypen
cyt	cytoplasmatic
DNA	Desoxyribonucleinacid
FACS	Flourescence activated cell sorting
Fc	Fragment crystallizable
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluorescein
FSC	Forward Scatter
g	relative Erdbeschleunigung
Geo Mean	geometrischer Mittelwert
GvHD	Graft versus Host Desease
GvL	Graft versus Leukemia desease
Gy	Gray
h	Stunden
HLA	humanes leukozyten Antigen
HR	high risk
IE	Internationale Einheiten
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin

IL	Interleukin
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motifs
K562	MHC I negative chronisch myeloische Leukämiezelllinie
KIR	Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor
LILR	Leukocyte Immunoglobulin-like Receptor
LUC	Large Unstained Cells
m	membranständig
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MFD	Matched Family Donor
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minuten
ml	Milliliter
MMFD	Mismatched Family Donor
6-MP	6-Mercaptopurin
MR	Mittlere Risikogruppe
MRD	Minimal Residual Disease
MTX	Metotrexat
MUD	Matched Unrelated Donor
Mw	Mittelwert
N-CAM	Neural Cell Adhesion Molecule
NCR	Natürliche cytotoxische Rezeptoren
ng	Nanogramm
NHL	Non Hodgkin Lymphom
NK-Zelle	Natürliche Killer Zelle
NKG	Immunorezeptor auf NK-Zellen
NKp	natural killer cell receptor
NKT	Natürliche Killer T-Zelle
p	probability
PBS	Phosphat buffered Saline
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-chlorophyll protein

PHA	Phythämagglutinin
PI	Propidiumiodid
PPR	Prednison poor response
r	recombinant
RAJI	Burkitt-Lymphom-Zelllinie
RT	Raumtemperatur
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SEM-K2	NK-Zell resistente akute lymphatische Leukämiezelllinie
SR	Standard Risikogruppe
SSC	Sideward Scatter
Stabw	Standardabweichung
SZT	Stammzelltransplantation
Tab.	Tabelle
T-ANK	tumor-activated natural killer cells
TDA	2,2':6',2"-terpyridine-6,6"-dicarboxylic acid
TdT	Thymic deoxy transferase
TGF	Transforming growth factor
µl	Mikroliter

1. Einleitung

1.1. Akute Lymphatische Leukämie im Kindesalter

Mit 30% ist die akute lymphatische Leukämie die häufigste Krebserkrankung im Kindesalter. Verglichen mit der akuten myeloischen Leukämie ist die Inzidenz der ALL mit 3,3 Erkrankungen pro 100 000 Einwohner unter 15 Jahren etwa fünfmal höher. Im Median liegt das Erkrankungsalter der ALL bei 4,7 Jahren. Die Prognose der ALL ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Die wichtigsten international anerkannten Risikofaktoren sind die initiale Leukozytenzahl, das Alter, das Ansprechen auf die Therapie und seltene molekulargenetische Veränderungen. Weitere sehr wichtige prognostische Faktoren sind der Immunphänotyp und die Ploidie. Immunphänotypisch werden die B-Vorläufer-Zell-ALL, die B-ALL, die T-Vorläufer-Zell-ALL und die AUL (akute unklassifizierbare Leukämie) unterschieden [1].

In dieser Arbeit wurden nur Blasten kindlicher Patienten mit einer B-Vorläufer-Zell-ALL verwendet. Die immunologische Definition einer B-Vorläufer-Zell-ALL setzt voraus, dass die Blasten für mindestens 2 der 3 Oberflächenantigene CD 19, CD 79 α und CD 22 positiv sind. Außerdem sind die Blasten dieser Leukämiegruppe meist TdT und HLA-DR positiv [2].

Die B-Vorläufer-Zell-ALL wiederum wird in drei Gruppen eingeteilt, die common (c)-ALL, die prä-B-ALL und die pro-B-ALL. Die c-ALL tritt am häufigsten auf, hat die beste Prognose und c-ALL Blasten sind zusätzlich zu den oben genannten Oberflächenantigenen CD 10 positiv. Die prä-B-ALL hat innerhalb der Gruppe der B-Vorläufer-Zell-ALL die zweitbeste Prognose und in den prä-B-ALL Blasten ist zytoplasmatisches IgM nachweisbar. Die schlechteste Prognose hat die pro-B-ALL. Laut Definition exprimieren pro-B-ALL-Blasten keine weiteren zusätzlichen Differenzierungsantigene der B-Zell-Linie.

Bisher wurde die ALL im Kindesalter bis vor kurzem an der Universität Tübingen nach dem Protokoll ALL-BFM 2000 therapiert. Mittlerweile gibt es auch das neue auf den Erkenntnissen der Therapiestudie ALL-BFM 2000 aufbauende Studienprotokoll ALL-BFM 2009, auf das nicht näher eingegangen wird. Die Therapie der ALL besteht aus verschiedenen Phasen, der Induktionstherapie (mit Prednison bzw. Dexamethason, Vincristin, Daunorubicin, Asparaginase, Cyclophosphamid, Cytarabin, 6-Mercaptopurin und Methotrexat intrathekal), der Konsolidierung (mit 6-Mercaptopurin und Methotrexat sowohl intravenös als auch intrathekal), der Reintensivierung (mit Dexamethason, Vincristin, Doxorubicin, Asparaginase, Cyclophosphamid, Cytarabin, 6-Thioguanin und Methotrexat intrathekal) und der Erhaltungstherapie (mit Methotrexat und 6-Mercaptopurin). Insgesamt dauert die komplikationslose Therapie 104 Wochen, das heißt 2 Jahre. Die Einteilung in Standard-Risikogruppe (SR), Mittlere Risikogruppe (MR) und Hochrisikogruppe (HR) ist abhängig vom Ansprechen auf die initiale Prednison-Vorphase, der zytogenetischen Morphologie, der Zytomorphologie und MRD an Tag 33 des Therapieprotokolls.

In der MR-Gruppe wird das Reintensivierungsprotokoll III in Abhängigkeit von der Randomisierung in Protokoll III oder II wiederholt, ansonsten unterscheidet sich die Therapie nicht von der SR-Gruppe.

Ist ein Patient in die HR-Gruppe eingeteilt wird statt der Konsolidierung nach drei verschiedenen HR-Protokollen hintereinander in kurzen Abständen therapiert. Hierbei sind die Dosierungen der Chemotherapeutika verglichen mit den Dosierungen der Induktionstherapie wesentlich höher. Der Reintensivierungsphase in der SR-Gruppe entsprechen in der HR-Gruppe in Abhängigkeit von der Randomisierung 3-4 Chemotherapieblöcke. Entweder werden 3 Wiederholungen von Block III mit 4 wöchigen Zwischenintervallen, bei denen mit 6-MP und MTX therapiert wird, durchgeführt oder HR-Block 1, 2, 3 und der Reintensivierungsblock II wird in 2-wöchigen Abständen verabreicht [3].

1.2. Residuale Resterkrankung und Stammzelltransplantation

Der Begriff minimale residuale Resterkrankung (MRD) bezeichnet residuale Tumorzellmengen im untersuchten Material unterhalb der Nachweisgrenze morphologischer Untersuchungsmethoden, deren Sensitivität bei etwa 1% liegt. Folglich können zum Zeitpunkt einer mit dem Mikroskop morphologisch definierten, kompletten Remission noch 10^{10} Blasten vorhanden sein [2]. Während der Therapie der ALL werden in bestimmten Abständen zu genau definierten Zeitpunkten Knochenmarkspunktionen zur Bestimmung der MRD durchgeführt. Die genaue Untersuchung des Knochenmarks erfolgt mittels Multiparameter-Durchflußzytometrie oder Polymerase-Kettenreaktion [4]. Die MRD gilt als negativ bei einer gemessenen Sensitivität von $\leq 1:10\ 000$. Wird die MRD mit Markern einer höheren Sensitivität von z.B. $1:1\ 000\ 000$ bestimmt, ist auch eine Negativität bei den jeweiligen KM-Untersuchungen zu fordern [3].

Die allogene Stammzelltransplantation (SZT) ist bei allen Hochrisiko-Patienten mit bestimmten Voraussetzungen indiziert. Indikationen zur SZT ist ein MRD-Niveau an Tag 1 des Protokoll M von $1:3000$ oder von $> 1:3000$, ein höheres MRD-Niveau an Tag 1 des Protokoll M als an Tag 33 Protokoll 1 und ein MRD-Niveau an Tag 1 des Protokoll M $\geq 1:3000$. Weitere Indikationen zur SZT sind ein nicht Ansprechen auf die Therapie bis Tag 33 des Therapieprotokolls, ein nicht-Ansprechen auf Prednison (PPR) kombiniert mit der Diagnose einer T-ALL oder Pro-B-ALL, einer Leukozytenzahl (WBC) ≥ 100.000 , einer Translokation $t(9;22)$ oder einer Translokation $t(4;11)$. Außerdem ist die SZT bei Hochrisikopatienten mit M3-Mark an Tag 15 des Therapieprotokolls indiziert [3].

Es werden drei Arten der allogenen, das heißt nicht körpereigenen, SZT unterschieden: die Familienspendertransplantation (MFD = matched family donor), die Fremdspendertransplantation (MUD = matched unrelated donor) und die haploidente Transplantation (MMFD = mismatched family donor)[3].

Insgesamt ist die allogene Transplantation mit hämatopoetischen Vorläuferzellen die einzige kurative Therapie vieler bösartiger und nicht bösartiger Erkrankungen [5, 6].

Die haploidente SZT eines Spenders aus der Familie hat den großen Vorteil, dass der Spender sofort zur Verfügung steht und nicht nach einem HLA kompatiblen Fremdspender gesucht werden muss. Dies ist ein riesiger Fortschritt, denn nur 25% der Patienten, die transplantiert werden müssen haben ein HLA identisches Geschwisterkind und für weniger als 60% der verbleiben Patienten kann ein freiwilliger HLA-kompatibler Patient gefunden werden [7, 8]. Das 3 jährige krankheitsfreie Langzeitüberleben betrug in der an der Universitätskinderklinik Tübingen durchgeführten Studie mit 39 Patienten 38%. Den Kindern, die in dieser Studie haploident Stammzell-transplantiert wurden, stand keine alternative kurative Therapiemöglichkeit zur Verfügung. Es wurden Kinder mit malignen (ALL, AML, MDS, CML, Hodgkin Lymphom und NHL) und nicht-malignen (SCID, Wiskott-Aldrich-Syndrom, schwere aplastische Anämie und Osteopetrosis) Erkrankungen transplantiert. Bei den malignen Erkrankungen betrug die Wahrscheinlichkeit für das ereignisfreie 3-jährige Langzeitüberleben 28% (n=31) [6]. Mittlerweile ist die haploidente SZT etabliert zur Behandlung von Patienten mit einer Hochrisiko-Leukämie oder einem Leukämierезidiv [9-11]. Durch den nicht übereinstimmenden HLA-Typ des Patienten mit dem des Spenders ist der Graft-versus-Leukämie Effekt besser als bei der HLA kompatiblen Fremdspender SZT. Das Risiko für eine GVHD, verursacht durch zytotoxische T-Zellen, ist jedoch höher als bei der SZT mit HLA-Kompatibilität (match). Um möglichst nur die „schädlichen“ Lymphozyten hinsichtlich Lymphomen und GVHD auszusortieren ist die CD19/CD3 Depletion mit Magnet-Antikörpern Standard geworden bei der allogenen SZT. Damit wird im Vergleich zur CD34 Anreicherung und CD3 Depletion eine deutlich höhere Menge an NK-Zellen transfundiert, ein schnelleres Engraftment gefördert und die Zeit, in der die Patienten praktisch kein Immunsystem besitzen verkürzt [12].

1.3. NK-Zellen verbessern die Tumorlyse nach Stammzelltransplantation

Die Lymphozyten werden in B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und NK-Zellen eingeteilt. NK-Zellen machen mit etwa 15% den kleinsten Anteil an Lymphozyten im peripheren Blut aus und sind unabdingbar für die regelrechte Funktion des angeborenen Immunsystems. Sie lysieren virusinfizierte und neoplastische körpereigene Zellen. NK-Zellen sind große granulierende Lymphozyten, die Zielzellen „natürlich“ töten können, das heißt spontan unabhängig von einer Vorstimulation (priming) und der Expression von MHC auf der Zielzelle [13].

Im Gegensatz zu B- und T-Zellen, die zum erworbenen Immunsystem gehören, zählt man NK-Zellen zur angeborenen Immunabwehr [14]. Wobei einige Studien zeigen, dass NK-Zellen sowohl Eigenschaften des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems aufweisen und folglich postuliert wird, dass sie eine Zwischenform darstellen [15]. Durch die Interaktion mit dendritischen Zellen [13, 16] Monozyten, T-Zellen und Endothelzellen [17] haben NK-Zellen einen starken regulatorischen Einfluß auf das erworbene Immunsystem. NK-Zellen sind in lymphatischen und nicht lymphatischen Geweben [17] anzutreffen, hauptsächlich befinden sie sich im peripheren Blut, der Milz und im Knochenmark [18].

Klassischerweise werden NK-Zellen immunologisch, phänotypisch als $CD56^+$ und $CD3^-$ definiert [19, 20]. NK-Zellen werden in zwei Hauptgruppen, $CD56^{high}$ und $CD56^{dim}$ eingeteilt [21-23]. $CD56^{dim}$ NK-Zellen befinden sich hauptsächlich im peripheren Blut und werden in die primär für die zytotoxische Aktivität gegen Tumorzellen verantwortlichen $CD56^{dim}/CD16^-$ NK-Zellen und die weniger zytotoxisch aktiven $CD56^{dim}/CD16^+$ NK-Zellen eingeteilt [24]. Im peripheren Blut stellen die $CD56^{dim}/CD16^+$ NK-Zellen die Mehrheit dar [25]. $CD56^{high}$ NK-Zellen, die hauptsächlich Zytokine und andere Botenstoffe wie Interferon γ produzieren und eine geringe zytotoxische Aktivität aufweisen, sind in der Mehrzahl in Lymphknoten

anzutreffen [21, 26, 27]. Innerhalb der letzten Jahre wurden auch dysfunktionale CD56 negative NK-Zellen im peripheren Blut von HIV infizierten Patienten entdeckt. Diese sind kaum zytotoxisch aktiv und weisen eine minimale Zytokinproduktion auf [28]. Die NK-Zell-typischen Marker NKp46 und NKp36, die zu den natürlichen Zytotoxizitäts-Rezeptoren (NCRs) gehören, werden von den CD56 negativen NK-Zellen in geringem Maße exprimiert [28]. Der N-CAM (neural cell adhesion molecule) Rezeptor CD56 wird nicht ausschließlich an der Oberfläche von NK-Zellen, sondern teilweise auch auf dendritischen Zellen und T-Zellen exprimiert [29]. Bisher gibt es noch keinen ausschließlich NK-Zell-spezifischen Marker [13]. In einem Studienergebnis von 2009 werden NK-Zellen als CD7/CD56 doppelt positiv definiert und postuliert diese Definition sei spezifischer als die klassische CD56⁺/CD3⁻ [29].

Zur verbesserten Behandlung der MRD nach Stammzelltransplantation ist die Infusion von Spender NK-Zellen ein vielversprechender Therapieansatz [20], da allogene NK-Zellen für GVL Effekte verantwortlich sind [16, 20, 30, 31]. Außerdem induzieren die Spender NK-Zellen bei dem Empfänger keine GVHD [30, 32-34]. Im Gegenteil sie reduzieren sogar die GVHD indem sie aktivierte, alloreaktive T-Zellen indirekt durch das Töten von unreifen dendritischen Zellen hemmen. Durch eine reduzierte Zahl an unreifen dendritischen Zellen wird deren Migration und damit die Aktivierung (priming) von T-Zellen in sekundären lymphatischen Geweben limitiert [35]. Hinzu kommt, dass NK-Zellen bei der Immunrekonstitution nach SZT als erste Lymphozytenpopulation im Gegensatz zu den B- und T-Zellen bereits nach einem Monat eine normale Aktivität aufweisen [36]. In klinischen Studien konnte bereits eine erfolgreiche Therapie von bestimmten Leukämien mit alloreaktiven NK-Zellen additiv zur Stammzelltransplantation gezeigt werden [34, 37, 38]. Bei der Immuntherapie mit NK-Zellen allogener Spender nach haploidenter SZT wurden diese aufgereinigt, aktiviert und in einer großen Anzahl dem kindlichen Patient appliziert [32]. Bei STZ von Kindern mit pre-B-Zell Leukämie, ALL und AML konnte mit NK-Zell Co-Infusion eine geringere Rückfallrate als bei der konventionellen SZT beobachtet werden [39, 40]. Im Vergleich zur klassischen Expansion von NK-

Zellen durch Kultivierung mit IL-2, IL-15, IL-12 und/oder IL-21, konnte eine noch bessere Expansion mit modifizierten, membrangebundenen IL-15 exprimierenden K562-Blasten erreicht werden [41]. Hierbei wurden NK Zellen sehr erfolgreich mit bestrahlten IL-15 und 41BB Ligand exprimierenden K-562 Blasten kultiviert [36].

1.3.1 NK-Zell-vermittelte Zytolyse von Blasten

Es gibt mehrere Auslöser die NK-Zellen dazu bewegen veränderte körpereigene Zellen zu lysieren.

Bereits 1990 wurde die "missing self" Hypothese als Erklärung für die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen aufgestellt [42]. Nach dieser Hypothese erkennen NK-Zellen aufgrund fehlender Expression von MHC Klasse I Molekülen an der Oberfläche von entarteten oder virusinfizierten körpereigenen Zellen diese als fremd und lysieren sie [43]. Diese Hypothese konnte anhand der besseren Lyse leukämischer, kindlicher Blasten der B-Zell-Reihe durch NK-Zellen, deren HLA Klasse I Moleküle, das heißt unter anderem deren Killer-Zell Immunoglobulin-ähnlichen Rezeptoren (KIR) nicht mit denen der Blasten übereinstimmten, belegt werden [44]. Oberflächenrezeptoren, die zur Klasse der KIR gehören werden genetisch klassischerweise durch die HLA-Klasse I Gene kodiert [45]. Das Fehlen von KIR vermittelter Hemmung ist jedoch nicht alleiniger Anlaß für die NK-Zell-Lyse von primären Leukämien [30, 46].

Über CD16, den als erstes identifizierten aktivierenden NK-Zell Rezeptor, wird die Antikörper-abhängige zelluläre-Zytotoxizität (ADCC) vermittelt. Dies wurde durch die bessere zytotoxische Aktivität von NK-Zellen gegenüber Antikörper markierten Zielzellen bewiesen [47]. Hierbei wird der Fc ϵ R1 γ -Teil des an der Oberfläche der Zielzelle gebundenen Antikörpers an den Fc-Rezeptor CD16 gebunden [15].

Allgemein unterscheidet man aktivierende und inhibierende NK-Zell Rezeptoren, die miteinander im Gleichgewicht stehen. Unter den KIR werden auch die

zytotoxische Aktivität hemmende und fördernde Rezeptoren unterschieden [15]. KIR werden durch die für HLA Klasse I kodierenden Gene HLA-A, HLA-B und HLA-C determiniert [48]. Die bisher bekannten KIR wirken bei Bindung des Liganden der Zielzelle an den Rezeptor hauptsächlich inhibierend auf die NK-Zelle [15]. Je weniger Liganden und Rezeptoren miteinander übereinstimmen (KIR mismatch) und je weniger HLA Klasse I Moleküle auf der Zielzelle vorhanden sind, desto besser ist die NK-Zell vermittelte Lyse [49]. Das HLA-A Allel determiniert KIR3DL2/CD158k, das HLA-B Allel KIR3DL1/CD158e und das HLA-C Allel KIR2DL1/CD158a, KIR2DL2, KIR2DL3/CD158b. In vorliegender Arbeit lag bei der Untersuchung der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen meist ein KIR mismatch vor. KIR2DL2 (158b) bindet an HLA I Moleküle der C1-Gruppe (HLA-Cw3), KIR2DL1(CD158a) bindet an HLA I Moleküle der C2-Gruppe (HLA-Cw4) und KIR3DL1 (CD158e) bindet an HLA-Bw4-Moleküle [50]. Weitere inhibierende Rezeptoren sind LILR (leukocyte immunoglobulin-like receptors), die wie KIR monomere Typ I Glykoproteine der Immunglobulinfamilie sind und CD94/NKG2A, der ein C-Typ Lektin-ähnliches Typ II Glykoprotein darstellt [51].

NK-Zellen besitzen im Gegensatz zu B- und T-Zellen nicht einen dominierenden aktivierenden Rezeptor, sondern greifen auf ein großes Repertoire an Rezeptoren zurück, die in Kombination miteinander Zytotoxizität beziehungsweise eine Aktivierung bewirken [51]. Zu den aktivierenden Rezeptoren zählt der oben erwähnte CD16 Rezeptor, der als einziger Rezeptor alleinig zytolytische Aktivität bewirken kann [51]. Weitere aktivierende bzw. co-aktivierende Rezeptor-Gruppen, die aufgrund drei unterschiedlicher Signalwege wirken, sind die ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) abhängigen NK Rezeptor Komplexe, die DAP10-assoziierten NKG2D Rezeptor Komplexe und das CD244 Rezeptor System [51].

Weder die genaue Funktion der natürlichen Killer Zell Rezeptoren NKp30, NKp44 und NKp46, noch deren Liganden sind bekannt [15, 52].

Für die erfolgreiche zytotoxische Aktivität von NK-Zellen ist deren primäre Aktivierung (priming) und ein Trigger (triggering) notwendig [46]. Ursache für die NK-Zell Resistenz von Tumoren sei entweder das Fehlen eines primär aktivierenden Liganden oder eines Trigger-Liganden [46]. Im Gegensatz zu NK-Zell Klonen oder IL-2 aktivierten NK-Zellen, benötigen inaktive NK-Zellen als Trigger zur Lyse mindestens zwei Rezeptor-Ligand-Bindungen [53].

Die Lyse der Zielzellen selbst läuft über zwei Mechanismen ab: Einerseits über Apoptoseinduktion durch Bindung der NK-Zelle an den Fas-Liganden (APO-1, CD95) von Zielzellen, andererseits über Apoptoseinduktion durch Exozytose zytotoxischer Granula [54]. Durch die Interaktion der NK-Zelle mit der Zielzelle strömt Ca^{2+} in die NK-Zelle ein, anschließend kommt es zur Fusion der zytoplasmatischen Granula mit der Zellmembran und ihr Inhalt bestehend aus Proteasen und Perforin wird freigesetzt. Über die durch Perforin geschaffenen Poren in der Membran der Zielzelle gelangen die Proteasen in deren Zytoplasma und bewirken Apoptose. CD107a ist in der Granulamembran lokalisiert und somit ein funktioneller Marker der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen. Bei Fusionierung der Granula mit der Zellmembran ist CD107a an der NK-Zell Oberfläche nachweisbar [54].

Die NK-Zell Aktivität wird direkt durch Zytokine wie IL-2, IL-12, IL-15, IL-21 oder IFN- α beeinflusst, die die lytische Aktivität erhöhen und die Lebensdauer verlängern können [52].

1.3.2 Interleukin-2 aktiviert NK-Zellen

Interleukin-2 ist ein lymphozytärer Wachstumsfaktor, der von aktivierten T-Zellen produziert wird [55]. Als Zytokin aktiviert er T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und NKT-Zellen [55-57]. IL-2 gehört zur Gruppe Proteine mit 4 Helices und bindet an einen heterotrimeren IL2-Rezeptor, der aus α -, β - und γ -Ketten besteht [55].

IL-2 aktivierte NK-Zellen lysieren Zielzellen besser als nicht stimulierte NK-Zellen und sie benötigen nur einen Liganden als Trigger um zytotoxisch aktiv zu werden [53]. Auch zur Prävention von Autoimmunität spielt IL-2 eine einzigartige Rolle bei der Eliminierung von zytotoxischen T-Zellen, die sich gegen den eigenen Körper richten [58].

Therapeutisch wird IL-2 erfolgreich hauptsächlich subkutan eingesetzt. Tiermodelle zeigten, dass die Expression von transgenem IL-2 die Lyse von Tumoren, Leukämien mit eingeschlossen, verbessert [59]. Erfreulicherweise induziert IL-2 kaum eine Proliferation von leukämischen Blasten [60], selbst wenn die Blasten IL-2 Rezeptoren exprimieren [61].

In vorliegender Arbeit wurde IL-2 einerseits zur Stimulation von NK-Zellen, andererseits zur Kultivierung von separierten NK-Zellen mittels Magnet Antikörpern verwendet.

1.3.3 Interleukin-15 aktiviert NK-Zellen

IL-15 ist wie IL-2 ein lymphozytärer Wachstumsfaktor, der im Gegensatz zu IL-2 von vielen Zellen produziert wird [55], vor allem von Monozyten und „nicht-T-Zellen“ [62]. Er bindet zwei verschiedene Rezeptor Komplexe. Auf Lymphozyten bindet IL-15 an einen trimeren Rezeptor (IL-15R), der aus der IL-15R α -Kette und der mit dem IL-2R geteilten β - und γ -Kette besteht [55, 57]. IL-15 bindet auf Mastzellen an einen speziellen IL-15RX Rezeptor [55]. Sowohl IL-15 als auch IL-2 steigert die Interferon γ Produktion von NK-Zellen [55]. Außerdem steigert die IL-15 Exposition die Expression von CD69, CD56, CD48 und NKG2D von NK-Zellen, auf andere Oberflächenmoleküle wie NKG2A, CD244, NKp46 hat IL-15 keinen signifikanten Einfluss [63].

Gebunden an die hoch affine IL-15R α -Kette stimuliert IL-15 in vivo im Mausmodell sehr potent NK-Zellen. Hier stellte sich heraus, dass im Mausmodell in vivo mit IL-

IL-15 expandierte NK-Zellen eine promptere Abstoßung von Hauttransplantaten verursachte. Da in den Mäusen keine anderen Zellen der adaptiven Immunabwehr vorhanden waren ist diese Abstoßungsreaktion nur auf die NK-Zellen zurückzuführen [64]. Bisher wird in vivo am Menschen keine Therapie mit IL-15 durchgeführt.

Bei der Kultivierung von NK-Zellen zusammen mit bestrahlten IL-15 produzierenden K562-Blasten konnte eine um 10er Potenzen höhere Expansion von NK-Zellen erreicht werden als bei der Kultivierung mit laborchemisch hergestelltem IL-2 und IL-15 [65].

In der vorliegenden Arbeit wurden NK-Zellen mit IL-2 und IL-15 in vitro expandiert, die oben beschriebene Methode der Expansion mit IL-15 produzierenden K562 Blasten war bei Durchführung der Versuche noch nicht bekannt. Außerdem wurde das Zytokin IL-15 zur Aktivierung von NK-Zellen vor Zytotoxizitätstests verwendet.

1.4 CD69 als Aktivierungs-Marker von NK-Zellen

CD 69 spielt als sehr früher Aktivierungsmarker von Lymphozyten und als ein variables Signalmolekül eine Schlüsselrolle bei Effektor-Funktionen des Immunsystems [66]. Exprimiert wird CD69 an der Oberfläche von CD3^{bright} Thymozyten, Monozyten [67], Neutrophilen Granulozyten, Langerhans' Zellen, Thrombozyten und erscheint sehr früh bei Aktivierung von T-Lymphozyten, NK-Zellen, Makrophagen, und weiteren Zellen hämatopoietischen Ursprungs an deren Oberfläche [66]. In vivo Tiermodelle unterstreichen die Rolle von dem Membranprotein CD69 bei der genetischen Regulation der Zytokinproduktion und bei der Zell Migration von aktivierten Leukozyten [68]. Es konnte in einer Studie mit Mäusen gezeigt werden, dass die genetische Steuerung von CD69 komplex ist und in B- und T-Zellen unterschiedlich reguliert wird [68]. Das CD69 Gen ist im NK-Zell-Komplex des Menschen auf Chromosom 12 lokalisiert [68]

Als Typ II Membranprotein, genauer homodimeres C-Typ Lektin, besteht CD69 aus zwei über eine Disulfidbrücke verbundene phosphorylierte und unterschiedlich glykosylierte Polypeptidketten [66].

Zur Aktivierung zytotoxischer Funktionen von zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen ist CD69 als Teil einer Signalvernetzung zwischen aktivierenden und hemmenden Rezeptoren auf der Oberfläche dieser Zellen wichtig [66, 69]. Dieses Triggermolekül auf aktivierten NK-Zellen ist sowohl fähig Zytotoxizität zu induzieren als auch die Zytokinproduktion anzuregen [70]. Nach aktuellen Studienergebnissen scheint der CD69 Rezeptor sowohl die zytotoxische NK-Zell-Aktivität hemmende als auch aktivierende Eigenschaften zu haben [66]. Es gibt bisher keine allgemein einheitliche Erkenntnis über die genaue Funktion von CD69.

CD69^{-/-} Mäuse lysieren Tumoren, die MHC Klasse I Moleküle nur in geringer Menge exprimieren, deutlich besser als CD69 positive Mäuse. Dies hängt vor allem mit einer geringeren TGF- β Produktion zusammen [71]. Monoklonale anti-CD69 Antikörper, die weder Maus-Komplement binden, noch ADCC von NK-Zellen fördern oder FcR-induzierten Zelltod induzieren, bewirken im Mausmodell eine vermehrte zytotoxische NK-Zell Aktivität gegen maligne Zellen mit geringer MHC I Expression. Eine Erklärung hierfür ist die Hemmung der TGF- β Produktion von NK-Zellen durch Blockade des CD69 Rezeptors auf NK-Zellen mit monoklonalen anti-CD69 Antikörpern [72].

NK-Zellen gesunder Spender, die mit bestrahlten Blasten einer NK resistenten, akuten lymphatischen Leukämiezelllinie (CTV-1) inkubiert wurden, synthetisierten bereits innerhalb von 60 Min CD69 mit einer maximalen Oberflächenexpression nach 6 Stunden [46]. Hierbei nahm die CD69 Expression konstant zu während die CD16 Expression auf den NK-Zellen deutlich abnahm [46]. Die mit CTV-1 primär aktivierten NK-Zellen (priming) wurden in CD69⁺ und CD69⁻ Fraktionen separiert. Die CD69⁺ NK-Zellen lysierten maligne Zellen der NK-Zell resistenten, MHC I exprimierenden Burkitt-Lymphom-Zelllinie RAJI mehr als doppelt so gut wie CD69⁻ NK-Zellen (n=5) [46]. Weiter lysierten primär mit CTV-1 Blasten inkubierte NK-Zellen (T-ANK) AML-Patientenblasten allgemein besser als nicht primär mit CTV-1

aktivierte NK-Zellen. Auf diesen AML Blasten konnte mittels eines löslichen rCD69-Rezeptors ein unbekannter CD69-Ligand blockiert werden. Durch diese Blockierung verschlechterte sich die spezifische Lyse der Blasten signifikant um ca. 5% (n=5). Auf MHC I negativen K562-Blasten konnte mit dem löslichen rCD69-Rezeptor kein Ligand blockiert werden [46].

Bisher ist weder ein CD69 Ligand noch die genaue Funktion des CD69 Rezeptors bekannt.

1.5 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war eine NK-Zellsubpopulation zu finden, die ALL-Blasten der B-Zellreihe kindlicher Patienten mit Hochrisiko oder Rezidiv besser lysieren als andere NK-Zellsubpopulationen. Weiter sollte geklärt werden ob es möglich ist spezifische NK-Zellen eines gesunden Spenders zu kultivieren, die einem kindlichen Patienten mit B-ALL zur verbesserten Bekämpfung der MRD nach Stammzelltransplantation verabreicht werden können.

Folglich stellen sich hierzu zwei Fragen. Erstens: Inwiefern ändern sich NK-Zell-Subpopulationen gesunder Spender im zeitlichen Verlauf zytokin- und zielzellabhängig? Zweitens: Gibt es verglichen mit anderen NK-Zellen, spezifische NK-Zellen eines gesunden Spenders mit einer besseren zytotoxischen Aktivität gegen B-ALL-Blasten pädiatrischer Patienten?

Zur Klärung dieser Thematik wurde zunächst das Verhalten der Aktivitätsrezeptoren CD 16 und CD 69 auf NK-Zellen mittels FACS-Analysen in Abhängigkeit von verschiedenen Stimuli und der Zeit untersucht. Anschließend wurden Zytotoxizitätstests mit CD 69 separierten NK-Zellen durchgeführt. Um festzustellen ob die separierten NK-Zellen nach polyklonaler Expansion ihre spezifischen zytotoxischen Eigenschaften beibehalten, wurden weitere Zytotoxizitätstests nach Kultivierung der CD 69⁺ und CD 69⁻ NK-Zellen durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellen

Tab.1: Zelllinien

Zellen	HLA C/B - Typ	Herkunft
K- 562	MHC Klasse I negativ	DSMZ
SEM – K2	Cw 3 +, Cw 4 -	Prof. Greil Heidelberg

Tab.2: Spender

Zellen	HLA C/B - Typ	Hintergrund
Spender 1 S.G.	Cw3 + ,Cw4 + ,Bw4 -	gesund
Spender 2 J.H.	Cw3 + ,Cw4 - ,Bw4 -	gesund
Spender 3 U.M.	Cw3 + ,Cw4 + ,Bw4 -	gesund
Spender 4 C.Z.	Cw3 + ,Cw4 + ,Bw4 -	gesund
Spender 5 M.S.	Cw3 + ,Cw4 + ,Bw4 +	gesund
Spender 6 K.W.	Cw3 + ,Cw4 + ,Bw4 +	gesund
Spender 7 A.W.	Unbekannt	gesund
Spender 8 M.P.	Cw3 + ,Cw4 + ,Bw4 +	gesund

Aus dem Vollblut der in Tabelle 2 genannten Spender wurden PBMCs und NK-Zellen gewonnen. Feeder - Zellen für die NK-Zellkulturen wurden aus mit 30 Gy bestrahlten PBMCs verschiedener gesunder Spender mit HLA-mismatch zum NK-Zellspender gewonnen.

Tab.3: Patientenblasten

Zellen	HLA C/B - Typ	Hintergrund
Patient 1	Cw3 - ,Cw4 + ,Bw4 +	11 jähriges Mädchen mit c-ALL Rezidiv
Patient 2	Cw3 + ,Cw4 - ,Bw4 +	9 jähriger Junge mit c-ALL Erstdiagnose
Patient 3	Cw3 - ,Cw4 + ,Bw4 -	9 jähriger Junge mit prä- oder pro-B-ALL Erstdiagnose

Die Patientenblasten in Tabelle 3 waren kryokonserviert und wurden zu Versuchszwecken aufgetaut.

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Albumin-Lösung human (5%) autologes Serum der NK-Zell-Spender AB Rh pos, CMV pos Humanserum	Blutspendedienst DRK, Deutschland aus Vollblut der Spender in Tab. 2 Pool HS Tübingen, Deutschland
BATDA – Ligand	Wallac Oy, Turku, Finland
Biocoll - Hypaque	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
DMSO (CryoSure - Dimethylsulfoxid)	WAK-Chemie Medical GmbH
Europium - Lösung	Wallac Oy, Turku, Finland
FACS-Flow™	BD Biosciences, Ontario, Canada
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Heparin-Natrium 25 000 (100 µl = 500 IE)	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Hepes-Buffer 1 M	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Interleukin 2, human, Proleukin®	Chiron, Emmerlyville, California, USA
Interleukin 15, human, rekombinant	R & D Systems, Minneapolis, USA

L-Glutamin (200 nm)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Lyse – Puffer	Wallac Oy, Turku, Finland
MACS-Puffer (CliniMacs buffer)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Gibco, Eggenstein, Deutschland
Phytohämagglutinin (PHA)	REMEL LIMITED, Dartford, Großbritannien
Polyglobin (5 % humanes IgG)	Bayer Vital, Fernwald, Deutschland
Propidiumiodid (0,5 mg/ml PBS)	Sigma Aldrich Corp., St. Louis, USA
RPMI 1640	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Trypanblau 0,4 %	Sigma - Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland

2.1.3 Zell-Kultur-Medien

Medium A: Zellkulturmedium:

- | | |
|---|--------------------------------|
| • 500 ml RPMI 1640 | Biochrom, Berlin, Deutschland |
| • 50 ml Fetales Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert (30 min bei 56°C) | Gibco, Eggenstein, Deutschland |
| • 5 ml L-Glutamin (200 mM) | Biochrom, Berlin, Deutschland |
| • 5 ml Penicillin/Streptomycin (Vorratslösung: 10000 U/ml) | Biochrom, Berlin, Deutschland |
| • 12,5 ml Hepes-Buffer 1 M | Biochrom, Berlin, Deutschland |

Medium B: NK-Zell-Kulturmedium:

- | | |
|--|--|
| • 42,5 ml Medium A ohne FCS | Selbst hergestellt
Pool-HS/Tübingen |
| • 7,5 ml autologes Serum des Spenders oder 7,5 ml AB-Rh positives Humanserum | |

Einfriermedium:

- 8 ml humane Albumin – Lösung (5%)
- 2 ml Dimethylsulfoxid (DMSO)

DRK

WAK–Chemie Medical GmbH

2.1.4 Geräte

Bestrahlungsgerät

Beheizbares Wasserbad

Brutschrank Hera cell

Blutanalysegerät: Cellcounter Advia 120

Cell Disruptor Sonifier B-12

FACS Calibur

- Angeschlossene Hardware
- Auswertungsprogramm CellQuestpro

FACS-Aria

- Angeschlossene Hardware
- Software

Inversionsmikroskop

Lichtmikroskop

Magnete

- Vario MACS
- MiniMACS

Multilabel Counter Victor 1420

- Angeschlossene Hardware
- Software

Tischschüttler

Ultraschallbad Sonorex, Super RK 100 SH

Vortexgerät Reax top

Gamma-Cell

Memmert, Schwabach, Deutschland

Heraeus Instruments, Hanau,
Deutschland

Bayer Diagnostics, Dublin, Irland

Branson Sonic Power, Danbury, USA

Becton Dickinson, Heidelberg,
Deutschland

Apple

Becton Dickinson

Becton Dickinson, Heidelberg,
Deutschland

Windows

FACS Diva

Olympus, Japan

Olympus, Japan

Mitlenyi Biotec,

Bergisch Gladbach, Deutschland

Wallac, Turku, Finland

Compaque

Wallac 1420 Workstation

Heidolph, Nürnberg, Deutschland

Bandelin, Berlin, Deutschland

Heidolph, Nürnberg, Deutschland

Sterile Werkbank Hera safe

Heraeus Instruments, Hanau,
Deutschland

Zentrifugen:

- Rotixa 50 RS
- Rotixa RP

Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Hettich, Tuttlingen, Deutschland

2.1.5 Laborzubehör

Butterfly (Safety-Multifly-Set)

Sarsted, Nümbrecht, Deutschland

Deckglas

Menzel, Braunschweig,
Deutschland

FACS-Analyseröhrchen (5 ml, Rundboden)

BD Biosciences, Bedford, USA

Handschuhe

Ansell, Kulim, Malaysia

Kanülen Sterican®, 19 G, 20 G, 22 G, 24 G

Braun, Melsungen, Deutschland

Neubauer – improved

Brand, Wertheim, Deutschland

Mikrotiterplatte, 96-Well, U-Form, F-Form

Greiner, Frickenhausen,
Deutschland

Pipette Pipetman (10, 20, 100, 200, 1000 µl)

Gilson, Villers-le Bel, Frankreich

Pipettierhilfe Pipettboy

Integra Biociences, Fernwald,
Deutschland

Pipettenspitzen (10, 200, 1000 µl)

Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Plastikpipetten, steril (1, 2, 5, 10, 25, 50 ml)

Costar, Corning, USA

Probenröhrchen, steril, 15 ml, 50 ml

Greiner bio-one GmbH,
Frickenhausen, Deutschland

Reaktionsgefäße, steril, 1,5 ml

Eppendorf,

Separationssäule Typ 25 LS

Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach,
Deutschland

Serumröhrchen (4,5 ml, 7,5 ml)

Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Spritzen, steril, 10 ml, 20 ml, 50 ml

Braun, Melsungen, Deutschland

Transferpette® (5-50 µl, 20-200 µl)

Brand, Wertheim, Deutschland

Zellsieb 40 µm

BD Biosciences, Bedford, USA

Zellkulturflasche, 200 ml

Greiner bio-one GmbH,
Frickenhausen, Deutschland

2.1.6 Immunologische Kits und MicroBeads

CD 19 MicroBeads (human)

Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach,
Deutschland

CD 56 MicroBeads (human)

Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach,
Deutschland

CD 69 MicroBead Kit (human)

Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach,
Deutschland

NK Cell Isolation Kit (human)

Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach,
Deutschland

2.1.7 Antikörper

Antikörper für den Isotypenansatz:

IgG1 in FITC, PE, PerCP und APC alle Klon X40 und von Becton Dickinson

Liste primärer Antikörper:

Antikörper	Isotyp	Klon	Farbe	Hersteller
CD 3	IgG1	SK7	FITC	Becton Dickinson
		SK7	PerCP	
CD 16	IgG1	Leu 11c	PE	BD Biociences, San Jose,
			FITC	USA
CD 19	IgG1	4G7	FITC	BD Biociences, San Jose,
	IgG1	SJ25C1	PE	USA
CD 45	IgG1	2D1	FITC	Becton Dickinson
CD 56	IgG1	B159	APC	BD BiociencesPharmingen
	IgG1	NCAM16.2	PE	BD Biociences, San Jose,
				USA
CD 69	IgG1	FN50	FITC	Becton Dickinson, San
	IgG1	FN50	APC	Jose, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturen

2.2.1.1 Zelllinien

2.2.1.1.1 Hintergrund

In dieser Arbeit wurde die NK-Zell-sensitive Zelllinie K562 als Referenzzelllinie, zur Stimulation von NK-Zellen und in Zytotoxizitätstests als Ziel (Target) verwendet. An der Oberfläche der erythroleukämischen Zellen dieser Zelllinie wird MHC der Klasse I nicht exprimiert. Folglich exprimieren sie keine KIR-Rezeptoren und werden deshalb von NK-Zellen besonders gut lysiert. Diese Zelllinie wurde 1970 während einer Blastenkrise einer 53-jährigen CML-Patientin isoliert [73].

Außerdem wurde eine zweite Zelllinie SEM-K2, die von NK-Zellen nur schwer lysierbar ist, für die Stimulation und den Nachweis der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen verwendet. Die SEM-K2 Zelllinie ist ein Subklon der SEM-Zelllinie, die mit Lymphoblasten eines fünfjährigen Mädchens während des ersten ALL-Rezidivs etabliert wurde. Typischerweise geht die chromosomale Aberration $t(4;11)(q21;q23)$ mit pro-B-ALL im Kindesalter und einer schlechten Prognose einher. Auch in der SEM und SEM-K2 Zelllinie liegt diese Chromosomenaberration vor. Charakteristischerweise koexprimieren diese beiden Zelllinien den B-Zellmarker CD 19 und den myeloischen Oberflächenrezeptor CD 13. SEM-K2 erfüllt die Kriterien für eine biphänotypische akute Leukämie mit einem Score > 2 für B – Marker und Myeloische Marker (s. Tabelle 4). Zusätzlich weisen die Blasten der in SCID (severe combined immunodeficiency) Mäusen etablierten, menschlichen Zelllinie SEM-K2 in ihrer Mehrzahl eine Überexpression von BCL-2 auf. Die Expression von BCL-2 scheint ein Überlebensvorteil der leukämischen Blasten in vivo zu bewirken [74]. Durchflußzytometrisch wurde nachgewiesen, dass Zellen der Linie SEM-K2 zu 99,9 % CD 19 positiv, CD 10 negativ und CD 56 negativ sind.

Punkte	B - Marker	T - Marker	Myeloische Marker
2	CD79α Cyt IgM Cyt CD 22	CD 3 (cyt/m) Anti – TCRα/β Anti – TCRγ/δ	Anti – MPO
1	CD19, CD10, CD20	CD2, CD5, CD8, CD10	CD13, CD33, CD65, CD 117
0,5	TdT, CD 24	TdT, CD 7, CD 1a	CD 14, CD 15, CD 64

Tab.4: Biphänotypische akute Leukämie liegt vor wenn der Score > 2 Punkte für die myeloische und eine der lymphatischen Zellreihen beträgt

2.2.1.1.2 Versorgung

Beide Zelllinien wurden im CO₂ (5 %) begasten Brutschrank bei 37°C als Suspensionskulturen in Medium A geführt. Es stellte sich hierbei heraus, dass sich die Zelllinie SEM-K2 entgegen der Empfehlung sehr gut mit Penicillin und Streptomycin enthaltendem Medium kultivieren lässt. Beide Zellkulturen wurden alle 2-3 Tage im Verhältnis 1:1 geteilt und das gleiche Volumen an frischem Medium A zugegeben. Außerdem wurden die Zellen unmittelbar einen Tag vor jedem Zytotoxizitätstest (s. 3.7) umgesetzt, um eine hohe Vitalität der Zellen und somit eine geringe Spontanlyse zu erreichen.

Die Überprüfung der Zellkulturen auf Kontamination mit Bakterien oder Pilzen wurde alle 2 Tage mikroskopisch durchgeführt, im Falle einer Kontamination konnte dies meist schon makroskopisch durch eine Trübung des Mediums festgestellt werden. Außerdem wurden die Zellkulturen mittels einer Mykoplasmen-PCR auf nicht im Mikroskop sichtbare Mykoplasmen getestet.

2.2.1.2 Kultivierung von NK-Zellen

2.2.1.2.1 Hintergrund

Ziel war CD 69⁺ und CD 69⁻ NK-Zellen, die wie in 2.2.4.2.2 beschrieben gewonnen wurden, zu vermehren und herauszufinden ob die zytotoxische Aktivität der CD 69⁺ Zellen nach Kultivierung besser, schlechter oder gleich wie die der CD 69⁻ NK-Zellen ist. Dazu war keine Klonierung (monoklonales Wachstum), sondern nur eine Kultivierung (polyklonales Wachstum) notwendig, da das Ziel war Unterschiede zwischen zwei verschiedenen NK-Zell-Subpopulationen zu finden und nicht zwischen zwei verschiedenen NK-Zellen. Nach unterschiedlichen Versuchen dies zu erreichen, stellte sich die in 2.2.1.2.2 beschriebene Methode als die effizienteste heraus.

