

Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
(Schwerpunkt: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie und Onkologie)

**Induktion der phänotypischen Reifung Natürlicher
Killer Zellen mittels Interleukin-15 in einem
humanisierten NOD/LtSz-scid IL2Rg^{-/-} Mausmodell**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Philippek, Martin

2017

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Handgretinger

2. Berichterstatter: Professor Dr. W. K. Aicher

Tag der Disputation: 10.05.2017

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Natürliche Killer Zellen	1
Entwicklung von NK Zellen im menschlichen Organismus	2
Funktion und Differenzierung von NK Zellen	3
NK Zell Rezeptoren	6
Klinische Bedeutung von NK Zellen.....	8
1.2 Kindliche Leukämien.....	9
Die hämatopoetische Stammzelltransplantation bei kindlichen Leukämien	10
1.3 Der NOD/LtSz-scid IL2Rg ^{-/-} (NSG) Mausstamm	12
Entwicklung des NOD/SCID Mausstamms	12
Einführung der IL2Rg-Mutation in den NOD/SCID Mausstamm	13
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit	14
2 Material und Methoden.....	15
2.1 Material	15
Chemikalien und Reagenzien.....	15
Anti-humane Antikörper	16
Puffer	18
Medien und Zelllinien.....	18
Versuchstiere.....	19
2.2 Methoden.....	20
Zellzahlbestimmung.....	20
Transplantation von peripher mobilisierten Blutstammzellen (PBSCs) in NSG-Mäuse	20
Induktion von Spender-spezifischen NK Zellen in NSG-Mäusen.....	21
<i>In vivo</i> Stimulation von CD16 ⁺ KIR ⁺ NK Zellen mit IL15/IL15R α oder K562-mbIL-15-41BBL Zellen	22
Etablierung eines Patienten-spezifischen Leukämiemodells in der NSG-Maus.....	23
Graft versus Leukemia-Versuch in humanisierten NSG-Mäusen	27

3	Ergebnisse	28
3.1	Induktion einer NK Zellreifung im NSG-Mausmodell.....	28
	Die funktionelle Reifung von NK Zellen mit IL15/IL15R α Komplex ist im NSG-Mausmodell möglich.....	29
	Eine Induktion der NK Zellen mittels K562-mbIL-15-41BBL-Zellen gelingt nicht	31
3.2	Leukämieinduktion im NSG-Mausmodell	34
	Patienten-spezifische AML, BCP-ALL und T-ALL Zellen engraften in NSG-Mäusen	34
	NSG-generierte Blasten entsprechen in ihrem Genexpressionsmuster den humanen Vergleichsproben	37
	NSG-generierte Blasten und humane Blasten besitzen vergleichbare immunologische, genetische und chromosomale Charakteristika.....	39
3.3	Nach Injektion leukämischer Zellen in huNSG-Mäuse kommt es zu Graft-vs.-Leukemia-Effekten bei definierten KIR-KIRL- Konstellationen	41
4	Diskussion	47
4.1	IL15/IL15R α induziert reife NK Zellen aus peripher mobilisierten Blutstammzellen im NSG-Mausmodell.....	47
4.2	Patienten-spezifische Leukämieinduktion ist in NSG-Mäusen möglich....	52
4.3	Bei einem KIR-KIRL Mismatch zeigt sich ein gesteigerter GvL-Effekt im NSG-Mausmodell.....	54
5	Zusammenfassung	56
	Literaturverzeichnis	58
	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	69
	Anhang.....	72
	Danksagung	77

Abkürzungsverzeichnis

ADCC	Antibody dependent cellular cytotoxicity (Antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität)
AML	Akute myeloische Leukämie
BCP-ALL	B cell precursor acute lymphatic leukemia (Vorläufer-B Zell ALL)
CD	Cluster of differentiation
cGy	Centigray
CMV	Cytomegalivirus
CR	Komplette Remission
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
ED	Erstdiagnose
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAB	French-American-British
FACS	Fluorescence-activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
Fc-IL7	Human Fc-Interleukin-7 fusion protein (Humanes Fc-IL7 Fusionsprotein)
FCS	Fetal calf serum (Fötales Kälberserum)
FISH	Fluorescence <i>in situ</i> hybridization (Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung)
GMP	Good manufacturing practice
GvHD	Graft-versus-Host Disease (Graft-versus-Host Erkrankung)
GvL	Graft-versus-Leukemia (Graft-versus-Leukämie Effekt)
HLA	Human leukocyte antigen (Humanes Leukozytenantigen)
HR	Hochrisiko
HSA	Humanes Serumalbumin
HSC	Hematopoetic stem cell (Hämatopoetische Stammzelle)
HSCT	Hematopoetic stem cell transplantation (Hämatopoetische Stammzelltransplantation)
huNSG	Humanisierte NSG (-Maus)
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
IL	Interleukin
IL15	Recombinant Human Interleukin-15 (Rekombiniertes humanes Interleukin 15)

IL15R α	Recombinant Human Interleukin-15 receptor alpha (Rekombinierter humaner Interleukin 15 Rezeptor Alpha)
KIR	Killer Immunglobulin-ähnlicher Rezeptor
KIRL	Killer Immunglobulin-ähnlicher Rezeptorligand
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarkstransplantation
LIC	Leukemia inducing cell (Leukämieinduzierende Zelle)
LK	Lymphknoten
MACS	Magnet activated cell sorting (Magnetische Zellsortierung)
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MR	Mittleres Risiko
MRD	Minimal residual disease (Minimale Resterkrankung)
NK Zelle	Natürliche Killer Zelle
NKT Zelle	Natürliche Killer T Zelle
NOD	Non-Obese diabetic
NSG	NOD/LtSz-scid IL2Rg ^{-/-} (NOD/SCID/gamma)
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell (Periphere Blutlymphozyten)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PBSC	Peripheral blood stem cell (Periphere Blutstammzelle)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
Prkdc	Protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SCID	Severe combined immunodeficiency (Schwerer kombinierter Immundefekt)
SD	Standard deviation (Standardabweichung)
SLT	Secondary lymphoid tissue (Sekundäre lymphatische Organe)
SR	Standardrisiko
T-ALL	Akute lymphatische T Zell-Leukämie
TCR	T Zell Rezeptor
UCB-HSC	Umbilical cord blood hematopoietic stem cell (Hämatopoetische Nabelschnurblutstammzelle)
XSCID	X-linked severe combined immunodeficiency (X-chromosomaler schwerer kombinierter Immundefekt)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Modell der humanen NK Zell Entwicklung	3
Abbildung 2: Common γ chain (γ_c) Zytokin-Rezeptoren und ihre Liganden.....	4
Abbildung 3: Trans-Präsentation von IL15/IL15R α	5
Abbildung 4: Experimenteller Versuchsaufbau: Stammzelltransplantation und Induktion der NK Zellreifung in NSG-Mäusen.....	28
Abbildung 5: Die <i>in vivo</i> Stimulation von huNSG-Mäusen mit IL15/IL15R α induziert die phänotypische Ausreifung der NK Zellen	30
Abbildung 6: In der IL15/IL15R α -Gruppe kann im Verlauf im peripheren Blut der huNSG-Mäuse eine phänotypische Ausreifung der NK Zellen gezeigt werden.....	32
Abbildung 7: In der Organanalyse zeigt sich eine Ausreifung der NK Zellen unter IL15/IL15R α , nicht jedoch unter K562-mbIL-15-41BBL.....	33
Abbildung 8: Unterschiedliche kindliche Leukämien zeigen nach Injektion in NSG-Mäuse ein sehr gutes Engraftment	35
Abbildung 9: Höhe des Engraftments humaner CD45 ⁺ Zellen im zeitlichen Verlauf	36
Abbildung 10: Patientenblasten und ihre Korrelate aus damit transplantierten NSG-Mäusen weisen sehr ähnliche Genexpressionsmuster auf.....	38
Abbildung 11: Experimenteller Plan zur Untersuchung von GvL-Effekten in huNSG-Mäusen in Abhängigkeit bestimmter KIR-KIRL Mismatch bzw. Match Situationen	42
Abbildung 12: KIR-KIRL Match bzw. Mismatch zwischen Stammzellspender und Patient für den GvL-Versuch.....	44
Abbildung 13: Bei KIR-KIRL Mismatch reduziert sich der Blastenanteil, bei KIR-KIRL Match erhöht er sich in der huNSG-Maus	45
Abbildung 14: Nach Normalisierung der Leukämie-spezifischen Kinetik auf die naiven NSG-Mäuse resultiert ein deutlich niedrigerer Blastenanteil in den huNSG-Mäusen bei KIR-KIRL Mismatch als bei KIR-KIRL Match	46

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Chemikalien und Reagenzien.....	15
Tabelle 2:	Verwendete Anti-Humane Antikörper	16
Tabelle 3:	HLA-Status und KIR-KIRL-Zuordnung der Stammzellen und Blasten im oben dargestellten GvL-Versuch.....	43
Tabelle 4:	Patientencharakteristika	73
Tabelle 5:	Ausgewählte Gene für die Genexpressionsanalyse	74
Tabelle 6:	Klassische immunologische Marker kindlicher Leukämien	74
Tabelle 7:	Spezifizierung der KIR-Allele des Stammzellspenders aus dem GvL-Versuch auf DNA-Ebene.....	75
Tabelle 8:	Aktivierende und inhibierende NK Zell Rezeptoren	76