2.2.1.2.2 Versorgung

Alle folgenden Arbeitsschritte wurden steril durchgeführt.

Die NK-Zellen wurden in einer U-Form-Mikrotiterplatte (96 Kavitäten) mit „Feeder“-Zellen und autologem Serum, 1 ng IL-15, 1000 IE IL-2 und 0,5 µg/ml PHA enthaltendem Kulturmedium versorgt. Anfangs wurde für die Herstellung von Medium B steriles humanes Rhesus positives AB-Serum aus dem Tübinger HS-Pool verwendet, wobei sich herausstellte, dass sich die ursprünglich aus peripherem Blut gesunder Spender gewonnen NK-Zellen noch besser mit autologem Serum vermehren ließen. Zur Gewinnung des autologen Serums wurde den NK-Zell-Spendern zusätzlich insgesamt 20-30 ml Vollblut in mehreren Serumröhrchen abgenommen, diese 7 min mit 3000 g bei 10°C zentrifugiert, das autologe Serum im Überstand steril mit einer Pipette abgenommen und in ein 15 ml Röhrchen gefüllt. Zu dem 15 % autologes Serum enthaltendem Medium B wurde 0,5 µg/ml PHA, 1000 IE IL 2/ml und 1 ng IL 15/ml frisch hinzugefügt (Medium B₂). Anschließend wurden 10 – 15 x 10⁶ mit 30 Gy bestrahlte PBMCs

(„Feeder“-Zellen) verschiedener gesunder Spender, die wie in 2.2.3.2 beschrieben gewonnen wurden, gezählt und in dem mit Zytokinen und PHA versetzten Medium B₂ auf 10⁶ Zellen/ml eingestellt, zu dieser Zellsuspension wurde nochmals 0,5 µg/ml PHA, 1000 IE IL-2/ml und 1 ng IL-15/ml hinzugefügt. Zunächst wurden 100 µl (10⁵ Zellen) dieser „Feeder“-Zellsuspension in die benötigte Anzahl an Kavitäten einer sterilen 96-Well-Rundboden-Mikrotiterplatte vorgelegt. Die nach Durchführung des in 2.2.7.2 beschriebenen Zytotoxizitätstestes verbliebenen CD 69⁺, CD 69⁻ und nur mit IL-15 stimulierten in Medium A gelösten NK-Zellen wurden folgendermaßen kultiviert: Es konnte jeweils direkt 100 µl der entsprechenden NK-Zellsuspension zu einer mit Feeder-Zellen versehenen Kavität hinzugefügt werden, da die in der 69-Well-Mikrotiterplatte vorgelegte „Feeder“-Zellsuspension die doppelte Menge an das Zellwachstum anregenden Zytokinen und PHA enthielt. Die Mikrotiterplatte wurde stets steril abgedeckt und die NK-Zellen im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre kultiviert. Alle 1-2 Tage wurden diese mikroskopisch auf Zellwachstum und Kontaminationen kontrolliert. Nach ca. 4-6 Tagen färbte sich das Medium zum ersten Mal gelblich, woraufhin 100 µl Medium pro Kavität entnommen wurde und 100 µl mit Zytokinen und PHA versetztes Medium B₂ zugefügt wurde. Darauf folgende Medienwechsel fanden alle zwei Tage statt. Sobald die Anzahl an NK-Zellen anfang stark zuzunehmen und sich das Medium schon am nächsten Tag gelblich färbte, wurde gesplittet, das heißt die NK-Zellen einer Kavität wurden auf zwei Kavitäten verteilt und jeweils 100 µl Medium B₂ hinzugefügt. Nach 2 Wochen Kultur wurden die jeweiligen NK-Zellen geerntet, 10 min mit 300 g bei RT abzentrifugiert und in Medium A resuspendiert. Die Zellzahl der einzelnen NK-Zellpopulationen wurde mittels ADVIA Zählgerät und Durchflußzytometrie wie in 2.2.2 und 2.2.5.2.2 beschrieben ermittelt und am Folgetag wurde ein Zytotoxizitätstest gegen unterschiedliche Zielzellen (s.2.2.7.2) durchgeführt.

2.2.1.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Im Stickstofftank bei -195°C kryokonservierte Zellen für die Zellkultur oder Patientenblasten für einen Versuch wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Weiter wurden diese direkt in ein mit 45 ml PBS gefülltes 50 ml Röhrchen überführt und 10 min mit 400 g bei RT gewaschen. Dieser Waschschrift wurde nochmals wiederholt, die Zellen in 5-10 ml Medium A resuspendiert und anschließend wurde die Anzahl der lebenden Zellen in der Neubauerkammer bestimmt. Hierbei konnten die toten Zellen, deren Zellkern und Zytoplasma durch den Farbstoff Trypanblau tief blau gefärbt wurde, leicht von den vitalen Zellen unterschieden werden. Dann wurden die Zellen der Zelllinien oder die Patientenblasten je nach weiterer Verwendung auf $0,5$ oder $1 \times 10^6/\text{ml}$ in Medium A eingestellt, in eine Kulturflasche überführt bzw. im 50 ml Röhrchen belassen im Brutschrank bei 37°C , 5 % CO_2 und Wasserdampf gesättigter Atmosphäre gelagert.

Die Zelllinien K562 und SEM-K2 wurden zum Teil wieder eingefroren. Aufgrund der zelltoxischen Eigenschaften von DMSO (Dimethylsulfoxid) im Einfriermedium, das die Bildung großer, zellschädigender Eiskristalle verhindert, musste möglichst zügig gearbeitet werden. Zwischen $5-10 \times 10^6$ Zellen/ml Medium A wurden auf 4°C vorgekühlt und im Verhältnis 1 : 2 in einem Kryoröhrchen mit Einfriermedium gemischt. Die Kryoröhrchen wurden mit Zellstoff umwickelt und 20 - 60 min bei -20°C , dann bei -80°C aufbewahrt und zur Langzeitlagerung in den Stickstofftank mit flüssigem Stickstoff überführt.

2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zählung von PBMCs, NK-Zellen, Patientenblasten, K562 und SEM-K2 Zellen erfolgte mikroskopisch in einer Neubauer-Zählkammer oder mit dem ADVIA-Zählgerät.

Zunächst wurde eine 50 prozentige Mischung aus Zellsuspension und Trypanblau (0,4%) hergestellt und 10 µl davon zwischen Deckglas und Neubauerkammer pipettiert. Trypanblau färbt das Zytoplasma und den Kern toter Zellen blau, von vitalen Zellen wird der Farbstoff nicht aufgenommen. Gekennzeichnet ist die Neubauer-Zählkammer durch ein Raster aus 4 Großquadranten mit jeweils 16 Kleinquadranten. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die Anzahl der vitalen Zellen in allen 4 Großquadranten bestimmt. Diese Zellzahl wurde durch 4 (Anzahl der gezählten Großquadranten) dividiert, mit dem Verdünnungsfaktor 2 und dem Kammerfaktor 10^4 multipliziert, so erhielt man die Konzentration der untersuchten Zellsuspension pro ml. Um nun die Gesamtzellzahl vitaler Zellen zu erhalten wurde Konzentration mit dem Gesamtvolumen der Zellsuspension in ml gemäß folgender Formel multipliziert:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \frac{\text{gezählte Zellen}}{2} \times 10^4 \times \text{Volumen in ml} \quad (2.1)$$

Zur Bestimmung der Zellzahl mittels ADVIA - Zählgerät wurden zunächst 400 µl in Medium, PBS oder MACS-Puffer gelöste Zellen in ein Reaktionsgefäß pipettiert und geschüttelt. Mit dem ADVIA-Gerät wurden anschließend die Konzentration der Leukozyten und die Anteile der Lymphozyten ermittelt. Gemäß folgender Formel konnte weiter die Gesamtzellzahl bestimmt werden:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \text{Leukozyten/ml} \times (\% \text{ Lymphozyten} + \% \text{ LUC}) \times \text{Volumen in ml} \quad (2.2)$$

LUC sind große, ungefärbte Zellen („large unstained cells“), die Peroxidase negativ sind und mit der gängigen Färbetechnik nicht angefärbt werden können. Zu den LUCs zählen Stammzellen, vergrößerte Lymphozyten, Plasmazellen und stimulierte Lymphozyten. Der Prozentteil an LUCs wurde in die Berechnung der Gesamtzellzahl mit eingeschlossen, da Patientenblasten, SEM-K2, K562 und auch manchmal stimulierte NK-Zellen unter „large unstained cells“ registriert werden.

2.2.3 Isolierung peripherer mononukleärer Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation

2.2.3.1 Hintergrund

Bei der Dichtegradientenzentrifugation nutzt man die unterschiedliche Dichte der Blutbestandteile aus, um mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) zu gewinnen. Mittels Aufschichten des mit PBS verdünnten, antikoagulierten Vollblutes auf Ficoll-Hypaque, zusammengesetzt aus dem Polysaccharid Ficoll und der iodhaltigen Verbindung Metrizamid (Dichte: 1,007 g/l), wird ein Stufengradient hergestellt. Zellen mit geringer Dichte wie Lymphozyten und Monozyten sammeln sich an der Phasengrenze zwischen Ficoll und Plasma als weißer Ring an, während Zellen mit höherer Dichte wie Granulozyten, polymorphkernige Leukozyten und Erythrozyten ein Pellet am Gefäßboden bilden. Mittels Zentrifugation wird dieser Prozess beschleunigt und die PBMCs nicht zu lange mit dem zellschädlichen Ficoll-Hypaque in Kontakt gebracht (Boeyum 1968). Durch Absaugen des trüb-weißen Rings mit einer Pipette werden die PBMCs gewonnen.

2.2.3.2 Durchführung

Alle Lösungen und Materialien, die mit den Zellen in Kontakt kommen, müssen steril sein und steril gehalten werden. Alle Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

50-150 ml heparinisieretes Vollblut (10 IU/ml) wurde mit PBS im Verhältnis 1:1 verdünnt, davon wurden jeweils 30 ml in einem 50 ml Röhrchen mit einer Pipette so auf 20 ml Ficoll-Hypaque aufgeschichtet, dass sich Ficoll und das heparinisierte, verdünnte Blut nicht vermischten. Die 50 ml Röhrchen wurden dann 30 min bei Raumtemperatur mit 400 g, einer Anlaufzeit von 100 s, und einer ausgeschalteten Rotorbremse zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde der Großteil der obersten, Thrombozyten enthaltenden, Plasmaschicht mit einer 5 ml Pipette entfernt.

Anschließend wurde die PBMC-Schicht mit einer neuen Pipette vorsichtig abgesaugt, in ein 50 ml Röhrchen überführt, das bis zur Hälfte gefüllt wurde und im Verhältnis 1 : 2 mit PBS aufgefüllt wurde. Daraufhin wurden die PBMCs bei RT, mit 400 g 10 min gewaschen. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen, das Zellpellet in PBS resuspendiert und der Waschvorgang wiederholt. Je nach weiterer Verwendung der PBMCs wurde das Zellpellet in Medium A oder MACS-Puffer resuspendiert.

2.2.4 Zellanreicherung mit dem MACS-System

2.2.4.1 Hintergrund

Beim „Magnetic-activated cell sorting“ können PBMCs anhand ihrer Oberflächenmoleküle, der CD-Moleküle (Clusters of Differentiation) voneinander getrennt werden. Mittels eines monoklonalen Antikörpers kann man Zellen anreichern oder depletieren. Diese monoklonalen Antikörper sind entweder direkt über das Fc-Fragment oder indirekt über einen Sekundärantikörper mit kleinen magnetischen Metallpartikeln (Eisenoxid) konjugiert. Die aus Zellen und daran gebundenen magnetischen Antikörpern bestehende Suspension durchläuft eine sich in einem starken Magnetfeld befindende paramagnetische Eisenmatrix, die Trennsäule. Man trennt so die in der Säule gebundene Positivfraktion von der durch die Eisenmatrix hindurchlaufende Negativfraktion. Nachdem die Trennsäule aus dem Magnetfeld entfernt wurde, lässt sich die Positivfraktion eluieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden aus PBMCs NK-Zellen isoliert, die durch das NCAM (neural cell adhaesion molecule) CD 56, ein hauptsächlich von NK-Zellen und einigen T-Zellsubpopulationen exprimiertes Adhäsionsmolekül, charakterisiert werden. NK-Zellen wurden sowohl mithilfe gegen CD 56 gerichteten magnetischen Antikörpern angereichert, als auch mittels eines NK-Zell-Isolations-Kits mit Sekundärantikörpern gegen Antigene, die nicht von NK-Zellen exprimiert werden,

depletiert. Markierte NK-Zellen wurden für den in 2.2.5.2.1 beschriebenen CD 69 Assay verwendet, die unmarkierten NK-Zellen wurden nach Stimulation mit SEM-K2 bzw. Patientenblasten für die in 2.2.4.2.2 b) beschriebene Selektion von CD 69⁺ und CD 69⁻ NK-Zellen für den späteren Zytotoxizitätsassay benötigt. Dies wurde mittels eines CD 69 MicroBead Kits mit Sekundärantikörpern gegen CD 69 erreicht. Mit anti CD 19 Antikörpern wurden dann die SEM-K2 Zellen bzw. c-ALL-Blasten unterschiedlicher Patienten aus der CD 69⁻ NK-Zell-Fraktion depletiert.

2.2.4.2 Durchführung

2.2.4.2.1 Anreicherung CD56⁺ Zellen aus peripherem Blut mittels Magnet gekoppelter Antikörper als Voraussetzung für den CD 69 Assay

Der MACS-Puffer wurde im Ultraschallbad entgast, auf 4°C gekühlt und auf Eis gelagert. Es mußte darauf geachtet werden, dass die Zellen steril bleiben.

Das wie in 2.2.3.2 beschrieben isolierte PBMC-Zellpellet wurde in MACS-Puffer resuspendiert und bei 400 g 10 min gewaschen. Die PBMCs wurden danach in ca. 10 ml MACS-Puffer aufgenommen, gezählt und auf 10⁸ Zellen/ml Puffer eingestellt.

Alle folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt.

Die PBMCs wurden zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit 50 µl/10⁸ Zellen Polyglobulin für 10 min auf dem Tischschüttler inkubiert. Darauf folgte eine 30 minütige Inkubation auf dem Tischschüttler mit 20 µl CD 56 MicroBeads pro 10⁷ PBMCs, das heißt bei einer Konzentration von 10⁸ Zellen/ml wurden 200 µl MicroBeads pro ml Zellsuspension benötigt. Anschließend wurden die Zellen mit 10-15 ml entgastem MACS-Puffer 10 min mit 300 g gewaschen und in 7 ml entgastem MACS-Puffer resuspendiert. Als nächstes wurde die Trennsäule (LS 25) im Vario MACS oder MiniMACS Magneten eingebracht und mit 10 ml entgastem MACS-Puffer gespült. Die Zellsuspension wurde dann langsam auf die Säule aufgetragen und durchquerte die Säule vollständig. Wenn sich Zellklumpen

durch vorsichtiges Resuspendieren im MACS-Puffer nicht lösen ließen, wurde die Zellsuspension über einen aufgesetzten Zellsieb auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde anschließend mit 3 x 3 ml MACS-Puffer gespült und die unmarkierten Zellen im Durchlauf wurden verworfen. Weiter wurde die Trennsäule aus dem Magnet entnommen und auf ein 15 ml Röhrchen platziert, mit 7 ml MACS-Puffer aufgefüllt und dieser wurde schnell und kräftig mit dem Stempel durch die Säule gedrückt. Um sicher zu gehen, dass alle markierten NK-Zellen aus der Säule gespült wurden, wurde der Vorgang wiederholt. Anschließend wurde die NK-Zellzahl, wie in 2.3.2 beschrieben, bestimmt. Danach wurden die NK-Zellen mit 300 g für 10 min abzentrifugiert, mit Medium A auf 10^6 /ml eingestellt und in folgende 4 gleichgroße Fraktionen, in 4 15 ml Röhrchen, aufgeteilt:

- unstimulierte NK-Zellen
- Mit 1000 bzw. 40 IE IL-2/ml stimuliert
- Mit 1 bzw. 10 ng IL-15/ml stimuliert
- Mit 1000 bzw. 40 IE IL-2/ml und 1 bzw. 10 ng IL-15/ml stimuliert

Um einen Gasaustausch zu gewährleisten, wurden diese NK-Zellen über Nacht 10 h im Brutschrank im nur leicht verschlossenen Reaktionsröhrchen bei 37°C, 5% CO₂ und Wasserdampf gesättigter Atmosphäre inkubiert. Am nächsten Tag, nach 10 h Inkubationszeit wurden die NK-Zellen in dem in 3.5.2.1 beschriebenen CD 69 Assay verwendet. Die Reinheit der NK-Zellpopulation betrug nach CD 56⁺ Anreicherung 80,5 % ± 10 %.

2.2.4.2.2 Drei Schritte zur Gewinnung CD 69⁺ und CD 69⁻ NK-Zellen:

a) Depletion der NK-Zellen mittels eines NK-Zell-Isolations-Kits

Dieses Kit wurde zur Gewinnung unmarkierter NK-Zellen eingesetzt. Die meisten Arbeitsschritte wurden analog zu 2.2.4.2.1 durchgeführt mit dem Unterschied, dass

die PBMCs auf $10^8/400$ μl MACS-Puffer eingestellt wurden und Sekundärantikörper verwendet wurden. Nach Inkubation mit Polyglobulin wurden 10 μl NK-Zell-Biotin-Antikörper Cocktail pro 10^7 PBMCs, das heißt 100 $\mu\text{l}/10^8$ Zellen, 15 min auf dem Tischschüttler auf Eis mit den PBMCs inkubiert. Anschließend wurden 300 μl MACS-Puffer pro 10^8 Zellen und 200 μl NK-Zell-MicroBead- Cocktail pro 10^8 Zellen hinzugefügt. Die Zellsuspension wurde vorsichtig resuspendiert und weitere 30 min auf Eis auf dem Tischschüttler inkubiert. Danach wurden die PBMCs analog zu 2.2.4.2.1 gewaschen, resuspendiert und auf die gespülte Trennsäule aufgetragen. Die unmarkierten, die Magnetsäule passierenden NK-Zellen, wurden im selben 50 ml Röhrchen aufgefangen, wie die folgende Spülung. Diese setzte sich aus 4-maligem Spülen mit 3 ml entgastem MACS-Puffer zusammen. Anschließend wurden die depletierten NK-Zellen am ADVIA-Zählgerät gezählt, 10 min mit 300 g abzentrifugiert und mit Medium A in einem 50 ml Reaktionsröhrchen auf $10^6/\text{ml}$ konzentriert. Die Reinheit der $\text{CD } 56^+ \text{ CD } 3^-$ NK-Zellpopulation betrug nach Depletion mit dem NK Cell Isolation Kit $87,2\% \pm 2,31\%$. Über Nacht wurden die depletierten NK-Zellen 10 h je nach Versuch mit 1 , 5 oder 10 ng IL-15/ml stimuliert und am nächsten Tag mit bestrahlten SEM-K2 Zellen oder Patientenblasten als Angriffszielzellen im Verhältnis $1 : 1$ inkubiert. Wegen der beschränkten Anzahl an kryokonservierten c-ALL-Blasten variierte das Verhältnis NK-Zellen zu Patientenblasten zwischen $1 : 1$ und $15 : 1$. Die Suspension wurde im 50 ml Röhrchen für 2 min bei 100 g zentrifugiert, somit setzten sich die Zellen schneller am Boden ab. Die Inkubationszeit im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 betrug 6 h. Mit dem Ziel, dass möglichst alle NK-Zellen mit dem Target in Kontakt kommen, wurde das Zellgemisch nach 3 h mit dem Schüttler gemischt, nochmals mit 100 g für 2 min zentrifugiert und weiter im Brutschrank inkubiert.

b) Selektion $\text{CD } 69^+$ NK-Zellen

Während der 6 stündigen Inkubation bildeten sich zwei Zellfraktionen, $\text{CD } 69^+$ und $\text{CD } 69^-$ NK-Zellen. Die $\text{CD } 69^+$ NK-Zellen wurden durch „Magnetic-Activated Cell

Sorting“ mittels des CD 69 MicroBead Kits von den CD 69⁻ NK-Zellen getrennt. Es wurde bis auf einige kleine Differenzen wie in 2.2.4.2.2 a) vorgegangen. Die Zellkonzentration wurde auf 10⁷ Zellen pro 50 µl MACS-Puffer eingestellt.

Alle folgenden Arbeitsschritte wurden nach Herstellerangabe bei 6-12 °C durchgeführt.

Mit 10 µl Hapten-konjugierten-anti-CD69-Antikörpern pro 10⁷ Zellen wurde die Zellsuspension 15 Minuten auf dem Tischschüttler, in einem Becher, der in einem mit Eis gefüllten Behälter stand (6-12°C), inkubiert. Anschließend wurden 30 µl MACS-Puffer pro 10⁷ Zellen und 20 µl Anti-Hapten-MicroBeads-FITC pro 10⁷ Zellen hinzugefügt. Die Zellsuspension wurde weitere 30 min auf dem Schüttler inkubiert. Weiter wurden die Zellen mit 1-2 ml MACS-Puffer 10 min mit 300 g gewaschen. Da sowohl die CD 69 Positiv-, als auch die Negativfraktion der NK-Zellen für folgende Versuche benötigt wurde, wurden die depletierten CD 69⁻ NK-Zellen und SEM-K2-Zellen bzw. Patientenblasten in einem 50 ml Röhrchen aufgefangen und die Trennsäule wurde mit 3 x 3 ml MACS-Puffer gespült. Für die angereicherten CD 69 markierten NK-Zellen wurde ebenfalls ein 50 ml Röhrchen verwendet und es wurde wie in 2.2.4.2.1 2 x 7 ml MACS-Puffer mit dem Stempel durch die vom Magneten gelöste Säule gedrückt. Die Negativfraktion aus CD 69⁻ Zellen und SEM-K2 Zellen bzw. Patientenblasten wurde nochmals auf eine frische, mit 10 ml MACS-Puffer gespülte, Magnetsäule aufgetragen, um die Reinheit und die Ausbeute an CD69⁺ NK-Zellen zu optimieren. So wurden die nochmals angereicherten bzw. depletierten Zellen im jeweils selben, zugehörigen 50 ml Röhrchen wie bei der ersten CD 69 Selektion, aufgefangen. Im Anschluss wurde von beiden Zellfraktionen die Zellzahl bestimmt. Die CD 69⁺ NK-Zellen wurden in Abhängigkeit von der absoluten Zellzahl auf 10⁶/ml (bei mindestens 1,5 x 10⁶ NK-Zellen) oder 0,5 x 10⁶/ml (bei weniger als 1,5 x 10⁶ NK-Zellen) konzentriert und in Medium A aufgenommen. Die depletierten Zellen (CD 69⁻ NK-Zellen und SEM-K2 Zellen bzw. Patientenblasten) wurden dagegen nochmals in MACS-Puffer aufgenommen.

c) Depletion CD 19⁺ SEM-Zellen beziehungsweise c-ALL-Blasten

Aus der in 2.2.4.2.2 b) gewonnenen unmarkierten Zellsuspension wurden die CD 19⁺ SEM-K2-Zellen bzw. c-ALL-Blasten depletiert, um eine möglichst reine CD 69⁻ NK-Zell-Suspension zu erhalten. Der Versuchsablauf entsprach größtenteils dem in 2.2.4.2.1 beschriebenen. Die in 2.2.4.2.2 b) gewonnene unmarkierte Zellsuspension wurde auf 10⁷ Zellen pro 100 µl entgastem, gekühltem MACS-Puffer konzentriert und 20 µl CD 19 MicroBeads pro 10⁷ Zellen hinzugefügt. Im weiteren Verlauf wurde diese Suspension 30 min auf dem Schüttler auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die mit CD 19 MicroBeads inkubierte Zellsuspension mit 1-2 ml MACS-Puffer pro 10⁷ Zellen für 10 min mit 300 g gewaschen. Als nächstes wurden die Zellen in 7 ml entgastem MACS-Puffer resuspendiert und die Magnetsäule mit 10 ml Puffer analog zu 2.2.4.2.1 gespült. Die Zellsuspension wurde dann langsam auf die Säule pipettiert und die Trennsäule mit 3 x 3 ml MACS-Puffer gespült. Dieser, die depletierten CD 69⁻ NK-Zellen enthaltende, Durchlauf wurde in einem 50 ml Röhrchen aufgefangen, die Zellzahl bestimmt und für 10 min mit 300g abzentrifugiert. Analog zu den CD 69⁺ NK-Zellen, wurden die CD 69⁻ NK-Zellen in Medium A aufgenommen und auf 10⁶/ml oder 0,5 x 10⁶/ml konzentriert. Anschließend wurden die beiden Fraktionen im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ bis zur weiteren Verwendung für den Zytotoxtest am darauffolgenden Tag gelagert und die genaue, absolute NK-Zellzahl der CD 69⁺ und der CD 69⁻ Fraktion wurde wie in 2.2.5.2.2 beschrieben mittels Durchflußzytometrie direkt oder am nächsten Tag bestimmt.

2.2.5 Durchflußzytometrie

2.2.5.1 Hintergrund

Bei der Durchflußzytometrie werden bestimmte physikalische und biochemische Zellcharakteristika wie Zellgröße, spezifische Oberflächenantigene und

Granularität gleichzeitig genutzt um die einzelnen Zellen voneinander zu unterscheiden. Mit einem Leitungssystem, das durch Überdruck aus der zu untersuchenden Zellsuspension über eine Kapillare Zellen aufnimmt, werden diese einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Dies geschieht indem der langsamere fließende Probenstrom in einer Düse der schneller fließenden Trägerflüssigkeit zugemischt wird (hydrodynamische Fokussion). So werden während der Passage der einzelnen Zellen vorbei am Laserstrahl Streuungseffekte und Fluoreszenzen der verwendeten fluoreszierenden Antikörper gemessen.

Man unterscheidet beim Streulicht (light scatter) zwischen Vorwärtsstreulicht (forward light scatter, FSC), das fast in Richtung des ursprünglichen Strahls gestreut wird und mit der Zellgröße zunimmt, und Seitwärtsstreulicht (side light scatter SSC), das im 90° Winkel zum ursprünglichen Strahl gemessen wird und mit der Granularität der Zelle zunimmt. Folglich kann man durch Auftragung einzelner Vollblutzellen in einem Koordinatensystem mit FSC als X und SSC als Y-Achse verschiedene Zellpopulationen, wie Thrombozyten, Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten, mit unterschiedlichen Eigenschaften abgrenzen.

Weiter können bei der immunologischen Phänotypisierung die durch den Laser angeregten, an monoklonale Antikörper gebundene, Farbstoffe mit ihren Fluoreszenzen erfasst werden. In dem benutzten FACSCalibur wird die Bandbreite der anregbaren Fluoreszenzen mit dem Einsatz von 2 Laserstrahlen, dem Argon Laser, der Licht bei 488 nm emittiert und einem, bei 633 nm emittierenden Dioden Laser, erweitert. Voraussetzung ist, dass die Farbstoffe unterschiedliche Emissionsmaxima haben müssen, um das jeweils unterschiedlich von den Farbstoffen emittierte Licht in einem Detektorsystem aus Bildverstärkerröhren registrieren zu können. Das eingehende Signal wird über einzelne Verstärker geregelt und zu einem Analog-Digital-Wandler geleitet. Die digitalisierten Daten werden dann in einem entsprechenden Computer weiterverarbeitet. So können Zellmorphologie festgestellt und bis zu 4, mit verschiedenen fluoreszierenden Antikörpern markierte, Antigene gleichzeitig auf einer Zelle nachgewiesen werden.

Neue FACS-Geräte mit mehreren Lasern können bis zu 16 Fluoreszenzen detektieren.

Fluorochrom	Exzitation	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum	Detektion
FITC	488 nm	495 nm	519 nm	FL-1
PE	488 nm	566 nm,	576 nm	FL-2
PerCP	488 nm	490 nm	677 nm	FL-3
APC	635 nm	650 nm	660 nm	FL-4

Tab.5: Fluorochrome der verwendeten Antikörper: Wellenlängen der Anregung, Absorption und Emission von den Antikörper-konjugierten Fluorochromen Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Peridinin-chlorophyll protein (PerCP), Allophycocyanin (APC).

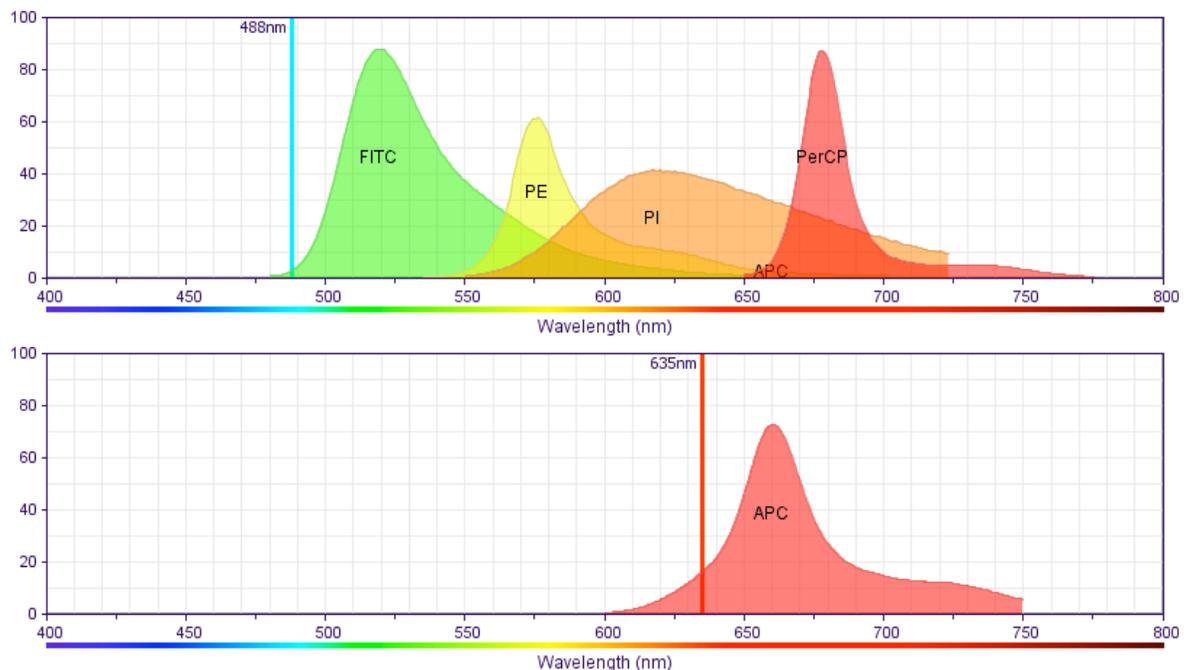


Abb.1: Darstellung der Emissionsspektren von FITC, PE, PerCP und PI (obere Bildhälfte), sowie APC (untere Bildhälfte) [75].

Mit Propidiumiodid (PI) können tote Zellen nachgewiesen werden, da es bei geschädigter Zellmembran in die Zelle eindringen kann und an Nucleinsäure bindet. An DNA gebundenes Propidiumiodid hat ein Emissionsmaximum von 617

nm, wird vom Argon-Laser mit 488 nm angeregt und kann sowohl im FI 2 als auch im FI 3 Kanal detektiert werden.

Die Intensität der einzelnen Fluoreszenzen steigt mit der Zahl an eine Zelle gebundener fluoreszierender Antikörper. Die vom Hersteller aus Hybridomzellen gewonnenen monoklonalen Antikörper werden in unterschiedliche Isotypen (IgG1, IgG2a, IgG2b) eingeteilt, die auch unspezifisch an die Zelloberfläche binden können. Wegen der Autofluoreszenz der Zellen und der unspezifischen Antikörperbindung ist es wichtig bei der Immunfluoreszenzfärbung die zu untersuchende Zell-Probe mit einer Negativkontrolle der Zellen zu vergleichen. Es sollte darauf geachtet werden, dass die in der Kontrolle nur unspezifisch bindenden, fluoreszierenden Kontrollantikörper demselben Isotyp der spezifischen, in der Probe verwendeten Antikörper angehören. So kann festgelegt werden ab welcher Fluoreszenzintensität, die Fluoreszenz auf die spezifisch an ein Antigen gebunden Antikörper zurückzuführen ist und die Zelle demnach positiv ist.

In vorliegender Arbeit war das Ziel der Durchflußzytometrie die Differenzierung, die Zellzahlbestimmung und die Kontrolle der Reinheit unterschiedlicher CD 56⁺ NK-Zellpopulationen. Es wurde mit allen 4 Kanälen gearbeitet, wobei FI 3 meistens für Propidiumiodid verwendet wurde. Die Kompensation, wurde einmalig für NK-Zell-Messungen mit Propidiumiodid und ohne Propidiumiodid eingestellt und für entsprechende Messungen aufgerufen. Dabei wird die von einem bestimmten Farbkanal in einen anderen emittierende Strahlung von diesem abgezogen, um zu vermeiden, dass einfachpositive Zellen nicht fälschlicherweise als doppeltpositiv registriert werden.

2.2.5.2 Durchführung

2.2.5.2.1 CD 69 Assay

Vorbereitung:

In diesem Assay wurden die in 2.2.4.2.2 a) mit CD 56 MicroBeads angereicherten und über Nacht (10 h) sowohl mit verschiedenen Zytokinen stimulierten NK-Zellen als auch unstimulierten NK-Zellen mit den Zielzellen K562 bzw. SEM-K2 in unterschiedlichen Verhältnissen in Kontakt gebracht und nach 2, 4, 6 und 24 Stunden mit dem FACSCalibur auf die Rezeptoren CD 16, CD 69 und CD 56 untersucht.

Zunächst wurden 10^6 - 2×10^6 K562-Zellen bzw. SEM-K2-Zellen aus der Zellkultur entnommen und auf eine Konzentration von 10^6 /ml in Medium A in einem 15 ml oder 50 ml Röhrchen eingestellt (für einen Versuch wurden 2 zusätzliche Röhrchen, eines mit einer Konzentration von 10^7 K562-Zellen/ml und eines mit 10^5 K562-Zellen/ml benötigt). Nun wurden nach folgendem Schema in eine Kavität einer Rundboden-Mikrotitrierplatte mit 96 Kavitäten jeweils 100 μ l NK-Zell-Suspension und 100 μ l K562- bzw. SEM-K2-Zell-Suspension und als Kontrolle nur 200 μ l NK-Zell-Suspension titriert:

Die Konzentrationen der Zellsuspensionen waren 10^6 Zellen/ml, das Verhältnis Effektor : Zielzelle entsprach 1 : 1 und die Interleukinkonzentrationen entsprechen denen in 2.2.4.2.2 a).

1. 200 μ l NK-Zellen für die Isotypenkontrolle
2. 200 μ l NK-Zellen als Vergleichskontrolle
3. 100 μ l NK-Zellen + 100 μ l K562 bzw. SEM-K2-Zellen
4. 200 μ l NK-Zellen + IL-2
5. 100 μ l NK-Zellen + IL-2 + 100 μ l K562 bzw. SEM-K2-Zellen
6. 200 μ l NK-Zellen + IL-15
7. 100 μ l NK-Zellen + IL-15 + 100 μ l K562 bzw. SEM-K2-Zellen

8. 200 µl NK-Zellen + IL-2 + IL-15
9. 100 µl NK-Zellen + IL-2 + IL-15 + 100 µl K562 bzw. SEM-K2-Zellen

Dieses Schema wurde 3 Mal wiederholt, so dass insgesamt 4 x 9 Kavitäten gefüllt wurden. In einem Versuch wurden NK : K 562 zusätzlich zu 1 : 1 im Verhältnis 1 : 10 und 10 : 1 in der Mikrotitrierplatte inkubiert, folglich wurden 4 x 17 Kavitäten mit NK- und K562-Zellen bzw. nur NK-Zellen gefüllt und die NK-Zellen ebenfalls nach 2, 4, 6, 24 h mittels Durchflußzytometrie untersucht.

Immunfluoreszenzfärbung:

Es wurden jeweils 10 µl monoklonale Antikörper in den gewünschten Kombinationen in FACS-Analyseröhrchen vorgelegt, pro Meßserie wurden demnach in jeweils 8 oder 16 Analyseröhrchen anti-CD 69 FITC bzw. APC, anti-CD 16 PE und anti-CD 56 APC bzw. FITC Antikörper und in ein Analyseröhrchen die entsprechenden Isotypen vorgelegt. Anschließend wurden in jedes dieser Analyseröhrchen nach 2, 4, 6 und 24 h 100 µl Zellsuspension aus der zugehörigen Kavität der Mikrotitrierplatte pipettiert, die Proben wurden geschüttelt (Vortexgerät) und 30 min im Kühlschrank unter Lichtabschluss inkubiert. Außerdem wurden die schon vorbereiteten FACS-Analyseröhrchen für die weiteren Serien ebenfalls im Kühlschrank unter Lichtabschluss aufbewahrt. Nach der Inkubation wurden die Analyseröhrchen mit PBS aufgefüllt, 10 min mit 400 g bei 10°C abzentrifugiert und dekantiert. Die verbleibende Restflüssigkeit diente als Trägerflüssigkeit für das Durchflußzytometer. Bis zur Messung, die immer direkt im Anschluß durchgeführt wurde, wurden die Proben lichtgeschützt abgedeckt. 2-5 min vor der Messung wurde 5 µl PI-Lösung (0,5 mg/ml PBS) in die Röhrchen pipettiert, die Isotypenkontrolle mit eingeschlossen, und die Proben kurz mithilfe eines Vortexgeräts durchmischt.

Unmittelbar vor der Messung wurden die Proben nochmals durchmischt.

FACS-Messung und Auswertung:

Die Messung erfolgte am FACSCalibur, die Auswertung mit der zugehörigen Software CellQuestpro. Genaue Meßeinstellungen anhand der Isotypenkontrollen wurden ausgehend von den Routineeinstellungen für NK-Zellen mit Propidiumiodid durchgeführt. An den Verstärkerspannungen für FSC und SSC musste nicht viel verändert werden, um die Lymphozyten- bzw. die NK-Zellpopulation im dimensionslosen FSC (x-Achse) zwischen 200 und 500 und im dimensionslosen SSC (y-Achse) zwischen 40 und 160 einzustellen. In dieser Darstellung konnte so um die NK-Zellpopulation ein Gatter (Gate) gesetzt werden, das nur die Darstellung dieser NK-Zellen in einem weiteren Diagramm erlaubt. Die Verstärkerspannungen der verschiedenen Fluoreszenzkanäle wurden so eingestellt, dass sich die Zellen bei der Messung der Isotypenfärbung im jeweiligen Kanal möglichst ohne Kontakt zu den Achsen zwischen 10^0 und 10^1 der Fluoreszenzskala befanden, mit Ausnahme des FI 3 Kanals, in dem die toten mit PI gefärbten Zellen detektiert wurden. In diesem Kanal konnten in Abhängigkeit von der Anzahl der toten Zellen 2 Zellpopulationen differenziert werden. Eine dieser Zellpopulationen, die lebenden Zellen, wurde zwischen 10^0 und 10^2 der logarithmischen Skala eingestellt. Um dies zu erreichen wurde die vor Beginn der Versuchsreihe eingestellte Kompensation für NK-Zellen mit PI übernommen. Im Anschluss daran erfolgte die Messung der einzelnen Proben, nach Möglichkeit wurden jeweils 10^4 sich im Gatter (Gate) befindende Zellen gemessen.

Zur Auswertung, wie in Abb. 2 dargestellt, wurde wieder ein Gatter (Gate) um die Lymphozytenpopulation gesetzt. Diese Zellen wurden in einem weiteren Diagramm hinsichtlich ihrer Fluoreszenz in FI 3 (PI, x-Achse) dargestellt und ein weiteres Gatter um die lebenden Zellen gesetzt. Im nächsten Diagramm wurden die vitalen Zellen auf die CD 56 Fluoreszenz in FI 4 (APC) oder FI 3 (FITC) untersucht und ein drittes Gatter um die CD 56⁺ NK-Zellpopulation gesetzt. In weiteren Diagrammen wurden diese NK-Zellen hinsichtlich ihrer Fluoreszenz in 2 verschiedenen gegeneinander gestellten Kanälen dargestellt, z.B. FITC gegen APC. Zur

statistischen Auswertung wurde in diese Diagramme 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 wurden von dem Programm CellQuestpro automatisch berechnet (s. Abb. 2).

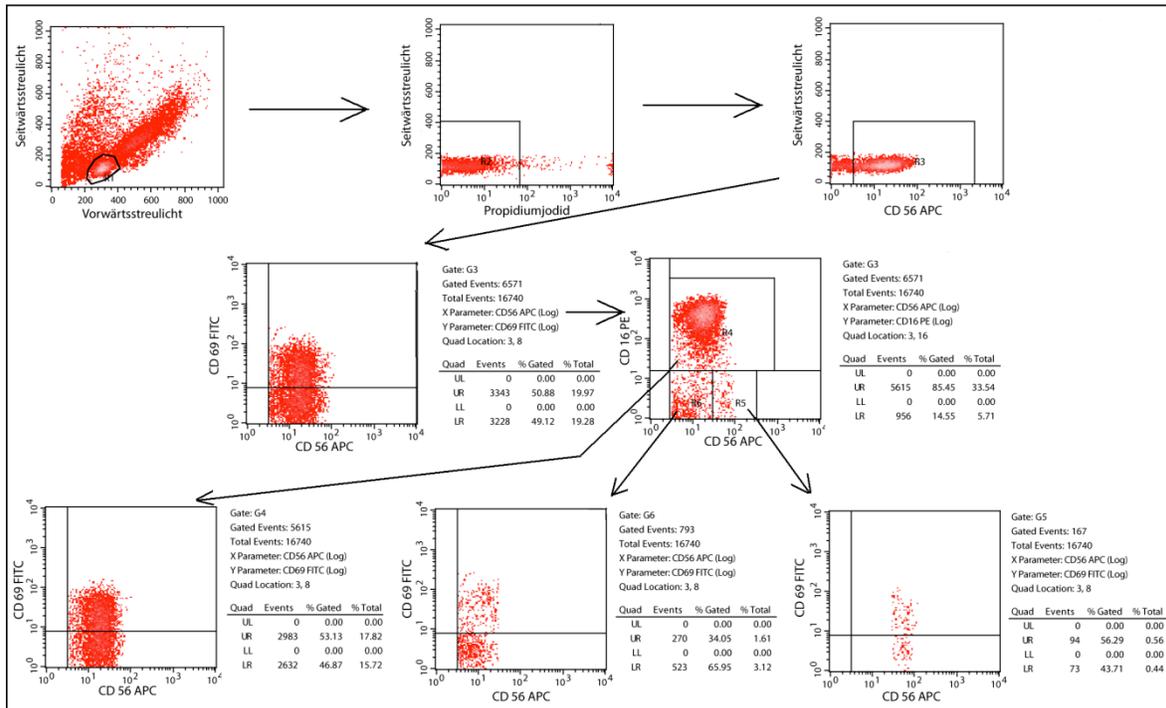


Abb.2: Schematische Auswertung einer Probenmessung nach 6 h Inkubation von NK-Zellen ($10^6/\text{ml}$) mit SEM-K2-Zellen im Verhältnis 1 : 1, die 10 h zuvor primär mit IL-15 (1 ng IL-15/ml) stimuliert wurden.

2.2.5.2.2 Bestimmung der Absoluten Anzahl der NK- Zellen in der CD 69⁺ und CD 69⁻ Fraktion

Hintergrund:

Die tatsächlichen prozentualen Anteile an NK-Zellen (NK-Zell-Reinheit), der in 2.2.4.2.2 c) gewonnenen CD 69⁺ NK-Zellfraktion, der CD 69⁻ NK-Zellfraktion und der entsprechenden wie in 2.2.1.2.2 beschrieben kultivierten NK-Zellen wurden mittels FACS-Analyse bestimmt und mit den jeweiligen absoluten, am ADVIA-

Gerät bestimmten Zellzahlen multipliziert. Zur Veranschaulichung hier ein Beispiel: Mittels ADVIA-Zellzählung war die Zellzahl der CD 69⁺ NK-Zellen in einem Versuch $1,2 \times 10^6$. In der FACS-Analyse waren 62,17 %, der angereicherten CD 69⁺ Zellen, wirklich NK-Zellen wovon tatsächlich 57,91 % CD 69⁺ waren. Nun wurden $1,2 \times 10^6$ Zellen mit 0,6217 multipliziert und so erhielt man die absolute NK-Zellzahl von $7,46 \times 10^5$, mit der die anschließende Einstellung der CD 69⁺ NK-Zellen auf $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml Medium A durchgeführt wurde. Um in dem in 2.2.7.2 beschriebenen Zytotoxtest zu gewährleisten, dass insgesamt immer gleichviele NK-Zellen der CD 69⁺ und der CD 69⁻ Fraktion auf eine Zielzelle (Target) kamen, wurde in Kauf genommen, dass zwischen 20 % und 99,5 % der CD 69⁺ NK-Zellfraktion wirklich CD 69⁺ war. Die CD 69⁻ NK-Zellfraktion war dagegen nach wiederholter Depletion mit einem Anteil zwischen 88 % und 99 % tatsächlich CD 69⁻.

Immunfluoreszenzfärbung:

In diesen FACS-Analysen wurde kein Propidiumiodid verwendet. Bei geringer Zellzahl wurden oft nur 50 µl NK-Zellsuspension statt 100 µl ($0,5$ bzw. 1×10^6 Zellen/ml Medium A) in jeweils 2 Probenröhrchen verwendet und dementsprechend jeweils nur 7 µl Kontrollantikörper und jeweils 7 µl Antikörper gegen CD 56, CD 69, CD 16 und bei einigen Messungen auch gegen CD 3 verwendet. Ansonsten wurde die Immunfluoreszenzfärbung analog zu 2.2.5.2.1 durchgeführt.

FACS-Messung und Auswertung:

Genauere Meßeinstellungen anhand der Isotypenkontrollen wurden ausgehend von den Routineeinstellungen für NK-Zellen ohne Propidiumiodid durchgeführt. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden analog zu 2.2.5.2.1 durchgeführt.

2.2.5.2.3 Berechnung der Ausbeute an CD 69⁺ und CD 69⁻ NK-Zellen

Im ersten Schritt wurden die NK-Zellen mittels CD 69 MicroBead Kit CD 69 separiert (2.2.4.2.2). Anschließend wurden die angereicherten CD 69⁺ NK-Zellen durchflußzytometrisch auf CD 56, CD 69 und CD 19 untersucht. So konnte der prozentuale Anteil CD 56⁺ NK-Zellen bestimmt werden (NK-Zell-Reinheit). Mit Formel 3.1 wurde nun die absolute Anzahl CD 56⁺ NK-Zellen in der CD 69⁺ Fraktion nach Anreicherung bestimmt (A).

In der durch CD 69 Depletion gewonnenen CD 69⁻ Fraktion waren zunächst noch bestrahlte Zielzellen enthalten, die mittels CD 19 MicroBeads depletiert wurden (2.2.4.2.2). Nach CD 19 Depletion wurde die CD 69⁻ Fraktion ebenfalls durchflußzytometrisch auf CD 56, CD 69 sowie CD 19 untersucht und der prozentuale Anteil CD 56⁺ NK-Zellen bestimmt (NK-Zell-Reinheit). Mit Formel 3.2 wurde die absolute Anzahl CD 56⁺ NK-Zellen in der CD 69⁻ Fraktion nach Depletion bestimmt (B). Werden A und B addiert ergibt sich daraus die absolute NK-Zellzahl (Formel 3.3) nach CD 69 Separation.

$$A = \frac{\text{Zellzahl der CD 69+ NK-Zellfraktion nach MACS-Anreicherung} \times \text{NK-Zell-Reinheit in \%}}{100} \quad (3.1)$$

$$B = \frac{\text{Zellzahl der CD 69- NK-Zellfraktion nach MACS-Depletion} \times \text{NK-Zell-Reinheit in \%}}{100} \quad (3.2)$$

A = absolute NK-Zellzahl der CD 69⁺ NK-Zellfraktion

B = absolute NK-Zellzahl der CD 69⁻ NK-Zellfraktion

$$A + B = \text{absolute NK-Zellzahl nach CD 69 Separation} \quad (3.3)$$

Die CD 69 Ausbeute ist definiert als der prozentuale Anteil der NK-Zellen in der CD 69⁺ bzw. CD 69⁻ Fraktion an der absoluten NK-Zellzahl nach CD 69 Separation.

$$\text{CD 69}^+ \text{ Ausbeute} = \frac{A}{A + B} \times 100 \quad (3.4)$$

$$\text{CD 69}^- \text{ Ausbeute} = \frac{B}{A + B} \times 100 \quad (3.5)$$

Tab.7 und Tab.8 gibt einen Überblick über die CD 69⁺ bzw. CD 69⁻ Ausbeute in 4 Versuchen mit SEM-K2-Blasten. Angegeben wird ob ein KIR-HLA match oder -mismatch zwischen den NK-Zellen und den SEM-K2-Blasten vorlag. Die nach CD 69 Separation mittels ADVIA bestimmte Zellzahl in der CD 69⁺ bzw. CD 69⁻ Fraktion, der mittels Durchflußzytometrie bestimmte NK-Zell-Anteil in dieser Fraktion und die sich daraus ergebende absolute NK-Zellzahl der jeweiligen Fraktion sind ebenfalls aufgestellt. Zuletzt ist die CD 69⁺ bzw. CD 69⁻ Ausbeute und der Anteil CD 69⁺ bzw. CD 69⁻ NK-Zellen von den NK-Zellen in der CD 69⁺ bzw. CD 69⁻ Fraktion zum Zeitpunkt der durchflußzytometrischen Analyse 1 – 22 h nach CD 69 Separation dargestellt.

Tab.6: CD 69⁺ Ausbeute nach MACS-Anreicherung. Zuvor 10 h primärer Stimulus mit 1 ng IL-15/ml und anschließend 6 h Stimulus mit SEM-K2-Blasten im Verhältnis NK : SEM-K2 = 1 : 1

Versuch	KIR-HLA match/mismatch	Zellzahl 69 ⁺ nach MACS ×10 ⁶	CD 56 ⁺ , CD 19 ⁻ nach FACS in %	A Anzahl 69 ⁺ ×10 ⁶	CD 69 ⁺ Ausbeute in %	davon tatsächlich 69 ⁺ in %
1	mismatch	2	79,59	1,6	34,33	97,7
2	mismatch	1,25	73,88	0,92	31	99,91
3	mismatch	4,66	89,27	4,16	60,5	99,91
4	mismatch	8,7	85,35	7,43	60,4	99,95
Mittelwerte		4,15	82,02	3,53	46,56	99,37
Standardabweichung		3,37	6,73	2,95	16,10	1,11

Tab.7: CD 69⁻ Ausbeute nach MACS-Depletion. Zuvor 10 h primärer Stimulus mit 1 ng IL-15/ml und anschließend 6 h Stimulus mit SEM-K2-Blasten im Verhältnis NK : SEM-K2 = 1 : 1

Versuch	KIR-HLA match/mis- match	Zellzahl 69 ⁻ nach MACS ×10 ⁶	CD 56 ⁺ , CD 19 ⁻ nach FACS in %	A Anzahl 69 ⁻ ×10 ⁶	CD 69 ⁻ Ausbeute in %	davon tatsächlich 69 ⁻ in %
1	mismatch	3,6	84,87	3,06	65,67	39,2
2	mismatch	2,4	65,07	2,04	69	30,28
3	mismatch	3,7	73,45	2,72	39,5	28,63
4	mismatch	5,7	80,7	4,6	39,6	41,96
Mittelwerte		3,85	76,02	3,11	53,44	35,02
Standard- abweichung		1,37	8,69	1,08	16,10	6,56

Tab.9 und Tab.10 gibt einen Überblick analog zu Tab.7 und Tab.8 über die CD 69⁺ bzw. CD 69⁻ Ausbeute in 8 Versuchen mit ALL-Blasten kindlicher Patienten. Zusätzlich ist der Anteil CD 69⁺ NK-Zellen nach 10 h Vorbehandlung mit 1 ng IL-15/ml angegeben.

Tab.8: CD 69⁺ Ausbeute nach MACS-Anreicherung. Zuvor 10 h primärer Stimulus mit 1 ng IL-15/ml und anschließend 6 h Stimulus mit ALL-Blasten im Verhältnis NK : ALL = 7 ± 4,6 : 1

Versuch	KIR-HLA match/ mismatch	69 ⁺ nach primärem Stimulus mit IL-15 in %	Zellzahl 69 ⁺ nach MACS ×10 ⁶	CD 56 ⁺ , CD 3 ⁻ nach FACS in %	A Anzahl 69 ⁺ ×10 ⁶	CD 69 ⁺ Ausbeute in %	davon tatsächlich 69 ⁺ in %
1	mismatch		2,3	11,31	0,3	4,8	27,14
2	mismatch		3,4	21,27	0,72	8,4	24,92
3	mismatch		2	32,87	0,6	8,8	45,27
4	mismatch	3,85	2	63,95	1,3	13	23,6
5	mismatch	1,16	1,2	62,17	0,7	7,2	57,91
6	mismatch	0,87	1,13	71,63	0,8	13,3	52,12
7	mismatch	1,37	1,4	78,24	1,1	6,6	20,5
8	mismatch	2,19	1,1	77,42	0,9	7	28,78
Mittelwert		1,89	1,82	52,36	0,80	8,64	35,03
Standardabweichung		1,20	0,74	26,54	0,31	3,04	14,47

Tab. 9: CD 69⁻ Ausbeute nach MACS-Depletion. Zuvor 10 h primärer Stimulus mit 1 ng IL-15/ml und anschließend 6 h Stimulus mit ALL-Blasten im Verhältnis NK : ALL = 7 ± 4,6 : 1.

Versuch	KIR-HLA match/ mismatch	Zellzahl 69 ⁻ nach MACS ×10 ⁶	CD 56 ⁺ , CD 3 ⁻ nach FACS in %	A Anzahl 69 ⁻ ×10 ⁶	CD 69 ⁻ Ausbeute in %	davon tatsächlich 69 ⁻ in %
1	mismatch	15,6	37,49	5,9	95,2	99,01
2	mismatch	12,6	62,22	7,84	91,6	96,95
3	mismatch	11	55,9	6,2	91,2	92,45
4	mismatch	10	87,57	8,7	87	94,45
5	mismatch	11	80,71	9	92,8	88,63
6	mismatch	6	86,28	5,2	86,7	90,94
7	mismatch	16,5	94,44	15,6	93,4	96,81
8	mismatch	13,5	88,16	12	93	92,26
Mittelwert		12,03	74,10	8,81	91,36	93,94
Standardabweichung		3,33	19,99	3,50	3,04	3,49

2.2.6 Europium-Zytotoxizitätstest

2.2.6.1 Hintergrund

Bei der hier angewandten Methode wird die Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber verschiedenen Zielzellen (targets), die mit der intrazellulären, hydrophilen Verbindung TDA (2,2':6',2"-terpyridine-6,6"-dicarboxylic acid) markiert sind, gemessen [76, 77]. Die veresterte, hydrophobe Form von TDA, BATDA (bis(acetoxymethyl) 2,2':6',2"-terpyridin-6,6"-dicarboxylat) diffundiert bei Inkubation mit den Zielzellen durch deren Zellmembran und wird intrazellulär zu TDA hydrolysiert, das die intakte Zellmembran nicht passieren kann. Nach Inkubation der markierten Zielzellen mit zytotoxischen Effektorzellen (NK-Zellen) für eine bestimmte Zeit, wird durch die Lyse der Zielzellen TDA im Überstand freigesetzt. TDA bildet zusammen mit Europium einen fluoreszierenden Chelatkomplex, die

Stärke der Fluoreszenz korreliert mit der Menge an freigesetztem TDA. Die zytotoxische Aktivität der Effektorzellen kann nun anhand des stark fluoreszierenden EuTDA Chelatkomplexes quantifiziert werden, da das im Fluorometer gemessene Signal direkt mit der Anzahl der lysierten Zellen korreliert. Indem das spezifische Signal auf das Signal einer bestimmten Anzahl an maximal lysierbaren Zielzellen bezogen wird, kann die Zytotoxizität der Effektorzellen als prozentualer Anteil an lysierten Zielzellen ausgedrückt werden. Als Voraussetzung müssen folgende Werte im Zytotoxtest zusätzlich bestimmt werden:

Maximallyse: Entspricht dem Wert, der maximal erreicht werden kann, wenn alle Targetzellen lysiert werden.

Spontanlyse: Dadurch, dass Zielzellen auch ohne Einfluss von Effektorzellen absterben und den Liganden TDA freisetzen, kommt dieser Wert zustande.

Die spezifische Lyse in Prozent ergibt sich aus folgender Rechnung:

$$\text{Spezifische Lyse in \%} = \frac{\text{Messwert} - \text{Spontanlyse}}{\text{Maximallyse} - \text{Spontanlyse}} \quad (2.3)$$

Im Vergleich zum klassischen, radioaktiven ^{51}Cr Chromfreisetzungstest wird TDA schneller als ^{51}Cr von den Zielzellen freigesetzt [76].

Ziel des Europium – Zytotoxizitätstests war es die zytotoxische Aktivität der $\text{CD } 69^+$ NK-Zellen mit der der $\text{CD } 69^-$ NK-Zellen gegen verschiedene Zielzellen zu vergleichen und zu überprüfen ob diese separierten NK-Zellen ihre zytotoxischen Eigenschaften nach 2-wöchiger Kultivierung beibehalten.

2.2.6.2 Durchführung

Die Zielzellen (Targetzellen) wurden in einem 15 oder 50 ml Röhrchen auf 10^6 Zellen/ml Medium A eingestellt. Anschließend wurden 2,5 μ l BATDA/ml K562-Zellsuspension, 3,5 μ l/ml SEM-K2-Zellsuspension und 3 μ l/ml ALL-Blasten-Zellsuspension zugegeben. Weiter wurden die Zellsuspensionen mit der Hand geschüttelt und 30 min (K562), 45 min (SEM-K2) bzw. 60 min (ALL-Blasten) im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Röhrchen mit 37°C warmen Medium A aufgefüllt und 5 min bei 200 g zentrifugiert (c-ALL-Blasten und SEM-K2: 7min, 300 g). Dieser Waschschrift wurde insgesamt fünfmal wiederholt. Danach wurden die Zellen in der Neubauerzählkammer gezählt und auf 5×10^4 /ml Medium A eingestellt, wobei durch Zugabe von Trypanblau tote Zellen erkannt wurden und nicht mitgezählt wurden. Bei einem großen Anteil an toten Zellen nach dem Waschen war eine hohe Spontanlyse im Zytotoxtest zu erwarten, die das Testergebnis unter Umständen nicht auswertbar machte. Deshalb konnte in diesem Fall durch wiederholtes Waschen der Anteil an toten Zellen vermindert werden. 0,5 bis 1 ml dieser auf 5×10^4 /ml Medium A konzentrierten Zielzellen wurden erneut 5 min bei 200 g (bzw. 7 min bei 300 g) zentrifugiert, da man 100 μ l Überstand zur Bestimmung des Backgrounds im Zytotoxtest benötigt.

Die Effektorzellen waren CD 69⁺, CD 69⁻ und nur mit IL 15 stimulierte NK-Zellen, die wie in 2.2.4.2.2 a) - c) beschrieben in den beiden Vortagen gewonnen wurden. Die Effektor-Zellzahl wurde wie in 2.2.5.2.2 beschrieben bestimmt und je nach absoluter NK-Zellzahl auf 0,5 bzw. 1×10^6 Zellen/ml konzentriert. Zum Nachweis zytotoxischer Eigenschaften wurden die Effektorzellen in unterschiedlichen Verhältnissen zu einer gleichbleibenden Anzahl von Zielzellen (Targets) pipettiert (E/T – Verhältnis), um zu zeigen, dass sich die gemessene Zelllyse auf die Effektorzellen zurückführen ließ. Beim Testansatz wurden pro Kavität 100 μ l Effektorzellen und 100 μ l Zielzellen eingesetzt, deren Zellzahl durchgehend 5000 betrug. Für ein E/T – Verhältnis von 20 : 1 bzw. 10 : 1 musste die Ausgangskonzentration der Effektorzellen folglich 1×10^6 bzw. $0,5 \times 10^6$ betragen.

Da vier E/T – Verhältnisse getestet wurden, erfolgte die Herstellung einer Verdünnungsreihe über drei Stufen. Der eigentliche Zytotoxtest wurde in einer U-Boden-Mikrotiterplatte (96 Kavitäten) angesetzt; Background, Spontanlyse und Maximallyse wurden jeweils vierfach, die anderen Werte dreifach bestimmt. Für den Background wurden in einer Kavität 100 µl Überstand und 100 µl Medium A angesetzt. Der Ansatz für die Spontanlyse bestand aus 100 µl Zielzellen und 100 µl Medium A. Die Maximallyse wurde zweimal auf unterschiedliche Art und Weise bestimmt, einmal wurden 100 µl Zielzellen mit 30 µl Lysepuffer und 70 µl Medium A angesetzt, der zweite Ansatz ergab sich aus 100 µl Ultraschall – zerstörter Zielzellen und 100 µl Medium A. Danach wurde die benötigte Anzahl an Kavitäten mit einer entsprechenden Menge an Zielzellen beladen (jeweils 100 µl). Anschließend wurden zu den Zielzellen jeweils 100 µl Effektorzellen in entsprechender Verdünnung pipettiert und die Platte 2 min mit 100 g bei 37°C (Bremse und Beschleunigung 3) abzentrifugiert und 2 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Platte 5 min mit 200 g bei 37°C (Bremse und Beschleunigung 3) zentrifugiert, um den Überstand für den Nachweis des Liganden zu gewinnen. Weiter wurde nun eine entsprechende Anzahl an Kavitäten einer Flachbodenplatte mit 200 µl Europiumlösung und je 20 µl Überstand aus der entsprechenden Kavität der Testansatz-Mikrotiterplatte beladen und die Flachbodenplatte lichtgeschützt 15 – 20 min auf einem Tischschüttler inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Flachbodenplatte in den Multilabel-Counter gesetzt und die Fluoreszenz gemessen [77]. Die gemessenen „counts“ wurden entsprechend der Formel 2.3 in Prozentzahlen umgerechnet, wobei aus den dreifach- und vierfach Bestimmungen jeweils Mittelwerte gebildet wurden. Zum Abschätzen der Güte des Tests wurde die Spontanlyse des Zytotoxizitätstests folgendermaßen berechnet:

$$\text{Spontanlyse in \%} = \frac{\text{Spontanlyse} - \text{Background}}{\text{Maximallyse} - \text{Background}} \times 100 \quad (2.4)$$

Die Spontanlyse sollte nicht mehr als 30 % betragen.

2.2.7 Statistik

Alle durchgeführten Versuche wurden mindestens 6-8 Mal wiederholt. Ausnahmen waren orientierende Vorversuche zur Planung daran anschließender Versuche. Nur einmalig durchgeführte Vorversuche werden in der vorliegenden Arbeit nicht dargestellt. Um das umfangreiche Datenmaterial leichter zugänglich zu machen, wurden die Daten in der Regel als arithmetische Mittelwerte +/- Standardabweichung (SD) graphisch dargestellt.

Zur Berechnung der statistischen Signifikanz der Unterschiede einzelner Ergebnisse wurde der gepaarte T-Test und einmalig der Wilcoxon-Rangsummentest angewendet. Statistische Signifikanz wurde bei p-Werten von $< 0,05$ angenommen. Hohe Signifikanz wurde bei p-Werten $< 0,01$ und höchste Signifikanz bei p-Werten $< 0,001$ angenommen. Sowohl die rechnerische, als auch statistische Auswertung und graphische Darstellung der Daten erfolgte über die Programme Excel®, Word® (Microsoft Office Home and Student 2007, USA) und Paint® von Microsoft. Für einzelne Graphiken wurde außerdem das Programm GraphPad Prism 4 verwendet. Für die Auswertung und Darstellung der durchflußzytometrischen Daten wurde das Programm CellquestPro von Apple verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Die CD 56^{dim}/CD 16⁺ Subpopulation macht den größten Anteil der NK-Zellen im peripheren Blut gesunder Spender aus

Die CD 56^{dim}/CD 16⁺ NK-Zellen machen mit 64,81 % ± 17,98 % den größten Anteil der NK-Zellen im peripheren Blut 7 verschiedener, gesunder menschlicher Spender aus. Den zweitgrößten Anteil machen mit 29,07 % ± 14,43 % die CD 56^{dim}/CD 16⁻ NK-Zellen aus und der kleinste Anteil ist mit 5,97 % ± 4,57 % die CD 56^{high}/CD 16⁻ NK-Zell-Fraktion (s.Abb.3 und Tab.6). Die NK-Zellen eines männlichen Spenders stellten eine Ausnahme dar, hier war der Anteil der CD 56^{dim}/CD 16⁺ mit 37,56 % fast 10 % kleiner als der Anteil der CD 56^{dim}/CD 16⁻ NK-Zellen (s.Tab.6).

Mit 6,82 % ± 1,55 % ist der Anteil CD 69⁺ NK-Zellen im peripheren Blut gering (s.Abb.3 und Tab.6).

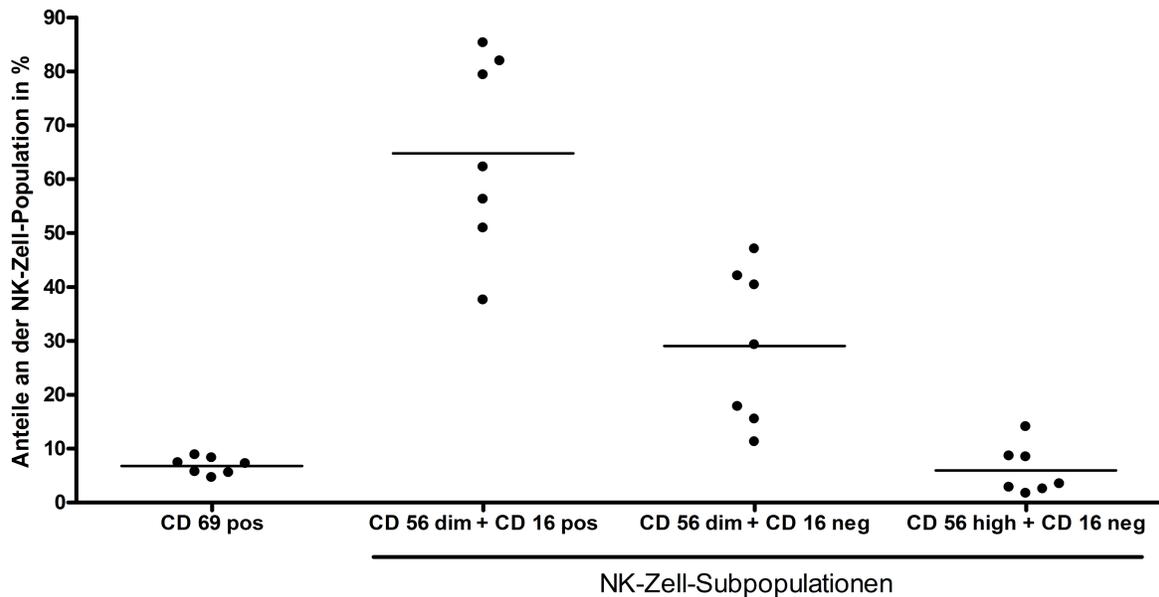


Abb.3: Durchflußzytometrische Bestimmung der prozentualen Anteile CD 69⁺ NK-Zellen und der einzelnen NK-Zell-Subpopulationen 7 gesunder, humaner Spender; CD 56 mittels MACS angereicherte, unstimulierte, aus peripherem Blut gewonnene NK-Zellen.

Zwischen den einzelnen gesunden NK-Zell-Spendern gibt es individuelle Schwankungen der Anteile der NK-Zell-Subpopulationen, die Größte liegt bei der CD 56^{dim}/CD 16⁺ NK-Zell-Subpopulation zwischen 37,56 % und 85,28 % (Tab. 6). Eine geschlechtsspezifische Korrelation konnte nicht festgestellt werden (Tab. 6).

Tab.10: Durchflußzytometrische Bestimmung der Zusammensetzung der NK-Zellpopulationen der einzelnen gesunden Spender nach MACS-Anreicherung mit CD 56 MicroBeads.

NK-Zell-Spender	CD 69 ⁺ in %	CD 56 ^{dim} /CD 16 ⁺ in %	CD 56 ^{dim} /CD 16 ⁻ in %	CD 56 ^{high} /CD 16 ⁻ in %
1 (weiblich)	7,22	79,35	17,84	2,83
2 (männlich)	4,66	85,28	11,29	3,48
3 (weiblich)	8,86	81,98	15,48	2,57
4 (weiblich)	5,73	62,27	29,27	8,49
5 (männlich)	8,32	56,3	42,1	1,69
6 (männlich)	7,38	37,56	47,08	14,09
7 (weiblich)	5,54	50,94	40,42	8,66
Mittelwert	6,8	64,8	29,1	6,0
Standardabweichung	1,5	18,0	14,4	4,6

3.2 Die Ausprägung von NK-Zell-Subpopulationen ändert sich Zytokin und Zielzell bedingt

In folgendem Kapitel wird das Verhalten der 3 NK-Zell-Subpopulationen CD 56^{dim}/CD 16⁺, CD 56^{dim}/CD 16⁻ und CD 56^{high}/CD 16⁻ nach verschiedenen Stimuli mit IL-2, IL-15 und K562-Blasten dargestellt. Anteile der Subpopulationen von NK-Zellen aus peripherem Blut gesunder Spender ändern sich abhängig von diesen Stimuli dynamisch innerhalb von Stunden.

NK-Zellen, die 10 h vor Versuchsbeginn mit IL-2 bzw. IL-15 aktiviert wurden, exprimieren vermehrt CD 56. Nach weiteren 24 h wächst der Anteil der CD 56^{high}/CD 16⁻ Subpopulation der zytokinbehandelten NK-Zellen.

Nach Stimulation der NK-Zellen mit K562-Blasten nimmt die Expression von CD 16 auf CD 56^{dim} NK-Zellen innerhalb weniger Stunden ab. Durch eine vorhergehende Aktivierung der NK-Zellen mit IL-2 bzw. IL-2 + IL-15 kann dieser Effekt noch verstärkt werden. Die Expression von CD16 in der CD 56^{dim} Subpopulation nimmt bei mit IL-2 bzw. IL-2 + IL-15 vorbehandelten NK-Zellen nach Ablauf von 24 Stunden Inkubation mit K562-Blasten wieder zu.

Der Anteil der CD 56^{high}/CD 16⁻ Subpopulation erhöht sich bei mit IL-2 bzw. mit IL-2 + IL-15 vorbehandelten und anschließend 2 bis 4 h mit K562 inkubierten NK-Zellen. Nach 24 h K562-Stimulus verringert sich der Anteil der CD 56^{high}/CD 16⁻ NK-Zellen wieder.

3.2.1 Nach Aktivierung humaner NK-Zellen mit K562-Blasten ändern sich die Anteile der NK-Zell-Subpopulationen im zeitlichen Verlauf

Abb.4 gibt eine Übersicht über das dynamische Verhalten der drei NK-Zell Subpopulationen CD 56^{dim}/CD 16⁺, CD 56^{dim}/CD 16⁻ und CD 56^{high}/CD 16⁻ einer gesunden Spenderin nach verschiedenen Stimuli mit IL-2, IL-15 und K562-Blasten.

Nach Aktivierung mit 1000 IE IL-2/ml bzw. 1000 IE IL-2/ml + 1 ng IL-15/ml ist eine Erhöhung der Expression von CD 56 auf aus peripherem Blut gewonnenen NK-Zellen zu beobachten. Die Fluoreszenzintensität von CD 56 ist um eine halbe Log-Phase höher als bei den unbehandelten NK-Zellen. In Abb.4 1a)+2a)+4a) ist dies anhand der FACS-Analyse von NK-Zellen dieser Spenderin zu erkennen.

Der Anteil der CD 56^{high}/CD 16⁻ NK-Zellen nimmt bei den 10 h vor Versuchsbeginn mit 1000 IE IL-2/ml behandelten NK-Zellen nach weiteren 24 h im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle von 2 % auf 8 % zu (Abb.4 1a)+2a)). Entsprechend steigt der Anteil der CD 56^{high}/CD 16⁻ NK-Zellen, die 10 h mit 1000 IE IL-2/ml und 1 ng IL-15/ml vorstimuliert wurden nach weiteren 24 h von 2 % auf 9 % an (Abb.4 1a)+4a)).

Nach Inkubation der unbehandelten NK-Zellen mit K562-Blasten im Verhältnis 1 : 1 verringert sich die Expression des CD 16 Rezeptors deutlich. Der Anteil der CD 56^{dim}/CD 16⁺ NK-Zellen vermindert sich maximal nach 24 h K562-Stimulus um 14 % auf 62 %, gleichzeitig erhöht sich der Anteil der CD 56^{dim}/CD 16⁻ um 13 % auf 35 % (Abb.4 1a)+1b)).

Nach 6 h Inkubation, der primär 10 h mit 1000 IE IL-2/ml vorbehandelten NK-Zellen mit K562-Blasten ist das Minimum der CD 16 Expression im Vergleich zur alleinig mit IL-2 behandelten Kontrolle erreicht. Der Anteil der CD 56^{dim}/CD 16⁺ Subpopulation verringert sich um 56 % auf 24 %, gleichzeitig erhöht sich der Anteil der CD 56^{dim}/CD 16⁻ Subpopulation um 45 % auf 60 % (Abb.4 2b)). Nach 24 h K562-Stimulus nimmt die CD 16 Expression wieder zu. Verglichen mit dem 6 stündigen K562-Stimulus erhöht sich der Anteil der CD 56^{dim}/CD 16⁺ NK-Zell-Subpopulation um 25 %. Gleichzeitig verringert sich der Anteil der CD 56^{dim}/CD 16⁻ Subpopulation um 25 %. Insgesamt ist der Anteil der CD 16⁺ NK-Zellen nach 24 h K562-Stimulus mit 49 % noch deutlich geringer als der Anteil von 79 % der mit IL-2 behandelten Kontrolle (Abb.4 2a)+b)).

Nach 24 stündiger Inkubation der primär 10 h mit 1 ng IL-15/ml stimulierten NK-Zellen nimmt die CD 16 Expression gegenüber der mit IL-15 behandelten Kontrolle

maximal ab. Der Anteil der CD 56^{dim}/CD 16⁺ Subpopulation verringert sich um 24 % auf 56 %, gleichzeitig erhöht sich der Anteil der CD 56^{dim}/CD 16⁻ NK-Zellen um 19 % auf 35 % (Abb.4 3a)+b)).

Nach 6 stündiger Inkubation der primär 10 h mit 1000 IE IL-2/ml und 1 ng IL-15/ml stimulierten NK-Zellen mit K562 ist das Minimum der CD 16 Expression gegenüber der mit IL-2 und IL-15 behandelten Kontrolle erreicht. Verglichen mit den anderen Stimulationskonstellationen ist bei diesen Stimuli die maximale Änderung der CD 16 Expression zu beobachten. Der Anteil der CD 56^{dim}/CD 16⁺ Subpopulation verringert sich um 60 % auf 22 %, gleichzeitig erhöht sich der Anteil der CD 56^{dim}/CD 16⁻ Subpopulation um 53 % auf 68 %. Insgesamt ist der Anteil der CD 16⁺ NK-Zellen nach 24 h K562-Stimulus mit 23 % noch deutlich geringer als der Anteil von 70 % der mit IL-2 und IL-15 behandelten Kontrolle (Abb.4 4a)+b)).

Der Anteil der CD 56^{high}/CD 16⁻ Subpopulation steigt abhängig von der primären Aktivierung mit IL-2 bzw. IL-15 nach sekundärem Stimulus mit K562 gegenüber der jeweiligen Kontrolle unterschiedlich schnell und stark an. Im Vergleich zu den anderen Stimulationskombinationen ist der maximale Anstieg des Anteils der CD 56^{high}/CD 16⁻ NK-Zellen nach 6 h K562-Stimulus der 10 h zuvor mit 1000 IE IL-2/ml aktivierten NK-Zellen erreicht. Hier erhöht sich der Anteil der CD 56^{high}/CD 16⁻ Subpopulation um 11 % auf 16 %. Nach 24 h vermindert er sich wieder um 12 % von 16 % auf 4 % (Abb.4 2a)+2b)).

Der Anteil der CD 56^{high}/CD 16⁻ Subpopulation vergrößert sich um 5 % auf 9 % bei NK-Zellen, die 10 h mit 1 ng IL-15/ml vorbehandelt und anschließend 24 h mit K562-Blasten inkubiert wurden (Abb.4 3a)+3b)).

Nach 6 h Inkubation der primär 10 h mit 1000 IE IL-2/ml + 1 ng IL-15/ml aktivierten NK-Zellen mit K562-Blasten steigt der Anteil der CD 56^{high}/CD 16⁻ Subpopulation um 7 % auf 10 % an. Nach 24 h verringert sich der Anteil der CD 56^{high}/CD 16⁻ NK-Zell-Subpopulation wieder um 3 % auf 7 % (Abb.4 4a)+4b)).

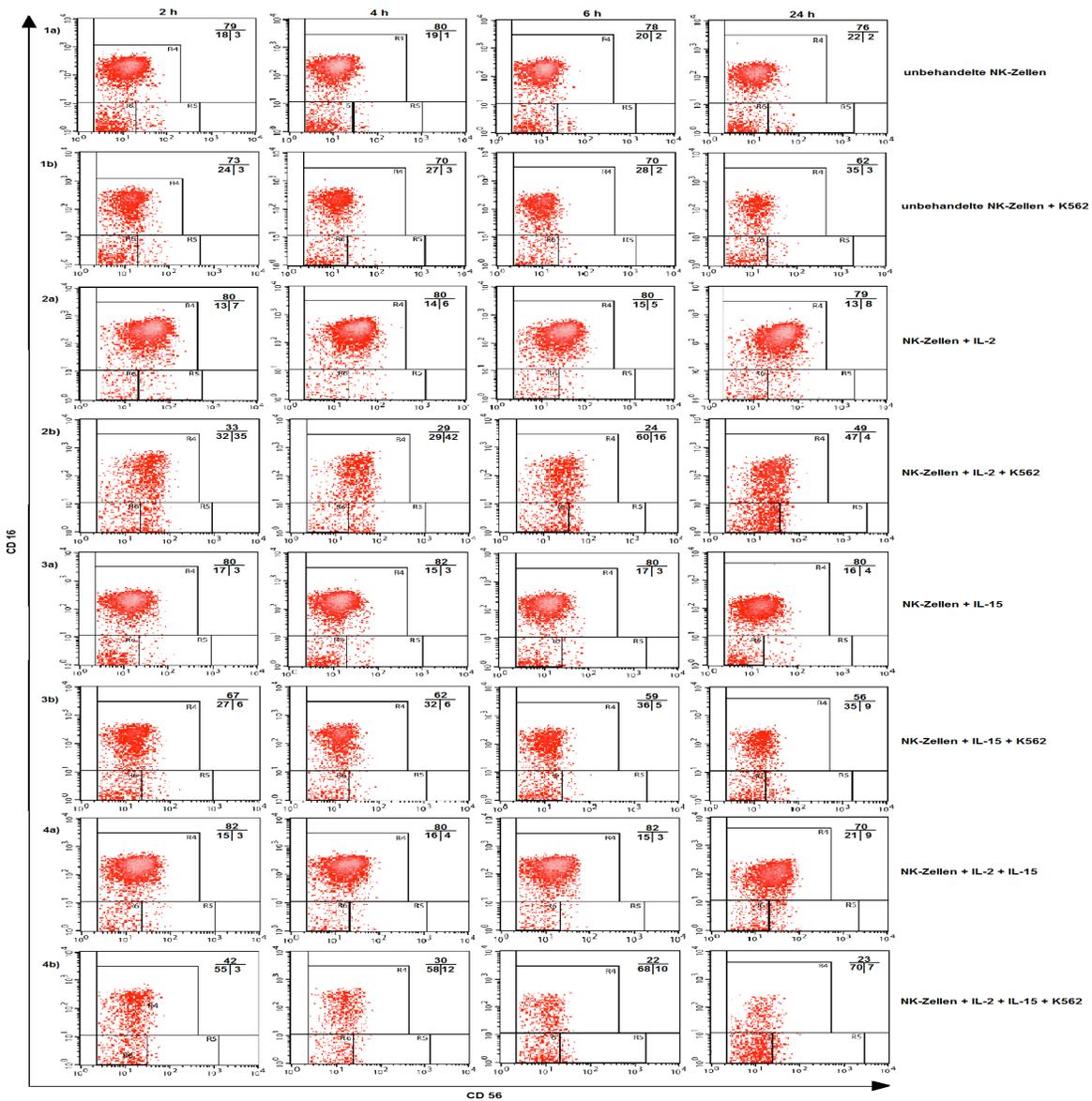


Abb. 4: Beispielhafte Darstellung der durchflußzytometrischen Bestimmung der Anteile der einzelnen NK-Zell-Subpopulationen. Vergleich von primären und sekundären Stimuli im zeitlichen Verlauf nach Zugabe von K562-Blasten zur unbehandelten Kontrolle: **1a)** unbehandelten Kontrolle; **1b)** Stimulation mit K562 (im Verhältnis 1 : 1); **2a)** nur primärer Stimulus 10 h vor Versuchsbeginn mit 1000 IE IL-2/ml; **2b)** primärer Stimulus mit 1000 IE IL-2/ml 10 h vor sekundärem Stimulus mit K562 im Verhältnis NK : K562 = 1 : 1; **3a)** nur primärer Stimulus mit 1 ng IL-15/ml 10 h vor Versuchsbeginn; **3b)** primärer Stimulus mit 1 ng IL-15/ml 10 h vor sekundärem Stimulus mit K562 im Verhältnis NK : K562 = 1 : 1; **4a)** nur primärer Stimulus mit 1000 IE IL-2/ml + 1 ng IL-15/ml 10 h vor Versuchsbeginn; **4b)** primärer Stimulus mit 1000 IE IL-2/ml + 1 ng IL-15/ml 10 h vor sekundärem Stimulus mit K562 im Verhältnis NK : K562 = 1 : 1; Zahlen in den dot plots zeigen die prozentualen Anteile der CD 56dim CD 16⁺ NK-Zellen (oben, R4), der CD 56dim CD 16⁻ NK-Zellen (unten links, R6) und CD 56high CD 16⁻ NK-Zellen (unten rechts, R5) an. CD 56⁺ CD 3⁺ NK-Zellen sind in den Messungen mit eingeschlossen; NK-Zellen einer gesunden Spenderin.

3.2.2 Abnahme der CD 16 Expression auf NK-Zellen nach Stimulation mit K562

Abb. 5 gibt einen Überblick über das Verhalten von NK-Zell-Subpopulationen 7 gesunder, geschlechts- und altersheterogener Spender nach Stimulation mit K562 Blasten im Verhältnis 1:1. Das Maximum der Änderung der Anteile der 3 NK-Zellsubpopulationen ist nach 24 stündiger Inkubation mit K562 Blasten erreicht, ebenfalls wie in 3.2.1 Abb.4 1b).

Bereits nach 2 stündigem Stimulus mit K562-Blasten ist gegenüber der unbehandelten Kontrolle ein hoch signifikanter ($p < 0,01$) Anstieg des Anteils der CD 56^{dim}/CD 16⁻ Subpopulation von 28,03 % \pm 13,12 % auf 33,03 % \pm 14,94 % zu beobachten.

Nach 4 h vermindert sich der Anteil der CD 56^{dim}/CD 16⁺ Subpopulation weiter im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant ($p < 0,05$) von 64,97 % \pm 17,68 % auf 56,85 % \pm 16,95. Gleichzeitig nimmt der Anteil der CD 56^{dim}/CD 16⁻ Subpopulation signifikant ($p < 0,05$) von 28,06 % \pm 12,93 % auf 37,66 % \pm 16,82 % zu.

Gegenüber der Kontrolle nimmt nach 6 h Stimulus mit K562-Blasten der Anteil der CD 56^{dim}/CD 16⁺ Subpopulation von 63,31 % \pm 17,31 % auf 53,17 % \pm 18,67 % hoch signifikant ($p < 0,01$) ab. Gleichzeitig erhöht sich der Anteil der CD 56^{dim}/CD 16⁻ Subpopulation signifikant ($p < 0,05$) von 30,35 % \pm 13,76 % auf 41,45 % \pm 18,34 %.

Nach 24 h verringert sich der Anteil der CD 56^{dim}/CD 16⁺ Subpopulation gegenüber der Kontrolle maximal und signifikant ($p < 0,05$) von 62,59 % \pm 15,22 % auf 50,57 % \pm 21,30 %. Im gleichen Zug erhöht sich der Anteil der CD 56^{dim}/CD 16⁻ NK-Zellen signifikant ($p < 0,05$) von 33,07 % \pm 13,45 % auf 43,88 % \pm 19,5 %. Der Anteil der CD 56^{high}/CD 16⁻ Subpopulation erhöht sich ebenfalls signifikant ($p < 0,05$) von 4,33 % \pm 2,58 % auf 5,6 % \pm 3,89 %.

Insgesamt ist festzuhalten, dass nach alleiniger Stimulation mit K562-Blasten hauptsächlich die CD 16 Expression abnimmt und als Folge davon der Anteil der CD 56^{dim}/CD 16⁺ kleiner und der CD 56^{dim}/CD 16⁻ Subpopulation größer wird. Der

Anteil der CD 56^{high}/CD 16⁻ NK-Zell-Subpopulation erhöht sich erst nach 24 h Stimulus mit K562-Blasten signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

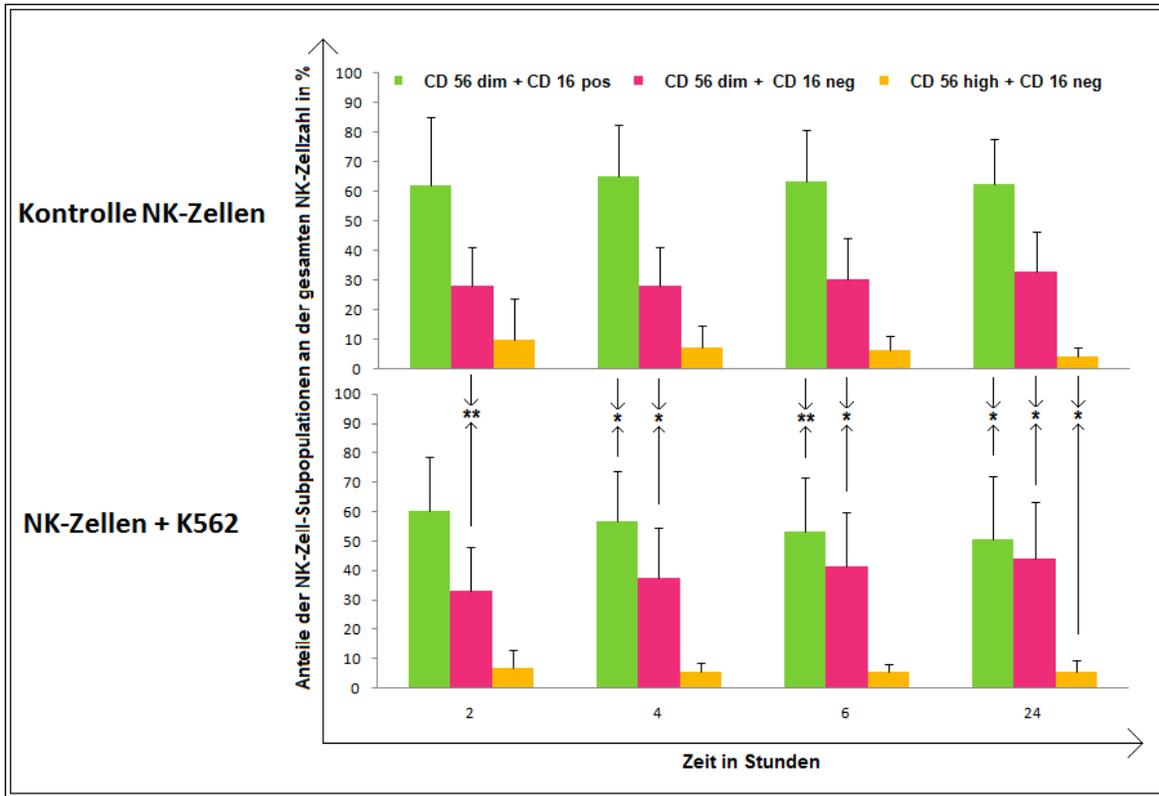


Abb. 5: Durchflußzytometrische Bestimmung der Anteile der NK-Zell-Subpopulationen im zeitlichen Verlauf nach Zugabe von K562-Blasten. Die NK-Zellen stammen aus peripherem Blut 7 geschlechts- und altersheterogener gesunder Spender: kein Stimulus (oben); alleinige Stimulation mit K562 im Verhältnis NK : K562 = 1 : 1 (unten); gezeigt sind Mw., Stabw. und gepaarter, zweiseitiger student t-test: *p < 0,05; **p < 0,01, verglichen werden die Anteile der NK-Zell-Subpopulationen unstimulierter NK-Zellen mit denen mit K562 stimulierter NK-Zellen; mittels MACS CD 56 angereicherte NK-Zellen.

3.2.3 Die CD 16 Expression auf CD 56^{dim} NK-Zellen variiert in Abhängigkeit vom IL-15 und K562 Stimulus.

Abb.6 zeigt die Zunahme der CD 16 Expression auf CD 56^{dim} NK-Zellen 6 gesunder, geschlechts- und altersheterogener Spender nach alleinigem Stimulus mit IL-15. Nach K562-Stimulus von mit IL-15 vorbehandelten NK-Zellen nimmt die CD 16 Expression ab. Außerdem bewirkt der alleinige Stimulus mit 1 ng IL-15/ml eine Zunahme des Anteils CD 56^{high}/CD 16⁻ NK-Zellen.

Nach 14 h (10 h + 4 h) Aktivierung der NK-Zellen mit 1 ng IL-15/ml ist eine hoch signifikante ($p < 0,01$) Abnahme des Anteils der CD 56^{dim}/CD 16⁻ Subpopulation gegenüber der unbehandelten Kontrolle von 28,06 % \pm 12,93 % auf 23,33 % \pm 13,30 % festzustellen. Außerdem ist nach 34 stündiger (10 h + 24 h) Stimulation mit IL-15 eine hoch signifikante ($p < 0,01$) Verkleinerung des Anteils der CD 56^{dim}/CD 16⁻ Subpopulation von 33,07 % \pm 13,45 % auf 24,85 % \pm 15,58 % festzustellen. Gleichzeitig ist eine signifikante ($p < 0,05$) Erhöhung des Anteils der CD 56^{high}/CD 16⁻ Subpopulation von 4,33 % \pm 2,85 % auf 5,63 % \pm 3,7 % gegenüber der unbehandelten Kontrolle zu beobachten.

Bereits nach 4 stündiger sekundärer Stimulation mit K562-Blasten im Verhältnis 1 : 1 nimmt der Anteil der CD 56^{dim}/CD 16⁺ Subpopulation hoch signifikant ($p < 0,01$) von 72,05 % \pm 14,71 % auf 46,35 % \pm 20,22 % ab. Gleichzeitig erhöht sich durch die Abnahme der CD 16 Expression der Anteil der CD 56^{dim}/CD 16⁻ NK-Zellen gegenüber der Kontrolle hoch signifikant ($p < 0,01$) von 23,33 % \pm 13,30 % auf 43,61 % \pm 18,74 %.

Die Verringerung der Expression von CD 16 auf 10 h mit 1 ng IL-15/ml vorbehandelten NK-Zellen ist nach 6 stündigem K562- Stimulus im Verhältnis 1 : 1 maximal. Hierbei nimmt der Anteil der CD 56^{dim}/CD 16⁺ Subpopulation gegenüber der alleinig mit 1 ng IL-15/ml vorbehandelten Kontrolle höchst signifikant ($p < 0,001$) von 68,25 % \pm 17,9 % auf 40,11 % \pm 19,1 % ab. Im Gegenzug nimmt der Anteil der CD 56^{dim}/CD 16⁻ Subpopulation hoch signifikant ($p < 0,01$) von 26,82 %

$\pm 16,55\%$ auf $50,7\% \pm 17,07\%$ zu.