1 Einleitung

1.1 Natürliche Killer Zellen

Zur Abwehr von Krankheiten verfügt das menschliche Immunsystem über zahlreiche Schutzmechanismen, die neben mechanischen und chemischen Barrieren auch zelluläre und humorale Komponenten beinhalten. Klassischerweise wird unterteilt in angeborene (unspezifische) und adaptive (spezifische) Immunabwehr. Zur angeborenen Immunabwehr gehören das Komplementsystem sowie die zelluläre Verteidigung durch Granulozyten, Makrophagen, Monozyten, Dendritische Zellen und Natürliche Killer Zellen (NK Zellen). Sie ist ohne Latenz einsatzbereit und stellt die vorderste Verteidigungslinie dar. Die adaptive Immunabwehr erfolgt durch B und T Zellen, welche mit ihrem Pathogen-spezifischen Rezeptor mit einer Latenz von einigen Tagen bei Erstkontakt die Elimination des Krankheitserregers bewirken. Ihr immunologisches Gedächtnis ermöglicht bei erneutem Kontakt mit dem gleichen Erreger eine deutlich schnellere Reaktion und schwächt damit die Erkrankung erheblich ab oder verhindert sie ganz. NK Zellen sind große granuläre Lymphozyten und wurden 1975 erstmalig in Mäusen von Kiessling und Kollegen als Lymphozyten mit selektiver lytischer Aktivität gegen murine Moloney Leukämiezellen beschrieben und aufgrund ihrer zytotoxischen Eigenschaft als Natürliche Killer Zellen bezeichnet (Kiessling et al., 1975). Mehr als zehn Jahre später wurden NK Zellen als eigenständige Zellreihe der Lymphozyten beschrieben und von der Population der Natürlichen Killer T Zellen (NKT Zellen) abgegrenzt (Lanier et al., 1986). NK Zellen besitzen keinen T Zell Rezeptor (TCR) und sind ohne vorhergehende Sensibilisierung und scheinbar ohne Abhängigkeit von MHC Klasse I-Molekülen in der Lage, Zielzellen zu lysieren (Lanier et al., 1986; Trinchieri, 1989). Das Team um Kärre und Ljunggren konnte später jedoch zeigen, dass NK Zellen auf die Präsenz von MHC Klasse I angewiesen sind. MHC Klasse I-Moleküle eines Individuums inhibieren NK Zellen desselben Individuums und bewirken damit Selbsttoleranz. Fehlt MHC Klasse I auf der Zelloberfläche oder passt es nicht zum Rezeptorrepertoire der NK Zellen („missing self-recognition“) entfällt die Inhibition der NK Zellen und sie werden zytotoxisch gegenüber der nicht

erkannten Zelle (Kärre et al., 1986; Ljunggren et al., 1990; 2007). NK Zellen, die nie MHC Klasse I-Molekülen ausgesetzt waren, zeigen bei späterer Exposition gegenüber MHC Klasse I-defizienten Zielzellen kaum Zytotoxizität. Um diese Zytotoxizität zu erlangen, bedarf es einer Reifung der NK Zellen (Education, Licensing) durch Interaktion mit körpereigenem MHC Klasse I-Molekülen (Anfossi et al., 2006; Yokoyama et al., 2006).

Entwicklung von NK Zellen im menschlichen Organismus

Täglich werden ca. 15×10^6 NK Zellen pro Liter Blut neu gebildet und machen ca. 10 bis 20% der peripheren Blutlymphozyten (PBMC) des Menschen aus. Ihre ungefähre Lebensdauer liegt bei zwei Wochen (Zhang et al., 2007). NK Zellen sind im peripheren Blut und in den allermeisten Organen nachweisbar, darunter primäre und sekundäre lymphatische Organe (SLT) sowie nicht-lymphatische Organe wie Lunge, Leber, Haut, Darm und Uterus (Moffett-King, 2002; Di Santo, 2006; Gregoire et al., 2007). NK Zellen entwickeln sich aus $CD34^+$ hämatopoetischen Stammzellen (HSC), sind $CD3^-$ und $CD56^+$ (Robertson et al., 1990). Das Knochenmark ist der Entwicklungsort für $CD34^+$ HSC und beim erwachsenen Menschen Ausgangspunkt für die Entwicklung aller Blutzellen. Schäden des Knochenmarks führen in Mausmodellen zu qualitativ und quantitativ beeinträchtigten NK Zellen (Haller et al., 1977; Seaman et al., 1978; Kumar et al., 1979). Die genauen Orte und die Sequenz der NK Zell Reifung sind jedoch nicht abschließend geklärt. Eine These ist die intramedulläre Bildung und Reifung. Di Santo und Vosshenrich gelang es drei Entwicklungsschritte zu differenzieren: 1. Zuordnung zur NK Zellreihe, 2. Reifung und 3. funktionelle Kompetenz (Di Santo et al., 2006). Dem gegenüber steht die These der extramedullären Reifung von Vorläuferzellen medullären Ursprungs im Zielorgan. Freud und Kollegen gelang der Nachweis einer HSC Subpopulation ($CD34^+CD45RA^+$) im Knochenmark sowie in geringer Zahl im peripheren Blut und in sehr hoher Zahl in Lymphknoten (LK) und Tonsillen des Menschen. Sie konnten die Ausreifung der NK Zellen über mehrere Stadien im SLT zeigen (Abbildung 1). Der größte Teil der unreiferen $CD56^{hi}CD16^-$ Population verbleibt im LK und macht dort den Hauptteil der NK

Zellen aus. Die reiferen CD56^{lo}CD16⁺ NK Zellen verlassen den LK wieder und machen im peripheren Blut ca. 90% der NK Zellen aus (Ferlazzo et al., 2004; Freud et al., 2006). Eine derartige Reifung medullärer Vorläuferzellen *in situ* ist auch für andere Organe denkbar, bspw. in Uterus, Leber oder Thymus (Moffett-King, 2002; Di Santo et al., 2006).

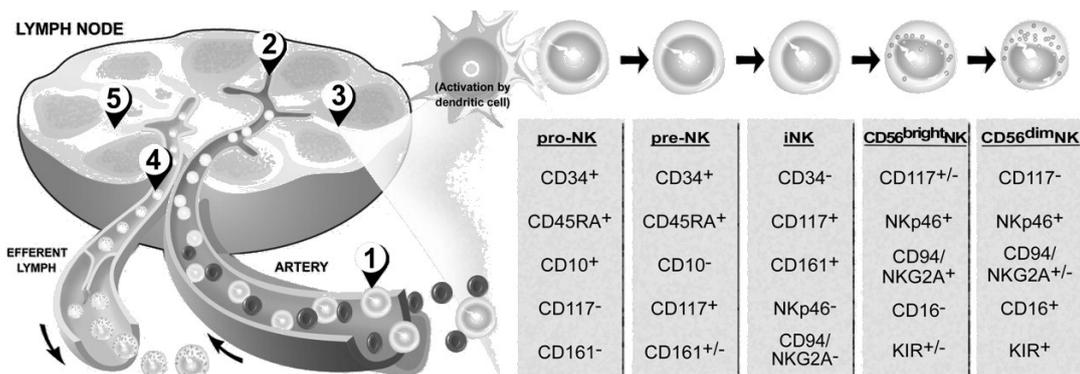


Abbildung 1: Modell der humanen NK Zell Entwicklung

Medulläre CD34⁺CD45RA⁺ HSC zirkulieren in der Blutbahn (1) und verlassen diese in den Lymphknoten (LK) (2). Dort erfolgt die Ausreifeung in Interaktion mit Dendritischen Zellen (3). Ein Großteil der CD56^{lo} Population verlässt den LK über die Lymphe (4), wohingegen die meisten Zellen der CD56^{hi} Population im LK verbleiben (5). Abbildung aus Caligiuri (2008).

Funktion und Differenzierung von NK Zellen

Der Status einer NK Zelle wird über aktivierende und inhibierende Rezeptoren reguliert. Ein Ungleichgewicht mit übermäßiger Aktivierung bewirkt Autoaktivität, wohingegen übermäßige Inhibierung zu mangelnder Reaktivität bei Kontakt mit Zielzellen führt. In der Regel überwiegt das inhibitorische Signal (Selbsttoleranz), wird aber unter pathologischen Bedingungen (Virusinfektion, Malignität usw.) durch verstärkte Aktivierung überschrieben (Biassoni, 2008). Generell verfügt jeder NK Zell-Klon über ein individuelles Rezeptorrepertoire. Welche Rezeptoren eine NK Zelle exprimiert und in welcher Dichte, ist Ausdruck ihrer Differenzierung und wird durch multiple extrinsische und intrinsische Faktoren beeinflusst. Trotz dieser Einmaligkeit jedes NK Zell-Klons ist es jedoch möglich, NK Zellen anhand der Expression bestimmter Rezeptoren bzw. Rezeptorklassen (CD16, Killer Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren (KIR)) in Subpopulationen einzuteilen. Die gängigste Unterteilung wurde bereits angesprochen und beinhaltet die unreifere Population der

CD56^{hi}CD16⁻KIR⁻ NK Zellen, sowie die reifere Population der CD56^{lo}CD16⁺KIR⁺ NK Zellen. Funktionell besteht der Unterschied darin, dass die unreifere CD56^{hi} Population bei schwach ausgeprägter Zytotoxizität in der Lage ist, große Mengen immunregulatorischer Zytokine zu produzieren. Demgegenüber produziert die reifere CD56^{lo} Population kaum Zytokine, weist jedoch eine ausgeprägte Zytotoxizität auf (Cooper et al., 2001; Malhotra et al., 2011). Diese gesteigerte Zytotoxizität wird teilweise antigenabhängig über die sog. Antigen-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) durch CD16 vermittelt. Darüber hinaus ermöglicht die Expression von KIRs in Interaktion mit MHC Klasse I-Molekülen die Reifung (Education) der NK Zelle und steigert dadurch das natürliche Zytotoxizitätspotential (Brodin et al., 2009). Welcher Regulation dieser Prozess der Reifung von CD56^{hi} nach CD56^{lo} im Menschen unterliegt, ist derzeit nicht vollständig bekannt. Der Einfluss von Zytokinen, insbesondere Interleukin-15 (IL15) ist jedoch relevant (Ozdemir et al., 2005; Huntington et al., 2009). IL15 gehört zur Familie der common γ chain Zytokine, deren Rezeptoren als Gemeinsamkeit die gleiche γ_c -Kette haben (Abbildung 2). Die Mitglieder dieser Zytokinfamilie sind alle an der Regulation der Immunantwort sowie der Homöostase der lymphatischen Reihe beteiligt (Rochman et al., 2009). Ein Defekt des Gens der γ -Kette führt beim Menschen zum Krankheitsbild des X-chromosomalen schweren kombinierten Immundefekts (XSCID) (Noguchi et al., 1993). In Mausmodellen führt ein Defekt der murinen γ -Kette ebenfalls zu schweren Immundefiziten und ermöglicht damit die Generierung muriner Xenotransplantationsmodelle, die hochpermissiv für die Transplantation humaner Zellen sind (siehe Kapitel NSG-Mausstamm).

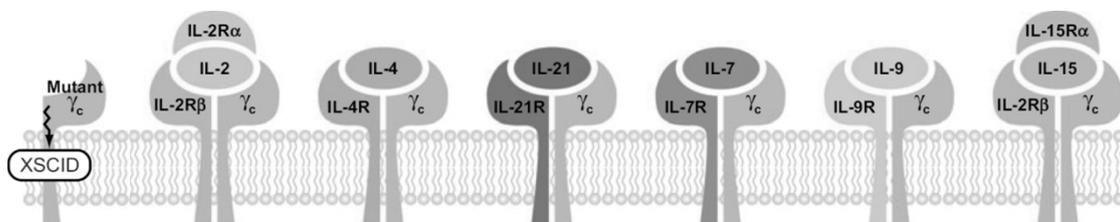


Abbildung 2: Common γ chain (γ_c) Zytokin-Rezeptoren und ihre Liganden

Rezeptoren mit gemeinsamer γ -Kette nehmen durch Bindung gezeigter Interleukine Einfluss auf die Entwicklung und Homöostase der lymphatischen Reihe. IL2 und IL15 teilen sich darüber hinaus die IL2R β -Kette. Beim Menschen führt ein Defekt der γ -Kette zum XSCID (X-linked severe combined immunodeficiency). Abbildung aus Spolski et al. (2008).

Von besonderem Interesse für die NK Zell Entwicklung und Funktion sind die Interleukine IL2, IL7, IL15 und IL21. Neben ihrer Wirkung auf NK Zellen haben diese noch weitere Funktionen, die im Folgenden aber nicht besprochen werden. Für die Homöostase der lymphatischen Reihe ist IL7 verantwortlich (Puel et al., 1998). In humanisierten Mäusen (in dieser Arbeit werden darunter mit humanen Stammzellen transplantierte Mäuse verstanden) kann unter IL7 Gabe ein stabiles Anwachsen humaner Blutstammzellen, insbesondere der T Zellen beobachtet werden (Shultz et al., 2005). Auch NK Zellen sind nachweisbar, diese zeigen jedoch einen funktionellen Entwicklungsstopp (André et al., 2010). IL2 und IL15 haben aufgrund einer weiteren gemeinsamen Kette im Rezeptorkomplex (β - und γ -Kette, Abbildung 2) teilweise ähnliche Funktionen und sind verantwortlich für Proliferation, Reifung und Überleben von NK Zellen (Carson et al., 1997; Waldmann, 2006). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von NK Zellen durch die Kombination IL2/IL15 der alleinigen Stimulation mit IL15 nicht überlegen ist. IL2 hingegen war sowohl IL15 alleine als auch der Kombination IL2/IL15 unterlegen (Ozdemir et al., 2005). Huntington und Kollegen wiesen eine deutlich gesteigerte Wirkung auf die Reifung von NK Zellen durch die Trans-Präsentation von IL15 und der Alpha-Kette des Rezeptorkomplexes (IL15/IL15R α) nach (Abbildung 3). Sie konnten in humanisierten Mäusen zeigen, dass die Gabe von IL15/IL15R α eine Reifung der NK Zellen von CD56^{hi}CD16⁻KIR⁻ über CD56^{lo}CD16⁺KIR⁻ nach CD56^{lo}CD16⁺KIR⁺ bewirkt (Huntington et al., 2009). IL21 ist für die Ko-Stimulation der NK Zell Proliferation verantwortlich und steuert die terminale Differenzierung der durch IL15 stimulierten NK Zellen (Spolski et al., 2008).

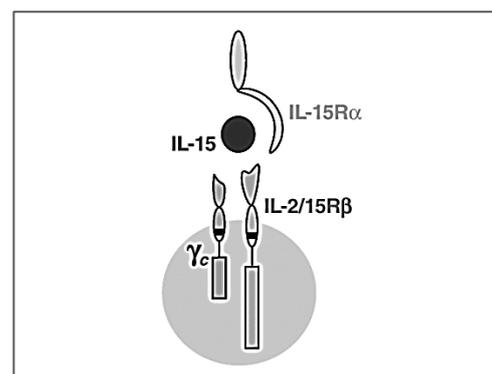


Abbildung 3: Trans-Präsentation von IL15/IL15R α

Die lösliche Form von IL15R α im Komplex mit IL15 bei der Bindung an die Rezeptorkette IL2/IL15 β und die gemeinsame γ -Kette auf einer IL15-abhängigen Zelle. Abbildung modifiziert aus Ma et al. (2006)

Neben Zytokinen kann der Kontakt mit Zielzellen eine NK Zell Aktivierung bewirken. Beispielsweise führt die multipotente erythroleukämische und HLA Klasse I-defiziente Tumorzelllinie K562 bei Kontakt mit NK Zellen zu deren Aktivierung und ausgeprägter Zytotoxizität (Lozzio et al., 1979). Transfektanten dieser Zelllinie können neben dem Auslösen zytotoxischer Reaktionen auch die Reifung und Expansion von NK Zellen *in vitro* beeinflussen. Die K562-mbIL-15-41BBL-Zelllinie wurde mit den Genen für IL15 sowie den Liganden 4-1BBL für den Rezeptor 4-1BB aus der Superfamilie der Tumornekrose-Faktor Rezeptoren transduziert. Beide werden konstitutiv membran-gebunden exprimiert. Der 4-1BB Rezeptor ist auf ruhenden NK Zellen kaum nachweisbar, wird aber durch IL2, IL15 oder CD16 induziert und hat bei Bindung seines Liganden eine aktivierende Wirkung auf den Zellzyklus (Lin et al., 2008; Baessler et al., 2010). In Ko-Kultur mit NK Zellen führt dies zu einer Expansion der NK Zellen bei deutlich gesteigerter Zytotoxizität (Imai et al., 2005). Auf diese Weise expandierte und aktivierte NK Zellen vermitteln nach Injektion in immundefiziente Mäuse anti-leukämische Effekte *in vivo* (Fujisaki et al., 2009).

NK Zell Rezeptoren

NK Zellen verfügen über ein umfangreiches Repertoire an Rezeptoren. Zytokinrezeptoren dienen zur Steuerung von Wachstum und Differenzierung der NK Zellen. Über Adhäsions- und chemotaktische Rezeptoren können NK Zellen Entzündungsherde lokalisieren und erreichen. Die große Anzahl an inhibitorischen und aktivierenden Rezeptoren verhindert Autoreaktivität und ermöglicht sekretorische und zytotoxische Aktivität bei Kontakt mit Zielzellen. Die Erkennung von Zielzellen erfolgt hierbei nicht wie bei T und B Zellen über somatisch rekombinierte Rezeptoren, deren Ligand zum Zeitpunkt der Rekombination noch unbekannt ist, sondern über genetisch determinierte Rezeptoren mit invariabler Spezifität für vorbestimmte Liganden. Das bislang bekannte Repertoire an aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren und ihren Liganden ist in Tabelle 8 im Anhang dargestellt. Im weiteren Verlauf werden nur die Killer Immunglobulin-ähnlichen Rezeptoren (KIR) besprochen.

Die Familie der Killer Immunglobulin-ähnlichen Rezeptoren wurde von Moretta und Kollegen 1990 erstmals beschrieben (Moretta et al., 1990). Diese können nach Bindung ihres Liganden (KIRL) entweder einen aktivierenden oder inhibierenden Einfluss auf die NK Zelle haben. Die KIR-Nomenklatur richtet sich nach dessen Struktur und lässt (mit Ausnahme von KIR2DL4) Rückschlüsse auf seine Funktion zu. Nach der Bezeichnung KIR folgen die Anzahl der Immunglobulin-ähnlichen extrazellulären Domänen (2D oder 3D), sowie die Angabe über die Länge des intrazytoplasmatischen Anteils (L für long, S für short). Rezeptoren mit kurzem intrazytoplasmatischen Anteil vermitteln ein aktivierendes Signal. Rezeptoren mit langem intrazytoplasmatischen Anteil vermitteln ein inhibierendes Signal (Purdy et al., 2009). Das KIR-Repertoire eines Menschen ist hochgradig individuell. Der KIR-Genlocus auf Chromosom 19 beinhaltet je nach Haplotyp (A oder B) 9 bis 14 KIR-Gene, die sich ihrerseits durch zahlreiche Polymorphismen unterscheiden. Die daraus entstehenden Kombinationsmöglichkeiten haben zur Folge, dass unverwandte Individuen in den seltensten Fällen über identische KIR-Genotypen verfügen (Shilling et al., 2002a). Neben Haplotyp und Polymorphismus trägt ein für jeden NK Zell-Klon individuelles Transkriptionsmuster der codierten KIRs zur weiteren Variabilität des KIR-Repertoires bei. In stochastischer Verteilung werden kein, ein oder beide Allele eines KIR-Gens (sofern vorhanden) transkribiert und exprimiert. Dieses Transkriptionsmuster des jeweiligen NK Zell-Klons wird bei weiteren Zellteilungen beibehalten (Valiante et al., 1997; Santourlidis et al., 2002; Chan et al., 2003). Darüber hinaus ist die KIR-Expression eines Individuums durch dessen HLA-Status beeinflusst (Shilling et al., 2002b; Yawata et al., 2006; Middleton et al., 2010). Diese Arbeit beschränkt sich inhaltlich auf inhibitorische KIRs. Zur besseren Lesbarkeit bezieht sich daher die Bezeichnung KIR im Folgenden immer auf inhibitorische KIRs, außer es ist anders angegeben.