Nach 24 stündiger Inkubation mit K562-Blasten steigt die CD 16 Expression auf den CD 56^{dim} NK-Zellen wieder geringfügig an. Gegenüber der Verteilung der NK-Zell-Subpopulationen nach 6 h Inkubation mit K562 nähert sich die Verteilung durch Erhöhung der CD 56^{dim}/CD 16⁺ und Verminderung der CD 56^{dim}/CD 16⁻ NK-Zellen langsam wieder den Ausgangswerten an. Trotzdem ist der Anteil der CD 56^{dim}/CD 16⁺ NK-Zell-Subpopulation mit $42,10\% \pm 23,66\%$ gegenüber dem der Kontrolle der mit IL-15 aktivierten NK-Zellen von $69,14\% \pm 17,97\%$ noch höchst signifikant ($p < 0,001$) vermindert. Der Anteil der CD 56^{dim}/CD 16⁻ NK-Zellen ist mit $48,56\% \pm 20,41\%$ noch hoch signifikant ($p < 0,01$) größer gegenüber dem der Kontrolle mit $24,85\% \pm 15,58\%$.

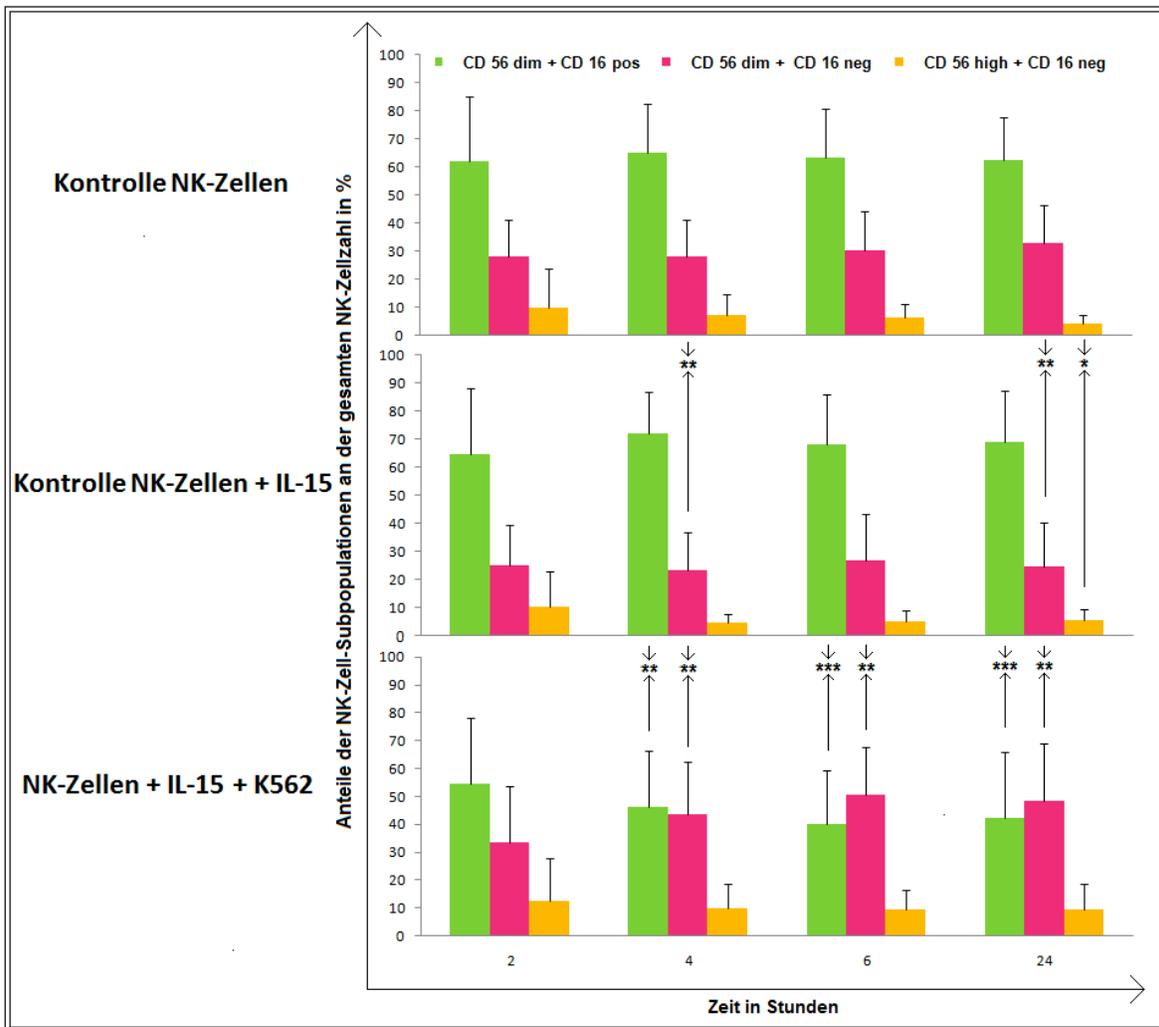


Abb. 6: Durchflußzytometrische Bestimmung der prozentualen Anteile der NK-Zell-Subpopulationen an den aus peripheren Blut gewonnenen NK-Zellen 6 gesunder Spender im zeitlichen Verlauf nach Zugabe von K562-Blasten: kein Stimulus (oben); nur primärer Stimulus mit 1 ng IL-15/ml 10 h vor Versuchsbeginn (Mitte); primärer Stimulus mit 1 ng IL-15/ml 10 h vor sekundärem Stimulus mit K562 im Verhältnis NK : K562 = 1 : 1 (unten); gezeigt sind Mw., Stabw. und gepaarter, zweiseitiger student t-test: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001, verglichen werden jeweils die Anteile der NK-Zell-Subpopulationen unstimulierter NK-Zellen mit denen mit IL-15 stimulierter NK-Zellen, bzw. die Anteile der NK-Zell-Subpopulationen mit IL-15 stimulierter NK-Zellen mit denen primär mit IL-15 und sekundär mit K562 stimulierter NK-Zellen; mittels MACS CD 56 angereicherte NK-Zellen.

3.2.4 Änderung der CD 16 und CD 56 Expression auf NK-Zellen in Abhängigkeit vom IL-2 und K562 Stimulus

Abb.7 stellt die Abnahme der CD 16 Expression auf CD 56^{dim} NK-Zellen 6 gesunder, geschlechts- und altersheterogener Spender nach K562-Stimulus von mit 1000 IE IL-2/ml vorbehandelten NK-Zellen da. Außerdem nimmt durch dieselben Stimuli der Anteil CD 56^{high}/CD 16⁻ NK-Zellen zu.

Der alleinige Stimulus mit 1000 IE IL-2/ml bewirkt ebenfalls eine Zunahme des Anteils CD 56^{high}/CD 16⁻ NK-Zellen.

Der Anteil der CD 56^{high}/CD 16⁻ NK-Zellen erhöht sich gegenüber dem der unbehandelten Kontrolle nach 16 h (10 h + 6 h) Aktivierung der NK-Zellen mit 1000 IE IL-2/ml signifikant ($p < 0,05$) von 6,19 % \pm 5,01 % auf 9,18 % \pm 5,07 %. Nach 34 h (10 h + 24 h) steigt er weiter gegenüber dem der Kontrolle signifikant ($p < 0,05$) von 4,33 % \pm 2,85 % auf 14,02 % \pm 10,86 %.

Bereits nach 2 h K562-Stimulus verringert sich der Anteil der CD 56^{dim}/CD 16⁺ NK-Zellen gegenüber der nur mit IL-2 behandelten Kontrolle höchst signifikant ($p < 0,001$) von 66,34 % \pm 15,6 % auf 33,70 % \pm 17,46 %. Im Gegenzug steigt der Anteil der CD 56^{dim}/CD 16⁻ NK-Zellen höchst signifikant ($p < 0,001$) von 24,45 % \pm 12,51 % auf 45,24 % \pm 14,46%.

Nach 4 h Stimulus mit K562-Blasten vermindert sich die CD 16 Expression auf den mit IL-2 vorbehandelten NK-Zellen weiter. Gegenüber der Kontrolle nimmt der Anteil der CD 56^{dim}/CD 16⁺ NK-Zell-Subpopulation höchst signifikant ($p < 0,001$) von 65,54 % \pm 13,34 % auf 25,35 % \pm 10,80 % ab. Der Anteil der CD 56^{dim}/CD 16⁻ NK-Zellen erhöht sich im Gegenzug höchst signifikant ($p < 0,001$) von 26,85 % \pm 10,37 % auf 52,9 % \pm 16,08 %.

Die maximale Verminderung der CD 16 Expression auf primär 10 h mit 1000 IE IL-2/ml vorbehandelten NK-Zellen ist nach 6 h sekundärem Stimulus mit K562 im Verhältnis 1 : 1 erreicht. Hier nimmt der Anteil der CD 56^{dim}/CD 16⁺ NK-Zell-Subpopulation gegenüber der mit IL-2 behandelten Kontrolle höchst signifikant ($p <$

0,001) von 59,87 % ± 16,45 % auf 18,59 % ± 7,06 % ab. Im Gegenzug erhöht sich der Anteil der CD 56^{dim}/CD 16⁻ NK-Zellen höchst signifikant (p < 0,001) von 31,06 % ± 12,38 % auf 64,16 % ± 6,37 %.

Nach 24 h K562-Stimulus steigt die CD 16 Expression auf den NK-Zellen etwas gegenüber dem 6 Stunden Stimulus. Die Anteile der primär mit IL-2 vorbehandelten NK-Zell-Subpopulationen nähern sich langsam wieder denen der alleinig mit IL-2 stimulierten Kontrolle an. Der Anteil der CD 56^{dim}/CD 16⁺ NK-Zellen erhöht sich von 18,59 % ± 7,06 % auf 27,44 % ± 22,69 %. Dennoch ist er mit 27,44 % ± 22,69 % noch höchst signifikant (p < 0,001) niedriger als der der Kontrolle von 62,31 % ± 15,79 %. Der Anteil der CD 56^{dim}/CD 16⁻ NK-Zell-Subpopulation verringert sich dagegen von 64,16 % ± 6,37 % auf 59,52 % ± 20,78 %. Er ist mit 59,52 % ± 20,78 % trotzdem noch höchst signifikant (p < 0,001) größer gegenüber der Kontrolle mit 23,5 % ± 10,47 %.

Nach 4 h K562-Stimulus der mit IL-2 vorbehandelten NK-Zellen erhöht sich der Anteil der CD 56^{high}/CD 16⁻ Subpopulation maximal und signifikant (p < 0,05) von 7,64 % ± 3,87 % auf 22 % ± 12,98 %. Nach 6 h K562-Stimulus ist der Anteil der CD 56^{high}/CD 16⁻ NK-Zellen mit 17,68 % ± 10,61 % immer noch hoch signifikant (p < 0,01) größer als der der alleinig mit IL-2 aktivierten Kontrolle mit 9,18 % ± 5,07 %.

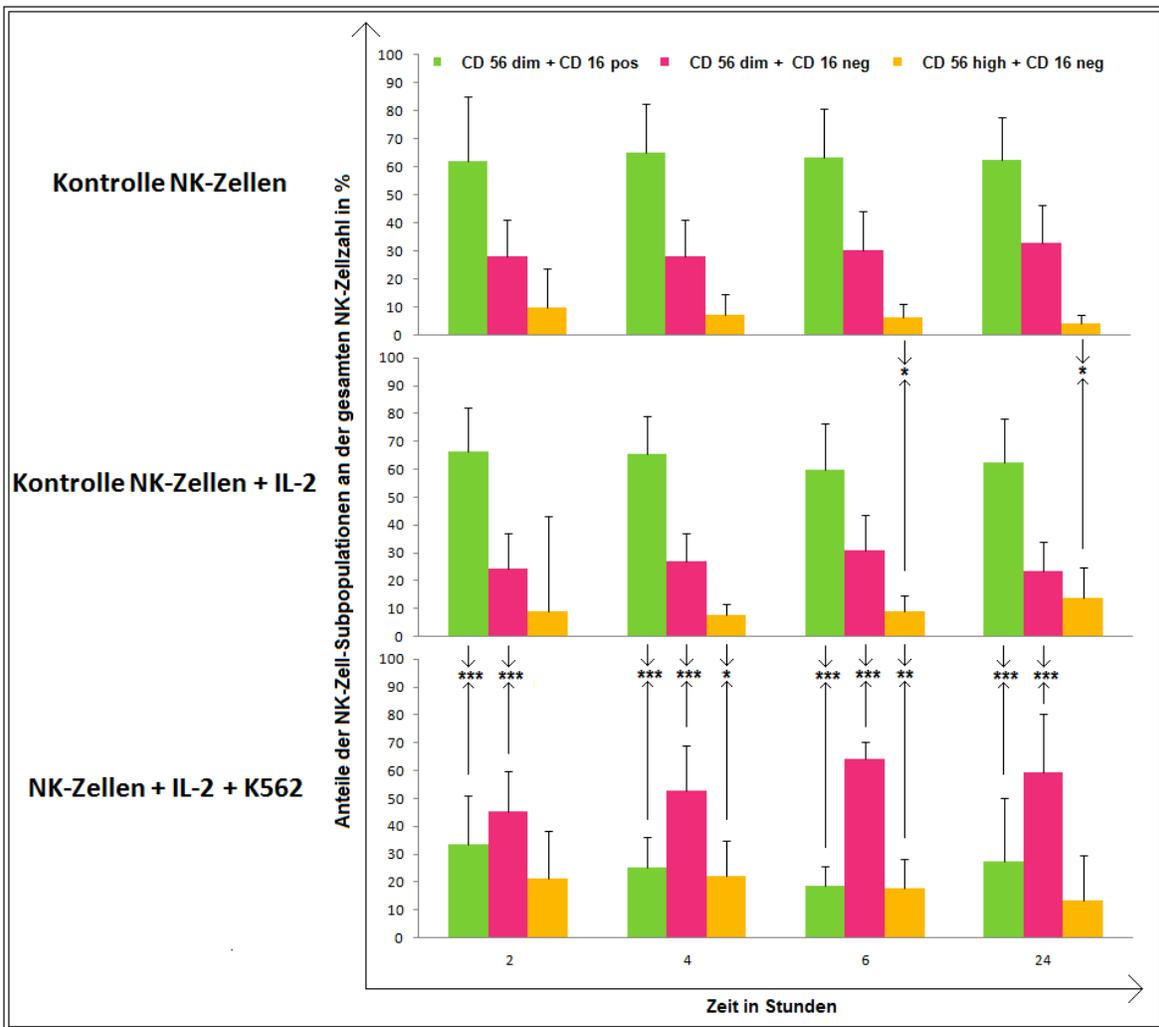


Abb. 7: Durchflußzytometrische Bestimmung der prozentualen Anteile der NK-Zell-Subpopulationen an den aus peripheren Blut gewonnenen NK-Zellen 7 gesunder Spender im zeitlichen Verlauf nach Zugabe von K562-Blasten: kein Stimulus (oben); nur primärer Stimulus mit 1000 IE IL-2/ml 10 h vor Versuchsbeginn (Mitte); primärer Stimulus mit 1000 IE IL-2/ml 10 h vor sekundärem Stimulus mit K562 im Verhältnis NK : K562 = 1 : 1 (unten); gezeigt sind Mw., Stabw. und gepaarter, zweiseitiger student t-test: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001, verglichen werden jeweils die Anteile der NK-Zell-Subpopulationen unstimulierter NK-Zellen mit denen mit IL-2 stimulierter NK-Zellen, bzw. die Anteile der NK-Zell-Subpopulationen mit IL-2 stimulierter NK-Zellen mit denen primär mit IL-2 und sekundär mit K562 stimulierter NK-Zellen; mittels MACS CD 56 angereicherte NK-Zellen.

3.2.5 Änderung der CD 16 und CD 56 Expression auf NK-Zellen in Abhängigkeit vom IL-2, IL-15 und K562 Stimulus

Ähnlich der mit 1000 IE IL-2/ml vorbehandelten NK-Zellen verhalten sich die NK-Zellen 6 gesunder, geschlechts- und altersheterogener Spender nach 10 h primärer Vorbehandlung mit 1000 IE IL-2/ml + 1 ng IL-15/ml und sekundärer Inkubation mit K562 im Verhältnis 1 : 1. Die CD 16 Expression nimmt nach 6 h Inkubation mit K562 maximal ab. Auch der Anteil der CD 56^{high}/CD 16^{dim} NK-Zellen ist nach 6 h K562-Stimulus maximal erhöht.

Gegenüber der unbehandelten Kontrolle ändern sich die Anteile der Subpopulationen der alleinig mit 1000 IE IL-2/ml + 1 ng IL-15/ml aktivierten NK-Zellen nicht (Abb.8).

Bereits nach 2 stündiger Inkubation mit K562 vermindert sich der Anteil der CD 56^{dim}/CD 16⁺ NK-Zellen hoch signifikant ($p < 0,001$) gegenüber dem der Kontrolle von 68,6 % \pm 15,53 % auf 36,01 % \pm 21,06 %. Gleichzeitig nimmt der Anteil der CD 56^{dim}/CD 16⁻ NK-Zell-Subpopulation hoch signifikant von 24,07 % \pm 12,94 % auf 48,05 % \pm 16,91 % zu.

Im Vergleich zur Kontrolle vermindert sich nach 4 h Inkubation mit K562 der Anteil der CD 56^{dim}/CD 16⁺ NK-Zell-Subpopulation weiter hoch signifikant von 66,55 % \pm 14,01 % auf 23,47 % \pm 12,17 %. Im Gegenzug nimmt der Anteil der CD 56^{dim}/CD 16⁻ NK-Zellen hoch signifikant von 27,10 % \pm 12,48 % auf 61,34 % \pm 12,78 % zu. Auch der Anteil der CD 56^{high}/CD 16⁻ NK-Zellen nimmt signifikant von 6,35 % \pm 4,53 % auf 15,37 % \pm 12,15 % zu.

Die maximale Änderung der NK-Zell-Subpopulationen der mit IL-2 + IL-15 vorbehandelten NK-Zellen ist nach 6 stündigem K562-Stimulus erreicht. Im Vergleich mit den Stimulationskonstellationen in Abb.7, 6 und 5 ist die Änderung der NK-Zell-Subpopulationen ebenfalls maximal. Gegenüber der mit IL-2 + IL-15 behandelten Kontrolle nimmt hierbei der Anteil der CD 56^{dim}/CD 16⁺ NK-Zellen von 60,54 % \pm 18,31 % auf 18,3 % \pm 8,67 % höchst signifikant ab. Der Anteil der CD 56^{dim}/CD 16⁻ NK-Zell-Subpopulation nimmt hoch signifikant von 31,09 % \pm 13,05 %

auf $65,84 \% \pm 8,76 \%$ zu. Außerdem erhöht sich der Anteil der $CD\ 56^{high}/CD\ 16^{-}$ NK-Zellen signifikant von $8,52 \% \pm 7,96 \%$ auf $16,37 \% \pm 13,40 \%$.

Nach 24 stündigem K562-Stimulus nähern sich die Verteilungen der NK-Zell-Subpopulationen ansatzweise wieder den Ausgangsverteilungen an. Im Vergleich zur Kontrolle ist der Anteil der $CD\ 56^{high}/CD16^{-}$ NK-Zellen nicht mehr signifikant höher. Der Anteil der $CD\ 56^{dim}/CD\ 16^{+}$ NK-Zellen ist mit $24,92 \% \pm 22,12 \%$ hoch signifikant kleiner gegenüber dem der Kontrolle mit $60,93 \% \pm 15,03 \%$. Der Anteil der $CD\ 56^{dim}/CD\ 16^{-}$ NK-Zellen ist mit $64,26 \% \pm 19,55 \%$ hoch signifikant größer verglichen mit dem der Kontrolle von $27,86 \% \pm 11,91 \%$ (Abb.8).

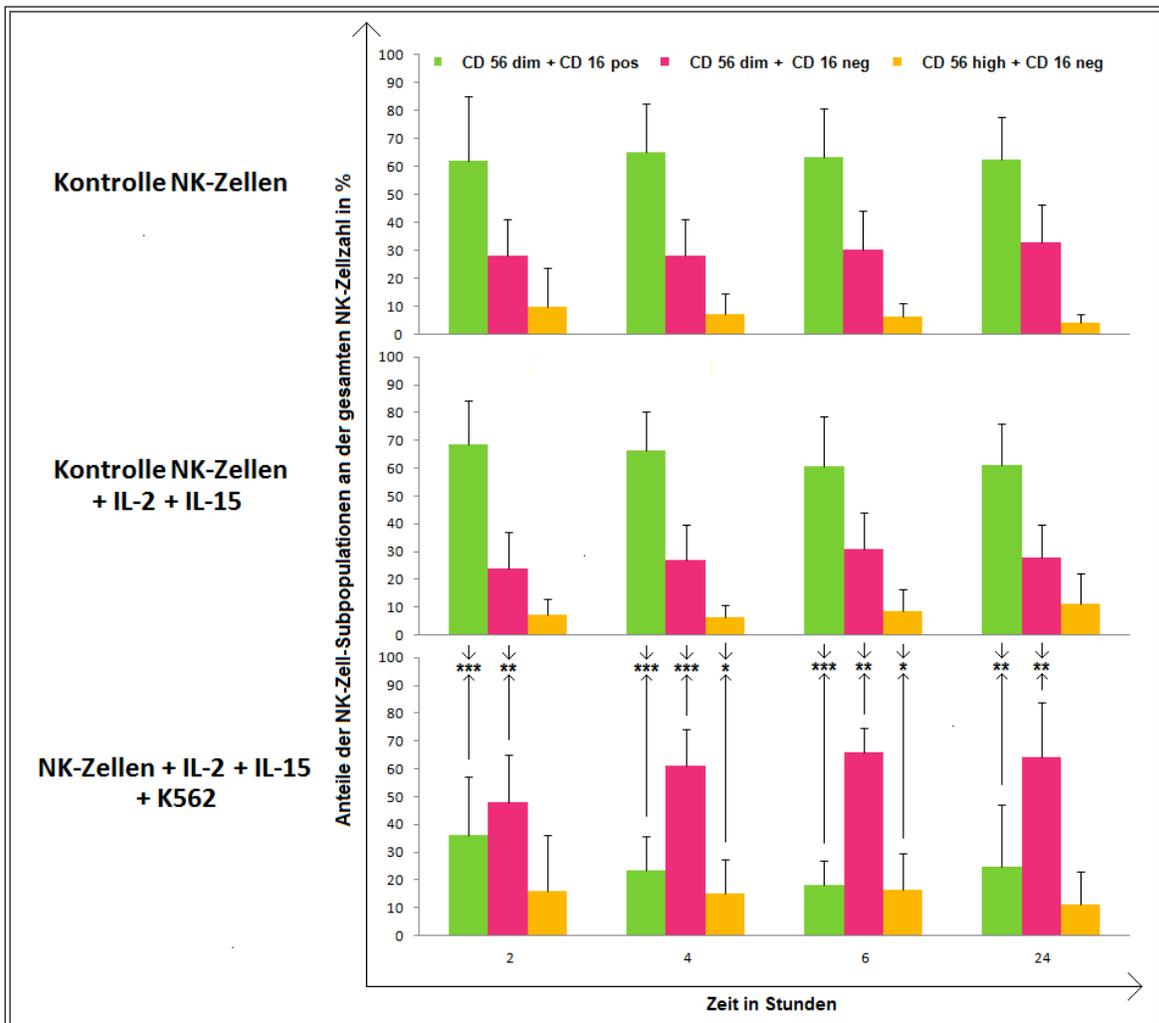


Abb. 8: Durchflußzytometrische Bestimmung der prozentualen Anteile der NK-Zell-Subpopulationen an den aus peripheren Blut gewonnenen NK-Zellen 6 gesunder Spender im zeitlichen Verlauf nach Zugabe von K562-Blasten: kein Stimulus (oben); nur primärer Stimulus mit 1000 IE IL-2/ml + 1 ng IL-15/ml 10 h vor Versuchsbeginn (Mitte); primärer Stimulus mit 1000 IE IL-2/ml + 1 ng IL-15/ml 10 h vor sekundärem Stimulus mit K562 im Verhältnis NK : K562 = 1 : 1 (unten); gezeigt sind Mw., Stabw. und gepaarter, zweiseitiger student t-test: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001, verglichen werden jeweils die Anteile der NK-Zell-Subpopulationen unstimulierter NK-Zellen mit denen mit IL-2 und IL-15 stimulierter NK-Zellen, bzw. die Anteile der NK-Zell-Subpopulationen mit IL-2 und IL-15 stimulierter NK-Zellen mit denen primär mit IL-2 und IL-15 und sekundär mit K562 stimulierter NK-Zellen; mittels MACS CD 56 angereicherte NK-Zellen.

3.3 Erhöhte Expression des Aktivitätsrezeptors CD 69⁺ auf mit IL-2, IL-15 und K562 stimulierten NK-Zellen

In Abb. 9 ist anhand einer beispielhaften, durchflußzytometrischen Darstellung das Verhalten des Aktivitätsrezeptors CD 69 im zeitlichen Verlauf nach verschiedenen Stimuli der NK-Zellen einer gesunden Spenderin dargestellt.

Im Vergleich zu den unbehandelten NK-Zellen nimmt der Anteil der CD 69⁺ NK-Zellen nach 6 h Stimulus mit K562-Blasten im Verhältnis 1 : 1 maximal von 8 % auf 25 % zu. Nach 24 stündigem K562 Stimulus nähert sich der Anteil der CD 69⁺ NK-Zellen mit 8 % wieder dem Anteil der Kontrolle von 6 % s. Abb. 9 1a) + 1b).

10 – 34 h mit 1000 IE IL-2 behandelte CD 56⁺ NK-Zellen sind zu 83 – 89 % CD 69⁺ (Abb. 9 2a)). Nach 2 h Inkubation der primär mit IL-2 stimulierten NK-Zellen mit K562-Blasten im Verhältnis 1 : 1 sind 96 % der NK-Zellen CD 69⁺, nach 4 h und 6 h sind jeweils 95 % der NK-Zellen CD 69⁺. Nach 24 h Inkubation nimmt der Anteil CD 69⁺ NK-Zellen mit 54 % im Vergleich zum 6 Stunden-Anteil und zur Kontrolle (mit IL-2 stimulierte NK-Zellen) deutlich ab (Abb. 9 2b)).

24 % der NK-Zellen sind nach 34 (10 h + 24 h) stündigem Stimulus mit 1 ng IL-15/ml CD 69⁺ (Abb. 9 3a)). Verglichen mit der Kontrolle (mit IL-15 stimulierte NK-Zellen) ist der Anteil CD 69⁺ NK-Zellen nach 6 h sekundärem Stimulus mit K562 im Verhältnis 1 : 1 mit einem Anstieg von 17 % auf 47 % maximal erhöht (Abb. 9 3b)). Mit 25 % CD 69⁺ NK-Zellen hat sich der Anteil CD 69⁺ NK-Zellen nach 24 h K562 Stimulus wieder deutlich dem der Kontrolle (24 % CD 69⁺ NK-Zellen) angenähert (Abb. 9 3 b)).

Nach 34 h (10 h + 24 h) Stimulus mit 1000 IE IL-2/ml und 1 ng IL-15/ml sind 91 % der NK-Zellen CD 69⁺. In dieser Kontrolle sind nach 16 h (10 h + 6 h) Stimulus mit IL-2 und IL-15 59 % der NK-Zellen CD 69⁺ (Abb. 9 4a)).

Nach 6 h sekundärem Stimulus mit K562 im Verhältnis 1 : 1 der mit IL-2 + IL-15 vorbehandelten NK-Zellen, erreicht der Anteil der CD 69⁺ NK-Zellen mit 87 % sein

Maximum. Der Anteil der CD 69⁺ NK-Zellen nimmt nach 24 h Stimulus mit K562 im Vergleich zum 6 stündigem Stimulus um 11 % von 87 % auf 76 % ab (Abb. 9 4b)).

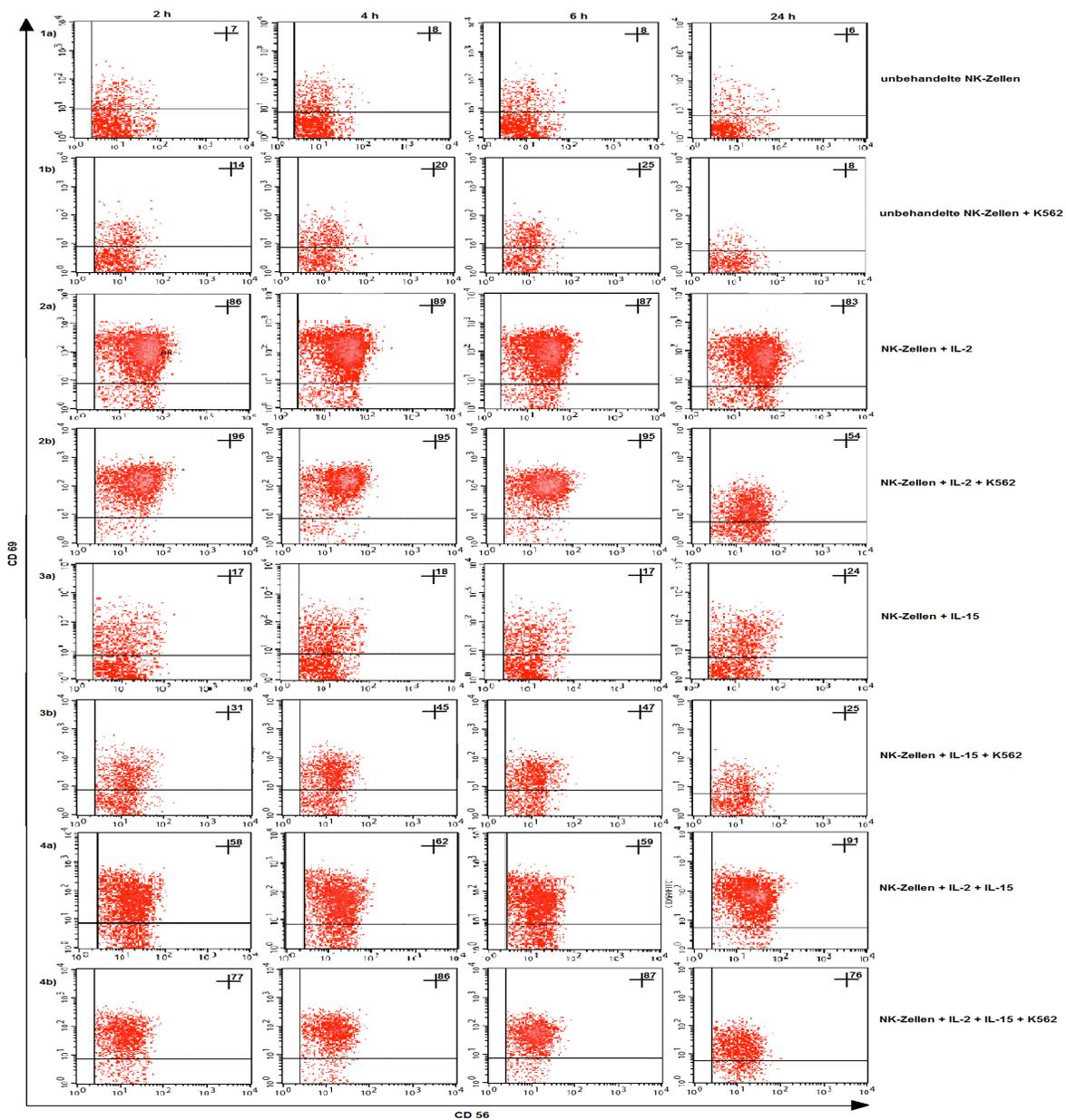


Abb. 9: Beispielhafte Darstellung der durchflußzytometrischen Bestimmung des Anteils CD 69⁺ NK-Zellen an der gesamten NK-Zellzahl ohne Stimulus und nach verschiedenen primären und sekundären Stimuli im zeitlichen Verlauf nach Zugabe von K562-Blasten: **1a)** kein Stimulus; **1b)** alleinige Stimulation mit K562 im Verhältnis NK : K562 = 1 : 1; **2a)** nur primärer Stimulus mit 1000 IE IL-2/ml 10 h vor Versuchsbeginn; **2b)** primärer Stimulus mit 1000 IE IL-2/ml 10 h vor sekundärem Stimulus mit K562 im Verhältnis NK : K562 = 1 : 1; **3a)** nur primärer Stimulus mit 1 ng IL-15/ml 10 h vor Versuchsbeginn; **3b)** primärer Stimulus mit 1 ng IL-15/ml 10 h vor sekundärem Stimulus mit K562 im Verhältnis NK : K562 = 1 : 1; **4a)** nur primärer Stimulus mit 1000 IE IL-2/ml + 1 ng IL-15/ml 10 h vor Versuchsbeginn; **4b)** primärer Stimulus mit 1000 IE IL-2/ml + 1 ng IL-15/ml 10 h vor sekundärem Stimulus mit K562 im Verhältnis NK : K562 = 1 : 1; Zahlen in den dot plots zeigen die prozentualen Anteile der CD 56⁺/CD 69⁺ NK-Zellen an; CD 56⁺/CD 3⁺ NK-Zellen sind in den Messungen mit eingeschlossen; NK-Zellen einer gesunden Spenderin.

3.3.1 Änderung der Anteile der einzelnen Subpopulationen an den CD 69⁺ NK-Zellen innerhalb von Stunden nach Aktivierung der NK-Zellen

Im zeitlichen Verlauf ändern sich nicht nur die Anteile der CD 69⁺ NK-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Stimuli (s. Abb. 9), sondern auch die Anteile der verschiedenen NK-Zell-Subpopulationen an den CD 69⁺ NK-Zellen. In folgendem Kapitel wird diese Dynamik genauer dargestellt.

3.3.1.1 Dynamik der Anteile CD 69⁺ NK-Zellen insgesamt und CD 69⁺ NK-Zell-Subpopulationen nach Stimulation mit K562

In Abb. 10 werden die Anteile der CD 69⁺ NK-Zellen insgesamt und die Anteile der einzelnen NK-Zell-Subpopulationen an den CD 69⁺ NK-Zellen unbehandelter und mit K562-Blasten stimulierter NK-Zellen miteinander verglichen. Die NK-Zellen wurden aus peripherem Blut 7 gesunder, geschlechts- und altersheterogener Spender gewonnen.

Bereits nach 2 stündigem K562 Stimulus nimmt der Anteil CD 69⁺ NK-Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle von 7,76 % ± 3,14 % auf 21,97 % ± 12,98 % hoch signifikant zu. Hierbei erhöht sich der Anteil der CD 69⁺/CD 56^{dim}/CD 16⁺ NK-Zellen hoch signifikant von 3,23 % ± 1,07 % auf 8,57 % ± 2,83 % und der Anteil der CD 69⁺/CD 56^{dim}/CD 16⁻ NK-Zellen signifikant von 3,66 % ± 1,83 % auf 10,26 % ± 8,91 %.

Weiter erhöht sich der Anteil CD 69⁺ NK-Zellen nach 4 h Inkubation mit K562-Blasten verglichen mit der Kontrolle höchst signifikant von 7,8 % ± 4,06 % auf 31,56 % ± 8,85 %. Der Anteil der CD 69⁺/CD 56^{dim}/CD 16⁺ NK-Zellen steigt hierbei hoch signifikant von 3,29 % ± 0,97 % auf 16,15 % ± 8,31 % und der Anteil der CD 69⁺/CD 56^{dim}/CD 16⁻ NK-Zellen hoch signifikant von 3,89 % ± 2,4 % auf 13,11 % ± 6,07 %. Gleichzeitig nehmen die CD 69⁺/CD 56^{high}/CD 16⁻ NK-Zellen im Vergleich zur Kontrolle höchst signifikant von 0,63 % ± 0,82 % auf 2,36 % ± 1,05 % zu.

Nach 6 stündigem Stimulus mit K562-Blasten steigt der Anteil CD 69⁺ NK-Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle maximal und hoch signifikant von 7,43 % ± 3,67 % auf 35,40 % ± 14,61 % an. Ebenfalls hoch signifikant steigt hiervon der Anteil CD 69⁺/CD 56^{dim}/CD 16⁺ NK-Zellen von 3,18 % ± 1,9 % auf 17,72 % ± 11,78 % an. Gleichzeitig erhöht sich der Anteil CD 69⁺/CD 56^{dim}/CD 16⁻ NK-Zellen höchst signifikant von 3,41 % ± 2,29 % auf 15,44 % ± 6,05 % und der Anteil CD 69⁺/CD 56^{high}/CD 16⁻ NK-Zellen signifikant von 0,85 % ± 1,17 % auf 2,28 % ± 1,31 %.

Nach 24 h K562 Stimulus nimmt der Anteil CD 69⁺ NK-Zellen wieder ab und nähert sich der Kontrolle an. Der Anteil der CD 69⁺ NK-Zellen ist mit 21,20 % ± 12,61 % noch signifikant höher als der der Kontrolle mit 6,78 % ± 7,49 %. Mit 9,5 % ± 6,33 % ist der Anteil der CD 69⁺/CD 56^{dim}/CD 16⁺ NK-Zellen noch hoch signifikant größer als der der Kontrolle mit 2,18 % ± 2,38 %.

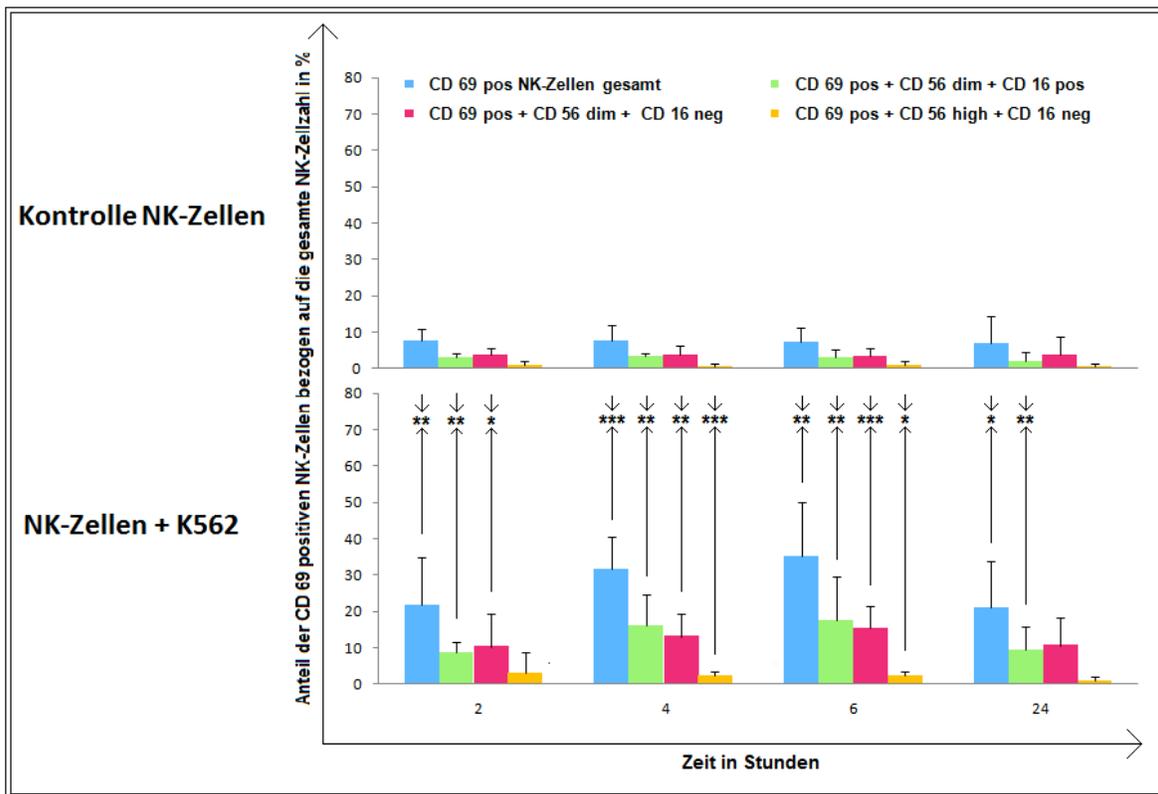


Abb. 10: Durchflußzytometrische Bestimmung der prozentualen Anteile CD 69⁺ NK-Zellen. CD 69⁺ NK-Zellen und CD 69⁺ NK-Zell-Subpopulationen der aus peripheren Blut gewonnenen NK-Zellen 7 gesunder Spender im zeitlichen Verlauf nach Zugabe von K562-Blasten: kein Stimulus (oben); nach Stimulation mit K562 im Verhältnis NK : K562 = 1 : 1 (unten); gezeigt sind Mw., Stabw. und gepaarter, zweiseitiger student t-test: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; verglichen werden jeweils die Anteile der CD 69⁺ NK-Zellen unstimulierter NK-Zellen mit denen mit K562 stimulierter NK-Zellen; mittels MACS CD 56 angereicherte NK-Zellen.

3.3.1.2 Dynamik der Anteile CD 69⁺ NK-Zellen insgesamt und CD 69⁺ NK-Zell-Subpopulationen nach Stimulation mit IL-15 und K562

In Abb.11 sind die Anteile der CD 69⁺ NK-Zellen unbehandelter NK-Zellen, mit 1 ng IL-15/ml stimulierter NK-Zellen und primär mit 1 ng IL-15/ml behandelter NK-Zellen 10 h vor sekundärem Stimulus mit K562 im Verhältnis 1 : 1 vergleichend im zeitlichen Verlauf dargestellt. Nach IL-15 und K562 Stimulus erhöht sich nicht nur der Anteil der CD 69⁺ NK-Zellen 6 gesunder, geschlechts- und altersheterogener Spender insgesamt, sondern es ändern sich auch die Anteile der NK-Zell-

Subpopulationen an der CD 69⁺ NK-Zell-Fraktion signifikant bis höchst signifikant. Hauptsächlich steigt hierbei der Anteil der CD 69⁺/CD 56^{dim}/CD 16⁺ NK-Zell-Fraktion signifikant bis höchst signifikant an.

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle steigt nach 12 h Stimulus mit 1 ng IL-15/ml der Anteil der CD 69⁺ NK-Zellen hoch signifikant von 7,76 % ± 3,14 % auf 26,48 % ± 11,85 % an. Der Anteil der CD 69⁺/CD 56^{dim}/CD 16⁺ NK-Zellen nimmt hierbei hoch signifikant von 3,23 % ± 1,07 % auf 13,69 % ± 6,9 % zu. Insgesamt ändert sich diese Verteilung der CD 69⁺ NK-Zellen im Vergleich zum 12 h Stimulus mit IL-15 nach 14, 16 und 34 stündiger Aktivierung mit IL-15 nicht wesentlich. Nach 14 h und nach 34 h Inkubation mit IL-15 ist zusätzlich ein hoch signifikanter bzw. signifikanter Anstieg der CD 69⁺/CD 56^{high}/CD 16⁺ NK-Zellen von 0,63 % ± 0,82 % auf 2,17 % ± 0,8 % bzw. von 0,71 % ± 0,77 % auf 2,95 % ± 1,16 % zu beobachten.

Nach Inkubation der 10 h mit 1 ng IL-15/ml aktivierten NK-Zellen mit K562 im Verhältnis 1 : 1 nimmt der Anteil der CD 69⁺ NK-Zellen signifikant bis höchst signifikant zu. Im Vergleich zur mit IL-15 stimulierten Kontrolle steigt hierbei nur der Anteil der CD 69⁺/CD 56^{dim}/CD 16⁻ NK-Zellen signifikant bis hoch signifikant an.

Bereits nach 2 h K562 Stimulus erhöht sich der Anteil der CD 69⁺ NK-Zellen im Vergleich zur mit 1 ng IL-15/ml stimulierten Kontrolle hoch signifikant von 26,48 % ± 11,85 % auf 45,82 % ± 14,09 %. Die Anteile der einzelnen NK-Zell-Subpopulationen an der CD 69⁺ NK-Zell-Fraktion erhöhen sich zwar, aber nicht signifikant verglichen mit der mit IL-15 stimulierten Kontrolle.

Nach 4 h Inkubation mit K562 nimmt der Anteil der CD 69⁺ NK-Zellen im Vergleich zur mit IL-15 stimulierten Kontrolle höchst signifikant von 24,7 % ± 5,05 % auf 59,57 % ± 12,06 % zu. Hauptsächlich ist diese Zunahme durch den hoch signifikanten Anstieg der CD 69⁺/CD 56^{dim}/CD 16⁻ NK-Zellen von 4,91 % ± 2,49 % auf 25,72 % ± 11,7 % verursacht.

Maximal und höchst signifikant erhöht sich der Anteil der CD 69⁺ NK-Zellen nach 6h K562 Stimulus im Vergleich zur mit IL-15 stimulierten Kontrolle von 28,49 % ±

14,51 % auf 59,85 % \pm 15,85 %. Größtenteils ist dieser Anstieg durch die hoch signifikante Zunahme der CD 69⁺/CD 56^{dim}/CD 16⁻ NK-Zellen von 5,49 % \pm 1,64 % auf 31,17 % \pm 13,04 % verursacht.

Nach 24 h Inkubation mit K562 verringert sich der Anteil der CD 69⁺ NK-Zellen verglichen mit dem Anteil nach 6 stündigem K562 Stimulus von 59,85 % \pm 15,85 % auf 42,08 % \pm 17,94 %. Im Vergleich zur mit IL-15 stimulierten Kontrolle (20,82 % \pm 6,83 %) ist der Anteil der CD 69⁺ NK-Zellen noch signifikant höher. Hierbei ist der Anteil der CD 69⁺/CD 56^{dim}/CD 16⁻ NK-Zellen mit 21,61 % \pm 13,68 % signifikant größer als der der Kontrolle mit 3,99 % \pm 2,13 %.