Als KIRL wirken Epitope von HLA-Klasse I-Molekülen. Die auf der jeweiligen NK Zelle exprimierten KIRs binden spezifisch an diese HLA-Klasse I-Epitope und vermitteln ein inhibitorisches Signal. Anhand dieser Epitope werden die HLA-Allele verschiedenen Gruppen zugeordnet. Epitope, die als KIRL dienen, sind

die C1 und C2 Epitope auf HLA-C-Molekülen sowie das Bw4 Motiv, welches hauptsächlich auf HLA-B-Molekülen zu finden ist. Das Gegenstück zum Bw4 Motiv ist das Bw6 Motiv, welches kein KIRL ist. Dabei erfolgt die Erkennung des Epitops unabhängig davon, ob die dazugehörige Zelle körpereigen oder körperfremd ist. Fehlt bei vorhandenem KIR das entsprechende HLA-Epitop, führt das Wegfallen des Inhibitionssignals zur Verschiebung des Status der NK Zelle in Richtung Aktivierung und zur Lyse der nicht erkannten Zelle („missing self-recognition“).

Klinische Bedeutung von NK Zellen

NK Zellen haben das Potential Virus-infizierte oder maligne transformierte Zellen zu zerstören. Zahlreiche Studien belegen eine direkte Erkennung von Tumorzellen durch NK Zellen (Cerwenka et al., 2001; Smyth et al., 2002; Moretta et al., 2008). Das damit verbundene Potential von NK Zellen in der Therapie von malignen Erkrankungen ist Gegenstand aktueller Forschung. Insbesondere im Rahmen haploidenter hämatopoetischer Stammzelltransplantationen (HSCT) spielen NK Zellen eine essentielle Rolle in der immunologischen Abwehr verbliebener maligner Zellen im Patienten. Von zentraler Bedeutung sind hierbei die zuvor geschilderten Mechanismen der NK Zell Aktivierung durch KIR-KIRL Interaktion (Velardi et al., 2009). Auf die Rolle von NK Zellen im Rahmen der haploidenten HSCT wird im Kapitel Kindliche Leukämien näher eingegangen.

1.2 Kindliche Leukämien

Akute lymphatische Leukämien (ALL) machen in Deutschland 85% aller kindlichen Leukämien und mit 26,5% gut ein Viertel aller Krebserkrankungen bei Kindern bis 15 Jahren aus. Die ALL hat einen Erkrankungsgipfel bei den 2-3 jährigen. Die Überlebensrate ist mit 89% über 15 Jahre mittlerweile sehr gut. (Kaatsch et al., 2014). Betrachtet man B Zell-ALL (B-ALL) und T Zell-ALL (T-ALL) getrennt, hat die B-ALL, insb. die Vorläufer-B Zell-ALL (BCP-ALL), den weitaus größten Anteil an allen ALL-Erkrankungen und weist daher eine ähnliche Statistik auf. Die seltenere T-ALL hat eine schlechtere Prognose. Die akute myeloische Leukämie (AML) macht die restlichen 15% der kindlichen Leukämien aus. Sie hat mit Überlebensraten von 71% über 15 Jahre eine schlechtere Prognose als die BCP-ALL (Kaatsch et al., 2014). Bei Leukämien kommt es zur malignen Transformation einer Zelle des hämatopoetischen Systems, welche sich daraufhin unkontrolliert klonal vermehrt. Diese leukämischen Zellen (Blasten) führen zur Beeinträchtigung der regulären Hämatopoese und zu den daraus folgenden Störungen. Immunologisch und zytogenetisch können die Linienzugehörigkeit (AML, B-ALL oder T-ALL) und der Differenzierungsgrad sowie genetische Aberrationen bestimmt werden. Aufgrund der Heterogenität von Leukämien ist davon auszugehen, dass keine monokausale Ursache vorliegt, sondern verschiedene Faktoren einwirken müssen. Eine derzeit gängige Theorie geht davon aus, dass die erste Veränderung bereits pränatal (z.B. Translokationen) stattfindet (Greaves, 2006). Diese Prädisposition führt dann postnatal, nach Einwirkung eines oder mehrerer Faktoren zum klinisch apparenten Bild einer Leukämie. Die Diagnose wird durch Untersuchung des Knochenmarks gestellt und die weitere Klassifikation anhand immunologischer und genetischer Merkmale vorgenommen. Wichtig ist die Bestimmung der „minimal residual disease-“ (MRD-) Marker, welche zur Quantifizierung und Klassifizierung der leukämischen Zellen im Patienten dienen. Die Therapie setzt sich aus mehreren Phasen zusammen und ist abhängig von Klassifizierung und Risikoprofil. Hierbei kommt auch die hämatopoetische Stammzelltransplantation zum Einsatz, insbesondere bei bestimmten Subtypen und Risikofaktoren sowie bei Rezidiven.

Die hämatopoetische Stammzelltransplantation bei kindlichen Leukämien

Unter einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSCT) bei Leukämie versteht man die Transfusion fremder humaner (allogener) Blutstammzellen nach (partieller) Zerstörung des Knochenmarks zur Re-Etablierung der Hämatopoese durch die transfundierten Stammzellen. Die Stammzellen werden entweder direkt aus dem Knochenmark entnommen oder nach pharmakologischer Mobilisierung aus dem peripheren Blut gewonnen (peripher mobilisierte Blutstammzellen (PBSC)). Der therapeutische Effekt besteht hierbei weniger in der weitgehenden Ablation des Knochenmarks und der darin enthaltenen malignen Zellklone, sondern vielmehr in einer immunologischen Reaktion der neu entstehenden Lymphozyten des Transplantats gegenüber verbliebenen hämatopoetischen Zellen (inkl. maligner Zellen) des Patienten. Diese Reaktion wird als Graft-versus-Leukemia (GvL)-Effekt bezeichnet und wird durch T und NK Zellen vermittelt (Hallett et al., 2004; Miller et al., 2010). Die immunologische Reaktion der Spender T Zellen kann sich jedoch auch gegen andere Gewebe und Organe richten und zu einer Graft-versus-Host Erkrankung (GvHD) führen. Je mehr sich der HLA-Typ von Spender und Empfänger gleichen, desto geringer ist das Risiko für eine GvHD. Einschränkungen bei HLA-Identer HSCT sind jedoch die schlechte Verfügbarkeit von möglichen Spendern (ca. 30-40% innerhalb der Familie und ca. 70% Fremdspender nach zeitintensiver Suche (Siegmond-Schultze, 2012)) und GvHD aufgrund sogenannter „minor histocompatibility antigens“ die trotz HLA-Übereinstimmung auftreten können (Miller et al., 2010). Um diese Einschränkungen zu umgehen, wird alternativ das Verfahren der haploidenten HSCT durchgeführt, d.h. ein HLA-Allel stimmt überein, das andere Allel jedoch nicht. Damit kann für fast alle Patienten ein Spender gefunden werden. Die größten Probleme sind hierbei ausgeprägte GvHD-Reaktionen oder ein Transplantatversagen (Ruggeri et al., 2006). Um eine GvHD bei haploidenter HSCT zu vermeiden, gibt es verschiedene Ansätze, die größtenteils auf die Elimination reaktiver T Zellen abzielen. Diese stehen damit aber nicht mehr für GvL-Reaktionen zur Verfügung und das Risiko eines Transplantatversagens steigt an. Neben T Zellen können auch NK Zellen ausgeprägte GvL-Effekte

erzielen und durch Transplantation großer Stammzellmengen (Hochdosis-HSCT) kann ein Transplantatversagen verhindert werden (Ruggeri et al., 1999; 2006). Beeinflusst wird die GvL-Aktivität von NK Zellen hauptsächlich durch die KIR/HLA-Interaktion mit Zielzellen (siehe Kapitel Natürliche Killer Zellen). Abhängig davon, ob für die KIRs der Spender NK Zellen passende KIRL im Patienten vorhanden sind, kommt es zu einem KIR-KIRL Match (passender Ligand vorhanden) oder Mismatch (kein passender Ligand vorhanden). Bei einem KIR-KIRL Mismatch entfällt das durch die Bindung eines KIRL vermittelte inhibitorische Signal auf die NK Zelle und die KIRL-defiziente Zelle wird lysiert. Durch einen Mismatch konnten nach HSCT in adulten AML-Patienten (Ruggeri et al., 2002; 2006; Velardi et al., 2009) und für die kindliche AML nach Transplantation haploidenter NK Zellen (Rubnitz et al., 2010) gesteigerte GvL-Effekte durch NK Zellen in Abwesenheit von GvHD-Reaktionen gezeigt werden. Zu beachten ist, dass den Studien von Ruggeri et al. und Velardi et al. das Modell des KIRL-KIRL Mismatches zugrunde lag. Hierbei wurden sowohl beim Empfänger als auch beim Spender lediglich die KIR-Liganden berücksichtigt und nicht der tatsächliche KIR-Status des Spenders. Das Modell des KIRL-KIRL Mismatch zeigte sich jedoch dem des KIR-KIRL Mismatch unterlegen, da die tatsächlichen KIRs eines Spenders nicht immer deckungsgleich mit seinen KIR-Liganden sind (Leung et al., 2004). Für die adulte ALL konnten GvL-Effekte nach haploidenter HSCT im Menschen bislang nicht gezeigt werden. *In vitro* Untersuchungen zeigen jedoch, dass auch bei der häufigsten Form der kindlichen ALL (BCP-ALL) bei einem KIR-KIRL Mismatch stärkere GvL-Reaktionen durch NK Zellen hervorgerufen werden können (Pfeiffer et al., 2007; Feuchtinger et al., 2009).

1.3 Der NOD/LtSz-scid IL2Rg^{-/-} (NSG) Mausstamm

Entwicklung des NOD/SCID Mausstamms

Die ersten immundefizienten Mäuse, die als Xenotransplantationsmodell genutzt wurden, trugen die 1966 erstbeschriebene Nude Mutation (Flanagan, 1966; Faguet et al., 1988). Sehr schlechtes Engraftment xenogener Zellen limitierte jedoch die wissenschaftliche Nutzung. In den 1980er Jahren wurden Mäuse mit einer Mutation des „protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide“ (Prkdc) Gens entwickelt. Diese sind charakterisiert durch einen schweren kombinierten Immundefekt (severe combined immunodeficiency (SCID)), welcher die Reifung von B und T Zellen verhindert und damit auch sämtliche durch diese Zellen vermittelten Funktionen unterbindet (Bosma et al., 1983). Die Kombination des SCID Mausstamms mit dem Non-Obese Diabetic (NOD) Mausstamm zum NOD/SCID Mausstamm in den 1990er Jahren führte durch multiple genetische Immundefekte zu beträchtlich besserem Engraftment humaner Zellen, insbesondere im Vergleich mit immundefizienten Mausstämmen ohne NOD-Hintergrund (Greiner et al., 1995; Larochelle et al., 1996; Hudson et al., 1998; Shultz et al., 1995; 2000). Der NOD Mausstamm ist gekennzeichnet durch gestörte Funktionen der angeborenen Immunität u.a. der NK und T Zellen sowie durch die gestörte Produktion von Zytokinen und Komplementfaktoren (Kataoka et al., 1983; Serreze et al., 1988; Baxter et al., 1993). Als Ursache für das bessere Engraftment bei NOD-Hintergrund wurde ein Polymorphismus des SIRP- α Gens innerhalb des „Insulin-dependent diabetes 13“ (IDD13) Genlokus bei NOD-Mäusen gefunden. Dieser Polymorphismus ermöglicht dem SIRP- α Rezeptor auf murinen Makrophagen die Bindung humaner CD47⁺ Zellen und bewirkt damit eine Inhibition der murinen Makrophagen, was Phagozytose und Zytokinfreisetzung verhindert (Takenaka et al., 2007). Dennoch waren auch bei NOD/SCID-Mäusen die Engraftmentraten aufgrund muriner NK Zellen niedrig und die Lebenszeit der Tiere durch endogene Lymphome deutlich verkürzt (Shultz et al., 2007).

Einführung der IL2Rg-Mutation in den NOD/SCID Mausstamm

Ein Meilenstein im Bereich muriner Xenotransplantationsmodelle war die gezielte Einführung eines Gendefekts der murinen IL2-Rezeptor- γ -Untereinheit (IL2Rg). Die γ -Untereinheit ist Bestandteil zahlreicher Interleukinrezeptoren, welche Interleukine der common γ chain Familie binden können (Abbildung 2). Diese Interleukine sind alle an der Regulation der Immunantwort sowie der Homöostase der lymphatischen Reihe beteiligt (siehe Kapitel Natürliche Killer Zellen). Die Mutation beeinträchtigt B und T Zellen in ihrer Entwicklung und Funktionalität und verhindert gänzlich die Entwicklung von NK Zellen (Cao et al., 1995). Durch Kreuzung dieser IL2Rg-Mutation auf den NOD/SCID Mausstamm entstand ein neuer, hochgradig immundefizienter Mausstamm, der NOD/LtSz-scid IL2Rg^{-/-} (NSG) Mausstamm (Shultz et al., 2005). Dieser NSG-Mausstamm zeichnet sich durch Langlebigkeit der Tiere sowie durch nachhaltig hohe Engraftmentraten sowohl bei HSCT (Shultz et al., 2005) als auch bei Transplantation von ALL und AML aus (Agliano et al., 2008; Sanchez et al., 2009; Taussig et al., 2010). NSG-Mäusen stehen aufgrund genannter Immundefekte kaum mehr Mechanismen der Transplantatabstoßung zur Verfügung. Einschränkungen in Entwicklung und Reifung der transplantierten Zellen durch das fehlende humane Milieu sind jedoch vorhanden. Diese Einschränkungen versucht man durch die exogene Gabe von Zytokinen oder durch transgene Mäuse mit Expression humaner MHC-Moleküle oder Zytokine zu verbessern (Shultz et al., 2007).

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Transplantation humaner Stammzellen (HSCT) stellt bei kindlichen Leukämien eine Therapieoption dar, die bei Rezidiven oder bereits bei Erstdiagnose in Hochrisikogruppen durchgeführt wird. Da sich experimentelle Studien im Rahmen von Stammzelltransplantationen am Patienten aus ethischen Gründen größtenteils verbieten, muss zur detaillierten Erforschung dieser Sachverhalte auf Tiermodelle ausgewichen werden. Der NSG-Mausstamm bietet gute Voraussetzungen sowohl für Engraftment und Differenzierung humaner Stammzellen nach HSCT, als auch für die Leukämieinduktion. Innerhalb der AG André wird der NSG-Mausstamm bereits als Surrogatmodell für die Situation im Patienten verwendet. Defizite zeigen sich jedoch unter anderem in der Ausreifung humaner zytotoxischer NK Zellen. Für andere Mausmodelle war eine Ausreifung der NK Zellen durch die Gabe von IL15 bereits erfolgreich, für den NSG-Mausstamm ist dies jedoch bis dato (03/2016) nicht gezeigt worden. Dementsprechend ist das Ziel dieser Arbeit die Generierung phänotypisch reifer zytotoxischer NK Zellen in humanisierten NSG-Mäusen (huNSG-Mäusen) durch die zusätzliche Gabe von humanem IL15. Des Weiteren sollen vorliegende Daten zur Leukämieinduktion in NSG-Mäusen im Hinblick auf Vergleichbarkeit mit den humanen Originalproben analysiert werden, mit dem Ziel, das bestehende Leukämiemodell zu validieren. Abschließend sollen in huNSG-Mäusen *in vivo* GvL-Effekte der IL15-aktivierten NK Zellen gegenüber leukämischen Zellen untersucht werden. Hierbei soll insbesondere getestet werden, ob sich das Ausmaß der GvL-Reaktion durch gezieltes KIR-KIRL Mismatching zwischen Stammzellen und leukämischen Zellen steigern lässt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Eigenschaft	Hersteller
Biocoll Separating Solution	Dichte: 1.077 g/ml	Biochrom (Berlin, Deutschland)
CD3 MicroBeads		Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)		Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	0,25 mM	Universitätsapotheke Tübingen
Fetal calf serum (FCS)		Biochrom (Berlin, Deutschland)
Human Fc-Interleukin-7 fusion protein (Fc-IL7)		Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Humanes Serumalbumin (HSA)		CSL Behring (Marburg, Deutschland)
L-Glutamin	200 mM	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Lyse Puffer		Universitätsapotheke Tübingen
Penicillin/Streptomycin	10.000 U/ml Penicillin 10.000 µg/ml Streptomycin	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Recombinant Human Interleukin-15 (IL15)		CellGenix (Freiburg, Deutschland)
Recombinant Human Interleukin-15 receptor alpha (IL15Rα)		R&D Systems (Wiesbaden, Deutschland)
RPMI 1640 Medium		Biochrom (Berlin, Deutschland)
Trimethoprim/Sulfamethoxazol (Cotrimk [®])		Ratiopharm (Ulm, Deutschland)
Trypanblau		Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland)

Anti-humane Antikörper

Tabelle 2: Verwendete Anti-Humane Antikörper

Antigen	Farbe	Hersteller	Klon
CD3	APC	ImmunoTools (Friesoythe, Deutschland)	UCHT-1
CD3	PerCP	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)	SK7
CD4	AF700	ExBio Praha (Vestec, Tschechien)	MEM-241
CD4	APC	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)	SK3
CD4	FITC	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)	SK3
CD4	PerCP	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)	SK3
CD5	FITC	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)	L17F12
CD5	PE	DAKO Germany (Hamburg, Deutschland)	DK23
CD7	PE	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)	8H8.1
CD8	APC H7	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)	SK1
CD8	PE	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)	SK1
CD8	PerCP	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)	SK1
CD10	PE	DAKO Germany (Hamburg, Deutschland)	SS2/36
CD13	FITC	DAKO Germany (Hamburg, Deutschland)	WM-47
CD13	PE	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)	L138
CD14	FITC	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)	RMO52
CD15	FITC	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)	MMA
CD16	AF700	ExBio Praha (Vestec, Tschechien)	LNK16
CD16	PE	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)	3G8
CD19	APC	Biolegend (München, Deutschland)	HIB19
CD20	PerCP	Biolegend (München, Deutschland)	2H7
CD31	FITC	AdB Serotec (Düsseldorf, Deutschland)	WM59
CD33	APC	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)	P67.6
CD33	FITC	DAKO Germany (Hamburg, Deutschland)	WM-54
CD33	Pacific Blue	ExBio Praha (Vestec, Tschechien)	HIM3-4
CD33	PE	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)	P67.6
CD34	APC	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)	8G12
CD34	PerCP	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)	8G12
CD38	AF700	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)	HIT2
CD38	PE	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)	HB-7
CD45	APC	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)	HI30
CD45	PECy7	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)	HI30
CD45RA	APC	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)	HI100