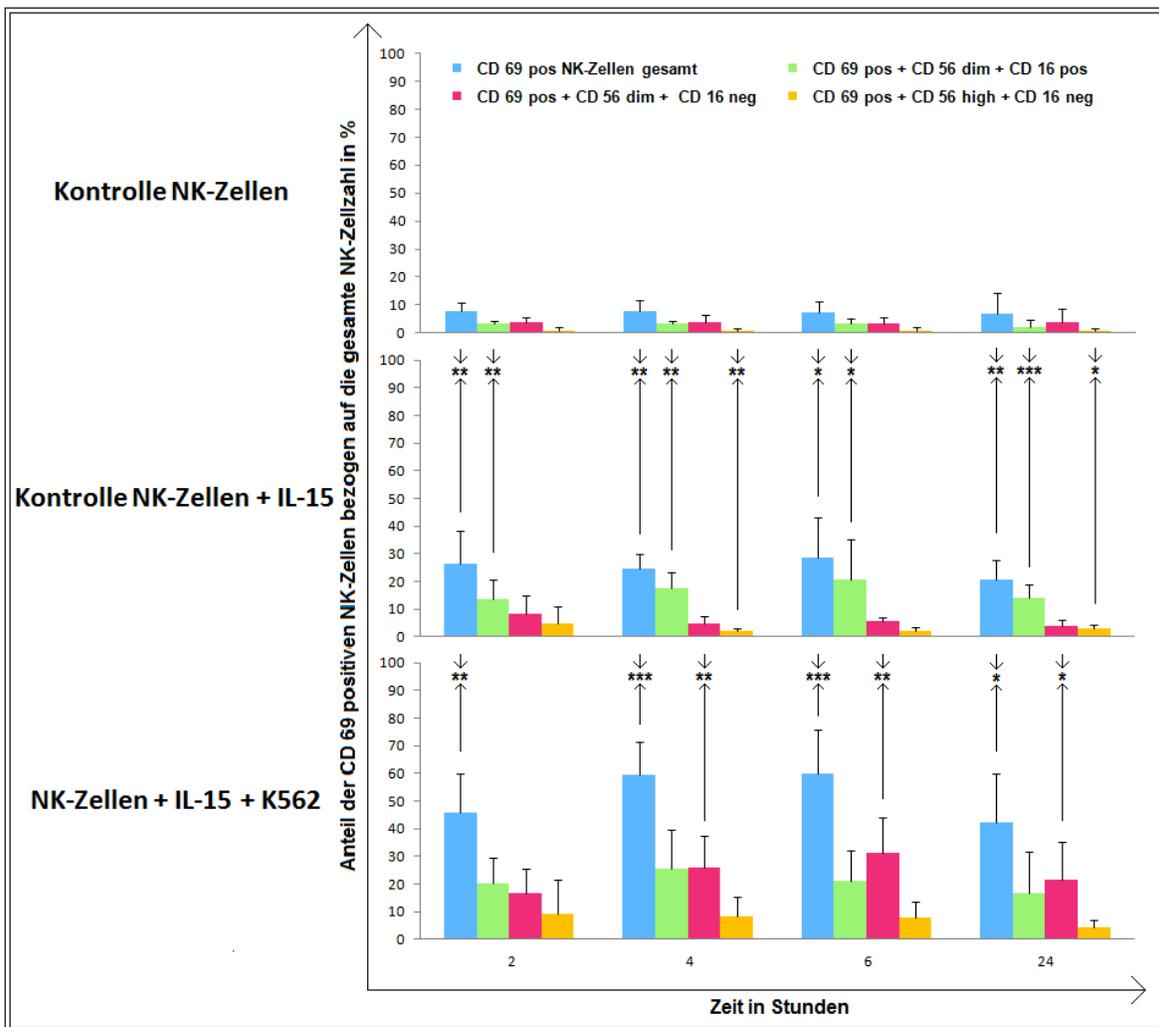


Abb. 11: Durchflußzytometrische Bestimmung der prozentualen Anteile CD 69⁺ NK-Zellen. CD 69⁺ NK-Zellen und CD 69⁺ NK-Zell-Subpopulationen der aus peripheren Blut gewonnenen NK-Zellen 6 gesunder Spender im zeitlichen Verlauf nach Zugabe von K562-Blasten: kein Stimulus (oben); nur primärer Stimulus mit 1 ng IL-15/ml 10 h vor Versuchsbeginn (Mitte); primärer Stimulus mit 1 ng IL-15/ml 10 h vor sekundärem Stimulus mit K562 im Verhältnis NK : K562 = 1 : 1 (unten); gezeigt sind Mw., Stabw. und gepaarter, zweiseitiger student t-test: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; verglichen werden jeweils die Anteile der CD 69⁺ NK-Zellen unstimulierter NK-Zellen mit denen mit IL-15 stimulierter NK-Zellen, bzw. die Anteile der CD 69⁺ NK-Zellen mit IL-15 stimulierter NK-Zellen mit denen primär mit IL-15 und sekundär mit K562 stimulierter NK-Zellen; mittels MACS CD 56 angereicherte NK-Zellen.

3.3.1.3 Dynamik der Anteile CD 69⁺ NK-Zellen insgesamt und CD 69⁺ NK-Zell-Subpopulationen nach Stimulation mit IL-2 und K562

In Abb.12 werden die Anteile der CD 69⁺ NK-Zellen unbehandelter NK-Zellen mit denen mit 1000 IE IL-2/ml stimulierter NK-Zellen 7 gesunder, geschlechts- und altersheterogener Spender verglichen. Weiter werden NK-Zellen nach 10 h primärem Stimulus mit 1000 IE IL-2/ml sekundär mit K562-Blasten im Verhältnis 1 : 1 inkubiert und mit der nur mit 1000 IE IL-2/ml behandelten Kontrolle im zeitlichen Verlauf von insgesamt 24 h verglichen.

Nach 12 h Stimulus mit 1000 IE IL-2/ml steigt der Anteil der CD 69⁺ NK-Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle höchst signifikant von 7,76 % ± 3,14 % auf 86,87 % ± 5,01 % an. Hierbei erhöht sich der Anteil der CD 69⁺/CD 56^{dim}/CD 16⁺ NK-Zellen höchst signifikant von 3,23 % ± 1,07 % auf 59,31 % ± 10,02 %, der Anteil der CD 69⁺/CD 56^{dim}/CD 16⁻ NK-Zellen hoch signifikant von 3,66 % ± 1,83 % auf 19,05 % ± 9,33 % und der Anteil der CD 69⁺/CD 56^{high}/CD 16⁻ NK-Zellen hoch signifikant von 0,88 % ± 1,12 % auf 8,51 % ± 4,42 %. Diese Verteilung ändert sich nicht wesentlich nach 34 h IL-2 Stimulus. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle mit einem Anteil an CD 69⁺ NK-Zellen von 6,78 % ± 7,49 % ist der Anteil CD 69⁺ NK-Zellen nach 34 h IL-2 Stimulus mit 88,82 % ± 9,49 % hoch signifikant erhöht. Der Anteil der CD 69⁺/CD 56^{dim}/CD 16⁺ NK-Zellen ist hierbei mit 58,6 % ± 14,19 % höchst signifikant größer im Vergleich zur dem der unbehandelten Kontrolle mit 2,18 % ± 2,38 %. Außerdem liegt hier eine signifikante Erhöhung des Anteils der CD 69⁺/CD 56^{dim}/CD 16⁻ NK-Zellen von 3,88 % ± 4,7 % auf 18,15 % ± 8,96 % und eine hoch signifikante Vergrößerung des Anteils der CD 69⁺/CD 56^{high}/CD 16⁻ NK-Zellen von 0,71 % ± 0,77 % auf 11,88 % ± 6,93 % vor.

Nach 2 h, 4 h und 6 h sekundärem Stimulus mit K562-Blasten der primär mit 1000 IE IL-2/ml aktivierten NK-Zellen ändern sich die Anteile der CD 69⁺ NK-Zellen insgesamt nicht signifikant im Vergleich zur mit IL-2 behandelten Kontrolle. Insgesamt ändern sich hauptsächlich innerhalb der CD 69⁺ NK-Zell-Fraktion die Anteile der CD 69⁺/CD 56^{dim}/CD 16⁺ NK-Zellen und der CD 69⁺/CD 56^{dim}/CD 16⁻

NK-Zellen hoch bis höchst signifikant.

Nach 2 h K562-Stimulus vermindert sich der Anteil der CD 69⁺/CD 56^{dim}/CD 16⁺ NK-Zellen im Vergleich zur mit IL-2 behandelten Kontrolle höchst signifikant von 59,31 % ± 10,02 % auf 30,65 % ± 15,64 %. Im Gegenzug erhöht sich der Anteil der CD 69⁺/CD 56^{dim}/CD 16⁻ NK-Zellen verglichen mit der Kontrolle höchst signifikant von 19,05 % ± 9,33 % auf 39,37 % ± 11,76 %.

Nach 4 h Inkubation mit K562-Blasten vermindert sich der Anteil der CD 69⁺/CD 56^{dim}/CD 16⁺ NK-Zellen weiter im Vergleich zur mit IL-2 behandelten Kontrolle höchst signifikant von 61,19 % ± 10,63 % auf 23,36 % ± 10,72 %. Im Gegenzug erhöht sich weiter der Anteil der CD 69⁺/CD 56^{dim}/CD 16⁻ NK-Zellen im Vergleich zur Kontrolle hoch signifikant von 21,49 % ± 6,75 % auf 46,04 % ± 13,92 %. Außerdem nimmt der Anteil der CD 69⁺/CD 56^{high}/CD 16⁻ NK-Zellen verglichen mit der Kontrolle signifikant von 7,27 % ± 3,61 % auf 21,68 % ± 12,84 % zu.

Nach 6 h Stimulus mit K562-Blasten ist im Vergleich zur mit IL-2 behandelten Kontrolle die maximale Änderung der Anteile der CD 69⁺ NK-Zell-Subpopulationen an dem gesamten Anteil der CD 69⁺ NK-Zellen erreicht. Hier nimmt der Anteil der CD 69⁺/CD 56^{dim}/CD 16⁺ NK-Zellen hoch signifikant von 55,31 % ± 12,10 % auf 16,35 % ± 6,38 % ab. Im Gegenzug erhöht sich der Anteil der CD 69⁺/CD 56^{dim}/CD 16⁻ NK-Zellen höchst signifikant von 24,34 % ± 8,3 % auf 56,79 % ± 8,66 % und der Anteil der CD 69⁺/CD 56^{high}/CD 16⁻ NK-Zellen hoch signifikant von 8,78 % ± 5,28 % auf 17,25 % ± 10,21 %.

Verglichen mit der mit 1000 IE IL-2/ml stimulierten Kontrolle haben die Anteile der CD 69⁺ NK-Zellen insgesamt nach 24 h Inkubation mit K562-Blasten höchst signifikant von 88,82 % ± 9,49 % auf 67,97 % ± 13,57 % abgenommen. Im Vergleich zur Kontrolle mit 58,6 % ± 14,19 % ist der Anteil der CD 69⁺/CD 56^{dim}/CD 16⁺ NK-Zellen mit 17,51 % ± 14,57 % wie nach 2, 4 und 6 stündigem K562-Stimulus höchst signifikant kleiner. Im Gegenzug ist der Anteil der CD 69⁺/CD 56^{dim}/CD 16⁻ NK-Zellen mit 42,15 % ± 19,28 % immer noch hoch signifikant größer als der der Kontrolle mit 18,15 % ± 8,96 %.

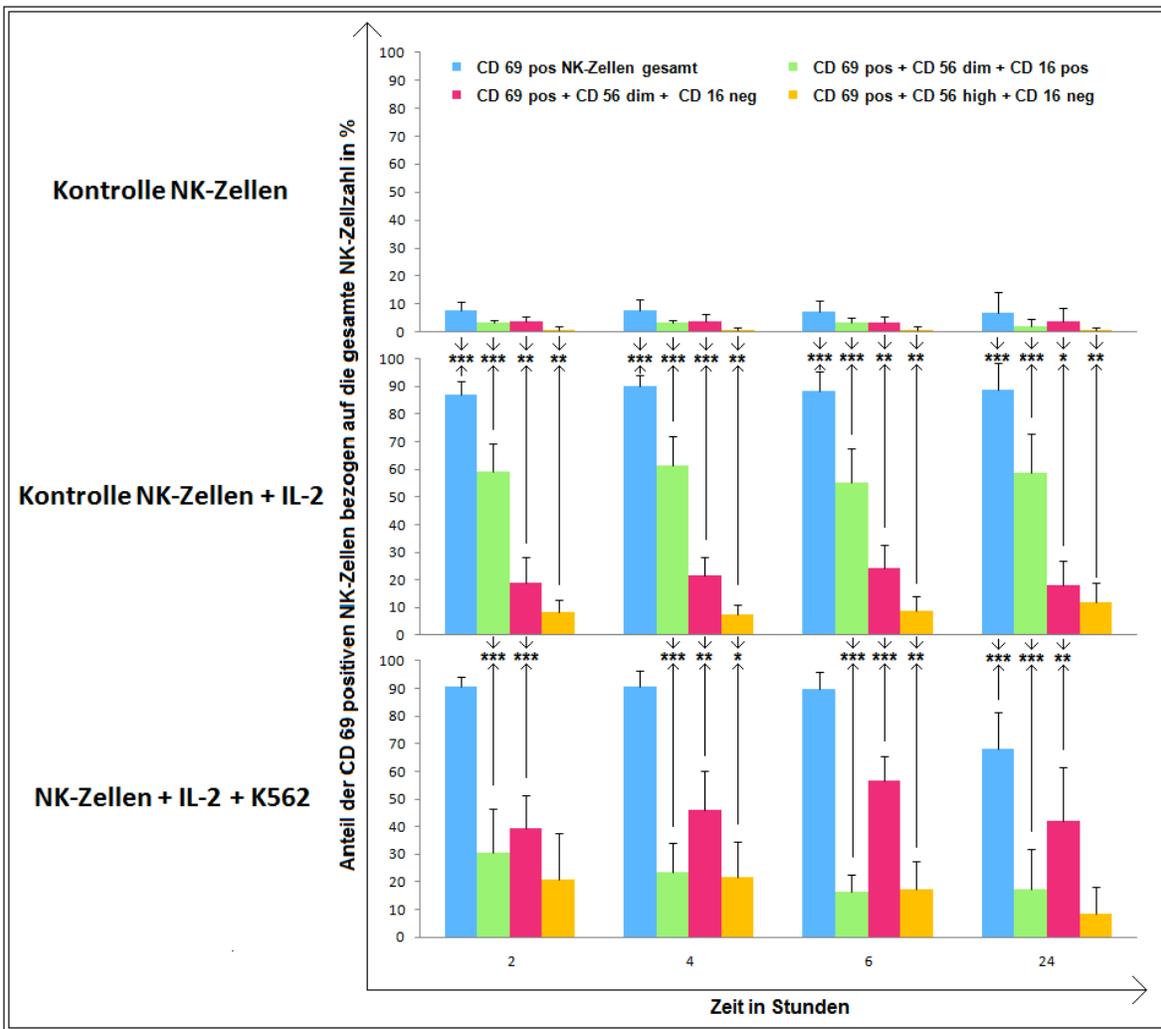


Abb. 12: Durchflußzytometrische Bestimmung der prozentualen Anteile CD 69⁺ NK-Zellen. CD 69⁺ NK-Zellen und CD 69⁺ NK-Zell-Subpopulationen der aus peripheren Blut gewonnenen NK-Zellen 7 gesunder Spender im zeitlichen Verlauf nach Zugabe von K562-Blasten: kein Stimulus (oben); nur primärer Stimulus mit 1000 IE IL-2/ml 10 h vor Versuchsbeginn (Mitte); primärer Stimulus mit 1000 IE IL-2/ml 10 h vor sekundärem Stimulus mit K562 im Verhältnis NK : K562 = 1 : 1 (unten); gezeigt sind Mw., Stabw. und gepaarter, zweiseitiger student t-test: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; verglichen werden jeweils die Anteile der CD 69⁺ NK-Zellen unstimulierter NK-Zellen mit denen mit IL-2 stimulierter NK-Zellen, bzw. die Anteile der CD 69⁺ NK-Zellen mit IL-2 stimulierter NK-Zellen mit denen primär mit IL-2 und sekundär mit K562 stimulierter NK-Zellen; mittels MACS CD 56 angereicherte NK-Zellen.

3.3.1.4 Dynamik der Anteile CD 69⁺ NK-Zellen insgesamt und CD 69⁺ NK-Zell-Subpopulationen nach Stimulation mit IL-2, IL-15 und K562

In Abb.13 werden die Anteile der CD 69⁺ NK-Zellen unbehandelter NK-Zellen mit denen mit 1000 IE IL-2/ml und 1 ng IL-15/ml stimulierter NK-Zellen 7 gesunder, geschlechts- und altersheterogener Spender verglichen. Weiter werden 10 h nach primärem Stimulus mit 1000 IE IL-2/ml und 1 ng IL-15/ml sekundär mit K562-Blasten im Verhältnis 1 : 1 inkubierte NK-Zellen mit der Kontrolle der mit IL-2 und IL-15 aktivierten NK-Zellen im zeitlichen Verlauf verglichen. Insgesamt verhalten sich die CD 69⁺ NK-Zellen und CD 69⁺ NK-Zell-Subpopulationen in dieser Stimulationskonstellation ziemlich ähnlich wie die primär nur mit 1000 IE IL-2/ml aktivierten NK-Zellen in Abb.12.

Nach 12 h Stimulus mit 1000 IE IL-2/ml und 1 ng IL-15/ml steigt der Anteil der CD 69⁺ NK-Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle höchst signifikant von 7,76 % ± 3,14 % auf 81,35 % ± 13,5 % an. Hierbei erhöht sich der Anteil der CD 69⁺/CD 56^{dim}/CD 16⁺ NK-Zellen höchst signifikant von 3,23 % ± 1,07 % auf 55,62 % ± 11,9 %, der Anteil der CD 69⁺/CD 56^{dim}/CD 16⁻ NK-Zellen signifikant von 3,66 % ± 1,83 % auf 18,91 % ± 9,58 % und der Anteil der CD 69⁺/CD 56^{high}/CD 16⁻ NK-Zellen signifikant von 0,88 % ± 1,12 % auf 6,65 % ± 5,12 %. Diese Verteilung ändert sich nicht wesentlich innerhalb von 34 h IL-2 und IL-15 Stimulus. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle mit einem Anteil an CD 69⁺ NK-Zellen von 6,78 % ± 7,49 % ist der Anteil CD 69⁺ NK-Zellen nach 34 h IL-2 und IL-15 Stimulus mit 89,72 % ± 8,92 % höchst signifikant erhöht. Der Anteil der CD 69⁺/CD 56^{dim}/CD 16⁺ NK-Zellen ist hierbei mit 57,96 % ± 14,52 % höchst signifikant größer im Vergleich zur dem der unbehandelten Kontrolle mit 2,18 % ± 2,38 %. Außerdem liegt hier eine hoch signifikante Vergrößerung des Anteils der CD 69⁺/CD 56^{dim}/CD 16⁻ NK-Zellen von 3,88 % ± 4,7 % auf 21,85 % ± 8,03 % und eine signifikante Erhöhung des Anteils der CD 69⁺/CD 56^{high}/CD 16⁻ NK-Zellen von 0,71 % ± 0,77 % auf 9,99 % ± 8,12 % vor.

Nach 2 h, 4 h und 6 h sekundärem Stimulus mit K562-Blasten der primär mit 1000 IE IL-2/ml und 1 ng IL-15/ml aktivierten NK-Zellen ändern sich die Anteile der CD 69⁺ NK-Zellen insgesamt nicht signifikant im Vergleich zur mit IL-2 und IL-15 behandelten Kontrolle. Hauptsächlich ändern sich innerhalb der CD 69⁺ NK-Zell-Fraktion die Anteile der CD 69⁺/CD 56^{dim}/CD 16⁺ NK-Zellen und der CD 69⁺/CD 56^{dim}/CD 16⁻ NK-Zellen.

Nach 2 h K562-Stimulus vermindert sich der Anteil der CD 69⁺/CD 56^{dim}/CD 16⁺ NK-Zellen im Vergleich zur mit IL-2 und IL-15 behandelten Kontrolle hoch signifikant von 55,62 % ± 11,9 % auf 29,08 % ± 18,58 %. Im Gegenzug erhöht sich der Anteil der CD 69⁺/CD 56^{dim}/CD 16⁻ NK-Zellen verglichen mit der Kontrolle hoch signifikant von 18,91 % ± 9,58 % auf 42,64 % ± 14,4 %.

Nach 4 h Inkubation mit K562-Blasten vermindert sich der Anteil der CD 69⁺/CD 56^{dim}/CD 16⁺ NK-Zellen weiter im Vergleich zur mit IL-2 und IL-15 behandelten Kontrolle höchst signifikant von 56,44 % ± 11,43 % auf 19,57 % ± 10,84 %. Im Gegenzug erhöht sich weiter der Anteil der CD 69⁺/CD 56^{dim}/CD 16⁻ NK-Zellen im Vergleich zur Kontrolle höchst signifikant von 21,32 % ± 8,3 % auf 54,65 % ± 12,95 %. Außerdem nimmt der Anteil der CD 69⁺/CD 56^{high}/CD 16⁻ NK-Zellen verglichen mit der Kontrolle signifikant von 5,97 % ± 4,1 % auf 15,1 % ± 11,9 % zu.

Nach 6 h Stimulus mit K562-Blasten ist im Vergleich zur mit IL-2 und IL-15 behandelten Kontrolle die maximale Änderung der Anteile der CD 69⁺ NK-Zell-Subpopulationen an dem gesamten Anteil der CD 69⁺ NK-Zellen erreicht. Hier nimmt der Anteil der CD 69⁺/CD 56^{dim}/CD 16⁺ NK-Zellen höchst signifikant von 49,42 % ± 10,16 % auf 14,13 % ± 6,6 % ab. Im Gegenzug erhöht sich der Anteil der CD 69⁺/CD 56^{dim}/CD 16⁻ NK-Zellen höchst signifikant von 23,98 % ± 9,87 % auf 59,02 % ± 11,28 % und der Anteil der CD 69⁺/CD 56^{high}/CD 16⁻ NK-Zellen signifikant von 8,12 % ± 7,41 % auf 16,02 % ± 12,96 %.

Verglichen mit der mit 1000 IE IL-2/ml und 1 ng IL-15/ml stimulierten Kontrolle sind die Anteile der CD 69⁺ NK-Zellen insgesamt nach 24 h Inkubation mit K562-Blasten hoch signifikant von 89,72 % ± 8,92 % auf 65,9 % ± 17,43 % gesunken. Im

Vergleich zur Kontrolle mit $57,96 \% \pm 14,52 \%$ ist der Anteil der $CD\ 69^+/CD\ 56^{dim}/CD\ 16^+$ NK-Zellen mit $16,91 \% \pm 18,24 \%$ wie nach 4 und 6 stündigem K562-Stimulus höchst signifikant kleiner. Im Gegenzug ist der Anteil der $CD\ 69^+/CD\ 56^{dim}/CD\ 16^-$ NK-Zellen mit $42,63 \% \pm 18,21 \%$ immer noch hoch signifikant größer als der der Kontrolle mit $21,85 \% \pm 8,03 \%$.

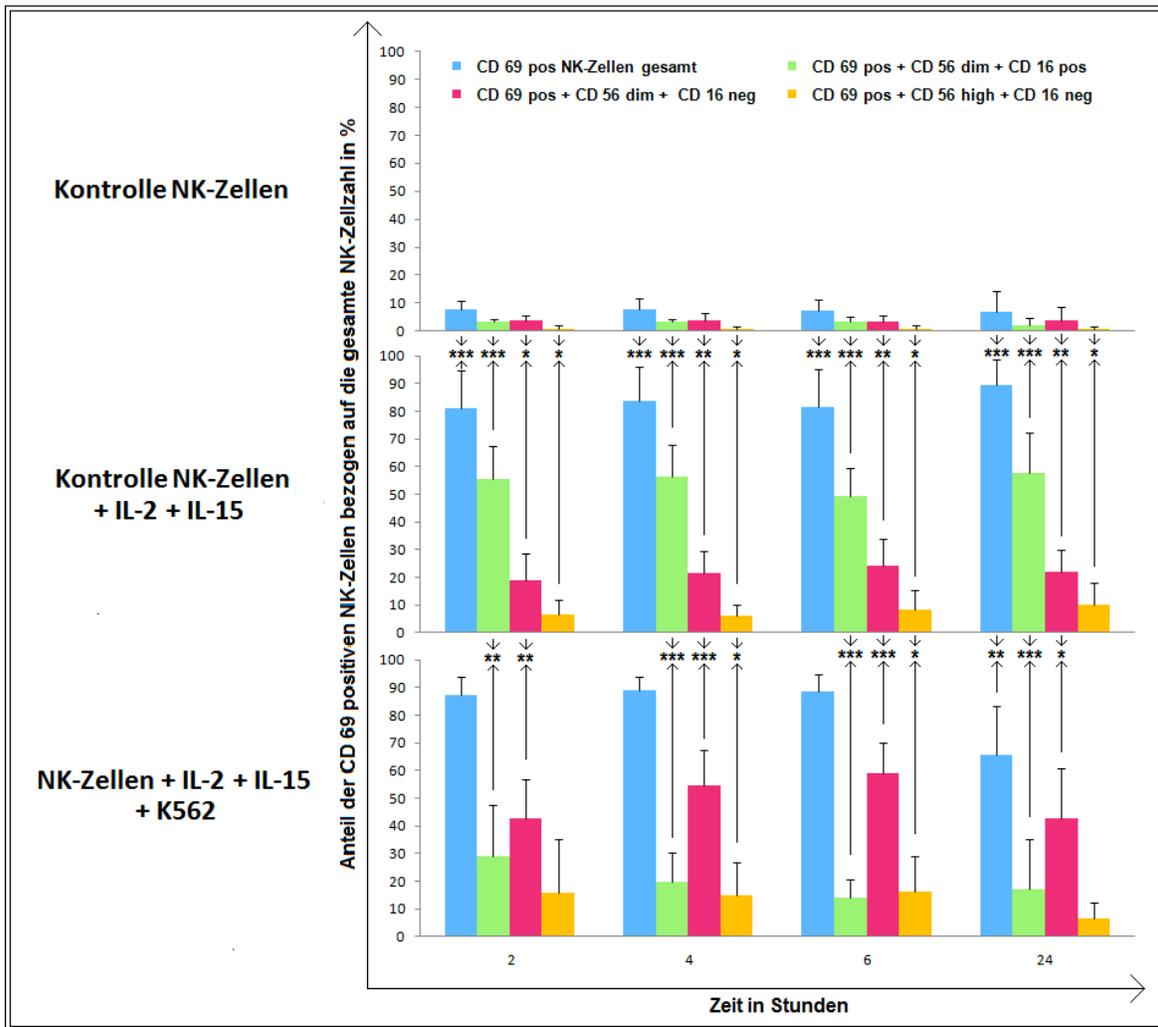


Abb. 13: Durchflußzytometrische Bestimmung der prozentualen Anteile CD 69⁺ NK-Zellen. CD 69⁺ NK-Zellen und CD 69⁺ NK-Zell-Subpopulationen der aus peripheren Blut gewonnenen NK-Zellen 6 gesunder Spender im zeitlichen Verlauf nach Zugabe von K562-Blasten: kein Stimulus (oben); nur primärer Stimulus mit 1000 IE IL-2/ml + 1 ng IL-15/ml 10 h vor Versuchsbeginn (Mitte); primärer Stimulus mit 1000 IE IL-2/ml + 1 ng IL-15/ml 10 h vor sekundärem Stimulus mit K562 im Verhältnis NK : K562 = 1 : 1 (unten); gezeigt sind Mw., Stabw. und gepaarter, zweiseitiger student t-test: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; verglichen werden jeweils die Anteile der CD 69⁺ NK-Zellen unstimulierter NK-Zellen mit denen mit IL-2 und IL-15 stimulierter NK-Zellen, bzw. die Anteile der CD 69⁺ NK-Zellen mit IL-2 und IL-15 stimulierter NK-Zellen mit denen primär mit IL-2 und IL-15 und sekundär mit K562 stimulierter NK-Zellen; mittels MACS CD 56 angereicherte NK-Zellen.

3.3.2 Das Maximum des Anteils CD 69⁺ NK-Zellen ist abhängig von primären Stimuli mit Interleukinen und sekundärem Stimulus mit K562-Blasten

Abhängig von der primären Behandlung mit IL-2 und IL-15 ist das Ausgangsniveau des Anteils der CD 69⁺ NK-Zellen 7 gesunder, alters- und geschlechtsinhomogener Spender unterschiedlich groß. Nach 6 h sekundärem Stimulus mit K562 ist Maximum bei primär unbehandelten und bei primär mit IL-15 aktivierten NK-Zellen erreicht. Bei primär mit IL-2 behandelten und bei primär mit IL-2 und IL-15 aktivierten NK-Zellen steigen schon nach 4 h die CD 69⁺ NK-Zellen maximal an. Unabhängig von dem primären Stimulus vermindert sich der Anteil der CD69⁺ NK-Zellen nach 24 h Inkubation mit K562 wieder.

Der Anteil der CD69⁺ NK-Zellen von unbehandelten NK-Zellen erhöht sich maximal nach 6 h K562 Stimulus im Verhältnis 1 : 1 von 7,43 % ± 3,67 % auf 35,40 % ± 14,61 %. Nach 24 h Inkubation mit K562 vermindert sich dieser Anteil wieder auf 21,20 % ± 12,61 % (Abb.14 a)).

Der Anteil der CD 69⁺ NK-Zellen von primär 10 h mit 1000 IE IL-2/ml aktivierten NK-Zellen nimmt geringfügig aber maximal nach 4 h sekundärem K562-Stimulus im Verhältnis 1 : 1 von 89,94 % ± 4,04 % auf 90,84 % ± 5,69 % zu. Nach 6 h Inkubation mit K562 verändert sich dieser Anteil mit 89,97 % ± 6,11 % kaum und vermindert sich nach 24 h K562-Stimulus deutlich auf 67,97 % ± 13,57 % (Abb.14 b)).

Der Anteil der CD 69⁺ NK-Zellen von primär 10 h mit 1 ng IL-15/ml aktivierten NK-Zellen erhöht sich maximal nach 6 h sekundärem K562-Stimulus im Verhältnis 1 : 1 von 28,49 % ± 14,51 % auf 59,85 % ± 15,85 %. Nach 24 h Inkubation mit K562 nimmt dieser Anteil wieder auf 42,08 % ± 17,94 % ab (Abb. 14 c)).

Der Anteil der CD 69⁺ NK-Zellen von primär 10 h mit 1000 IE IL-2/ml und 1 ng IL-15/ml aktivierten NK-Zellen erhöht sich maximal nach 4 h sekundärem K562-Stimulus im Verhältnis 1 : 1 von 83,74 % ± 12,22 % auf 89,17 % ± 4,87 %. Nach 6 h Inkubation mit K562 verändert sich dieser Anteil mit 88,67 % ± 6,11 %

geringfügig. Nach 24 h K562-Stimulus verringert sich der Anteil der CD 69⁺ NK-Zellen deutlich auf 65,9 % ± 17,43 % (Abb.14 d)).

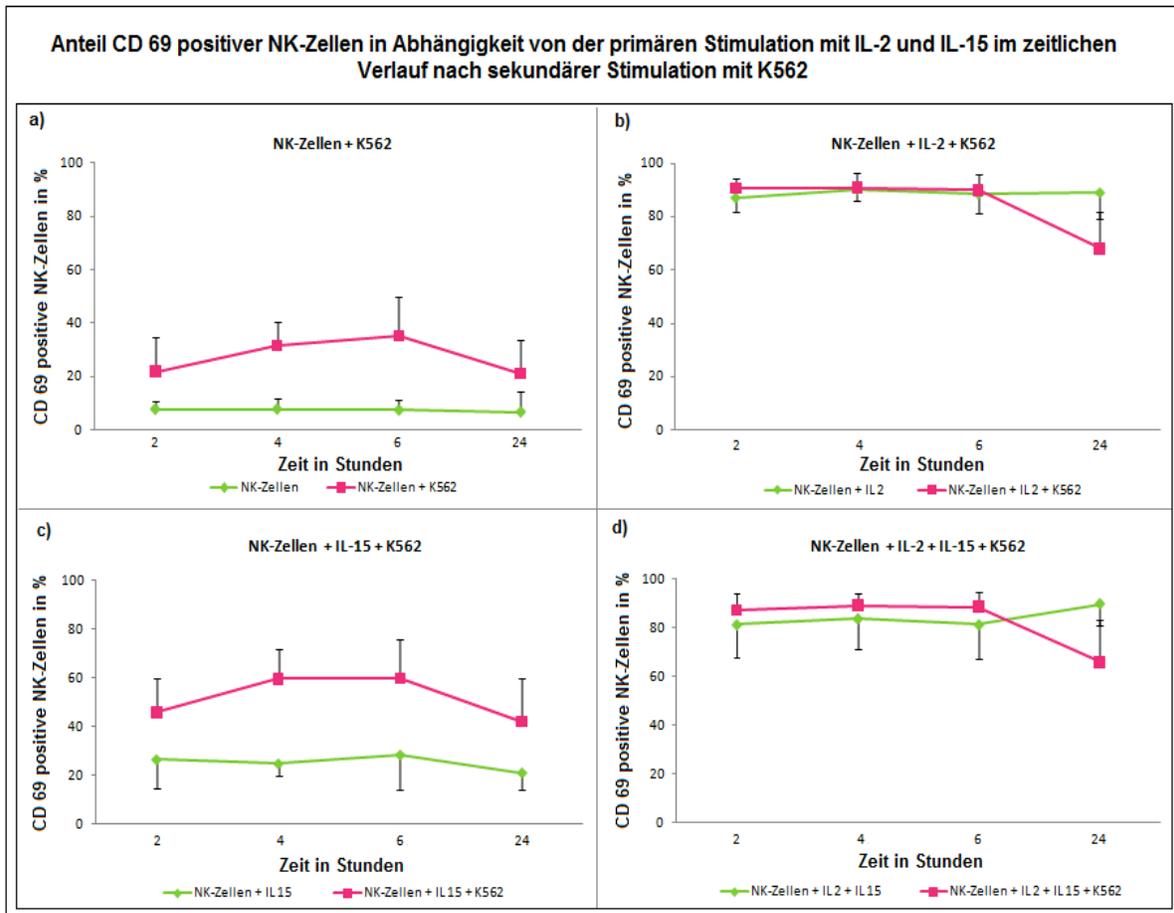


Abb.14: Durchflußzytometrische Bestimmung des Anteils CD 69⁺ NK-Zellen im zeitlichen Verlauf nach Zugabe von K562-Blasten im Verhältnis NK : K562 = 1 : 1 in Abhängigkeit verschiedener primärer Stimuli mit IL-2 und IL-15 10 h vor sekundärer Stimulation mit K562: **a)** alleinige Stimulation mit K562; **b)** primärer Stimulus mit 1000 IE IL-2/ml und sekundärer Stimulus mit K562; **c)** primärer Stimulus mit 1 ng IL-15/ml und sekundärer Stimulus mit K562; **d)** primärer Stimulus mit 1000 IE IL-2/ml + 1 ng IL-15/ml und sekundärer Stimulus mit K562; mittels MACS CD 56 angereicherte NK-Zellen; gezeigt sind Mw. und Stabw.; bei a) + b) n = 7 (gesunde Spender), bei c) + d) n = 6 (gesunde Spender).

3.3.3 Unterschiede der maximalen CD 69 Expression innerhalb einzelner NK-Zell-Subpopulationen abhängig vom Stimulus mit IL-2, IL-15 und K562

In Abb.15 werden die Anteile der CD 69⁺ NK-Zellen 7 bzw. 6 gesunder, geschlechts- und altersheterogener Spender innerhalb der einzelnen NK-Zell-Subpopulationen genauer betrachtet.

Generell ist das Ausgangsniveau der CD 69⁺ NK-Zellen innerhalb der NK-Zell-Subpopulationen unterschiedlich hoch. Bei unbehandelten NK-Zellen ist der Anteil der CD 69⁺ NK-Zellen innerhalb der CD 56^{dim}/CD 16⁺ Subpopulation am geringsten. Der Anteil CD 69⁺ NK-Zellen innerhalb der beiden CD 16⁻ Subpopulationen ist bei unbehandelten NK-Zellen ähnlich groß. Nach Aktivierung mit IL-2 bzw. IL-15 ist der Anteil der CD 69⁺ NK-Zellen innerhalb der CD 56^{high}/CD 16⁻ Subpopulation am höchsten (Abb.15 1b),2b),3b)).

Bezüglich des Verhaltens des CD 69 Rezeptors innerhalb der CD 56^{dim}/CD 16⁺ Subpopulation verglichen mit den anderen NK-Zell-Subpopulationen ist folgendes festzustellen:

In der CD 56^{dim}/CD 16⁺ NK-Zell-Subpopulation nimmt nach K562-Stimulus der unbehandelten, der primär mit IL-15 und der primär mit IL-2 + IL-15 aktivierten NK-Zellen der Anteil der CD 69⁺ NK-Zellen am geringsten zu. Eine Ausnahme stellt der primäre Stimulus mit IL-2 vor sekundärer Inkubation mit K562 dar. Hierbei ist der Anteil der CD 69⁺ NK-Zellen innerhalb der CD 56^{dim}/CD 16⁺ Subpopulation verglichen mit den anderen NK-Zell-Subpopulationen am zweithöchsten. Ansonsten ist bei den primär unbehandelten NK-Zellen und nach primärer Aktivierung mit IL-15 bzw. IL-2 + IL-15 der Anteil der CD 69⁺ NK-Zellen innerhalb der CD 56^{dim}/CD 16⁻ Subpopulation am zweithöchsten.

Innerhalb der CD 56^{high}/CD 16⁻ NK-Zell-Subpopulation wird unabhängig von der primären Aktivierung nach sekundärem K562-Stimulus der größte Anteil dieser NK-Zellen CD 69 positiv. In dieser Subpopulation nimmt auch der Anteil der CD 69⁺ NK-Zellen nach 24 h verglichen mit der CD 56^{dim}/CD 16⁺ und der CD 56^{dim}/CD 16⁻ Subpopulation am stärksten ab (Abb.15 1a),2a),3a)). Insgesamt macht diese

Subpopulation den kleinsten Anteil der NK-Zellen aus (Kap.3.1) und hat somit auch den geringsten Einfluss auf die Gesamtzahl der CD 69⁺ NK-Zellen (Kap.3.3.1).

Nach 6 h K562-Stimulus der unbehandelten NK-Zellen im Verhältnis 1 : 1 nimmt der Anteil der CD 69⁺ NK-Zellen innerhalb der CD 56^{dim}/CD 16⁺ Subpopulation maximal von 4,76 % ± 1,97 % auf 33,41 % ± 16,61 % zu. Bei den 10 h mit 1 ng IL-15/ml vorbehandelten NK-Zellen steigt er ebenfalls nach 6 h K562-Stimulus maximal von 30,31 ± 17,89 % auf 56,97 % ± 20,83 % an.

Der Anteil der CD 69⁺ NK-Zellen innerhalb der CD 56^{dim}/CD 16⁺ Subpopulation erhöht sich bei 10 h mit 1000 IE IL-2/ml vorbehandelten NK-Zellen nach 2 h sekundärem K562-Stimulus wenig aber maximal von 90,89 % ± 9,9 % auf 91,56 % ± 6,13 %.

Innerhalb der CD 56^{dim}/CD 16⁺ Subpopulation der 10 h mit 1000 IE IL-2/ml + 1 ng IL-15/ml vorbehandelten NK-Zellen, steigt die CD 69 Expression nach K562-Stimulus im Vergleich zur Kontrolle nicht an. Nach 4 h Inkubation mit K562 ist der Anteil der CD 69⁺ NK-Zellen mit 84,79 % ± 12,86 % zwar maximal, dennoch geringer als der, der Kontrolle mit 86,85 % ± 17,68 % (Abb.15 1a),1b)).

Innerhalb der CD 56^{dim}/CD 16⁻ Subpopulation erhöht sich der Anteil der CD 69⁺ NK-Zellen unabhängig von der primären Aktivierung nach 6 h K562-Stimulus im Verhältnis 1 : 1 maximal. Im Vergleich zur Kontrolle nimmt hierbei bei unbehandelten CD 56^{dim}/CD 16⁻ NK-Zellen der Anteil der CD 69⁺ NK-Zellen von 14,43 % ± 11,86 % auf 41,96 % ± 21,12 % zu.

Bei primär 10 h zuvor mit 1 ng IL-15/ml aktivierten NK-Zellen steigt der Anteil CD 69⁺ NK-Zellen in der CD 56^{dim}/CD 16⁻ Subpopulation nach 6 h K562-Stimulus von 29,72 % ± 19,95 % auf 63,78 % ± 24,21 %.

Primär 10 h zuvor mit 1000 IE IL-2/ml aktivierte CD 56^{dim}/CD 16⁻ NK-Zellen erhöhen ihren Anteil CD 69⁺ NK-Zellen von 81,44 % ± 14,15 % auf 88,39 % ± 9,61 % nach 6 h K562-Stimulus.

Primär 10 h zuvor mit 1000 IE IL-2/ml + 1 ng IL-15/ml aktivierte CD 56^{dim}/CD 16⁻

NK-Zellen vergrößern ihren Anteil CD 69⁺ NK-Zellen von 79,34 % ± 14,92 % auf 89,3 % ± 9,82 % nach 6 h K562-Stimulus (Abb.15 2a),2b)).

Innerhalb der CD 56^{high}/CD 16⁻ Subpopulation primär unbehandelter, primär mit IL-15 und primär mit IL-2 aktivierter NK-Zellen erhöht sich der Anteil der CD 69⁺ NK-Zellen nach 4 h K562-Stimulus im Verhältnis 1 : 1 maximal. Im Vergleich zur Kontrolle nimmt hierbei bei unbehandelten CD 56^{high}/CD 16⁻ NK-Zellen der Anteil der CD 69⁺ NK-Zellen von 13,9 % ± 13,27 % auf 49,67 % ± 22,75 % zu.

Bei primär 10 h zuvor mit 1 ng IL-15/ml aktivierten NK-Zellen steigt der Anteil CD 69⁺ NK-Zellen in der CD 56^{high}/CD 16⁻ Subpopulation maximal nach 4 h K562-Stimulus von 57,45 % ± 17,82 % auf 85,9 % ± 13,7 %.

Primär 10 h zuvor mit 1000 IE IL-2/ml aktivierte CD 56^{high}/CD 16⁻ NK-Zellen erhöhen ihren Anteil CD 69⁺ NK-Zellen maximal von 95,91 % ± 4,31 % auf 98,3 % ± 1,74 % nach 4 h K562-Stimulus.

Nach 6 h K562-Stimulus vergrößern primär 10 h zuvor mit 1000 IE IL-2/ml + 1 ng IL-15/ml aktivierte CD 56^{dim}/CD 16⁻ NK-Zellen ihren Anteil CD 69⁺ NK-Zellen geringfügig, aber maximal von 96,4 % ± 3,08 % auf 98,13 % ± 1,71 % (Abb.15 3a),3b)).

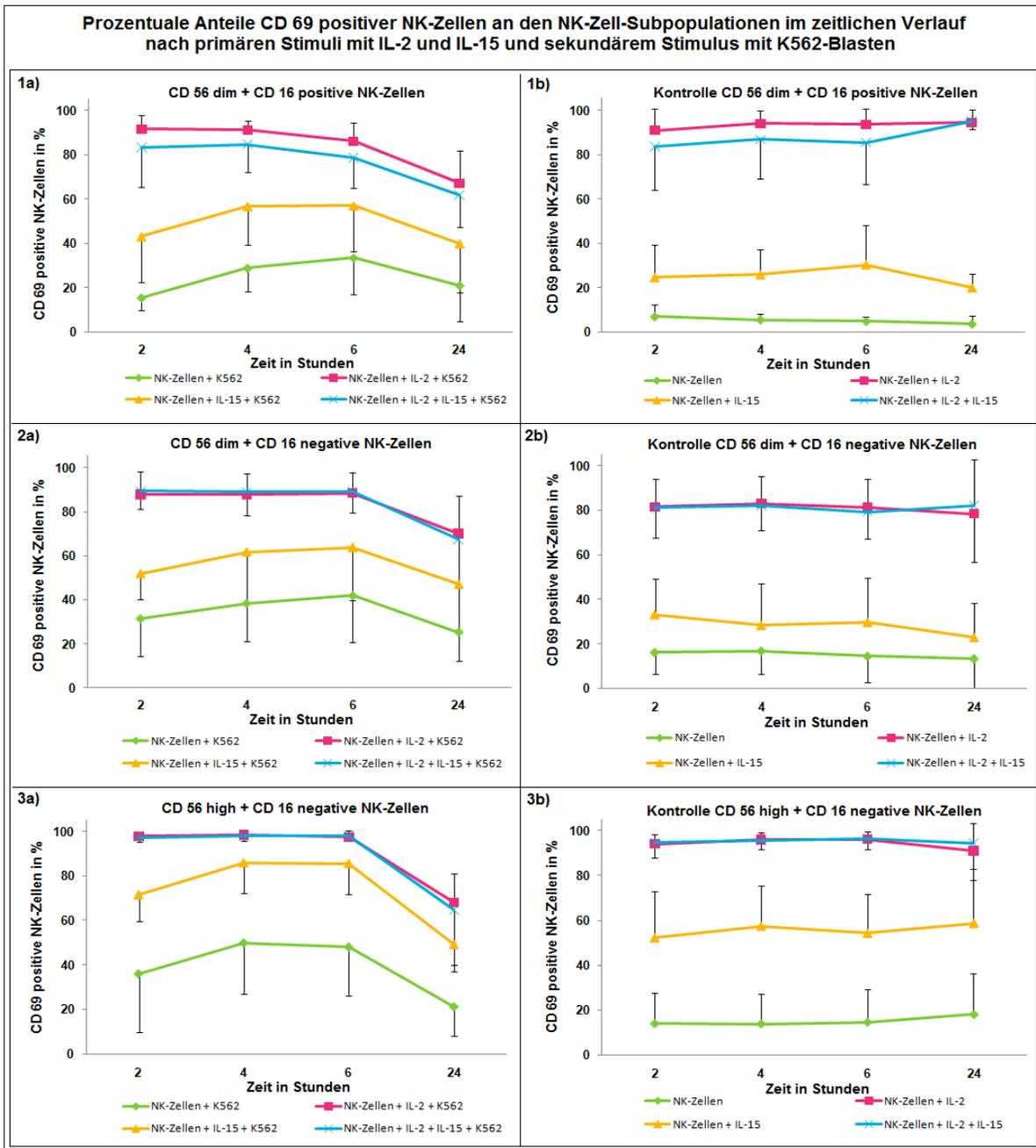


Abb. 15: Durchflußzytometrische Bestimmung des prozentualen Anteils CD 69⁺ NK-Zellen an den einzelnen NK-Zell-Subpopulationen im zeitlichen Verlauf nach Zugabe von K562-Blasten im Verhältnis NK : K562 = 1 : 1 in Abhängigkeit verschiedener primärer Stimuli mit IL-2 und IL-15 10 h vor sekundärer Stimulation mit K562 ; CD 56⁺ NK-Zellen (grün; n = 7); primärer Stimulus mit 1000 IE IL-2/ml (rot; n = 7); primärer Stimulus mit 1 ng IL-15/ml (gelb; n = 6); primärer Stimulus mit 1000 IE IL-2/ml + 1 ng IL-15/ml (blau; n = 6); die a) Teile stellen NK-Zellen nach Zugabe von K562-Blasten dar; die b) Teile stellen nicht mit K562 stimulierte NK-Zellen dar; **1a) + 1b)** CD 56 dim + CD 16⁺ NK-Zellen; **2a) + 2b)** CD 56 dim + CD 16⁻ NK-Zellen; **3a) + 3b)** CD 56 high + CD 16⁻ NK-Zellen; mittels MACS CD 56 angereicherte NK-Zellen; gezeigt sind Mw. und Stabw.