Antigen	Farbe	Hersteller	Klon
CD45RO	PE	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)	UCHL1
CD56	APC	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)	B 159
CD56	PE	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)	MY31
CD56	FITC	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)	NCAM16.2
CD58	FITC	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)	AICD58
CD61	FITC	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)	RUU-PL7F12
CD66c	APC	R&D Systems (Wiesbaden, Deutschland)	439424
CD66c	FITC	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)	KOR-SA3544
CD94	FITC	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)	HP-3D9
CD117	APC	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)	A3C6E2
CD135	PE	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)	4G8
CD158a	FITC	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)	HP-3E4
CD158a	PE	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)	EB6B
CD158b	PE	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)	GL183
CD158e	APC	R&D Systems (Wiesbaden, Deutschland)	DX9
CD158e	PE	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)	DX9
CD159a (NKG2A)	PE	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)	Z199
CD235a (Glycophorin A)	PE	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)	11E4B-7-6 (KC16)
CD314 (NKG2D)	APC	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)	BAT221
CD335 (NKp46)	PE	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)	BAB281
CD336 (NKp44)	PE	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)	Z231
CD337 (NKp30)	PE	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)	Z25
HLA-B12	FITC	One Lambda (Montpellier, Frankreich)	H0066
IgG1	APC	ImmunoTools (Friesoythe, Deutschland)	PPV-06
IgG1	FITC	ImmunoTools (Friesoythe, Deutschland)	PPV-06
IgG1	PE	ImmunoTools (Friesoythe, Deutschland)	PPV-06
IgG1	PerCP	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)	X40
IgG2a	AF700	ExBio Praha (Vestec, Tschechien)	PPV-04
IgM	FITC	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)	k.A.

Puffer

FACS-Puffer

Der FACS-Puffer setzt sich wie folgt zusammen:

PBS	500 ml
FCS	2%
EDTA	2 mM (\cong 4,2 ml einer 0,25M Lsg.)

Medien und Zelllinien

RPMI 1640⁺⁺⁺ Medium

Das Medium setzt sich wie folgt zusammen:

RPMI 1640	500 ml
FCS	10%
L-Glutamin	1%
Penicillin/Streptomycin	1%

DMSO Einfriermedium

Das Medium setzt sich wie folgt zusammen:

RPMI 1640	500 ml
HSA	40%
DMSO	10%
FCS	5%
L-Glutamin	0,5%

K562 Zelllinie

Bei der HLA Klasse I defizienten K562 Zelllinie handelt es sich um eine multipotente erythroleukämische Tumorzelllinie. Die Kultivierung erfolgte in RPMI 1640⁺⁺⁺ Medium bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank Heraeus der Marke Heraeus (Thermo Fisher Scientific, Bonn, Deutschland).

K562-mbIL-15-41BBL Zelllinie

Die K562-mbIL-15-41BBL Zelllinie ist die mit IL15 und dem Liganden für den 4-1BB Rezeptor (4-1BBL) transduzierte oben beschriebene K562 Zelllinie. Das konstitutiv exprimierte IL15 und der 4-1BBL werden membrangebunden präsentiert (Imai et al., 2005). Die Kulturbedingungen waren wie oben beschrieben. Die K562-mbIL-15-41BBL-Zellreihe wurde von Dario Campana, Health Science Center Universität Tennessee (mittlerweile National University Cancer Institute, Singapur) und den Abteilungen für Onkologie und Pathologie des St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee zur Verfügung gestellt.

Versuchstiere

Es wurden NOD.Cg-*Prkdc*^{scid}*IL2Rg*^{tm1Wjl}/SzJ Mäuse (NOD/LtSz-scid IL2Rg^{-/-} [NSG]) von The Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) verwendet. Die Haltung der Tiere erfolgte unter spezifiziert pathogenfreien Bedingungen im Tierstall der Unikinderklinik Tübingen. Es wurden dafür keimarme, einzelventilierte Käfige mit Einstreu verwendet. Die Tiere erhielten artgerechtes Futter und beginnend mit der Transplantation Trimethoprim/Sulfamethoxazol (CotrimK[®]) supplementiertes Trinkwasser. Die Genehmigung der Tierversuche erfolgte durch das Regierungspräsidium Stuttgart (Tierschutzanträge K2/07, K4/10 und K1/13). In Deutschland gültige gesetzliche Bestimmungen zur Durchführung von Tierversuchen wurden eingehalten.

2.2 Methoden

Zellzahlbestimmung

Die maschinelle Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit dem Zellzählgerät Cobas Micros OT (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland). Zur Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer wurde die Zellsuspension je nach erwarteter Zellmenge 1:1, 1:10 oder 1:100 mit Trypanblau verdünnt und auf eine Neubauer-Zählkammer aufgebracht. Es wurden die vier großen Eckquadrate ausgezählt. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Zellen pro ml} = \frac{\text{Gezählte lebende Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{4} \times 10^4$$

Transplantation von peripher mobilisierten Blutstammzellen (PBSCs) in NSG-Mäuse

Gewinnung, Aufbereitung und Konservierung von PBSCs

Die Gewinnung, Aufbereitung und Konservierung der Stammzellen wurde von Mitarbeitern des Knochenmarktransplantationslabors (KMT-Labors) unter GMP-Bedingungen (Good Manufacturing Practice-Bedingungen) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um Qualitätssicherungsrichtlinien die sich auf Abläufe und Umgebung bei der Herstellung von Arzneimitteln und Wirkstoffen beziehen. Die Stammzellen wurden mittels magnetaktivierter Zellsortierung (MACS) mit den entsprechenden Kits von Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland) entweder CD34⁺ oder CD133⁺ positiv selektioniert. Ein Bruchteil dieser SC (<5%) wurde, nach entsprechender schriftlicher Aufklärung der Spender und Patienten bzw. deren Erziehungsberechtigten, verwendet, um das hier beschriebene Xenotransplantationsmodell zu etablieren. Ein Ethikvotum zur Verwendung der PBSCs lag vor (Pr.-Nr.: 23/2007 und 199/2010BO1). Die PBSCs wurden entweder sofort transplantiert, oder in DMSO Einfriermedium in den Stickstofftanks der Unikinderklinik unter GMP-Bedingungen kryokonserviert.

Vorbereitung PBSCs und Transplantation in NSG-Mäuse

Die Vorbereitung und Transplantation der Stammzellen geschah durch Labormitarbeiter. Die Stammzellen wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut bis nur noch wenige Eisklumpen vorhanden waren. Die Stammzelllösung wurde mit einer Kanüle in ein 50 ml Falcon überführt, mit eiskaltem, sterilem PBS aufgefüllt und bei 350 G und 4°C für 10 min. abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 15 ml PBS resuspendiert und bei gleicher Einstellung nochmals abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert und die Zellzahl durch Trypanblaufärbung und Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Mäuse wurden im Alter zw. 8 und 12 Wochen vor der Stammzelltransplantation mit 250 cGy (Männchen) bzw. 200 cGy (Weibchen) mit einem ¹³⁷Cs Bestrahlungsgerät (Gammacell® 1000 Elite, MDS Nordion, Fleurus, Belgien) subletal bestrahlt. Vier Stunden später wurden pro Maus 1×10^6 Zellen i.v. in einem Volumen von 200 µl PBS injiziert. Die maximale Kontamination mit T-Zellen (CD3⁺) bzw. NK Zellen (CD56⁺) lag bei 0,2% bzw. 5% pro Maus. Mit Beginn der Transplantation erhielten die Tiere mit Trimethoprim/Sulfamethoxazol (CotrimK®) versetztes Trinkwasser.

Induktion von Spender-spezifischen NK Zellen in NSG-Mäusen

Alle Mäuse erhielten ab Stammzelltransplantation bis zu ihrem Tod wöchentlich 20 µg Fc-IL7 Fusionsprotein i.v. injiziert. Zur Überprüfung, ob sich in den transplantierten Mäusen ein humanes Immunsystem entwickelt, wurde den Tieren im Abstand von 3 bis 4 Wochen in CO₂-Narkose retrobulbär ca. 200 µl Blut entnommen. Die Injektionen und die Blutabnahmen erfolgten durch entsprechend ausgebildete Labormitarbeiter. Das entnommene Blut wurde mit 5 ml Lyse Puffer für 7 min. lysiert. Durch Zugabe von 5 ml PBS und abzentrifugieren für 3 min. bei 4°C und 350 G wurde die Lyse gestoppt. Nach Abkippen des Überstands wurde das Zellpellet mit 10 ml PBS gewaschen (3 min. bei 4°C und 350 G). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in der Restflüssigkeit resuspendiert und auf eine 96-Well Platte überführt. Die Zellsuspension wurde mit 100 µl FACS-Puffer gewaschen (3 min. bei 4°C und 350 G) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 50 µl

Antikörpercocktail (FACS-Puffer versetzt mit mehreren, unterschiedlich fluoreszierenden Antikörpern in entsprechender Verdünnung) resuspendiert und für 20 min. bei 4°C unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurde die Probe zweimal mit FACS-Puffer gewaschen, in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen, mit einem LSRII Durchflusszytometer und der Software FACSDiva (Version 6.1.2) analysiert und ausgewertet (beides BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland).

***In vivo* Stimulation von CD16⁺KIR⁺ NK Zellen mit IL15/IL15R α oder K562-mbIL-15-41BBL Zellen**

Die Transplantation der PBSCs in die Mäuse, die Induktion Spender-spezifischer NK Zellen sowie die Kontrolle des Engraftments wurde wie oben beschrieben durchgeführt. In Woche 12 nach Transplantation wurde je nach Versuchsgruppe die Behandlung mit PBS, IL15 oder K562-mbIL-15-41BBL Zellen begonnen. An Tag 0, 5 und 10 erhielten die Tiere 2,5 µg IL15 + 7,5 µg IL15R α i.p. (IL15-Gruppe) oder 5×10^6 K562-mbIL-15-41BBL Zellen, bestrahlt mit 30 Gy, in 125 µl PBS i.v. (K562-mbIL-15-41BBL-Gruppe). Die Kontrollgruppe erhielt 125 µl PBS i.p. an genannten Tagen. An Tag 0, 5 und 10 erfolgte eine retrobulbäre Blutentnahme und an Tag 15 wurden die Mäuse zur Organanalyse getötet. Die Injektionen und Blutentnahmen sowie das Töten der Tiere mittels CO₂ und die Organentnahmen wurden durch autorisiertes Personal durchgeführt. Entnommen wurden Leber, Milz, Knochenmark und Thymus. Das Knochenmark wurde aus beiden Oberschenkelknochen mit einer Kanüle mit kaltem PBS ausgespült. Alle entnommenen Organe wurden durch ein Zellsieb gedrückt und in kaltem PBS aufgenommen. Die Zellsuspension wurde für 10 min. bei 4°C und 350 G abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in der Restflüssigkeit resuspendiert. Die Zellsuspension wurde erneut mit 10 ml PBS gewaschen (10 min. bei 4°C und 350 G). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml PBS zur Zellzahlbestimmung resuspendiert. 50 bis 100 µl der Zellsuspension wurden entnommen und auf eine 96-Well Platte überführt. Die Zellsuspension wurde mit 100 µl FACS-Puffer gewaschen (3 min. bei 4°C und 350 G) und der

Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 50 µl Antikörpercocktail resuspendiert und für 20 min. bei 4°C unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurde die Probe zweimal mit FACS-Puffer gewaschen, in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen, mit einem LSRII Durchflusszytometer und der Software FACSDiva (Version 6.1.2) analysiert und ausgewertet (beides BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland).

Etablierung eines Patienten-spezifischen Leukämiemodells in der NSG-Maus

Gewinnung, Aufbereitung und Konservierung von leukämischen Zellen

Die Arbeitsschritte (Blutentnahme, Knochenmarksentnahme) zur Gewinnung von leukämischen Zellen (Blasten) für klinisch-diagnostische Zwecke wurden von Klinikpersonal durchgeführt. Entsprechend des von der Ethikkommission der Universität Tübingen genehmigten Vorgehens (Pr.-Nr.: 23/2007 und 199/2010BO1) erklärten sich die Patienten bzw. deren Erziehungsberechtigte nach entsprechender schriftlicher Aufklärung damit einverstanden, einen Teil der Blasten für Forschungszwecke freizugeben. Es wurden Zellen von Kindern mit BCP-ALL, T-ALL oder AML verwendet. Alle Patienten wurden nach dem ALL-BFM-2000 Protokoll oder dem AML-BFM-2004 Protokoll behandelt. Die Blasten wurden unmittelbar nach Entnahme frisch in NSG-Mäuse transplantiert oder in DMSO Einfriermedium in den Stickstofftanks der Unikinderklinik kryokonserviert. Bei einem T-Zellanteil >10% wurden CD3⁺ T-Zellen zur Reduzierung des Risikos einer GvHD mittels CD3 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) depletiert. Eine Übersicht der in diese Studie eingeschlossenen Patienten findet sich in Tabelle 4 im Anhang. Teile des obigen Abschnitts wurden aus Rohentwürfen der Publikation Woiterski et al. (2013) übersetzt und übernommen.

Leukämieinduktion in NSG-Mäusen und Monitoring des Engraftments

Je nach Art der Leukämie wurden $0,1-10 \times 10^6$ Blasten in 8-12 Wochen alte unbestrahlte Mäuse i.v. injiziert. Die Tiere erhielten mit Beginn der

Leukämieinduktion mit Trimethoprim/Sulfamethoxazol (CotrimK[®]) versetztes Trinkwasser. Bei der Transplantation von kryokonservierten Blasten verlief die Vorbereitung der Zellen analog zur Vorbereitung von PBSCs (s.o.). Ab Woche 8 nach Transplantation wurde den Tieren alle 2 Wochen retrobulbär Blut entnommen und durchflusszytometrisch analysiert. Hierbei wurden unter anderem die für die entsprechende Leukämie der jeweiligen Probe typischen Antigene angefärbt, um das Engraftment und den Phänotyp zu bestimmen. Wenn sich 20 Wochen nach Transplantation ein Anteil von weniger als 0,3% CD45⁺ humaner Zellen im peripheren Blut zeigte, wurde die Leukämie als „nicht angewachsen“ („not engrafted“) bewertet. Wenn der Gehalt humaner CD45⁺ Zellen 60% überschritt oder die Tiere Zeichen einer konsumierenden Erkrankung zeigten (Schwäche, Gewichtsverlust > 10%, struppiges Fell, gekrümmte Haltung usw.) wurden die Tiere getötet, analysiert und ggf. die Blasten in nachfolgende Mausgenerationen retransplantiert. Hierbei wurden 0,1-1 x 10⁶ Blasten aus Milz und Knochenmark retransplantiert um das Vorhandensein Leukämie-induzierender Stammzellen (LICs) nachzuweisen. Proben aller Organe wurden zur weiteren Analyse bei -80°C eingelagert. Die Injektionen, Blut- und Organentnahmen sowie die weitere Verarbeitung und Analyse verliefen analog zum Vorgehen bei Transplantation von PBSCs (s.o.). Die Phänotypisierung der Leukämie aus Mausproben erfolgte durch das entsprechende Labor der Universitätskinderklinik Tübingen. Teile des obigen Abschnitts wurden aus Rohentwürfen der Publikation Woiterski et al. (2013) übersetzt und übernommen.

Genexpressionsanalyse

„Es wurden die Proben von je drei Patienten mit BCP-ALL (Nr. P3B, P7E und P21S in Tabelle 4 im Anhang), T-ALL (Nr. P15M, P16P und P20S in Tabelle 4 im Anhang) und AML (Nr. P12K, P17R und P18R in Tabelle 4 im Anhang) zum Zeitpunkt der Erstdiagnose zusammen mit Patienten-spezifischen, nach der zweiten Re-Transplantation aus Knochenmark von NSG-Mäusen gewonnenen Blasten (Engraftment > 90%) mittels Human Gene Array 1.0 ST (Affymetrix, Santa Clara, USA) analysiert. Da sich gezeigt hat, dass das Expressionsmuster

durch die Anwesenheit von murinen Zellen bei > 90% humaner Zellen nicht beeinflusst wird (Samuels et al., 2010), wurden alle aus den NSG-Mäusen gewonnenen Knochenmarkszellen zur RNA-Isolation verwendet. Die gesamte RNA-Extraktion wurde mittels RNeasy Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Die Zusammenfassung der gemessenen Werte wurde mit der Affymetrix Expression Console 1.1 (Affymetrix, Santa Clara, USA) erstellt. Eine mindestens 1,5-fache Änderung der Expressionsrate und ein mittels Welch's t-Test ermittelter p-Wert unter 0,05 wurden, zur Identifikation der Gene für die eine signifikante Veränderung der Expressionsrate zwischen humaner und muriner Probe vorlag, als Grenzwert festgelegt. Verwendet wurde hierfür die Software Genespring 11.01 (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland). Biologische Abläufe, Signalwege und ausgewählte Genefunktionen wurden mit der Ingenuity Pathways Analysis Software (Ingenuity Systems, Redwood City, USA) verglichen. Heatmaps und Clusteranalysen wurden mit Hilfe der Bioconductor packages *gplot* und *geneplotter* (www.bioconductor.org) in R-2.14.0 (www.r-project.org) generiert. Die normalisierten Signalintensitäten wurden pro Gen skaliert und der euklidische Abstand wurde berechnet. Dendogramme wurden mittels *complete* bzw. *average-linkage* Verfahren gezeichnet. Die Rohdaten wurden bei NCBI Gene Expression Omnibus (Nr.: GSE26268 und GSE35504) hinterlegt.“ Der obige Abschnitt wurde aus Rohentwürfen der Publikation Woiterski et al. (2013) übersetzt und übernommen. Die Genexpressionsanalyse wurde durch die Microarray Facility der Abteilung für Medizinische Genetik an der Universität Tübingen durchgeführt.

Minimal Residual Disease (MRD) Quantifizierung

„DNA-Proben von zehn pädiatrischen Patienten mit Diagnose BCP-ALL (Nr. P2A, P3B, P8F, P9G, P10G, P13K, P14K, P19S, P21S und P22S aus Tabelle 4 im Anhang) wurden mittels PCR-Amplifikation unter Verwendung bereits beschriebener Primer-Sets (Conter et al., 2010) gescreent. Die junktionalen Regionen der geklonten PCR-Produkte wurden sequenziert und daraus Patienten-spezifische Sequenzen als potentielle MRD-Ziele wie zuvor

beschrieben (Flohr et al., 2008) identifiziert. Diese MRD-Ziele wurden auf Spezifität und Sensitivität überprüft, um zwei Ziele auszuwählen, die mindestens eine Sensitivität von 10^{-4} und einen quantitativen Range von mindestens 10^{-4} für das eine Ziel und 10^{-5} für das andere Ziel aufwiesen. Die Real-Time-quantitative-PCR-Analyse (RTq-PCR-Analyse) wurde nach den in der European Study Group for MRD detection in ALL (ESG-MRD-ALL) entwickelten Leitlinien durchgeführt und interpretiert (van der Velden et al., 2007).“ Der obige Abschnitt wurde aus Rohentwürfen der Publikation Woiterski et al. (2013) übersetzt und übernommen. Die Analyse wurde durch die Kinderklinik der Universitätsklinik Schleswig-Holstein, Campus Kiel durchgeführt.