3.4 Änderung der zytotoxischen Aktivität CD 69 separierter NK-Zellen gegen SEM-K2 und K562 nach polyklonaler Expansion der NK-Zellen

Wie die in Kapitel 3.3 beschriebenen Ergebnisse zeigen, liegt der Anteil der CD 69⁺ NK-Zellen nach 10 stündigem primärem Stimulus mit 1 ng IL-15/ml und anschließender 6 h Inkubation mit K562-Blasten zwischen 50 % und 60 %. Dies wurde auch in einem entsprechenden Vorversuch mit SEM-K2-Blasten festgestellt. Hier war der Anteil an 69⁺ NK-Zellen 50,88 % nach 6 h Inkubation der mit IL-15 vorbehandelten NK-Zellen mit SEM-K2-Blasten (nicht dargestellt). Nach dieser Stimulationskonstellation CD 69⁺ gewordene NK-Zellen besitzen nach CD 69 Separation keine bessere zytotoxische Aktivität gegen SEM-K2-Blasten als CD 69⁻ NK-Zellen. Nach polyklonaler Expansion hingegen ist die zytotoxische Aktivität CD 69⁺ NK-Zellen gegen SEM-K2-Blasten besser als die der ursprünglich CD 69⁻ NK-Zellen.

Insgesamt wurden 11 Versuche durchgeführt, wobei 6 Versuche davon orientierende Versuche waren um eine optimale Versuchsdurchführung (2.2.4.2.2) zu etablieren. Alle drei für KIR-Rezeptoren kodierende HLA Klasse I Typen Cw3, Cw4 und Bw4 der NK-Zellen gesunder Spender stimmten entweder mit denen der SEM-K2 Zellen überein (KIR-match) oder es stimmte mindestens einer der drei nicht überein (KIR-mismatch). Da nur 2 Versuche mit KIR-match durchgeführt wurden sind diese nicht dargestellt. Wegen keiner oder von 1 ng/ml abweichender Vorbehandlung mit IL-15 sind 4 von 9 Versuchen mit KIR-mismatch nicht dargestellt.

3.4.1 Nach Kultivierung höhere zytotoxische Aktivität der ursprünglich CD 69⁺ NK-Zellen gegen SEM-K2-Blasten als ursprünglich CD 69⁻ NK-Zellen

In Abb.16 ist die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen 3 gesunder, geschlechts- und altersheterogener Spender in 4 Versuchen gegen SEM-K2-Blasten und gegen HLA Klasse I negative K562-Blasten dargestellt. Hierbei stimmt mindestens eines der drei für die KIR-Rezeptoren kodierende HLA Klasse I Gen Cw3, Cw4 oder Bw4 der Spender nicht mit dem der SEM-K2-Blasten überein (KIR-mismatch). Nach 10 h Vorstimulation mit 1 ng IL-15/ml und anschließend 6 h Inkubation mit SEM-K2-Blasten im Verhältnis 1 : 1 wurde die CD 69 Separation durchgeführt. Die CD 69⁺ bzw. CD 69⁻ Ausbeute, das heißt der prozentuale Anteil der NK-Zellen in der CD 69⁺ bzw. CD 69⁻ Fraktion an der absoluten NK-Zellzahl nach CD 69 Separation betrug 46,56 % ± 16,1 % bzw. 53,44 % ± 16,1 %.

Die zytotoxische Aktivität der CD 69⁺ NK-Zellen wird mit der der CD 69⁻ NK-Zellen verglichen. Unabhängig von der CD 69 Expression sind die SEM-K2-Blasten deutlich schlechter lysierbar als die HLA Klasse I negativen K562-Blasten (Abb.16 a),b),c),d)).

Es gibt keine signifikanten Unterschiede in der zytotoxischen Aktivität der CD 69⁺ und der CD 69⁻ NK-Zellen sowohl gegen SEM-K2-Blasten als auch gegen K562-Blasten. Nach CD 69 Separation ist im Europium-Zytotoxizitätstest nur bei dem E : T Verhältnis von 2,5 : 1 eine signifikant höhere zytotoxische Aktivität der CD 69⁺ NK-Zellen gegen SEM-K2-Blasten festzustellen. Dies ist jedoch zu vernachlässigen, da die spezifische Lyse der CD 69⁺ NK-Zellen mit 13,55 % ± 8,24 % kleiner als die Hälfte der Spontanlyse mit 32,86 % ± 6,82 % ist (Abb.16 a),b)).

Nach 2 Wochen Kultivierung der separierten NK-Zellen lysieren die ursprünglich CD 69⁺ NK-Zellen SEM-K2-Blasten besser als CD 69⁻ NK-Zellen. Bei einem E : T Verhältnis von 20 : 1 ist die spezifische Lyse der CD 69⁺ NK-Zellen mit 59,64 % ± 28,86 % signifikant höher als die der CD 69⁻ NK-Zellen mit 45,41 % ± 23,66 % (Spontanlyse: 23,68 % ± 7,74 %)(Abb.16 c)).

Dagegen sind nach 2 wöchiger Kultivierung bei der Lyse von K562-Blasten keine

signifikanten Unterschiede zwischen den CD 69⁺ und den CD 69⁻ NK-Zellen zu beobachten (Abb.16 d)).

Generell erhöht sich die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen nach 2 Wochen polyklonaler Expansion mit IL-2, IL-15, PHA, bestrahlten PBMCs und autologem Serum verglichen mit der zytotoxischen Aktivität nach CD 69 Separation. Bei einem E : T Verhältnis von 20 : 1 ist beispielsweise die spezifische Lyse der CD 69⁺ NK-Zellen gegen SEM-K2-Blasten nach CD 69 Separation 17,12 % ± 20,3 %, nach Kultivierung ist sie mit 59,64 % ± 28,86 % jedoch deutlich höher (Abb.16 a),c)). Auch gegen K562-Blasten ist bei einem E : T Verhältnis von 20 : 1 die spezifische Lyse der CD 69⁺ NK-Zellen nach Kultivierung mit 95,92 % ± 5,2 % (Spontanlyse: 22,87 % ± 3,71 %) viel höher als nach CD 69 Separation mit 65,60 % ± 37,41 % (Spontanlyse: 17,07 % ± 2,6) (Abb.16 b),d)).

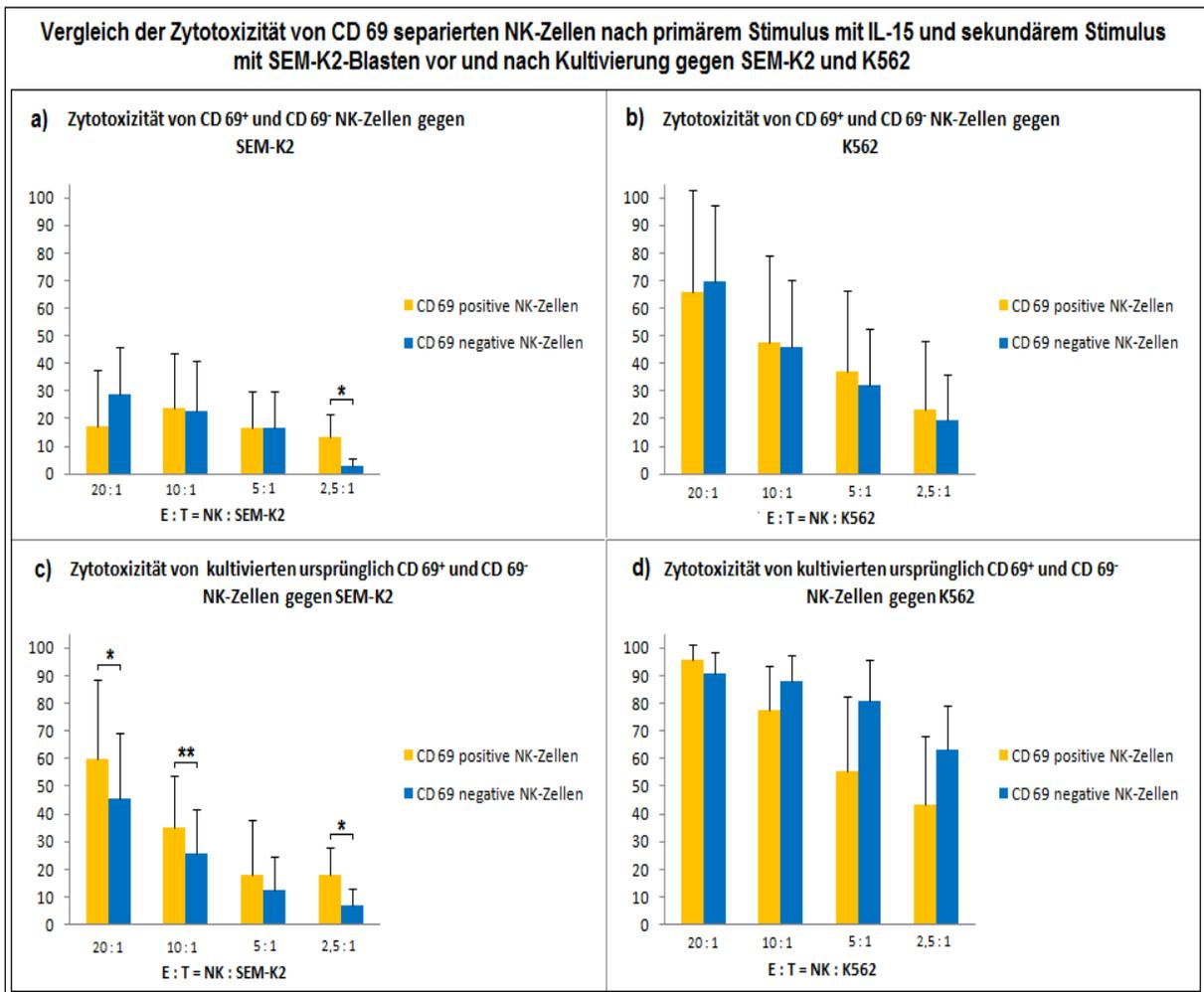


Abb. 16: Messung der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen 3 gesunder Spender gegen SEM-K2-Blasten und gegen K562-Blasten mittels 2h-Europium-Zytotoxizitäts-Assay: **a)** Zytotoxizität CD 69 depletierter bzw. CD 69 angereicherter CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen gegenüber SEM-K2-Blasten nach 6 h Inkubation der CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen mit SEM-K2-Blasten im Verhältnis 1 : 1; Stimulation der CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen 10 h vor Inkubation mit SEM-K2-Blasten mit 1 ng IL-15/ml; n = 4; KIR-mismatch; **b)** Zytotoxizität CD 69 depletierter bzw. CD 69 angereicherter CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen gegenüber K562-Blasten nach 6 h Inkubation der CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen mit SEM-K2-Blasten im Verhältnis 1 : 1; Stimulation der CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen 10 h vor Inkubation mit SEM-K2-Blasten (KIR-mismatch) mit 1 ng IL-15/ml; n = 4; **c)** Zytotoxizität nach 2-wöchiger Kultivierung der CD 69⁺ bzw. CD 69⁻ CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen gegenüber SEM-K2-Blasten; KIR-mismatch; n = 5; **d)** Zytotoxizität nach 2-wöchiger Kultivierung der CD 69⁺ bzw. CD 69⁻ CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen gegenüber K562; n = 4; gezeigt sind Mw., Stabw. und gepaarter, einseitiger student t-Test: *p < 0,05; **p < 0,01, verglichen wird jeweils die zytotoxische Aktivität CD 69⁺ NK-Zellen mit der CD 69⁻ NK-Zellen.

3.5 Höhere Lyse kindlicher ALL-Blasten durch CD 69⁺ als durch CD 69⁻ NK-Zellen und Angleichung der zytotoxischen Aktivität der NK-Zell-Gruppen nach Kultivierung

Analog zu den in Kap. 3.4 dargestellten Versuchen mit SEM-K2-Blasten wurden Versuche mit ALL-Blasten kindlicher Patienten durchgeführt. Nach Vorbehandlung mit IL-15 und anschließender Inkubation mit ALL-Blasten CD 69⁺ gewordene NK-Zellen gesunder, männlicher Spender besitzen nach CD 69 Separation eine bessere zytotoxische Aktivität gegen dieselben ALL-Blasten als die CD 69⁻ NK-Zellen. Gegen K562-Blasten ist die zytotoxische Aktivität CD 69⁺ NK-Zellen jedoch deutlich geringer als die der CD 69⁻ NK-Zellen.

Nach polyklonaler Expansion unterscheidet sich die zytotoxische Aktivität CD 69⁺ NK-Zellen sowohl gegen ALL-Blasten als auch gegen K562-Blasten unwesentlich von der der CD 69⁻ NK-Zellen.

3.5.1 Nach CD 69 Separation ist die Zytotoxische Aktivität CD 69⁺ NK-Zellen gegen ALL-Blasten höher als gegen K562-Blasten

In Abb.17 ist die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen 2 gesunder, männlicher Spender zwischen 27 und 35 Jahren in 8, 7 bzw. 6 Versuchen gegen ALL-Blasten 3 kindlicher Patienten und gegen HLA Klasse I negative K562-Blasten dargestellt. Hierbei stimmt mindestens eines der drei für die KIR-Rezeptoren kodierende HLA Klasse I Gen Cw3, Cw4 oder Bw4 der Spender nicht mit dem der ALL-Blasten überein (KIR-mismatch). Nach 10 h Vorstimulation mit 1 ng IL-15/ml und anschließend 6 h Inkubation mit ALL-Blasten im Verhältnis NK : ALL = 7 ± 5 : 1 wurde die CD 69 Separation durchgeführt. Das Inkubationsverhältnis NK : ALL unterlag Schwankungen zwischen 1,25 : 1 und 15 : 1, da die Anzahl der zur Verfügung stehenden ALL-Blasten begrenzt war. Die CD 69⁺ bzw. CD 69⁻ Ausbeute, das heißt der prozentuale Anteil der NK-Zellen in der CD 69⁺ bzw. CD 69⁻

Fraktion an der absoluten NK-Zellzahl nach CD 69 Separation betrug $8,64 \% \pm 3,04 \%$ bzw. $91,36 \% \pm 3,04 \%$. Ca. 36 h nach Beginn des IL-15 Stimulus lag der Anteil CD 69⁺ NK-Zellen der alleinig mit IL-15 behandelten NK-Zellen bei $1,89 \% \pm 1,2 \%$.

Die zytotoxische Aktivität der separierten CD 69⁺ NK-Zellen wird mit der der CD 69⁻ NK-Zellen verglichen. Außerdem ist die zytotoxische Aktivität der mit 1 ng IL-15/ml aktivierten, noch nicht mit ALL-Blasten in Kontakt gekommenen NK-Zellen insgesamt gegen ALL-Blasten und K562-Blasten dargestellt (Abb.17 a),b),c),d)).

Nach CD 69 Separation lysieren die CD 69⁺ NK-Zellen in 7 unabhängigen Versuchen dieselben ALL-Blasten mit denen sie zuvor Kontakt hatten besser als die CD 69⁻ NK-Zellen. Die spezifische Lyse der CD69⁺ NK-Zellen ist bei einem E : T Verhältnis von 10 : 1 mit $37,94 \% \pm 30,61 \%$ signifikant höher ($p < 0,05$) als die der CD 69⁻ NK-Zellen mit $24,03 \% \pm 19,83 \%$ (Spontanlyse: $18,9 \% \pm 6,89 \%$). Außerdem ist die spezifische Lyse der CD 69⁺ NK-Zellen bei demselben NK : ALL Verhältnis in 5 unabhängigen Versuchen sogar hoch signifikant ($p < 0,01$) besser als die Lyse der ausschließlich mit IL-15 aktivierten NK-Zellen von $20,15 \% \pm 16,35 \%$ (Abb.17 a)).

Gegen K562-Blasten hingegen ist die zytotoxische Aktivität der CD 69⁺ NK-Zellen nach CD 69 Separation in 8 unabhängigen Versuchen deutlich geringer als die der CD 69⁻ NK-Zellen. Die spezifische Lyse der CD 69⁺ NK-Zellen ist bei einem E : T Verhältnis von 10 : 1 mit $13,14 \% \pm 8,61 \%$ höchst signifikant geringer ($p < 0,00001$) als die der CD 69⁻ NK-Zellen mit $80,37 \% \pm 14,13 \%$ (Spontanlyse: $20,48 \% \pm 5,83 \%$). Außerdem ist die spezifische Lyse der CD 69⁺ NK-Zellen bei demselben NK : K562 Verhältnis in 6 unabhängigen Versuchen ebenfalls höchst signifikant ($p < 0,0001$) schlechter als die Lyse der ausschließlich mit IL-15 aktivierten NK-Zellen von $78,81 \% \pm 13,58 \%$ (Abb.17 b)). Insgesamt ist die zytotoxische Aktivität der CD 69⁻ NK-Zellen nach CD 69 Separation sowohl gegen ALL-Blasten als auch gegen K562-Blasten der der ausschließlich mit IL-15 aktivierten NK-Zellen sehr ähnlich. Die zytotoxische Aktivität CD 69⁺ NK-Zellen

gegen ALL-Blasten ist bei einem E : T Verhältnis von 10 : 1 mit 37,94 % ± 30,61 % signifikant höher als gegen K562-Blasten (13,14 % ± 8,61 %; Wilcoxon Rangsummentest) (Abb.17 a),b)).

Nach 2 wöchiger Kultivierung der CD 69 separierten und der ursprünglich ausschließlich mit IL-15 aktivierten NK-Zellen sind keine signifikanten Unterschiede in der zytotoxischen Aktivität der einzelnen NK-Zell-Gruppen gegen ALL-Blasten und gegen K562 festzustellen. Insgesamt lysieren alle drei NK-Zell-Gruppen nach 2 Wochen polyklonaler Expansion mit IL-2, IL-15, PHA, bestrahlten PBMC und autologem Serum die ALL-Blasten deutlich schlechter als die K562-Blasten (Abb.17 c),d)).

Die zytotoxische Aktivität der CD 69⁺ NK-Zellen gegen ALL-Blasten ist nach Kultivierung geringer als nach CD 69 Separation. Bei einem NK : ALL Verhältnis von 10 : 1 ist die spezifische Lyse der CD 69⁺ NK-Zellen nach Kultur mit 11,21 % ± 12,71 % (Spontanlyse: 13,34 % ± 10,56 %) signifikant geringer als die Lyse nach CD 69 Separation von 37,94 % ± 30,61 % (einseitiger, gepaarter T-Test; Abb.17 a),c)).

Allerdings ist die zytotoxische Aktivität der CD 69⁺ NK-Zellen gegen K562-Blasten nach Kultivierung höher als nach CD 69 Separation. Bei einem NK : K562 Verhältnis von 10 : 1 ist die spezifische Lyse der CD 69⁺ NK-Zellen nach Kultur mit 61,42 % ± 44,88 % (Spontanlyse: 19,01 % ± 5,84 %) signifikant höher als die Lyse nach CD 69 Separation von 13,14 % ± 8,61 % (einseitiger, gepaarter T-Test; Abb.17 b),d)).

Zytotoxizität von CD 69 separierten NK-Zellen nach primärem Stimulus mit IL-15 und sekundärem Stimulus mit ALL-Blasten verschiedener Patienten und nur mit IL-15 stimulierten NK-Zellen vor und nach Kultivierung gegen die jeweiligen ALL-Blasten und K562

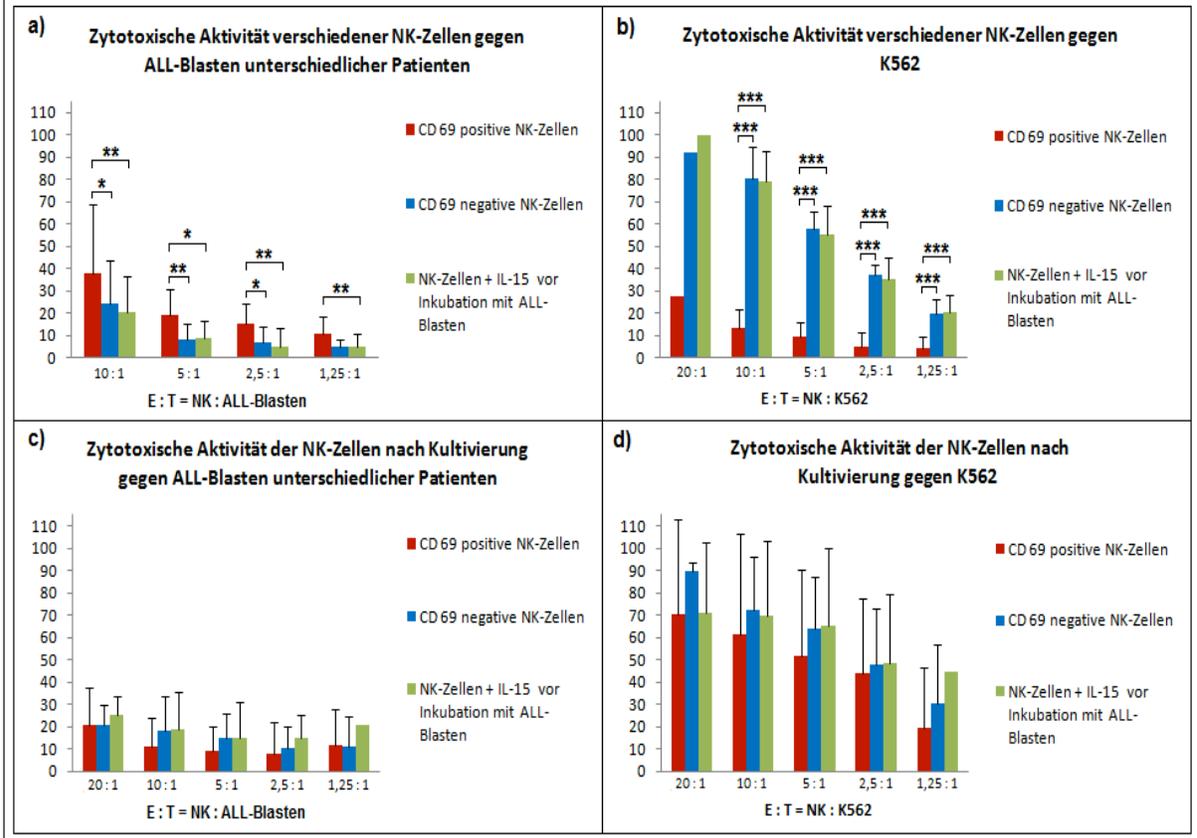


Abb. 17: Messung der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen 2 gesunder Spender gegen ALL-Blasten 3 unterschiedlicher kindlicher Patienten und gegen K562-Blasten mittels 2h-Europium-Zytotoxizitäts-Assay: **a)** Zytotoxizität CD 69 depletierter bzw. CD 69 angereicherter CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen gegenüber ALL-Blasten nach 6 h Inkubation der CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen mit ALL-Blasten (mit 30Gy bestrahlt) im Verhältnis 7 ± 4,55 : 1 und Zytotoxizität CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen nach Stimulation mit 1 ng IL-15/ml; Stimulation der CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen 10 h vor Inkubation mit ALL-Blasten mit 1 ng IL-15/ml; KIR-mismatch **b)** Zytotoxizität CD 69 depletierter bzw. CD 69 angereicherter CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen gegenüber K562-Blasten nach 6 h Inkubation der CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen mit ALL-Blasten im Verhältnis E : T = 7 ± 4,55 : 1 und Zytotoxizität CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen nach Stimulation mit 1 ng IL-15/ml; Vorbehandlung der CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen mit 1 ng IL-15/ml 10 h vor Inkubation mit ALL-Blasten (KIR-mismatch) **c)** Zytotoxizität nach 2-wöchiger Kultivierung der CD 69⁺ bzw. CD 69⁻ CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen gegenüber jeweils denselben ALL-Blasten wie in a) und Zytotoxizität nach Kultivierung der mit 1 ng IL-15/ml stimulierten CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen gegenüber jeweils denselben ALL-Blasten wie in a); KIR-mismatch **d)** Zytotoxizität nach 2-wöchiger Kultivierung der CD 69⁺ bzw. CD 69⁻ CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen gegenüber K562 und Zytotoxizität nach Kultivierung der mit 1 ng IL-15/ml stimulierten CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen gegenüber K562; gezeigt sind Mw., Stabw. und gepaarter, einseitiger student t-Test: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001, verglichen wird jeweils die zytotoxische Aktivität CD 69⁺ NK-Zellen mit der CD 69⁻ NK-Zellen bzw. CD 69⁺ NK-Zellen mit der nur mit IL-15 stimulierten NK-Zellen, die nicht separiert wurden.

3.5.2 CD 69 Expression auf ALL-Blasten der kindlichen Patienten

Zwei Versuche konnten nicht gewertet werden, da nach CD 69 Separation die CD 69⁺ Fraktion mit 63 % bzw. 80 % CD 69⁺ ALL-Blasten einer kindlichen Patientin und mit 7 % bzw. 10 % zu wenig NK-Zellen enthielt. Bei dieser Patientin waren 38 % der c-ALL-Blasten CD 69⁺ (nicht dargestellt). 2 Jahre nach der Erstbehandlung trat bei ihr ein Rezidiv auf.

Bei der durchflußzytometrischen Untersuchung der in dieser Arbeit verwendeten ALL-Blasten viel auf, dass alle drei kindlichen Patienten auf ihren Blasten in mehr oder weniger hohem Maße CD 69 exprimieren (nicht dargestellt). Bei einer 11-jährigen weiblichen Patientin, die ein c-ALL Rezidiv erlitt, waren 35 % der Blasten CD 69⁺. 33 % bzw. 64 % NK-Zellen in der CD 69⁺ Fraktion nach CD 69 Separation reichten jedoch für die Versuche im Anschluss aus.

Die Blasten eines 9-jährigen Jungen mit Erstdiagnose einer c-ALL waren zu 12 % CD 69⁺. Die Blasten eines 9-jährigen Jungen mit Erstdiagnose einer prä- oder pro-B-ALL wurden wegen der begrenzten Anzahl der zur Verfügung stehenden Blasten nicht durchflußzytometrisch untersucht. Hier lag jedoch in 2 Versuchen der Anteil der CD 19⁺ ALL-Blasten in der CD 69⁺ Fraktion nach CD 69 Separation bei 40 % bzw. 30 %. Insgesamt ist der Anteil der ALL-Blasten in der CD 69⁺ Fraktion von dem Anteil CD 69⁺-Blasten und dem Inkubationsverhältnis NK : ALL abhängig. Je größer die Zahl der ALL-Blasten im Inkubationsverhältnis und je mehr ALL-Blasten CD 69⁺ sind desto höher ist der Blasten-Anteil in der CD 69⁺ Fraktion nach Separation.

3.6 Erhöhung der CD 56 Expression nach Kultivierung von NK-Zellen

Nach polyklonaler Expansion der CD 69 separierten NK-Zellen erhöht sich die CD 56 Expression auf der Oberfläche der NK-Zellen deutlich. Dies trifft sowohl bei den nach Inkubation mit SEM-K2-Blasten separierten CD 69⁺ und CD 69⁻ NK-Zellen als auch bei den nach Inkubation mit ALL-Blasten kindlicher Patienten CD 69 separierten NK-Zellen zu. Vor Kultivierung ausschließlich mit IL-15 aktivierte NK-Zellen exprimieren nach polyklonaler Expansion ebenfalls vermehrt CD 56.

3.6.1 Die CD 56 Expression CD 69 separierter NK-Zellen nach Aktivierung mit IL-15 und SEM-K2-Blasten erhöht sich nach Kultivierung

CD 56⁺/CD 3⁻ NK-Zellen wurden aus peripherem Blut einer gesunden Spenderin gewonnen, 10 h mit 1 ng IL-15/ml vorbehandelt, 6 h mit SEM-K2-Blasten im Verhältnis 1 : 1 inkubiert und anschließend CD 69 separiert. Ein Teil der CD 69⁺ und der CD 69⁻ NK-Zellen wurde 2 Wochen kultiviert. Beim Vergleich der CD 56 Expression zwischen den CD 69⁺ und den CD 69⁻ NK-Zellen jeweils vor als auch nach Kultivierung fällt nur eine geringfügig niedrigere CD 56 Expression der CD 69⁺ NK-Zellen auf.

Eine deutlich höhere CD 56 Expression ist nach Kultivierung der CD 69⁺ bzw. CD 69⁻ NK-Zellen verglichen mit der CD 56 Expression der CD 69⁺ bzw. CD 69⁻ NK-Zellen nach Separation festzustellen.

Die durchflußzytometrisch bestimmte Fluoreszenzintensität mit CD 56 APC Antikörpern markierter CD 69⁺ NK-Zellen (Geo Mean = 33,74) ist verglichen mit der CD 69⁻ NK-Zellen (Geo Mean = 40,36) in Abb.18 a) geringfügig kleiner. Nach 2 Wochen Kultivierung der NK-Zellen ist die CD 56 APC Fluoreszenzintensität der CD 69⁺ NK-Zellen (Geo Mean = 93,98) in Abb.18 b) ebenfalls nur minimal kleiner

als die der ursprünglich CD 69⁻ NK-Zellen (Geo Mean = 100,4).

Nach polyklonaler Expansion erhöht sich der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität von mit CD 56 APC Antikörpern markierten CD 69⁺ NK-Zellen in Abb.18 c) deutlich von 33,74 auf 93,98. Bei den CD 69⁻ NK-Zellen nimmt der geometrische Mittelwert nach Kultivierung in Abb.18 d) von 40,36 auf 100,4 zu.

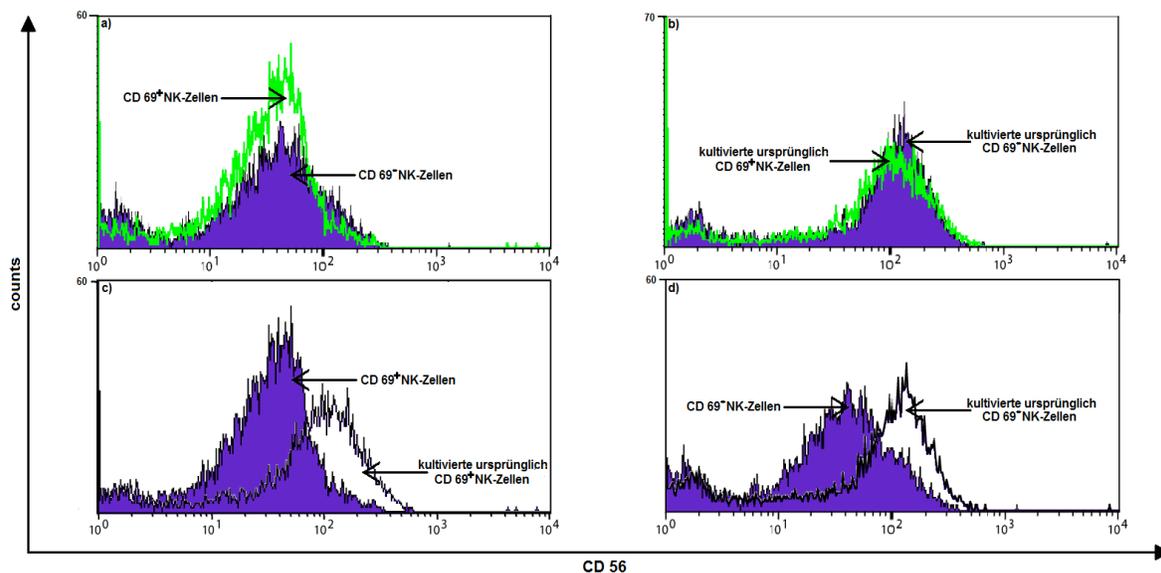


Abb.18: Beispielhafte durchflußzytometrische Darstellung der CD 56 Expression CD 69⁺ und CD 69⁻ NK-Zellen vor und nach Kultivierung: **a)** Histogramm overlay CD 69⁺ (grün) und CD 69⁻ NK-Zellen (blau) nach CD 69 Depletion bzw. Anreicherung nach 6 h Inkubation der CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen mit SEM-K2-Blasten (KIR-mismatch) im Verhältnis 1 : 1; Stimulation der CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen 10 h vor Inkubation mit SEM-K2-Blasten mit 1 ng IL-15/ml **b)** Histogramm overlay der 2-Wochen kultivierten CD 69⁺ (grün) und CD 69⁻ NK-Zellen (blau) **c)** Histogramm overlay CD 69⁺ NK-Zellen (blau) nach CD 69 Anreicherung nach 6 h Inkubation der CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen mit SEM-K2-Blasten im Verhältnis 1 : 1; Stimulation der CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen 10 h vor Inkubation mit SEM-K2-Blasten mit 1 ng IL-15/ml; 2-Wochen kultivierte CD 69⁺ NK-Zellen (weiß) **d)** Histogramm overlay CD 69⁻ NK-Zellen (blau) nach CD 69 Depletion nach 6 h Inkubation der CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen mit SEM-K2-Blasten im Verhältnis 1 : 1; Stimulation der CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen 10 h vor Inkubation mit SEM-K2-Blasten mit 1 ng IL-15/ml; 2-Wochen kultivierte CD 69⁻ NK-Zellen (weiß); Isolierung CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen einer gesunden Spenderin mittels MACS (NK Cell Isolation Kit).

In Abb.19 sind die Mittelwerte der CD 56 Expression CD 69⁺ und CD 69⁻ NK-Zellen aus 4 Versuchen mit SEM-K2-Blasten (KIR-mismatch) vor und nach Kultivierung dargestellt. Vor polyklonaler Expansion ist die CD 56 Expression der CD 69⁺ NK-Zellen (Geo Mean = 23,81 ± 7,61) zwar geringfügig, jedoch signifikant ($p < 0,05$) kleiner als die der CD 69⁻ NK-Zellen (Geo Mean = 29,37 ± 8,25). Nach polyklonaler Expansion gibt es keinen signifikanten Unterschied in der CD 56 Expression zwischen den CD 69⁺ NK-Zellen (Geo Mean = 88,64 ± 21,65) und den CD 69⁻ NK-Zellen (Geo Mean = 86,47 ± 45,08).

Die CD 56 Expression der CD 69⁺ NK-Zellen ist nach 2 Wochen Kultivierung (Geo Mean = 88,64 ± 21,65) hoch signifikant ($p < 0,01$, gepaarter T-test) stärker als nach CD 69 Separation (Geo Mean = 23,81 ± 7,61). Dies trifft nicht für die CD 69⁻ NK-Zellen zu. Ein Versuch, indem insgesamt nach Kultivierung wenig NK-Zellen vorlagen, war ein Ausreißer. Trotzdem ist die Fluoreszenzintensität von an CD 56 gebundenen APC Antikörpern der CD 69⁻ NK-Zellen mit einem geometrischen Mittelwert von 86,47 ± 45,08 nach 2 Wochen polyklonaler Expansion deutlich stärker als nach CD 69 Separation (Geo Mean = 29,37 ± 8,25).

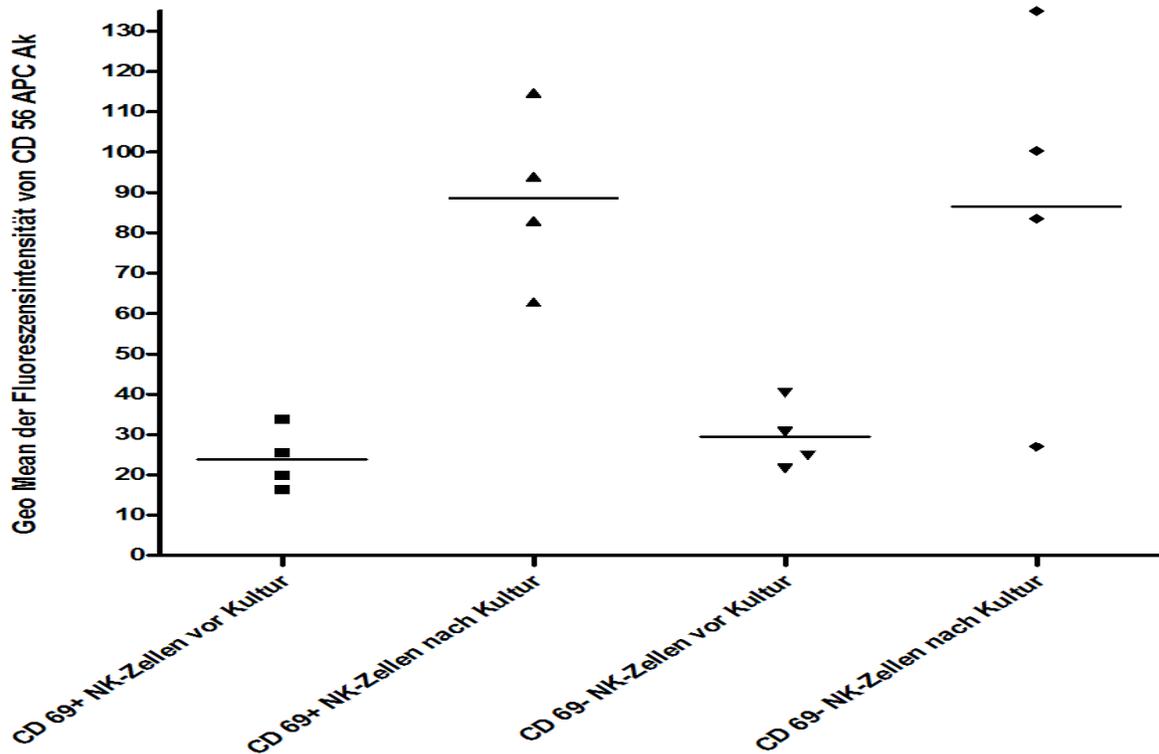


Abb. 19: Durchflußzytometrische Bestimmung der Fluoreszenzintensität von CD 56 APC Antikörpern auf CD 69⁺ und CD 69⁻ CD 56⁺, CD 3⁻ NK-Zellen vor und nach Kultivierung. Die Versuche wurden mit humanen NK-Zellen 2 gesunder weiblicher und 2 gesunder männlicher Spender durchgeführt. Unmarkierte CD 56⁺, CD 3⁻ NK-Zellen wurden mittels MACS (NK-Cell-Isolation-Kit) gewonnen, zunächst 10 h primärer Stimulus mit 1 ng/ml IL-15, dann 6 h sekundärer Stimulus mit SEM-K2 Blasten (KIR-mismatch) und anschließend CD 69 Anreicherung bzw. Depletion; n = 4; die Mittelwerte sind als Balken dargestellt.

3.6.2 Die CD 56 Expression CD 69 separierter NK-Zellen nach Aktivierung mit IL-15 und ALL-Blasten kindlicher Spender erhöht sich nach Kultivierung

Analog zu den Versuchen mit SEM-K2-Blasten wurden CD 56⁺/CD 3⁻ NK-Zellen aus peripherem Blut eines gesunden Spenders gewonnen, 10 h mit 1 ng IL-15/ml vorbehandelt, 6 h mit c-ALL-Blasten eines kindlichen Patienten im Verhältnis 2,5 : 1 inkubiert und anschließend CD 69 separiert. Ein Teil der CD 69⁺ und der CD 69⁻ NK-Zellen wurde 2 Wochen kultiviert. Ausschließlich mit IL-15 aktivierte NK-Zellen

wurden ebenfalls kultiviert. Beim Vergleich der CD 56 Expression CD 69⁺ und CD 69⁻ NK-Zellen jeweils vor als auch nach Kultivierung fällt wie in Kap. 3.6.1 beschrieben auch eine geringfügig niedrigere CD 56 Expression der CD 69⁺ NK-Zellen auf. Die CD 56 Expression der CD 69⁺ NK-Zellen ist nach CD 69 Separation geringer als die der mit IL-15 aktivierten NK-Zellen, nach polyklonaler Expansion hingegen ist kein Unterschied zu erkennen.

Eine deutlich höhere CD 56 Expression ist nach Kultivierung CD 69⁺ bzw. CD 69⁻ NK-Zellen verglichen mit der CD 56 Expression CD 69⁺ bzw. CD 69⁻ NK-Zellen nach Separation festzustellen. Dies trifft ebenfalls für die ursprünglich nur mit IL-15 aktivierten NK-Zellen zu.

Die durchflußzytometrisch bestimmte Fluoreszenzintensität mit CD 56 APC Antikörpern markierter CD 69⁺ NK-Zellen (Geo Mean = 6,71) ist verglichen mit der CD 69⁻ NK-Zellen (Geo Mean = 6,86) geringfügig kleiner. Auch beim Vergleich der CD 56 APC Fluoreszenzintensität der CD 69⁺ NK-Zellen mit den ausschließlich mit IL-15 aktivierten NK-Zellen (Geo Mean = 8,5) trifft dies zu (Abb.20 a)).

Nach 2 Wochen Kultivierung ist die CD 56 APC Fluoreszenzintensität CD 69⁺ NK-Zellen (Geo Mean = 38,64) kleiner als die ursprünglich CD 69⁻ NK-Zellen (Geo Mean = 45,44). Das trifft für den Vergleich CD 69⁺ NK-Zellen mit ursprünglich nur mit IL-15 inkubierten NK-Zellen (Geo Mean = 35,59) nicht zu (Abb.20 b)).

Nach polyklonaler Expansion erhöht sich der geometrische Mw der Fluoreszenzintensität von mit CD 56 APC Antikörpern markierten CD 69⁺ NK-Zellen von 6,71 auf 38,64 (Abb.20 c)). Der geometrische Mw der Fluoreszenzintensität von CD 56 APC Antikörpern auf CD 69⁻ NK-Zellen nimmt nach Kultivierung von 6,86 auf 45,44 zu (Abb.20 d)). Ebenfalls steigt die CD 56 Expression der alleinig mit IL-15 aktivierten NK-Zellen (Geo Mean = 8,5) nach polyklonaler (Geo Mean = 35,59) Expansion an (Abb.20 e)).

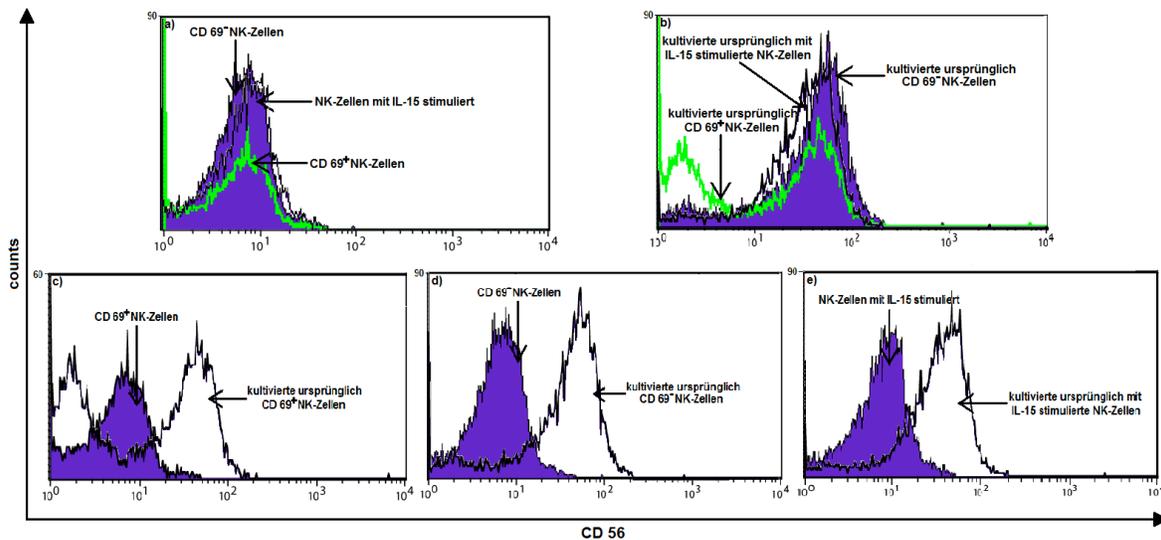


Abb. 20: Beispielhafte durchflußzytometrische Darstellung der CD 56 Expression CD 69⁺, CD 69⁻ und mit IL-15 stimulierter NK-Zellen vor und nach Kultivierung: **a)** Histogramm overlay CD 69⁺ (grün) und CD 69⁻ NK-Zellen (blau) nach CD 69 Depletion bzw. Anreicherung nach 6 h Inkubation der CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen mit ALL-Blasten im Verhältnis 2,5 : 1; Stimulation der CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen 10 h vor Inkubation mit ALL-Blasten mit 1 ng IL-15/ml; mit 1 ng IL-15/ml stimulierte NK-Zellen (weiß) **b)** Histogramm overlay der 2-Wochen kultivierten CD 69⁺ (grün), CD 69⁻ und ursprünglich mit 1 ng IL-15/ml stimulierten NK-Zellen (blau) **c)** Histogramm overlay CD 69⁺ NK-Zellen (blau) nach CD 69 Anreicherung nach 6 h Inkubation der CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen mit ALL-Blasten im Verhältnis 2,5 : 1; Stimulation der CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen 10 h vor Inkubation mit ALL-Blasten mit 1 ng IL-15/ml; 2-Wochen kultivierte CD 69⁺ CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen (weiß) **d)** Histogramm overlay CD 69⁻ NK-Zellen (blau) nach CD 69 Depletion nach 6 h Inkubation der CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen mit ALL-Blasten im Verhältnis 2,5 : 1; Stimulation der CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen 10 h vor Inkubation mit SEM-K2-Blasten mit 1 ng IL-15/ml; 2-Wochen kultivierte CD 69⁻ CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen (weiß) **e)** Histogramm overlay der mit 1 ng IL-15/ml stimulierten NK-Zellen vor (blau) und nach (weiß) 2-wöchiger Kultivierung; Isolierung CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen eines gesunden Spenders mittels MACS (NK Cell Isolation Kit).

Abb.21 gibt einen zusammenfassenden Überblick über die CD 56 Expression CD 69⁺, CD 69⁻ und alleinig mit 1 ng IL-15/ml aktivierter NK-Zellen vor und nach polyklonaler Expansion. Dargestellt sind die Daten aus insgesamt 8 Versuchen mit ALL-Blasten 3 kindlicher Patienten und NK-Zellen 2 gesunder Spender.

Die CD 56 Expression CD 69⁺ NK-Zellen (Geo Mean = 7,42 ± 1,3) nach CD 69

Separation ist in 8 Versuchen geringfügig, aber signifikant ($p < 0,05$) niedriger als die CD 69⁻ NK-Zellen (Geo Mean = $9,05 \pm 2,24$). In 5 Versuchen ist die CD 56 Expression der CD 69⁺ NK-Zellen (Geo Mean = $6,79 \pm 0,68$) verglichen mit der ausschließlich mit IL-15 aktivierten NK-Zellen (Geo Mean = $8,65 \pm 1,61$) ebenfalls minimal, aber signifikant ($p < 0,05$) geringer.

Nach Kultivierung ist die CD 56 Expression CD 69⁺ NK-Zellen (Geo Mean = $33,58 \pm 7,98$) gegenüber CD 69⁻ NK-Zellen (Geo Mean = $47,71 \pm 9,56$) in 6 Versuchen signifikant ($p < 0,05$) vermindert. Nach polyklonaler Expansion ist die CD 56 Expression CD 69⁺ NK-Zellen (Geo Mean = $31,22 \pm 11,32$) gegenüber ursprünglich alleinig mit IL-15 behandelten NK-Zellen (Geo Mean = $35,12 \pm 7,69$) in 3 Versuchen nicht signifikant niedriger.

Eine höchst signifikante ($p < 0,0004$) Erhöhung ist bei der Gegenüberstellung der CD 56 Expression CD 69⁺ NK-Zellen nach CD 69 Separation (Geo Mean = $7,42 \pm 1,52$) und nach Kultivierung (Geo Mean = $33,58 \pm 7,98$) in 6 Versuchen festzustellen. Dies trifft mit einem $p < 0,00006$ auch für den Vergleich der CD 56 Expression ursprünglich CD 69⁻ NK-Zellen vor (Geo Mean = $9,26 \pm 2,57$) und nach polyklonaler Expansion (Geo Mean = $47,71 \pm 9,56$) in 6 Versuchen zu. Nach Kultivierung nimmt der geometrische Mw der Fluoreszenzintensität von mit CD 56 APC Antikörpern markierten, ursprünglich alleinig mit IL-15 aktivierten NK-Zellen in 3 Versuchen signifikant ($p < 0,05$) von $7,61 \pm 0,77$ auf $35,12 \pm 7,69$ zu.

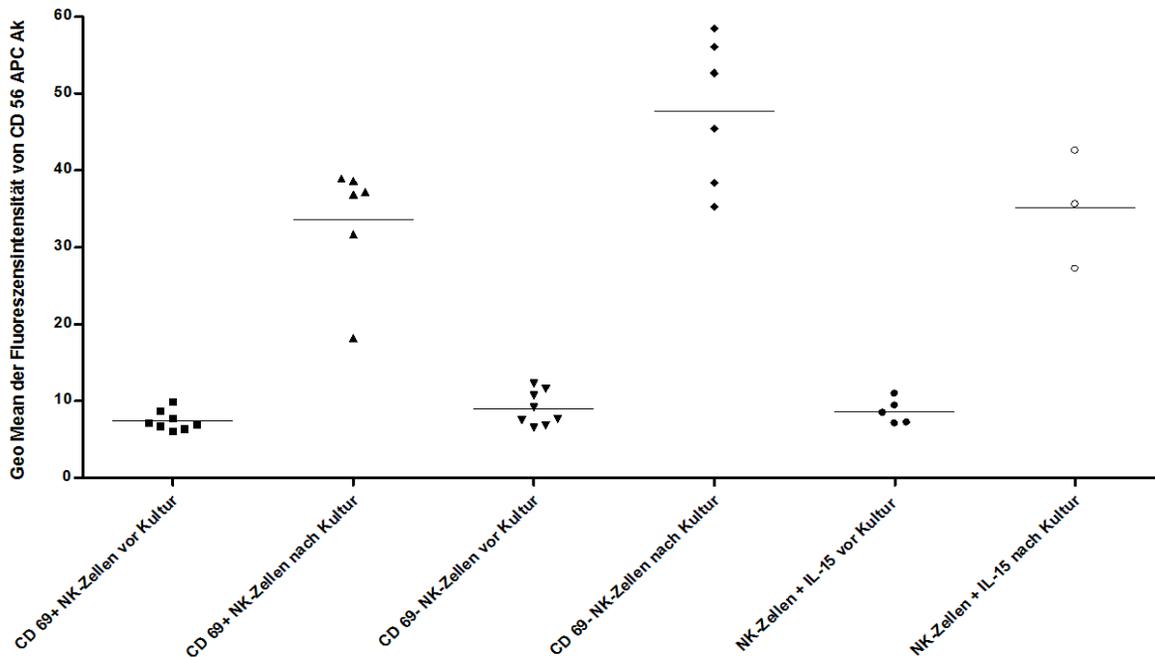


Abb. 21: Durchflußzytometrische Bestimmung der Fluoreszenzintensität von CD 56 auf CD 69⁺, CD 69⁻ und nur primär mit 1 ng/ml IL-15 stimulierten CD 56⁺, CD 3⁻ NK-Zellen vor und nach Kultivierung. Die Versuche wurden mit humanen NK-Zellen 2 gesunder männlicher Spender durchgeführt. Unmarkierte CD 56⁺, CD 3⁻ NK-Zellen wurden mittels MACS (NK-Cell-Isolation-Kit) gewonnen, zunächst 10 h primärer Stimulus mit 1 ng/ml IL-15, dann 6 h sekundärer Stimulus mit ALL-Blasten (3 kindlicher Patienten) und anschließend CD 69 Anreicherung bzw. Depletion; CD 69⁺ und CD 69⁻ CD 56⁺, CD 3⁻ NK-Zellen vor Kultur n = 8; CD 69⁺ und CD 69⁻ CD 56⁺, CD 3⁻ NK-Zellen nach Kultur n = 6; CD 56⁺, CD 3⁻ NK-Zellen + IL-15 vor Kultur n = 5; CD 56⁺, CD 3⁻ NK-Zellen + IL-15 nach Kultur n = 3; die Mittelwerte sind als Balken dargestellt.

3.7 Der Anteil CD 69⁺ NK-Zellen ist nach Kultivierung von NK Zellen hoch

Nach 2 wöchiger Kultivierung mit 0,5 µg/ml PHA, 1000 IE IL-2/ml, 1 ng IL-15/ml und $0,5 \times 10^6$ PBMCs/ml (mit 30 Gy bestrahlt) ist der Anteil CD 69⁺ NK-Zellen unabhängig davon, ob die NK-Zellen nach CD 69 Separation CD 69⁺ oder CD 69⁻ waren hoch. Dies trifft sowohl für die Versuche mit SEM-K2-Blasten als auch für die mit ALL-Blasten kindlicher Patienten durchgeführten Versuche zu. Auch ausschließlich mit IL-15 aktivierte NK-Zellen weisen nach polyklonaler Expansion einen deutlich größeren Anteil CD 69⁺ NK-Zellen auf.

3.7.1 Der Anteil CD 69⁺ NK-Zellen der CD 69 separierter NK-Zellen nach Aktivierung mit IL-15 und SEM-K2-Blasten ist nach Kultivierung hoch

In Abb.22 sind die Anteile CD 69⁺ NK-Zellen der CD 69 separierten NK-Zellen aus 5 Versuchen vor und nach Kultivierung dargestellt. Die NK-Zellen 4 verschiedener gesunder, alters- und geschlechtsheterogener Spender wurden 10 h mit 1 ng IL-15/ml vorbehandelt, 6 h mit SEM-K2-Blasten im Verhältnis 1 : 1 inkubiert und anschließend mittels mehrerer MACS Schritte CD 69 separiert. Die KIR-Rezeptoren der NK-Zellen stimmten nicht mit denen der SEM-K2-Blasten überein. In 2 Versuchen stammten die NK-Zellen von derselben Spenderin. Da die Kultivierung der NK-Zellen in einem Versuch nicht funktionierte konnten nur die durchflußzytometrischen Daten nach CD 69 Separation verwendet werden. In einem weiteren Versuch wurde die durchflußzytometrische Messung nur nach polyklonaler Expansion durchgeführt.

Der Anteil CD 69⁺ NK-Zellen der CD 69⁺ NK-Zell-Fraktion nach Separation ist mit 99,25 % ± 1,07 % ähnlich hoch wie nach polyklonaler Expansion (93,27 % ± 4,57 %). Nach Kultivierung der ursprünglich CD 69⁻ NK-Zellen erhöht sich der Anteil CD 69⁺ NK-Zellen hoch signifikant ($p < 0,005$) von 64,99 % ± 6,55 % auf 93,35 % ± 5,5 %.

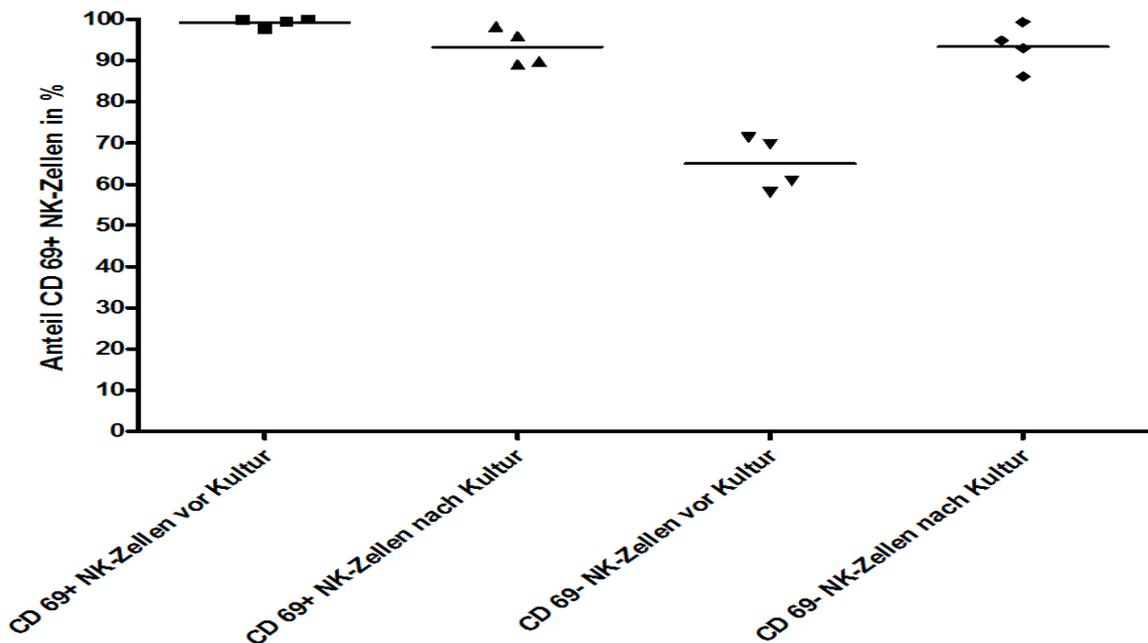


Abb. 22: Durchflußzytometrische Bestimmung des tatsächlichen Anteils CD 69⁺ NK-Zellen der einzelnen CD 56⁺, CD 3⁻ NK-Zell-Fraktionen nach CD 69 MACS-Separation und nach 2 wöchiger Kultivierung. Die Versuche wurden mit humanen NK-Zellen 2 gesunder weiblicher und 2 gesunder männlicher Spender durchgeführt. Unmarkierte CD 56⁺, CD 3⁻ NK-Zellen wurden mittels MACS (NK-Cell-Isolation-Kit) gewonnen, zunächst 10 h primärer Stimulus mit 1 ng/ml IL-15, dann 6 h sekundärer Stimulus mit SEM-K2 Blasten (KIR-mismatch) und anschließend CD 69 Anreicherung bzw. Depletion; n = 5 (in 2 Versuchen lag jeweils nur eine Messung vor bzw. nach Kultivierung vor); die Mittelwerte sind als Balken dargestellt.

3.7.2 Der Anteil CD 69⁺ NK-Zellen CD 69 separierter NK-Zellen nach Aktivierung mit IL-15 und ALL-Blasten erhöht sich nach Kultivierung

In Abb.23 sind die Anteile CD 69⁺ NK-Zellen der CD 69 separierten NK-Zellen aus insgesamt 8 Versuchen vor und nach Kultivierung dargestellt. Außerdem wird der Anteil CD 69⁺ NK-Zellen von ausschließlich mit 1 ng IL-15/ml behandelten NK-Zellen dem Anteil CD 69⁺ NK-Zellen nach polyklonaler Expansion gegenübergestellt. Aus peripherem Blut gewonnene NK-Zellen 2 gesunder, männlicher Spender wurden 10 h mit 1 ng IL-15/ml vorbehandelt, 6 h mit c-ALL-Blasten eines

kindlichen Patienten im Verhältnis $7 \pm 4,55 : 1$ inkubiert und anschließend CD 69 separiert. Ein Teil der CD 69⁺ und der CD 69⁻ NK-Zellen wurde in 6 Versuchen 2 Wochen kultiviert. Ausschließlich mit IL-15 aktivierte NK-Zellen wurden in 3 Versuchen kultiviert.

Der Anteil CD 69⁺ NK-Zellen der CD 69⁺ NK-Zell-Fraktion nach Separation ist mit $35,03 \% \pm 14,47 \%$ signifikant ($p < 0,05$) kleiner als nach polyklonaler Expansion ($79,38 \% \pm 31,36 \%$). Nach Kultivierung der ursprünglich CD 69⁻ NK-Zellen erhöht sich der Anteil CD 69⁺ NK-Zellen höchst signifikant ($p < 0,001$) von $6,06 \% \pm 3,49 \%$ auf $69,3 \% \pm 16,65 \%$. Bei den ursprünglich alleinig mit IL-15 aktivierten NK-Zellen vergrößert sich der Anteil CD 69⁺ NK-Zellen hoch signifikant von $1,89 \% \pm 1,2 \%$ auf $77,29 \% \pm 5,21 \%$.

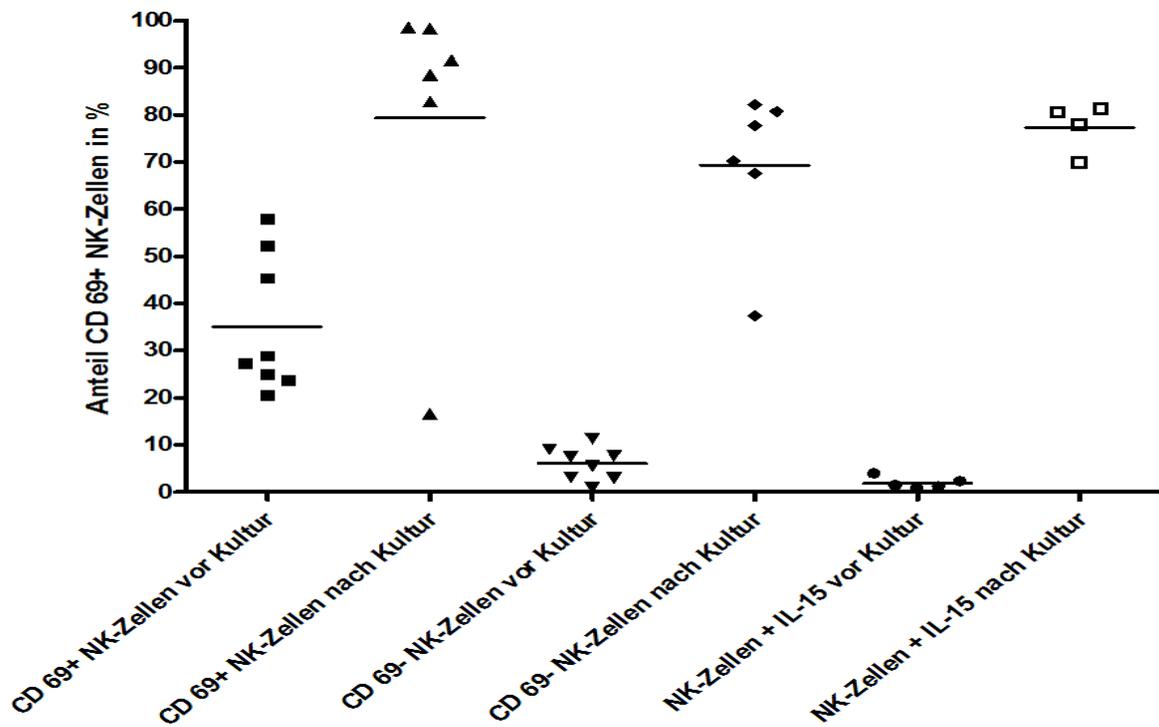


Abb. 23: Durchflußzytometrische Bestimmung des tatsächlichen Anteils CD 69⁺ NK-Zellen der CD 69⁺, CD 69⁻ und nur primär mit 1 ng/ml IL-15 stimulierten CD 56⁺, CD 3⁻ NK-Zellen vor und nach 2 wöchiger Kultivierung. Die Versuche wurden mit humanen NK-Zellen 2 gesunder männlicher Spender durchgeführt. Unmarkierte CD 56⁺, CD3⁻ NK-Zellen wurden mittels MACS (NK-Cell-Isolation-Kit) gewonnen, zunächst 10 h primärer Stimulus mit 1 ng/ml IL-15, dann 6 h sekundärer Stimulus mit ALL-Blasten (3 kindlicher Patienten) und anschließend CD 69 Anreicherung bzw. Depletion; CD 69⁺ und CD 69⁻ CD 56⁺, CD 3⁻ NK-Zellen vor Kultur n = 8; CD 69⁺ und CD 69⁻ CD 56⁺, CD 3⁻ NK-Zellen nach Kultur n = 6; CD 56⁺, CD 3⁻ NK-Zellen + IL-15 vor Kultur n = 5; CD 56⁺, CD 3⁻ NK-Zellen + IL-15 nach Kultur n = 4; die Mittelwerte sind als Balken dargestellt.

4 Diskussion

4.1 Methodenkritik

Bei dem zu Beginn zur orientierenden Untersuchung zytotoxischer NK-Zellen durchgeführten CD69 Assay wurden NK-Zellen aus peripherem Blut mittels Dichtegradienten Zentrifugation und CD56 Anreicherung gewonnen. Da CD56⁺/CD3⁺ NKT-Zellen im Median nur 0,23% von den PBMC im peripheren Blut gesunder Spender ausmachen [78] und mit einem Anteil von $6,1 \pm 2,9\%$ [79] eine kleine Lymphozytenpopulation darstellen [80], wurde auf eine CD3 Depletion verzichtet. In der durchflußzytometrischen Analyse wurde nicht zwischen NK und NKT-Zellen differenziert, da die Beobachtung des Verhaltens der Oberflächenrezeptoren CD69 und CD16 der vitalen CD56⁺ Zellen im Vordergrund stand. Folglich wurde im FacsCalibur mit vier Farbkanälen die Priorität auf CD56, CD16, Propidiumiodid und CD69 gesetzt; CD56 als typischer NK-Zell Marker zur Differenzierung von NK-Zellen, CD16 zur Einteilung der NK-Zellen in Subpopulationen, CD69 als Aktivierungsmarker von NK-Zellen und Propidiumiodid zur Unterscheidung zwischen vitalen und avitalen Zellen nach sekundärer Inkubation mit K562 Blasten. Deshalb wurde eine NK-/NKT-Zell Mischpopulation in Kauf genommen. Hintergrund dieser Versuche war das Verhalten des CD69 Rezeptors im zeitlichen Verlauf nach verschiedenen Stimuli zu beobachten und herauszufinden welche NK-Zellsubpopulation in Abhängigkeit von der CD16 Expression nach Stimulation am dominantesten CD69 exprimiert. Zu diesem Zweck konnte die „Verunreinigung“ mit NKT-Zellen akzeptiert werden.

Auf den Erkenntnissen der CD69 Assays aufbauend wurde ein Versuchsprotokoll zur vergleichenden Testung CD69⁺ und CD69⁻ NK-Zellen entwickelt. Hierbei wurden primär mit 1ng IL-15/ml und sekundär mit SEM-K2 Blasten im Verhältnis 1:1 aktivierte NK-Zellen CD69 separiert und auf ihre zytotoxischen Eigenschaften

getestet. Das Verhältnis 1:1 bei der sekundären Stimulation von NK-Zellen mit B-ALL-Blasten kindlicher Patienten konnte wegen der begrenzten Anzahl der zur Verfügung stehenden ALL-Blasten nicht eingehalten werden. Trotz einer geringeren Ausbeute an CD69⁺ NK-Zellen bei Stimulationsverhältnissen von 7±4,55 : 1 (NK : ALL), wurde die Inkubationszeit von 6 Stunden aufgrund dem zuvor mit Blasten der Zelllinie SEM-K2 etablierten Versuchsablauf beibehalten.

Zur Durchführung der auf den Versuchsergebnissen der CD69 Assays aufbauenden Zytotoxizitätsteste mussten primär mit IL-15 und sekundär mit SEM-K2 bzw. ALL-Blasten aktivierte NK-Zellen CD69 separiert werden. Hierzu wurden unmarkierte, mittels NK Cell Isolation Kit gewonnene, aktivierte CD56⁺/CD3⁻ NK-Zellen mittels Magnet-Antikörpern CD69 separiert. Nachteil war, dass die NK-Zell Reinheit in den beiden CD69 Fraktionen nur bei ca. 80% lag. Durch die rechnerische Angleichung (2.2.5.2.3) stellte dies jedoch im Zytotoxizitätstest kein wirkliches Problem dar. Die absolute Ausbeute an NK-Zellen, besonders CD69 positiven NK-Zellen war jedoch ausreichend hoch um anschließend Zytotoxizitätstests durchzuführen und einen Teil der NK-Zellen polyklonal zu expandieren. Dies war der wesentliche Vorteil gegenüber der mittels Cellsorting durchgeführten CD69 Separation. Hier konnte zwar in drei verschiedenen, nicht dargestellten Vorversuchen eine NK-Zell Reinheit in der CD69⁺ und der CD69⁻ Fraktion von über 95% erreicht werden. Die absolute Ausbeute an NK-Zellen war jedoch so gering, dass aufgrund dessen teilweise der Zytotoxizitätstest nicht adäquat durchführbar war, geschweige denn eine polyklonale Expansion möglich war.

Bewusst wurde bei der Bestimmung der CD69⁺ bzw. CD69⁻ NK-Zell Ausbeute der Anteil an NK-Zellen insgesamt in den CD69 Fraktionen bestimmt und nicht der, der CD 69⁺ bzw. CD69⁻ NK-Zellen. In vergleichenden Zytotoxizitätstests ist es enorm wichtig immer die Zytotoxizität gleicher NK-Zellzahlen unabhängig von der CD69 Expression innerhalb der 69⁺ bzw. CD69⁻ Fraktion einander gegenüberzustellen. Ansonsten werden fälschlicherweise Unterschiede in der zytotoxischen Aktivität

aufgrund verschieden hoher NK-Zellkonzentrationen festgestellt. Außerdem ändert sich die Expression von CD 69 unter unterschiedlichen Bedingungen innerhalb weniger Stunden [46, 66]. Die NK-Zellfraktionen wurden nicht unmittelbar nach der CD69 Separation durchflußzytometrisch untersucht, sondern zunächst in Kulturmedium aufgenommen. Folglich ist es naheliegend, dass der Anteil CD69⁺ NK-Zellen zum Zeitpunkt der durchflußzytometrischen Bestimmung nicht genau dem nach der CD69 Separation entspricht.

Versuche die CD69 separierten NK-Zellen in 7ml Kulturflaschen mit Medium A oder Medium B, IL-2 und IL-15 zu expandieren schlugen fehl. Folglich wurde auf die in der Arbeitsgruppe von Prof. Lang bereits etablierte Methode zur polyklonalen Expansion von NK-Zellen aus PBMC zurückgegriffen und diese etwas modifiziert. Letztendlich stellte sich heraus, dass sich die CD69 separierten NK-Zellen am besten mit autologem Serum statt humanem AB Serum aus einem Pool oder FBS im Medium vermehren ließen. Außerdem zeigte sich eine einmalige Versorgung mit „fremden“ bestrahlten Feeder Zellen, die von einem anderen gesunden Spender als die NK-Zellen stammten, zu Beginn der polyklonalen Expansion als effektiv. Als Konsequenz daraus wurde in den folgenden 2 Wochen der polyklonalen Expansion ausschließlich das Medium im Überstand der 96-Well Platte gewechselt und somit IL-2, IL-15 und PHA immer wieder aufgefrischt.

Die polyklonale Expansion und die 70-80 prozentige Reinheit der zu expandierenden CD69 NK-Zellfraktionen war nachteilig an dieser Methode. Es konnte keine ausschließliche Expansion der entsprechenden NK-Zellsubpopulation garantiert werden. Dieser Nachteil kann jedoch relativiert werden, denn wenn sich beispielsweise in einem Well 70% NK-Zellen einer bestimmten im Mittelpunkt des Interesses stehenden NK-Zellsubpopulation und 30% der NK-Zellen einer Anderen befinden, sind die NK-Zellen einer bestimmten NK-Zellsubpopulation nach 2 wöchiger Kultivierung immer noch in der Mehrzahl. Das unnatürliche Milieu in dem die NK-Zellen kultiviert werden ist ein weiterer Nachteil, der akzeptiert werden

muss. Ein solches Milieu kann weder im menschlichen Körper hergestellt werden noch ist es mit dem Leben vereinbar.

4.2 Definition von NK-Zellsubpopulation

Die Tatsache, dass bisher weder genetisch noch phänotypisch eine wirklich ausschließlich NK-Zell-spezifische Determination [13] gefunden werden konnte, spricht für die Plastizität von NK-Zellen. Es konnte in Abhängigkeit von der Vorstimulation mit IL-2 und IL-15, nach Kontakt der NK-Zellen mit MHC I negativen K562 Blasten eine Veränderung der CD16 Expression auf NK-Zellen innerhalb von Stunden beobachtet werden. Die maximale, hoch signifikante Verminderung der CD16 Expression auf CD56^{dim} Zellen konnte nach 6 h sekundärem Stimulus mit K562 bei primär mit IL-2 und IL-15 aktivierten NK-Zellen beobachtet werden. Hierbei verdoppelte sich der Anteil CD56^{dim}/CD16⁻ Zellen um 24% auf 48% (Abb.8). Primär mit 1000IE IL-2/ml oder 1ng IL-15/ml und sekundär mit K562 aktivierte NK-Zellen zeigten ebenfalls signifikante Zunahmen der CD56^{dim}/CD16⁻ NK-Zellen innerhalb von 2-4 Stunden (Abb.6 und Abb.7). Auch bei ausschließlich mit K562 aktivierten NK-Zellen nahm die CD16 Expression an ihrer Oberfläche ab. Dies ist bereits nach 2 stündigem K562 Stimulus an einer hochsignifikanten Steigerung des Anteils CD56^{dim}/CD16⁻ NK-Zellen um 5% auf 33% erkennbar (Abb.5). In der aktuellen Literatur zu NK-Zellen ist nach 6 h Inkubation von NK-Zellen mit MHC II negativen CTV-1 Zellen eine Verminderung der CD16 Expression bei simultaner Hochregulation von CD69 auf NK-Zellen beschrieben [24, 46]. Außerdem ist bekannt, dass die CD56^{dim}/CD16⁻ NK-Zellen, die im peripheren Blut (Abb.3) eine Minderheit darstellen, für die zytotoxische Aktivität gegen Leukämiezellen verantwortlich sind [24].

Überraschenderweise änderten vor allem primär mit 1000IE IL-2 vorstimulierte NK-Zellen nach sekundärem Stimulus mit MHC I negativen K562-Blasten signifikant

ihre CD56 Expression innerhalb von 4h (Abb.7). Hierbei nahm der Anteil der CD56^{high} NK-Zellen um mehr als das Doppelte auf durchschnittlich 22% zu (Abb.7). Dieses Phänomen ist auch bei der sekundären Aktivierung von primär mit 1000IE IL-2/ml und 1ng IL-15/ml stimulierten NK-Zellen (Abb.8) zu beobachten. Interessanterweise ist weder bei primär mit IL-2 noch primär mit IL-2 und IL-15 aktivierten NK-Zellen nach 24 stündigem sekundärem Stimulus mit K562 Blasten ein signifikanter Unterschied der Anteile CD56^{high} NK-Zellen im Vergleich zu ausschließlich primär aktivierten NK-Zellen zu erkennen (Abb.7 und 8). Folglich nimmt die CD56 Expression auf NK-Zellen bei diesen beiden Aktivierungskonstellationen nach 24h K562 Stimulus wieder ab (Abb.7 und 8).

Fasst man die beschriebenen Beobachtungen zusammen spricht dies für eine enorme Anpassungsfähigkeit von NK-Zellen. Diese Plastizität wird durch primäre und sekundäre Aktivierung von NK-Zellen veranlasst. Offensichtlich müssen NK-Zellen schon bis zu einem gewissen Grad aktiviert sein um auf einen sekundären zellulären Reiz mit einer Änderung der Expression von CD16 und CD56 zu reagieren. Mit diesen Erkenntnissen wird die strikte Einteilung von NK-Zellen in Subpopulationen in Abhängigkeit von der CD16 und der CD56 Expression an ihrer Oberfläche in Frage gestellt. Aktuell wird postuliert, dass CD56^{high} NK-Zellen bei der NK-Zell Reifung Vorläuferzellen der CD56^{dim} NK-Zellsubpopulation seien [81] und längere Telomere als CD56^{dim} NK-Zellen aufweisen [21]. Die Versuchsergebnisse sprechen jedoch dagegen, denn offensichtlich können bei entsprechender Aktivierung NK-Zellen innerhalb von Stunden vermehrt CD56 an ihrer Oberfläche exprimieren (Abb.7 und Abb.8) und somit CD56^{dim} NK-Zellen CD56^{high} werden. Allerdings ist das Milieu, in dem dies beobachtet wurde, nicht mit dem im menschlichen Körper vereinbar.

In einem Einzelversuch wurden primär mit IL-2 bzw. IL-15 aktivierte NK-Zellen analog zu 2.2.5.2.1 sekundär mit den NK-Zell resistenten MHC I exprimierenden SEM-K2-Blasten stimuliert (nicht dargestellt). Es lag ein KIR match zwischen den SEM-K2 Blasten und den NK-Zellen des gesunden Spenders vor. Interessanterweise konnte hier unabhängig von den unterschiedlichen primären

Stimuli mit IL-2 und IL-15 nach sekundärem Stimulus mit SEM-K2 Blasten weder eine relevante Änderung der CD16 als auch der CD56 Expression an der Oberfläche der NK-Zellen festgestellt werden. Durch diese Beobachtung stellt sich nicht nur die Frage, ob NK-Zellen ausschließlich auf einen sekundären Reiz mit MHC I negativen Zellen mit einer veränderten CD16 und CD56 Expression reagieren, sondern auch ob ein sekundärer Stimulus mit KIR inkompatiblen (MHC I mismatch) Blasten eine veränderte Expression dieser Rezeptoren bewirkt.

4.3 Die Rolle des Aktivitätsmarkers CD 69

In einem Vorversuch (nicht dargestellt) machten nach sekundärem Stimulus mit SEM-K2 unabhängig von der primären Aktivierung mit IL-2 und IL-15 die CD56^{dim}/CD16⁺ NK-Zellen den größten Anteil der CD69⁺ NK-Zellen aus. Hierbei lag ein HLA-match zwischen den MHC I exprimierenden SEM-K2 Blasten und den NK-Zellen eines gesunden Spenders vor. Werden hingegen primär mit IL-15 bzw. IL-2 aktivierte NK-Zellen einem Reiz mit MHC I negativen K562-Blasten ausgesetzt vermindert sich der Anteil CD16⁺ NK-Zellen innerhalb von Stunden und die CD56^{dim}/CD16⁻ NK-Zellen machen nach 6 h K562 Stimulus den Hauptanteil der CD69⁺ NK-Zellen aus (Abb.11,12 und 13). Bei ausschließlicher Aktivierung der NK-Zellen mit K562 halten sich in der CD69⁺ NK-Zellfraktion nach 6 h Stimulus die Anteile der CD56^{dim}/CD16⁻ und der CD56^{dim}/CD16⁺ NK-Zellen die Waage (Abb.10). Diese Beobachtungen legen nahe, dass abhängig von der primären Aktivierung mit IL-2 bzw. IL-15 und der MHC I Expression auf den Zielzellen bei gesteigerter CD69 Expression, die Expression des CD16 Rezeptors innerhalb weniger Stunden supprimiert bzw. gefördert wird.

Außerdem zeigen die in Kapitel 3.3.1 dargestellten Ergebnisse, dass verschiedene Stimuli eine Steigerung der CD69 Expression bewirken. So wird durch ausschließliche 6 stündigem K562-Stimulus eine maximale CD69 Expression auf

NK-Zellen veranlasst, die nach 24 h wieder abnimmt (Abb.10). Andererseits fördert IL-2 und IL-15 ebenfalls die Expression von CD69 auf NK-Zellen [82], hierbei verändern sich jedoch insgesamt die Anteile der einzelnen NK-Zellsubpopulationen an den CD69⁺ NK-Zellen nicht (Abb.11,12 und 13). Im Gegensatz zu sekundär mit K562 stimulierten NK-Zellen ist nach mehr als 24 stündiger ausschließlicher Aktivierung mit IL-2, IL-15 bzw. IL-2 und IL-15 die CD69 Expression gleichbleibend (Abb.11,12 und 13). Folglich scheint die vermehrte CD69 Expression verursacht durch verschiedene Reize unterschiedliche Wirkungen zu haben. Beispielsweise exprimieren proliferierende NK-Zellen ebenfalls vermehrt CD69 an ihrer Oberfläche (Abb.22 und 23). Diese Beobachtungen unterstreichen die These, dass CD69 nicht nur die Zytotoxizität von NK-Zellen, sondern auch andere NK-Zell Funktionen wie Proliferation, TNF α Produktion, die Expression anderer Aktivierungsmarker [70] und TGF β [72] fördert.

4.4 Die erhöhte zytotoxische Aktivität CD 69⁺ NK-Zellen gegen ALL-Blasten zeigt, dass sich NK-Zellen auf ihr Target einstellen können

Offensichtlich lysieren NK-Zellen, die bei Kontakt mit einer Zielzelle CD69 an ihrer Oberfläche exprimieren, dieselbe Zielzelle bei einem zweiten Kontakt einen Tag später besser als CD69⁻ NK-Zellen. Dies konnte eindeutig anhand der Zytotoxizitätstests gegen ALL-Blasten kindlicher Patienten nachgewiesen werden (Abb.17). Hierbei wiesen mit IL-15 aktivierte NK-Zellen, die nach primärem Kontakt mit leukämischen Blasten der B-Zell Reihe (KIR-mismatch) CD69 an ihrer Oberfläche exprimieren, eine signifikant höhere zytotoxische Aktivität gegen diese auf als CD69⁻ NK-Zellen. Interessanterweise lysieren primär CD69⁺ NK-Zellen B-ALL-Blasten kindlicher Patienten deutlich besser als MHC I negative K562-Blasten (Abb.17). CD69⁻ NK-Zellen und ausschließlich mit IL-15 aktivierte NK-Zellen

lysierten K562 Blasten jedoch höchst signifikant besser als CD69⁺ NK-Zellen. Eine solche Beobachtung ist außergewöhnlich und bisher nicht beschrieben. Normalerweise werden K562-Blasten immer sehr gut von zytotoxisch aktiven NK-Zellen lysiert und deshalb als Kontrolle verwendet. Insgesamt legt dies nahe, dass der CD69 Rezeptor in Abhängigkeit von der MHC I Expression auf den Zielzellen inhibierend oder aktivierend wirkt. Diese Annahme vereint somit die gegensätzlichen Ansichten dass CD69 einerseits die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen gegen MHC I exprimierende Tumorzellen steigert [46], andererseits die lytische Aktivität gegen kaum MHC I exprimierende Zielzellen hemmt [72].

Schlussfolgerung aus den Ergebnissen ist, dass sich NK-Zellen offensichtlich auf ihr zu lysierendes Target einstellen können. Außerdem zeigt die veränderte Expression des CD16 Rezeptors auf NK-Zellen in Abhängigkeit von der zu lysierenden Zielzelle, dass das Zusammenspiel der beiden Aktivitätsrezeptoren CD16 und CD69 eine wichtige Rolle bei der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen spielt.

Nach 2-wöchiger polyklonaler Expansion behalten die CD69 separierten NK-Zellen nicht ihre spezifischen zytotoxischen Eigenschaften bei, sondern gleichen sich in ihrer zytotoxischen Aktivität an (Abb.17). Folglich spricht dies gegen die Existenz genetisch voneinander differierender, spezifischer NK-Zellen und für die Anpassungsfähigkeit und Plastizität von NK-Zellen. Allerdings kann aus den Ergebnissen der Versuchsreihe mit NK-Zell resistenten, MHC I exprimierenden SEM-K2 Blasten kein eindeutiger Schluss diesbezüglich gezogen werden (Abb.16).

4.5 CD 69 auf der Oberfläche von Patientenblasten – ein prognostischer Marker ?

Bei der punktuell durchgeführten durchflußzytometrischen Analyse von Patientenblasten stellte sich heraus, dass diese in sehr unterschiedlichem Maße CD69 an ihrer Oberfläche exprimieren (nicht dargestellt). Zufälligerweise erlitten 2 Patienten mit einem Anteil CD69⁺ Blasten von mehr als 50% ein Rezidiv. Dies sind nur Einzelfälle. Es bedarf einer gründlichen Untersuchung vieler Patientenblasten um zu zeigen ob eine vermehrte CD69 Expression ein prognostisch ungünstiger Marker ist. Die Tatsache, dass proliferierende Lymphozyten vermehrt CD69 exprimieren und dass CD69 die TGF- β Produktion fördert [72] spricht für diese Hypothese.

4.6 Vermehrte CD 56 Expression als Zeichen expandierender NK-Zellen

CD56 bindet als N-CAM den Fibroblasten Wachstumsfaktor 1 [29]. In der aktuellen Literatur sind bereits die proliferativen Eigenschaften von CD56^{high} NK-Zellen beschrieben [25]. Die In Abb.19 und 21 dargestellte CD56 Expression von primär mit IL-15 aktivierten NK-Zellen und CD69 separierten NK-Zellen zeigt im Vergleich zu Beginn eine hoch signifikante Steigerung der CD56 Expression auf NK-Zellen nach 2-wöchiger polyklonaler Kultivierung (3.6, Abb.19 und 21). Demzufolge weisen expandierende NK-Zellen eine gesteigerte CD56 Expression auf und als Konsequenz entstehen aus CD56^{dim} NK-Zellen durch bestimmte aktivierende Faktoren wie IL-2, IL-15, PHA und Feeder Zellen im Kulturmedium CD56^{high} NK-Zellen.

4.7 Ausblick

Insgesamt sprechen die Ergebnisse für die enorme Anpassungsfähigkeit von NK-Zellen und gegen eine genetische Determination von NK-Zellsubpopulationen. Primär mit NK resistenten Blasten vorstimulierte CD69⁺ NK-Zellen weisen bessere zytotoxische Eigenschaften gegen MHC I exprimierende Zielzellen auf [46]. Die Ergebnisse bei der Untersuchung der zytotoxischen Aktivität CD69 separierter NK-Zellen gegen B-ALL-Blasten (Abb.17) belegen dies. Auf diesen Erkenntnissen aufbauend könnte die Inkubation von haploidenten (KIR-mismatch), mit IL-15 aktivierten Spender NK-Zellen mit bestrahlten leukämischen Blasten des Empfängers (ex vivo) für 6 h, zur Stimulation der NK-Zellen vor Transfusion, ein neuer Therapieansatz sein. Ein weiterer interessanter Ansatz ist NK-Zellen aus Spender PBMC zu expandieren und anschließend mit bestrahlten leukämischen Blasten in vitro unmittelbar vor Transfusion zu aktivieren. Hierfür müssten jedoch zunächst einige in vitro Experimente zur Testung der zytotoxischen Eigenschaften proliferierender NK-Zellen durchgeführt werden.

Interessant wäre es außerdem, den CD69 Assay analog zu 2.2.5.2.1 mit ausschließlich CD56⁺/CD3⁻ NK-Zellen durchzuführen. Vergleichend mit den Ergebnissen dieser Arbeit kann so getestet werden ob CD56⁺/CD3⁻ NKT-Zellen als regulatorische Zellen einen Einfluss auf die veränderte CD16 Expression auf CD56⁺ NK-Zellen nach verschiedenen primären (IL-2 bzw. IL-15) und sekundären Stimuli (K562) haben.

Um zu klären ob die veränderte CD16 und teilweise auch CD56 Expression auf NK-Zellen nach sekundärem Stimulus mit K562 abhängig von der MHC I Expression der Zielzelle ist, sollten weitere Versuche analog zu 2.2.5.2.1 mit MHC I exprimierenden Zielzellen durchgeführt werden. Hierbei ist es sinnvoll weiter zwischen Zielzellen mit KIR-mismatch und KIR-match zu differenzieren.

5 Zusammenfassung

NK-Zellen lysieren als Teil des angeborenen Immunsystems entartete und virusinfizierte Zellen. In klinischen Studien sind bereits Therapieerfolge bei der Bekämpfung der minimalen Resterkrankung nach Stammzelltransplantation durch die additive Gabe von NK-Zellen beschrieben. Hintergrund dieser Arbeit war eine NK-Zellsubpopulation zu finden, die ALL-Blasten der B-Zellreihe kindlicher Patienten mit Hochrisiko oder Rezidiv besser lysieren als andere NK-Zellsubpopulationen. Klassischerweise werden NK-Zellen in Subpopulationen mit unterschiedlichen Funktionen eingeteilt. Man unterscheidet $CD56^{dim}/CD16^{+}$, $CD56^{dim}/CD16^{-}$ und $CD56^{high}/CD16^{-}$ NK-Zellen.

Zunächst wurde das Verhalten des Aktivitätsrezeptors CD69 auf NK-Zellen in Abhängigkeit verschiedener Stimuli und in Abhängigkeit von der Zeit untersucht. Es konnte nicht nur eine Änderung der CD69 Expression auf NK-Zellen innerhalb von Stunden, sondern auch eine Änderung der CD16 Expression innerhalb von Stunden nachgewiesen werden. Bisher ist die genaue Funktion des lymphozytären Aktivierungsmarkers CD69 nicht bekannt, CD16 ist für die Antikörper abhängige zelluläre Zytotoxizität von NK-Zellen verantwortlich. Aus peripherem Blut gesunder Spender gewonnene NK-Zellen zeigten nach polyklonaler Expansion eine signifikant höhere CD56 Expression als zu Beginn. Diese Erkenntnisse sprechen sowohl für eine enorme Plastizität von NK-Zellen, als auch gegen eine strikte Einteilung von NK-Zellen in Subpopulationen.

Primär mit IL-15 und sekundär mit B-ALL-Blasten kindlicher Patienten aktivierte NK-Zellen gesunder Spender wurden $CD69^{+}$ separiert und anschließend wurde die zytotoxische Aktivität gegen die jeweiligen ALL-Blasten bestimmt. $CD69^{+}$ NK-Zellen lysieren diese signifikant besser als $CD69^{-}$ NK-Zellen gesunder Spender mit HLA-mismatch (KIR-mismatch). Interessanterweise werden K562-Blasten signifikant schlechter von $CD69^{+}$ als von $CD69^{-}$ NK-Zellen lysiert. K562-Blasten dieser MHC I negativen Zelllinie werden normalerweise von allen funktionierenden NK-Zellen

lysiert und in Zytotoxizitätstests als Kontrolle verwendet. Zum ersten Mal konnte gezeigt werden, dass es NK-Zellen gibt, die Patientenblasten besser lysieren als K562-Blasten. Nach polyklonaler Expansion der CD69⁺ und CD69⁻ NK-Zellen, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden NK-Zell Fraktionen in der zytotoxischen Aktivität gegen ALL-Patientenblasten und gegen K-562 Blasten festgestellt werden. Die veränderten Eigenschaften der NK-Zellen nach Kultivierung sprechen für die Anpassungsfähigkeit und Plastizität von NK-Zellen. Insgesamt sprechen die Ergebnisse gegen das Vorhandensein von spezifischen, sich genetisch voneinander unterscheidenden NK-Zellsubpopulationen, die durch initiale CD69 Expression nach primärer Stimulation mit IL-15 und ALL-Blasten voneinander getrennt werden können.

Bei der haploidenten Stammzelltransplantation könnte die Aktivierung von primär mit IL-15 stimulierten Spender NK-Zellen mit bestrahlten Patientenblasten für mindestens 6 Stunden ex vivo vor Transfusion der NK-Zellen in den Patienten ein neuer Therapieansatz sein.

6 Literaturverzeichnis

1. Schrappe Martin , K.C.U., Münster. *Akute lymphoblastische (ALL) und akute myeloische (AML) Leukämie im Kindesalter*. Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft und der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie [http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/025-014.pdf] 2008; AWMF-Leitlinien-Register Nr. 025/014 Entwicklungsstufe: 1 + IDA: [
2. Gadner, G., Niemeyer, Ritter, *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*, in *Minimale Resterkrankung*, Springer Medizin Verlag Heidelberg 2006, S.521-530.
3. *Studienprotokoll ALL-BFM 2000*, Fassung vom 1. Juli 2005.
4. Irving, J., et al., *Establishment and validation of a standard protocol for the detection of minimal residual disease in B lineage childhood acute lymphoblastic leukemia by flow cytometry in a multi-center setting*. *Haematologica*, 2009. 94(6): p. 870-4.
5. Armitage, J.O., *Bone marrow transplantation*. *The New England journal of medicine*, 1994. 330(12): p. 827-38.
6. Handgretinger, R., et al., *Megadose transplantation of purified peripheral blood CD34(+) progenitor cells from HLA-mismatched parental donors in children*. *Bone marrow transplantation*, 2001. 27(8): p. 777-83.
7. Moretta, L., *Dissecting CD56dim human NK cells*. *Blood*, 2010. 116(19): p. 3689-91.
8. Rocha, V. and F. Locatelli, *Searching for alternative hematopoietic stem cell donors for pediatric patients*. *Bone marrow transplantation*, 2008. 41(2): p. 207-14.
9. Pfeiffer, M.M., et al., *Reconstitution of natural killer cell receptors influences natural killer activity and relapse rate after haploidentical transplantation of T- and B-cell depleted grafts in children*. *Haematologica*, 2010. 95(8): p. 1381-8.
10. Lang, P., et al., *Transplantation of highly purified CD34+ progenitor cells from unrelated donors in pediatric leukemia*. *Blood*, 2003. 101(4): p. 1630-6.
11. Marks, D.I., et al., *Haploidentical stem cell transplantation for children with acute leukaemia*. *British journal of haematology*, 2006. 134(2): p. 196-201.
12. Schumm, M., et al., *Determination of residual T- and B-cell content after immunomagnetic depletion: proposal for flow cytometric analysis and results from 103 separations*. *Cytotherapy*, 2006. 8(5): p. 465-72.
13. Caligiuri, M.A., *Human natural killer cells*. *Blood*, 2008. 112(3): p. 461-9.
14. Cooper, M.D. and M.N. Alder, *The evolution of adaptive immune systems*. *Cell*, 2006. 124(4): p. 815-22.

15. Lanier, L.L., *NK cell recognition*. Annu Rev Immunol, 2005. 23: p. 225-74.
16. Moretta, A., F. Locatelli, and L. Moretta, *Human NK cells: from HLA class I-specific killer Ig-like receptors to the therapy of acute leukemias*. Immunological reviews, 2008. 224: p. 58-69.
17. Vivier, E., et al., *Functions of natural killer cells*. Nature immunology, 2008. 9(5): p. 503-10.
18. Moretta, A., et al., *What is a natural killer cell?* Nature immunology, 2002. 3(1): p. 6-8.
19. Robertson, M.J. and J. Ritz, *Biology and clinical relevance of human natural killer cells*. Blood, 1990. 76(12): p. 2421-38.
20. Lang, P., et al., *Clinical scale isolation of T cell-depleted CD56+ donor lymphocytes in children*. Bone marrow transplantation, 2002. 29(6): p. 497-502.
21. Poli, A., et al., *CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset*. Immunology, 2009. 126(4): p. 458-65.
22. Takahashi, E., et al., *Induction of CD16+ CD56bright NK cells with antitumour cytotoxicity not only from CD16- CD56bright NK Cells but also from CD16- CD56dim NK cells*. Scandinavian journal of immunology, 2007. 65(2): p. 126-38.
23. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri, *The biology of human natural killer-cell subsets*. Trends in immunology, 2001. 22(11): p. 633-40.
24. Penack, O., et al., *CD56dimCD16neg cells are responsible for natural cytotoxicity against tumor targets*. Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K, 2005. 19(5): p. 835-40.
25. Takahashi, E., et al., *Induction of CD16+ CD56bright NK cells with antitumour cytotoxicity not only from CD16- CD56bright NK Cells but also from CD16- CD56dim NK cells*. Scand J Immunol, 2007. 65(2): p. 126-38.
26. Ferlazzo, G., et al., *The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic*. Journal of immunology, 2004. 172(3): p. 1455-62.
27. Fehniger, T.A., et al., *CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity*. Blood, 2003. 101(8): p. 3052-7.
28. Mavilio, D., et al., *Characterization of CD56-/CD16+ natural killer (NK) cells: a highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. 102(8): p. 2886-91.

29. Milush, J.M., et al., *Functionally distinct subsets of human NK cells and monocyte/DC-like cells identified by coexpression of CD56, CD7, and CD4*. *Blood*, 2009. 114(23): p. 4823-31.
30. Ruggeri, L., et al., *Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants*. *Science*, 2002. 295(5562): p. 2097-100.
31. Locatelli, F. and A. Bertaina, *Reconstitution of repertoire of natural killer cell receptors after transplantation: just a question of time?* *Bone marrow transplantation*, 2010. 45(6): p. 968-9.
32. Koehl, U., et al., *Ex vivo expansion of highly purified NK cells for immunotherapy after haploidentical stem cell transplantation in children*. *Klinische Padiatrie*, 2005. 217(6): p. 345-50.
33. Farag, S.S., et al., *Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect*. *Blood*, 2002. 100(6): p. 1935-47.
34. Moretta, L., et al., *Killer Ig-like receptor-mediated control of natural killer cell alloreactivity in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation*. *Blood*, 2011. 117(3): p. 764-71.
35. Olson, J.A., et al., *NK cells mediate reduction of GVHD by inhibiting activated, alloreactive T cells while retaining GVT effects*. *Blood*, 2010. 115(21): p. 4293-301.
36. Guillaume, T., D.B. Rubinstein, and M. Symann, *Immune reconstitution and immunotherapy after autologous hematopoietic stem cell transplantation*. *Blood*, 1998. 92(5): p. 1471-90.
37. Velardi, A., et al., *Natural killer cell allorecognition of missing self in allogeneic hematopoietic transplantation: a tool for immunotherapy of leukemia*. *Current opinion in immunology*, 2009. 21(5): p. 525-30.
38. Lankester, A.C., et al., *Immunotherapy in the context of hematopoietic stem cell transplantation: the emerging role of natural killer cells and mesenchymal stromal cells*. *Pediatric clinics of North America*, 2010. 57(1): p. 97-121.
39. Peter J. Lang, M., Matthias Pfeiffer, MD*, Heiko-Manuel Teltschik, MD*, Ingo Mueller, MD*, Tobias Feuchtinger, MD*, Michael Schumm, MD* and Rupert Handgretinger, MD* *Co-Transfusion of Donor NK Cells in Haploidentical Stem Cell Transplantation*. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2008 112: Abstract 2907, 2008*.
40. Feuchtinger, T., et al., *Cytolytic activity of NK cell clones against acute childhood precursor-B-cell leukaemia is influenced by HLA class I expression on blasts and the differential KIR phenotype of NK clones*. *Bone marrow transplantation*, 2009. 43(11): p. 875-81.
41. Fujisaki, H., et al., *Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy*. *Cancer research*, 2009. 69(9): p. 4010-7.

42. Ljunggren, H.G. and K. Karre, *In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition*. Immunology today, 1990. 11(7): p. 237-44.
43. Parham, P., *MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival*. Nat Rev Immunol, 2005. 5(3): p. 201-14.
44. Pfeiffer, M., et al., *Intensity of HLA class I expression and KIR-mismatch determine NK-cell mediated lysis of leukaemic blasts from children with acute lymphatic leukaemia*. British journal of haematology, 2007. 138(1): p. 97-100.
45. Lanier, L.L., *NK cell recognition*. Annual review of immunology, 2005. 23: p. 225-74.
46. North, J., et al., *Tumor-primed human natural killer cells lyse NK-resistant tumor targets: evidence of a two-stage process in resting NK cell activation*. J Immunol, 2007. 178(1): p. 85-94.
47. Perussia, B. and M.J. Loza, *Assays for antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and reverse ADCC (redirected cytotoxicity) in human natural killer cells*. Methods Mol Biol, 2000. 121: p. 179-92.
48. Feuchtinger, T., et al., *Cytolytic activity of NK cell clones against acute childhood precursor-B-cell leukaemia is influenced by HLA class I expression on blasts and the differential KIR phenotype of NK clones*. Bone Marrow Transplant, 2009. 43(11): p. 875-81.
49. Karre, K., *Immunology. A perfect mismatch*. Science, 2002. 295(5562): p. 2029-31.
50. Lowdell, M.W., *Natural killer cells in haematopoietic stem cell transplantation*. Transfus Med, 2003. 13(6): p. 399-404.
51. Lanier, L.L., *Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition*. Nat Immunol, 2008. 9(5): p. 495-502.
52. Tomescu, C., et al., *Retention of viability, cytotoxicity, and response to IL-2, IL-15, or IFN-alpha by human NK cells after CD107a degranulation*. J Leukoc Biol, 2009. 85(5): p. 871-6.
53. Bryceson, Y.T., et al., *Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion*. Blood, 2006. 107(1): p. 159-66.
54. Alter, G., J.M. Malenfant, and M. Altfeld, *CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity*. J Immunol Methods, 2004. 294(1-2): p. 15-22.
55. Dunne, J., et al., *Selective expansion and partial activation of human NK cells and NK receptor-positive T cells by IL-2 and IL-15*. J Immunol, 2001. 167(6): p. 3129-38.
56. Grabstein, K.H., et al., *Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor*. Science, 1994. 264(5161): p. 965-8.

57. Waldmann, T., Y. Tagaya, and R. Bamford, *Interleukin-2, interleukin-15, and their receptors*. *Int Rev Immunol*, 1998. 16(3-4): p. 205-26.
58. Waldmann, T.A., *The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design*. *Nat Rev Immunol*, 2006. 6(8): p. 595-601.
59. Rousseau, R.F., et al., *Immunotherapy of high-risk acute leukemia with a recipient (autologous) vaccine expressing transgenic human CD40L and IL-2 after chemotherapy and allogeneic stem cell transplantation*. *Blood*, 2006. 107(4): p. 1332-41.
60. Granucci, F., et al., *Dendritic cell regulation of immune responses: a new role for interleukin 2 at the intersection of innate and adaptive immunity*. *EMBO J*, 2003. 22(11): p. 2546-51.
61. O'Brien, D. and B. Boughton, *High and low affinity IL-2 receptors on human leukaemic blast cells*. *Br J Haematol*, 1990. 76(2): p. 315-7.
62. Warren, H.S., et al., *Analysis of the costimulatory role of IL-2 and IL-15 in initiating proliferation of resting (CD56dim) human NK cells*. *Journal of immunology*, 1996. 156(9): p. 3254-9.
63. Gonzalez-Alvaro, I., et al., *Interleukin-15 and interferon-gamma participate in the cross-talk between natural killer and monocytic cells required for tumour necrosis factor production*. *Arthritis research & therapy*, 2006. 8(4): p. R88.
64. Kroemer, A., et al., *The innate NK cells, allograft rejection, and a key role for IL-15*. *J Immunol*, 2008. 180(12): p. 7818-26.
65. Fujisaki, H., et al., *Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy*. *Cancer Res*, 2009. 69(9): p. 4010-7.
66. Vanek, O., et al., *Soluble recombinant CD69 receptors optimized to have an exceptional physical and chemical stability display prolonged circulation and remain intact in the blood of mice*. *FEBS J*, 2008. 275(22): p. 5589-606.
67. Marzio, R., et al., *Expression and function of the early activation antigen CD69 in murine macrophages*. *Journal of leukocyte biology*, 1997. 62(3): p. 349-55.
68. Vazquez, B.N., et al., *CD69 gene is differentially regulated in T and B cells by evolutionarily conserved promoter-distal elements*. *Journal of immunology*, 2009. 183(10): p. 6513-21.
69. Moretta, A., et al., *CD69-mediated pathway of lymphocyte activation: anti-CD69 monoclonal antibodies trigger the cytolytic activity of different lymphoid effector cells with the exception of cytolytic T lymphocytes expressing T cell receptor alpha/beta*. *J Exp Med*, 1991. 174(6): p. 1393-8.
70. Thum, M.Y., et al., *An increase in the absolute count of CD56dimCD16+CD69+ NK cells in the peripheral blood is associated with a poorer IVF treatment and pregnancy outcome*. *Human reproduction*, 2004. 19(10): p. 2395-400.

71. Esplugues, E., et al., *Enhanced antitumor immunity in mice deficient in CD69*. J Exp Med, 2003. 197(9): p. 1093-106.
72. Esplugues, E., et al., *Induction of tumor NK-cell immunity by anti-CD69 antibody therapy*. Blood, 2005. 105(11): p. 4399-406.
73. Lozzio, C.B. and B.B. Lozzio, *Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome*. Blood, 1975. 45(3): p. 321-34.
74. Pocock, C.F., et al., *BCL-2 expression by leukaemic blasts in a SCID mouse model of biphenotypic leukaemia associated with the t(4;11)(q21;q23) translocation*. British journal of haematology, 1995. 90(4): p. 855-67.
75. BDbiosciences.
http://www.bdbiosciences.com/research/multicolor/spectrum_viewer/index.jsp. 2010.
76. Blomberg, K., et al., *Time-resolved fluorometric assay for natural killer activity using target cells labelled with a fluorescence enhancing ligand*. Journal of immunological methods, 1996. 193(2): p. 199-206.
77. Lang, P., et al., *Clinical scale isolation of T cell-depleted CD56+ donor lymphocytes in children*. Bone Marrow Transplant, 2002. 29(6): p. 497-502.
78. Hamzaoui, K., et al., *Discrepancies of NKT cells expression in peripheral blood and in cerebrospinal fluid from Behcet's disease*. Journal of neuroimmunology, 2006. 175(1-2): p. 160-8.
79. Galea-Lauri, J., et al., *Expression of a variant of CD28 on a subpopulation of human NK cells: implications for B7-mediated stimulation of NK cells*. Journal of immunology, 1999. 163(1): p. 62-70.
80. Peralbo, E., C. Alonso, and R. Solana, *Invariant NKT and NKT-like lymphocytes: two different T cell subsets that are differentially affected by ageing*. Experimental gerontology, 2007. 42(8): p. 703-8.
81. Yu, J., et al., *CD94 surface density identifies a functional intermediary between the CD56bright and CD56dim human NK-cell subsets*. Blood, 2010. 115(2): p. 274-81.
82. Baessler, T., et al., *CD137 ligand mediates opposite effects in human and mouse NK cells and impairs NK-cell reactivity against human acute myeloid leukemia cells*. Blood, 2010. 115(15): p. 3058-69.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Darstellung der Emmissionsspektren von FITC, PE, PerCP und PI (obere Bildhälfte), sowie APC (untere Bildhälfte) [75].....35

Abb.2: Schematische Auswertung einer Probenmessung nach 6 h Inkubation von NK-Zellen (10^6 /ml) mit SEM-K2-Zellen im Verhältnis 1 : 1, die 10 h zuvor primär mit IL-15 (1 ng IL-15/ml) stimuliert wurden.....40

Abb.3: Durchflußzytometrische Bestimmung der prozentualen Anteile CD 69⁺ NK-Zellen und der einzelnen NK-Zell-Subpopulationen 7 gesunder, humaner Spender; CD 56 mittels MACS angereicherte, unstimulierte, aus peripherem Blut gewonnene NK-Zellen.....51

Abb4.: Beispielhafte Darstellung der durchflußzytometrischen Bestimmung der Anteile der einzelnen NK-Zell-Subpopulationen. Vergleich von primären und sekundären Stimuli im zeitlichen Verlauf nach Zugabe von K562-Blasten zur unbehandelten Kontrolle: 1a) unbehandelten Kontrolle; 1b) Stimulation mit K562 (im Verhältnis 1 : 1); 2a) nur primärer Stimulus 10 h vor Versuchsbeginn mit 1000 IE IL-2/ml; 2b) primärer Stimulus mit 1000 IE IL-2/ml 10 h vor sekundärem Stimulus mit K562 im Verhältnis NK : K562 = 1 : 1; 3a) nur primärer Stimulus mit 1 ng IL-15/ml 10 h vor Versuchsbeginn; 3b) primärer Stimulus mit 1 ng IL-15/ml 10 h vor sekundärem Stimulus mit K562 im Verhältnis NK : K562 = 1 : 1; 4a) nur primärer Stimulus mit 1000 IE IL-2/ml + 1 ng IL-15/ml 10 h vor Versuchsbeginn; 4b) primärer Stimulus mit 1000 IE IL-2/ml + 1 ng IL-15/ml 10 h vor sekundärem Stimulus mit K562 im Verhältnis NK : K562 = 1 : 1; Zahlen in den dot plots zeigen die prozentualen Anteile der CD 56dim CD 16⁺ NK-Zellen (oben, R4), der CD 56dim CD 16⁻ NK-Zellen (unten links, R6) und CD 56high CD 16⁻ NK-Zellen (unten rechts, R5) an. CD 56⁺ CD 3⁺ NK-Zellen sind in den Messungen mit eingeschlossen; NK-Zellen einer gesunden Spenderin.55

Abb. 5: Durchflußzytometrische Bestimmung der Anteile der NK-Zell-Subpopulationen im zeitlichen Verlauf nach Zugabe von K562-Blasten. Die NK-Zellen stammen aus peripherem Blut 7 geschlechts- und altersheterogener gesunder Spender: kein Stimulus (oben); alleinige Stimulation mit K562 im Verhältnis NK : K562 = 1 : 1 (unten); gezeigt sind Mw., Stabw. und gepaarter, zweiseitiger student t-test: *p < 0,05; **p < 0,01, verglichen werden die Anteile der NK-Zell-Subpopulationen unstimulierter NK-Zellen mit denen mit K562 stimulierter NK-Zellen; mittels MACS CD 56 angereicherte NK-Zellen.57

Abb. 6: Durchflußzytometrische Bestimmung der prozentualen Anteile der NK-Zell-Subpopula-tionen an den aus peripheren Blut gewonnenen NK-Zellen 6 gesunder Spender im zeitlichen Verlauf nach Zugabe von K562-Blasten: kein Stimulus (oben); nur primärer Stimulus mit 1 ng IL-15/ml 10 h vor Versuchsbeginn (Mitte); primärer Stimulus mit 1 ng IL-15/ml 10 h vor sekundärem Stimulus mit K562 im Verhältnis NK : K562 = 1 : 1 (unten); gezeigt sind Mw., Stabw. und gepaarter, zweiseitiger student t-test: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001, verglichen werden jeweils die Anteile der NK-Zell-Subpopulationen unstimulierter NK-Zellen mit denen mit IL-15 stimulierter NK-Zellen, bzw. die Anteile der NK-Zell-Subpopulationen mit IL-15 stimulierter NK-Zellen mit denen primär mit IL-15 und sekundär mit K562 stimulierter NK-Zellen; mittels MACS CD 56 angereicherte NK-Zellen.60

Abb. 7: Durchflußzytometrische Bestimmung der prozentualen Anteile der NK-Zell-Subpopula-tionen an den aus peripheren Blut gewonnenen NK-Zellen 7 gesunder Spender im zeitlichen Verlauf nach Zugabe von K562-Blasten: kein Stimulus (oben); nur primärer Stimulus mit 1000 IE IL-2/ml 10 h vor Versuchsbeginn (Mitte); primärer Stimulus mit 1000 IE IL-2/ml 10 h vor sekundärem Stimulus mit K562 im Verhältnis NK : K562 = 1 : 1 (unten); gezeigt sind Mw., Stabw. und gepaarter, zweiseitiger student t-test: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001, verglichen werden jeweils die Anteile der NK-Zell-Subpopulationen unstimulierter NK-Zellen mit denen mit IL-2 stimulierter NK-Zellen, bzw. die Anteile der NK-Zell-Subpopulationen mit IL-2 stimulierter NK-Zellen mit denen primär mit IL-2 und sekundär mit K562 stimulierter NK-Zellen; mittels MACS CD 56 angereicherte NK-Zellen.....63

Abb. 8: Durchflußzytometrische Bestimmung der prozentualen Anteile der NK-Zell-Subpopula-tionen an den aus peripheren Blut gewonnenen NK-Zellen 6 gesunder Spender im zeitlichen Verlauf nach Zugabe von K562-Blasten: kein Stimulus (oben); nur primärer Stimulus mit 1000 IE IL-2/ml + 1 ng IL-15/ml 10 h vor Versuchsbeginn (Mitte); primärer Stimulus mit 1000 IE IL-2/ml + 1 ng IL-15/ml 10 h vor sekundärem Stimulus mit K562 im Verhältnis NK : K562 = 1 : 1 (unten); gezeigt sind Mw., Stabw. und gepaarter, zweiseitiger student t-test: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001, verglichen werden jeweils die Anteile der NK-Zell-Subpopulationen unstimulierter NK-Zellen mit denen mit IL-2 und IL-15 stimulierter NK-Zellen, bzw. die Anteile der NK-Zell-Subpopulationen mit IL-2 und IL-15 stimulierter NK-Zellen mit denen primär mit IL-2 und IL-15 und sekundär mit K562 stimulierter NK-Zellen; mittels MACS CD 56 angereicherte NK-Zellen.....66

Abb. 9: Beispielhafte Darstellung der durchflußzytometrischen Bestimmung des Anteils CD 69⁺ NK-Zellen an der gesamten NK-Zellzahl ohne Stimulus und nach verschiedenen primären und sekundären Stimuli im zeitlichen Verlauf nach Zugabe von K562-Blasten: 1a) kein Stimulus; 1b) alleinige Stimulation mit K562 im Verhältnis NK : K562 = 1 : 1; 2a) nur primärer Stimulus mit 1000 IE IL-2/ml 10 h vor Versuchsbeginn; 2b) primärer Stimulus mit 1000 IE IL-2/ml 10 h vor sekundärem Stimulus mit K562 im Verhältnis NK : K562 = 1 :

1; 3a) nur primärer Stimulus mit 1 ng IL-15/ml 10 h vor Versuchsbeginn; 3b) primärer Stimulus mit 1 ng IL-15/ml 10 h vor sekundärem Stimulus mit K562 im Verhältnis NK : K562 = 1 : 1; 4a) nur primärer Stimulus mit 1000 IE IL-2/ml + 1 ng IL-15/ml 10 h vor Versuchsbeginn; 4b) primärer Stimulus mit 1000 IE IL-2/ml + 1 ng IL-15/ml 10 h vor sekundärem Stimulus mit K562 im Verhältnis NK : K562 = 1 : 1; Zahlen in den dot plots zeigen die prozentualen Anteile der CD 56⁺/CD 69⁺ NK-Zellen an; CD 56⁺/CD 3⁺ NK-Zellen sind in den Messungen mit eingeschlossen; NK-Zellen einer gesunden Spenderin.69

Abb. 10: Durchflußzytometrische Bestimmung der prozentualen Anteile CD 69⁺ NK-Zellen. CD 69⁺ NK-Zellen und CD 69⁺ NK-Zell-Subpopulationen der aus peripheren Blut gewonnenen NK-Zellen 7 gesunder Spender im zeitlichen Verlauf nach Zugabe von K562-Blasten: kein Stimulus (oben); nach Stimulation mit K562 im Verhältnis NK : K562 = 1 : 1 (unten); gezeigt sind Mw., Stabw. und gepaarter, zweiseitiger student t-test: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; verglichen werden jeweils die Anteile der CD 69⁺ NK-Zellen unstimulierter NK-Zellen mit denen mit K562 stimulierter NK-Zellen; mittels MACS CD 56 angereicherte NK-Zellen.72

Abb. 11: Durchflußzytometrische Bestimmung der prozentualen Anteile CD 69⁺ NK-Zellen. CD 69⁺ NK-Zellen und CD 69⁺ NK-Zell-Subpopulationen der aus peripheren Blut gewonnenen NK-Zellen 6 gesunder Spender im zeitlichen Verlauf nach Zugabe von K562-Blasten: kein Stimulus (oben); nur primärer Stimulus mit 1 ng IL-15/ml 10 h vor Versuchsbeginn (Mitte); primärer Stimulus mit 1 ng IL-15/ml 10 h vor sekundärem Stimulus mit K562 im Verhältnis NK : K562 = 1 : 1 (unten); gezeigt sind Mw., Stabw. und gepaarter, zweiseitiger student t-test: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; verglichen werden jeweils die Anteile der CD 69⁺ NK-Zellen unstimulierter NK-Zellen mit denen mit IL-15 stimulierter NK-Zellen, bzw. die Anteile der CD 69⁺ NK-Zellen mit IL-15 stimulierter NK-Zellen mit denen primär mit IL-15 und sekundär mit K562 stimulierter NK-Zellen; mittels MACS CD 56 angereicherte NK-Zellen.75

Abb. 12: Durchflußzytometrische Bestimmung der prozentualen Anteile CD 69⁺ NK-Zellen. CD 69⁺ NK-Zellen und CD 69⁺ NK-Zell-Subpopulationen der aus peripheren Blut gewonnenen NK-Zellen 7 gesunder Spender im zeitlichen Verlauf nach Zugabe von K562-Blasten: kein Stimulus (oben); nur primärer Stimulus mit 1000 IE IL-2/ml 10 h vor Versuchsbeginn (Mitte); primärer Stimulus mit 1000 IE IL-2/ml 10 h vor sekundärem Stimulus mit K562 im Verhältnis NK : K562 = 1 : 1 (unten); gezeigt sind Mw., Stabw. und gepaarter, zweiseitiger student t-test: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; verglichen werden jeweils die Anteile der CD 69⁺ NK-Zellen unstimulierter NK-Zellen mit denen mit IL-2 stimulierter NK-Zellen, bzw. die Anteile der CD 69⁺ NK-Zellen mit IL-2 stimulierter NK-Zellen mit denen primär mit IL-2 und sekundär mit K562 stimulierter NK-Zellen; mittels MACS CD 56 angereicherte NK-Zellen.78

Abb. 13: Durchflußzytometrische Bestimmung der prozentualen Anteile CD 69⁺ NK-Zellen. CD 69⁺ NK-Zellen und CD 69⁺ NK-Zell-Subpopulationen der aus peripheren Blut gewonnenen NK-Zellen 6 gesunder Spender im zeitlichen Verlauf nach Zugabe von K562-Blasten: kein Stimulus (oben); nur primärer Stimulus mit 1000 IE IL-2/ml + 1 ng IL-15/ml 10 h vor Versuchsbeginn (Mitte); primärer Stimulus mit 1000 IE IL-2/ml + 1 ng IL-15/ml 10 h vor sekundärem Stimulus mit K562 im Verhältnis NK : K562 = 1 : 1 (unten); gezeigt sind Mw., Stabw. und gepaarter, zweiseitiger student t-test: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; verglichen werden jeweils die Anteile der CD 69⁺ NK-Zellen unstimulierter NK-Zellen mit denen mit IL-2 und IL-15 stimulierter NK-Zellen, bzw. die Anteile der CD 69⁺ NK-Zellen mit IL-2 und IL-15 stimulierter NK-Zellen mit denen primär mit IL-2 und IL-15 und sekundär mit K562 stimulierter NK-Zellen; mittels MACS CD 56 angereicherte NK-Zellen.82

Abb.14: Durchflußzytometrische Bestimmung des Anteils CD 69⁺ NK-Zellen im zeitlichen Verlauf nach Zugabe von K562-Blasten im Verhältnis NK : K562 = 1 : 1 in Abhängigkeit verschiedener primärer Stimuli mit IL-2 und IL-15 10 h vor sekundärer Stimulation mit K562: a) alleinige Stimulation mit K562; b) primärer Stimulus mit 1000 IE IL-2/ml und sekundärer Stimulus mit K562; c) primärer Stimulus mit 1 ng IL-15/ml und sekundärer Stimulus mit K562; d) primärer Stimulus mit 1000 IE IL-2/ml + 1 ng IL-15/ml und sekundärer Stimulus mit K562; mittels MACS CD 56 angereicherte NK-Zellen; gezeigt sind Mw. und Stabw.; bei a) + b) n = 7 (gesunde Spender), bei c) + d) n = 6 (gesunde Spender).84

Abb. 15: Durchflußzytometrische Bestimmung des prozentualen Anteils CD 69⁺ NK-Zellen an den einzelnen NK-Zell-Subpopulationen im zeitlichen Verlauf nach Zugabe von K562-Blasten im Verhältnis NK : K562 = 1 : 1 in Abhängigkeit verschiedener primärer Stimuli mit IL-2 und IL-15 10 h vor sekundärer Stimulation mit K562; CD 56⁺ NK-Zellen (grün; n = 7); primärer Stimulus mit 1000 IE IL-2/ml (rot; n = 7); primärer Stimulus mit 1 ng IL-15/ml (gelb; n = 6); primärer Stimulus mit 1000 IE IL-2/ml + 1 ng IL-15/ml (blau; n = 6); die a) Teile stellen NK-Zellen nach Zugabe von K562-Blasten dar; die b) Teile stellen nicht mit K562 stimulierte NK-Zellen dar; 1a) + 1b) CD 56 dim + CD 16⁺ NK-Zellen; 2a) + 2b) CD 56 dim + CD 16⁻ NK-Zellen; 3a) + 3b) CD 56 high + CD 16⁻ NK-Zellen; mittels MACS CD 56 angereicherte NK-Zellen; gezeigt sind Mw. und Stabw.88

Abb. 16: Messung der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen 3 gesunder Spender gegen SEM-K2-Blasten und gegen K562-Blasten mittels 2h-Europium-Zytotoxizitäts-Assay: a) Zytotoxizität CD 69 depletierter bzw. CD 69 angereicherter CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen gegenüber SEM-K2-Blasten nach 6 h Inkubation der CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen mit SEM-K2-Blasten im Verhältnis 1 : 1; Stimulation der CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen 10 h vor Inkubation mit SEM-K2-Blasten mit 1 ng IL-15/ml; n = 4; KIR-mismatch; b) Zytotoxizität CD 69 depletierter bzw. CD 69 angereicherter CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen gegenüber K562-Blasten nach 6 h Inkubation der CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen mit SEM-K2-Blasten im Verhältnis 1 : 1; Stimulation der CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen 10 h vor Inkubation mit SEM-K2-Blasten (KIR-

mismatch) mit 1 ng IL-15/ml; n = 4; c) Zytotoxizität nach 2-wöchiger Kultivierung der CD 69⁺ bzw. CD 69⁻ CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen gegenüber SEM-K2-Blasten; KIR-mismatch; n = 5; d) Zytotoxizität nach 2-wöchiger Kultivierung der CD 69⁺ bzw. CD 69⁻ CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen gegenüber K562; n = 4; gezeigt sind Mw., Stabw. und gepaarter, einseitiger student t-Test: *p < 0,05; **p < 0,01, verglichen wird jeweils die zytotoxische Aktivität CD 69⁺ NK-Zellen mit der CD 69⁻ NK-Zellen.....92

Abb. 17: Messung der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen 2 gesunder Spender gegen ALL-Blasten 3 unterschiedlicher kindlicher Patienten und gegen K562-Blasten mittels 2h-Europium-Zytotoxizitäts-Assay: a) Zytotoxizität CD 69 depletierter bzw. CD 69 angereicherter CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen gegenüber ALL-Blasten nach 6 h Inkubation der CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen mit ALL-Blasten (mit 30Gy bestrahlt) im Verhältnis 7 ± 4,55 : 1 und Zytotoxizität CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen nach Stimulation mit 1 ng IL-15/ml; Stimulation der CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen 10 h vor Inkubation mit ALL-Blasten mit 1 ng IL-15/ml; KIR-mismatch b) Zytotoxizität CD 69 depletierter bzw. CD 69 angereicherter CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen gegenüber K562-Blasten nach 6 h Inkubation der CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen mit ALL-Blasten im Verhältnis E : T = 7 ± 4,55 : 1 und Zytotoxizität CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen nach Stimulation mit 1 ng IL-15/ml; Vorbehandlung der CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen mit 1 ng IL-15/ml 10 h vor Inkubation mit ALL-Blasten (KIR-mismatch) c) Zytotoxizität nach 2-wöchiger Kultivierung der CD 69⁺ bzw. CD 69⁻ CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen gegenüber jeweils denselben ALL-Blasten wie in a) und Zytotoxizität nach Kultivierung der mit 1 ng IL-15/ml stimulierten CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen gegenüber jeweils denselben ALL-Blasten wie in a); KIR-mismatch d) Zytotoxizität nach 2-wöchiger Kultivierung der CD 69⁺ bzw. CD 69⁻ CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen gegenüber K562 und Zytotoxizität nach Kultivierung der mit 1 ng IL-15/ml stimulierten CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen gegenüber K562; gezeigt sind Mw., Stabw. und gepaarter, einseitiger student t-Test: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001, verglichen wird jeweils die zytotoxische Aktivität CD 69⁺ NK-Zellen mit der CD 69⁻ NK-Zellen bzw. CD 69⁺ NK-Zellen mit der nur mit IL-15 stimulierter NK-Zellen, die nicht separiert wurden.96

Abb.18: Beispielhafte durchflußzytometrische Darstellung der CD 56 Expression CD 69⁺ und CD 69⁻ NK-Zellen vor und nach Kultivierung: **a)** Histogramm overlay CD 69⁺ (grün) und CD 69⁻ NK-Zellen (blau) nach CD 69 Depletion bzw. Anreicherung nach 6 h Inkubation der CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen mit SEM-K2-Blasten (KIR-mismatch) im Verhältnis 1 : 1; Stimulation der CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen 10 h vor Inkubation mit SEM-K2-Blasten mit 1 ng IL-15/ml **b)** Histogramm overlay der 2-Wochen kultivierten CD 69⁺ (grün) und CD 69⁻ NK-Zellen (blau) **c)** Histogramm overlay CD 69⁺ NK-Zellen (blau) nach CD 69 Anreicherung nach 6 h Inkubation der CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen mit SEM-K2-Blasten im Verhältnis 1 : 1; Stimulation der CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen 10 h vor Inkubation mit SEM-K2-Blasten mit 1 ng IL-15/ml; 2-Wochen kultivierte CD 69⁺ NK-Zellen (weiß) **d)** Histogramm overlay CD 69⁻ NK-Zellen (blau) nach CD 69 Depletion nach 6 h Inkubation der CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen mit SEM-K2-Blasten im Verhältnis 1 : 1; Stimulation der CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen 10 h vor Inkubation mit SEM-K2-Blasten mit 1 ng IL-15/ml; 2-Wochen kultivierte CD

69⁻ NK-Zellen (weiß); Isolierung CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen einer gesunden Spenderin mittels MACS (NK Cell Isolation Kit).....99

Abb. 19: Durchflußzytometrische Bestimmung der Fluoreszenzintensität von CD 56 APC Antikörpern auf CD 69⁺ und CD 69⁻ CD 56⁺, CD 3⁻ NK-Zellen vor und nach Kultivierung. Die Versuche wurden mit humanen NK-Zellen 2 gesunder weiblicher und 2 gesunder männlicher Spender durchgeführt. Unmarkierte CD 56⁺, CD3⁻ NK-Zellen wurden mittels MACS (NK-Cell-Isolation-Kit) gewonnen, zunächst 10 h primärer Stimulus mit 1 ng/ml IL-15, dann 6 h sekundärer Stimulus mit SEM-K2 Blasten (KIR-mismatch) und anschließend CD 69 Anreicherung bzw. Depletion; n = 4; die Mittelwerte sind als Balken dargestellt. ...101

Abb. 20: Beispielhafte durchflußzytometrische Darstellung der CD 56 Expression CD 69⁺, CD 69⁻ und mit IL-15 stimulierter NK-Zellen vor und nach Kultivierung: **a)** Histogramm overlay CD 69⁺ (grün) und CD 69⁻ NK-Zellen (blau) nach CD 69 Depletion bzw. Anreicherung nach 6 h Inkubation der CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen mit ALL-Blasten im Verhältnis 2,5 : 1; Stimulation der CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen 10 h vor Inkubation mit ALL-Blasten mit 1 ng IL-15/ml; mit 1 ng IL-15/ml stimulierte NK-Zellen (weiß) **b)** Histogramm overlay der 2-Wochen kultivierten CD 69⁺ (grün), CD 69⁻ und ursprünglich mit 1 ng IL-15/ml stimulierten NK-Zellen (blau) **c)** Histogramm overlay CD 69⁺ NK-Zellen (blau) nach CD 69 Anreicherung nach 6 h Inkubation der CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen mit ALL-Blasten im Verhältnis 2,5 : 1; Stimulation der CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen 10 h vor Inkubation mit ALL-Blasten mit 1 ng IL-15/ml; 2-Wochen kultivierte CD 69⁺ CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen (weiß) **d)** Histogramm overlay CD 69⁻ NK-Zellen (blau) nach CD 69 Depletion nach 6 h Inkubation der CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen mit ALL-Blasten im Verhältnis 2,5 : 1; Stimulation der CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen 10 h vor Inkubation mit SEM-K2-Blasten mit 1 ng IL-15/ml; 2-Wochen kultivierte CD 69⁻ CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen (weiß) **e)** Histogramm overlay der mit 1 ng IL-15/ml stimulierten NK-Zellen vor (blau) und nach (weiß) 2-wöchiger Kultivierung; Isolierung CD 56⁺ CD 3⁻ NK-Zellen eines gesunden Spenders mittels MACS (NK Cell Isolation Kit).103

Abb. 21: Durchflußzytometrische Bestimmung der Fluoreszenzintensität von CD 56 auf CD 69⁺, CD 69⁻ und nur primär mit 1 ng/ml IL-15 stimulierten CD 56⁺, CD 3⁻ NK-Zellen vor und nach Kultivierung. Die Versuche wurden mit humanen NK-Zellen 2 gesunder männlicher Spender durchgeführt. Unmarkierte CD 56⁺, CD3⁻ NK-Zellen wurden mittels MACS (NK-Cell-Isolation-Kit) gewonnen, zunächst 10 h primärer Stimulus mit 1 ng/ml IL-15, dann 6 h sekundärer Stimulus mit ALL-Blasten (3 kindlicher Patienten) und anschließend CD 69 Anreicherung bzw. Depletion; CD 69⁺ und CD 69⁻ CD 56⁺, CD 3⁻ NK-Zellen vor Kultur n = 8; CD 69⁺ und CD 69⁻ CD 56⁺, CD 3⁻ NK-Zellen nach Kultur n = 6; CD 56⁺, CD 3⁻ NK-Zellen + IL-15 vor Kultur n = 5; CD 56⁺, CD 3⁻ NK-Zellen + IL-15 nach Kultur n = 3; die Mittelwerte sind als Balken dargestellt.105

Abb. 22: Durchflußzytometrische Bestimmung des tatsächlichen Anteils CD 69⁺ NK-Zellen der einzelnen CD 56⁺, CD 3⁻ NK-Zell-Fractionen nach CD 69 MACS-Separation und nach 2 wöchiger Kultivierung. Die Versuche wurden mit humanen NK-Zellen 2 gesunder weiblicher und 2 gesunder männlicher Spender durchgeführt. Unmarkierte CD 56⁺, CD3⁻ NK-Zellen wurden mittels MACS (NK-Cell-Isolation-Kit) gewonnen, zunächst 10 h primärer Stimulus mit 1 ng/ml IL-15, dann 6 h sekundärer Stimulus mit SEM-K2 Blasten (KIR-mismatch) und anschließend CD 69 Anreicherung bzw. Depletion; n = 5 (in 2 Versuchen lag jeweils nur eine Messung vor bzw. nach Kultivierung vor); die Mittelwerte sind als Balken dargestellt.....107

Abb. 23: Durchflußzytometrische Bestimmung des tatsächlichen Anteils CD 69⁺ NK-Zellen der CD 69⁺, CD 69⁻ und nur primär mit 1 ng/ml IL-15 stimulierten CD 56⁺, CD 3⁻ NK-Zellen vor und nach 2 wöchiger Kultivierung. Die Versuche wurden mit humanen NK-Zellen 2 gesunder männlicher Spender durchgeführt. Unmarkierte CD 56⁺, CD3⁻ NK-Zellen wurden mittels MACS (NK-Cell-Isolation-Kit) gewonnen, zunächst 10 h primärer Stimulus mit 1 ng/ml IL-15, dann 6 h sekundärer Stimulus mit ALL-Blasten (3 kindlicher Patienten) und anschließend CD 69 Anreicherung bzw. Depletion; CD 69⁺ und CD 69⁻ CD 56⁺, CD 3⁻ NK-Zellen vor Kultur n = 8; CD 69⁺ und CD 69⁻ CD 56⁺, CD 3⁻ NK-Zellen nach Kultur n = 6; CD 56⁺, CD 3⁻ NK-Zellen + IL-15 vor Kultur n = 5; CD 56⁺, CD 3⁻ NK-Zellen + IL-15 nach Kultur n = 4; die Mittelwerte sind als Balken dargestellt.....109

7.2 Tabellenverzeichnis

Tab.1: Zelllinien	14
Tab.2: Spender.....	14
Tab.3: Patientenblasten	15
Tab.4: Biphänotypische akute Leukämie liegt vor wenn der Score > 2 Punkte für die myeloische und eine der lymphatischen Zellreihen beträgt	22
Tab.5: Fluorochrome der verwendeten Antikörper: Wellenlängen der Anregung, Absorption und Emission von den Antikörper-konjugierten Fluorochromen Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Peridinin-chlorophyll protein (PerCP), Allophycocyanin (APC).....	35
Tab.6: CD 69 ⁺ Ausbeute nach MACS-Anreicherung. Zuvor 10 h primärer Stimulus mit 1 ng IL-15/ml und anschließend 6 h Stimulus mit SEM-K2-Blasten im Verhältnis NK : SEM-K2 = 1 : 1.....	43
Tab.7: CD 69 ⁻ Ausbeute nach MACS-Depletion. Zuvor 10 h primärer Stimulus mit 1 ng IL-15/ml und anschließend 6 h Stimulus mit SEM-K2-Blasten im Verhältnis NK : SEM-K2 = 1 : 1.....	44
Tab.8: CD 69 ⁺ Ausbeute nach MACS-Anreicherung. Zuvor 10 h primärer Stimulus mit 1 ng IL-15/ml und anschließend 6 h Stimulus mit ALL-Blasten im Verhältnis NK : ALL = 7 ± 4,6 : 1	44
Tab. 9: CD 69 ⁻ Ausbeute nach MACS-Depletion. Zuvor 10 h primärer Stimulus mit 1 ng IL-15/ml und anschließend 6 h Stimulus mit ALL-Blasten im Verhältnis NK : ALL = 7 ± 4,6 : 1	45
Tab.10: Durchflußzytometrische Bestimmung der Zusammensetzung der NK-Zellpopulationen der einzelnen gesunden Spender nach MACS-Anreicherung mit CD 56 MicroBeads.	51

Danksagung

Mein Dank gilt Allen, die mich während des gesamten Entstehungsprozesses dieser Arbeit unterstützt haben. Zunächst bedanke ich mich herzlich bei meinem wissenschaftlichen Lehrer Professor Dr. Peter Lang für die Bereitstellung des Themas, die gute Betreuung, die zahlreichen, zum Denken anregenden Diskussionen, die Unterstützung während der gesamten 4 Jahre und die Ratschläge fürs Leben. Außerdem bedanke ich mich bei Dr. Matthias Pfeiffer für die Unterstützung und Betreuung. Darüber hinaus bedanke ich mich im Besonderen bei Anni Barbarin-Dorner, die mir während der Laborarbeit stets mit Rat und Tat zur Seite stand und für gute Stimmung sorgte.

Mein Dank gilt ferner verschiedenen Kollegen, Freunden und Familienmitgliedern für ihre Diskussionen, Anregungen und Unterstützung während der Entstehung dieser Arbeit. An dieser Stelle möchte ich Kai Witte, Michael Schumm, Frieder Speidel, Dr. Thomas Borth-Bruhns, Mohammed Alkahled, Birgit Pelka und Michael Scheible danken. Nicht zuletzt danke ich meinen lieben Eltern Hansjörg und Renate für die Unterstützung und Motivation, meinem Bruder Felix für die zahlreichen konstruktiven Tipps beim Schreiben der Arbeit, meinen Geschwistern Marietta und Wolfgang und natürlich meinem lieben Jan, der mich von Anfang an bis zur Abgabe der Dissertation unterstützte, Blut spendete, mich in harten Zeiten ermutigte und motivierte, anhaltendes Verständnis hatte, mich konstruktiv kritisierte und mir zahlreiche Fragen im Umgang mit verschiedenen PC-Programmen beantworten konnte.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name Christiane Zwicker
Geburtsdatum 23.09.1984
Geburtsort Konstanz
Nationalität deutsch
Familienstand ledig

Schulbildung:

09/1990 – 07/1994 Grundschule Sonnenhalde in Konstanz
09/1994 – 06/2003 Alexander von Humboldt Gymnasium in Konstanz
06/2003 Zeugnis der allgemeinen Hochschulreife

Praktika:

09/2003 - 10/2003 Rehabilitationsklinik Mettnau Radolfzell Praktikum im
Bereich Sporttherapie/Physiotherapie
10/2003 - 02/2004 Orthopädische Klinik Vincentius Konstanz, Pflegepraktikum

Studium:

04/2004 – 10/2010 Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
03/2006 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Seit 01/2007 Promotion in der Universitätskinderklinik Tübingen Abteilung
Hämatologie und Onkologie bei Prof. Dr. med. Peter Lang

Famulaturen:

09/2006 - 10/2006 Klinikum Konstanz, Belegabteilung für Radioonkologie
08/2007 - 09/2007 Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen,
Abt. I, Station für Kinderonkologie / Kinderhämatologie
03/2008 Kinderarztpraxis Dr. med. Bernhard Asenbauer und Michael
Michael Barner
03/2008 – 04/2008 Universitätshautklinik Tübingen, allgemeine Dermatologie
07/2008 – 08/2008 ``Prince of Wales Hospital Adult Emergency Department``,
University of New South Wales, Sydney, Notfallmedizin

Praktisches Jahr:

02/2009 - 06/2009 Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen,
Abteilung für Neonatologie
06/2009 - 09/2009 Medizinische Klinik und Poliklinik der Universität Tübingen,
Notaufnahme, Intensivstation, Sportmedizin
08/2009 - 10/2009 Universitätsklinik Gemelli, Università Cattolica del Sacro
Cuore, Rom, Italien, Innere Medizin, Rheumatologie
10/2009 - 01/2010 Kantonsspital Münsterlingen, Lehrkrankenhaus der
Universität Zürich, Schweiz, Chirurgie
19/10/2010 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Weiterbildung zur Fachärztin:

Seit 03/2011 Nachsorgeklinik Tannheim, VS-Tannheim
Assistenzärztin für Kinder- und Jugendmedizin