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)-Analyse

„Es wurden folgende Sonden (Abbott, Wiesbaden, Deutschland) verwendet:

- LSI MLL Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe
- LSI TEL/AML1 ES Dual Color Translocation Probe Set
- LSI D7S486 (7q31) SpectrumOrange / CEP 7 SpectrumGreen Probe Set
- LSI EGR1 (5q31) SpectrumOrange / D5S23, D5S721 SpectrumGreen Probe Set

Die Proben von drei Patienten (Nr. P9G, P12K und P23T aus Tabelle 4 im Anhang) wurden 5 Minuten mit einer Pepsinlösung inkubiert (50 µg Pepsin/ml und 0,01M HCl bei pH 2,3 und 37°C). Anschließend wurden sie mit PBS gewaschen und für 10 Minuten bei 4°C mit 4%igem Formaldehyd fixiert. Nach zwei weiteren Waschvorgängen mit PBS wurden sie mit Alkohol in aufsteigender Konzentration (70, 90 und 100% Ethanol) dehydriert. Die luftgetrockneten Proben sowie die Sonden wurden für 8 Minuten auf einem 78°C warmen Heizblock parallel denaturiert und anschließend in einem 37° warmen Brutschrank über Nacht hybridisiert. Die darauf folgenden Waschvorgänge und die Analyse der Zellen wurden wie bereits beschrieben (Hotfilder et al., 2005) durchgeführt. In allen Fällen wurden mehr als 200 Zellkerne analysiert.“ Der obige Abschnitt wurde aus Rohentwürfen der Publikation Woiterski et al. (2013) übersetzt und übernommen. Die Analyse

wurde durch das Onkogenetische Labor der Abteilung für Kinderhämатologie und Onkologie der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt.

Graft versus Leukemia-Versuch in humanisierten NSG-Mäusen

Um NK Zell vermittelte Graft-vs.-Leukemia (GvL) Effekte zu untersuchen, wurden anhand der HLA-Klasse I Typisierung individuelle Paare aus PBSC und Patientenblasten gebildet, die entweder einen KIR-KIRL Match oder Mismatch aufwiesen. Die entsprechenden Spenderstammzellen wurden wie oben beschrieben in NSG-Mäuse transplantiert und 12 bis 20 Wochen nach Transplantation mit IL15/IL15R α aktiviert. Die bei -80°C eingelagerten NSG-gewonnenen primären leukämischen Zellen eines Patienten mit KIR-KIRL Match (Nr. P23T in Tabelle 4 im Anhang) und eines Patienten mit KIR-KIRL Mismatch (Nr. P3B in Tabelle 4 im Anhang) wurden nach oben beschriebenem Vorgehen aufgetaut, gewaschen und der prozentuale Anteil lebender Zellen mittels Trypanblaumethode bestimmt. Jeweils 3×10^6 lebende Zellen der jeweiligen Leukämie wurden gemischt und in zuvor humanisierte NSG-Mäuse (huNSG-Mäuse) und naive Kontrollmäuse i.v. injiziert. 20 Stunden nach der Injektion der Blasten wurde der Anteil der noch lebenden Blasten in Knochenmark und Milz mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Größe der Blastenpopulation der jeweiligen Leukämie aus den huNSG-Mäusen wurde dann auf ihre korrespondierende Blastenpopulation in den Kontrollmäusen normalisiert. Die Durchführung dieser Versuche erfolgte durch Mitarbeiter der AG André. Teile des obigen Abschnitts wurden aus Rohentwürfen der Publikation Kübler et al. (2014) übersetzt und übernommen.

3 Ergebnisse

3.1 Induktion einer NK Zellreifung im NSG-Mausmodell

Um dem Ziel eines Transplantationsmodells mit funktionsfähigem humanen Immunsystems näher zu kommen, soll in dieser Arbeit die Reifung humaner NK Zellen aus CD34⁺ PBMCs unter dem Einfluss von IL15 im NSG-Mausstamm validiert werden. Nach HSCT der NSG-Mäuse mittels oben beschriebener Methode, wurden die NK Zellen auf zwei unterschiedliche Arten mit IL15 stimuliert und anschließend die Expression bestimmter Oberflächenmarker durchflusszytometrisch gemessen (Abbildung 4). Die Expression von CD16 sowie der KIRs 2DL1 (CD158a), 2DL2/DL3 (CD158b) und 3DL1 (CD158e) auf der Zelloberfläche zeigen eine Reifung der NK Zellen.

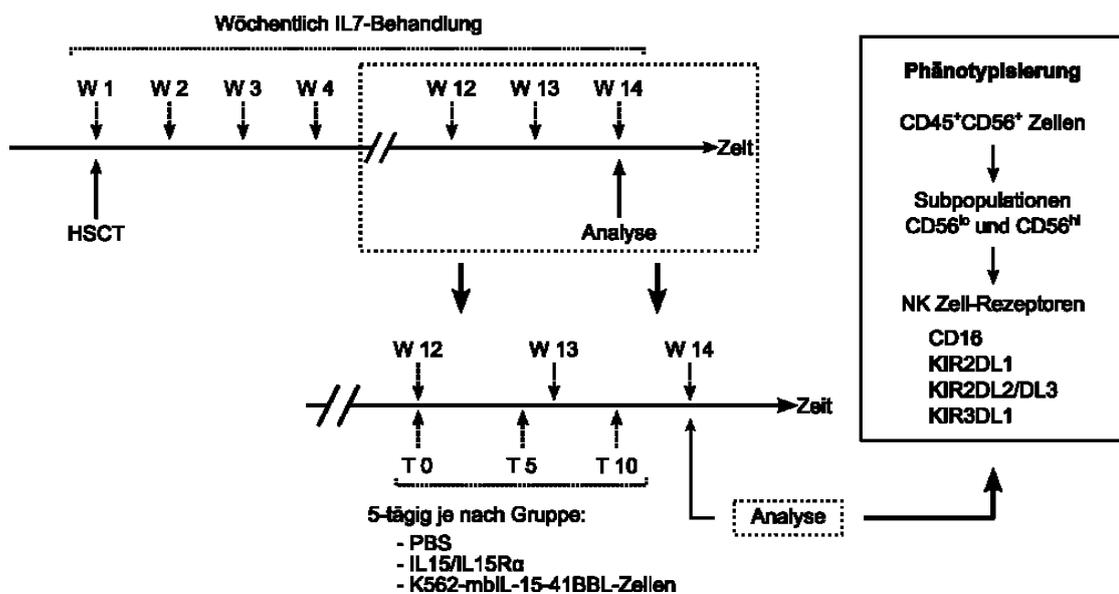


Abbildung 4: Experimenteller Versuchsaufbau: Stammzelltransplantation und Induktion der NK Zellreifung in NSG-Mäusen

Die HSCT erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben. Ab der 1. Woche nach Transplantation wurde den NSG-Mäusen im wöchentlichen Abstand Fc-IL7 Fusionsprotein i.v. verabreicht (W1 bis W14). Ab Woche 12 wurden an Tag 0, 5 und 10 entweder IL15/IL15R α , bestrahlte K562-mbIL-15-41BBL Zellen oder PBS injiziert. Blutentnahme zur Dokumentation der NK Zell Differenzierung und Reifung wurden an den Tagen 0, 5 und 10 jeweils vor den Injektionen durchgeführt. An Tag 15 erfolgte die Tötung der huNSG-Mäuse zur Organanalyse. Sowohl Blut als auch Organe wurden durchflusszytometrisch auf dargestellte phänotypische Merkmale untersucht (Kasten rechts).

Die funktionelle Reifung von NK Zellen mit IL15/IL15R α Komplex ist im NSG-Mausmodell möglich

Im diesem Versuchsteil wurde untersucht, ob die Verabreichung des Komplexes von IL15 zusammen mit seinem Rezeptor IL15R α (IL15/IL15R α) zur phänotypischen Ausreifung der humanen NK Zellen führt. Die huNSG-Mäuse (n=6 in drei Versuchsreihen) bekamen ab Woche 12 nach Stammzelltransplantation IL15/IL15R α verabreicht und zeigten im Verlauf im peripheren Blut sowohl eine Zunahme der CD45⁺CD56⁺ Zellen, als auch der phänotypisch reiferen CD56^{lo}CD16⁺KIR⁺ NK Zell-Subpopulation (Abbildung 5 und Abbildung 6). Im Gegenzug dazu nahm die Subpopulation der phänotypisch unreiferen NK Zellen (CD56^{hi}CD16⁻KIR⁻) ab. Auch in der abschließenden Organanalyse zeigte sich ein Anstieg der CD45⁺CD56⁺ Zellen vor allem in Knochenmark (KM) und Milz. Ein Anstieg der phänotypisch reiferen CD56^{lo}CD16⁺KIR⁺ NK Zell-Subpopulation konnte für Milz und Leber gemessen werden (Abbildung 7). Eine Reifung der NK Zellen mittels IL15/IL15R α ist in huNSG-Mäusen somit möglich.

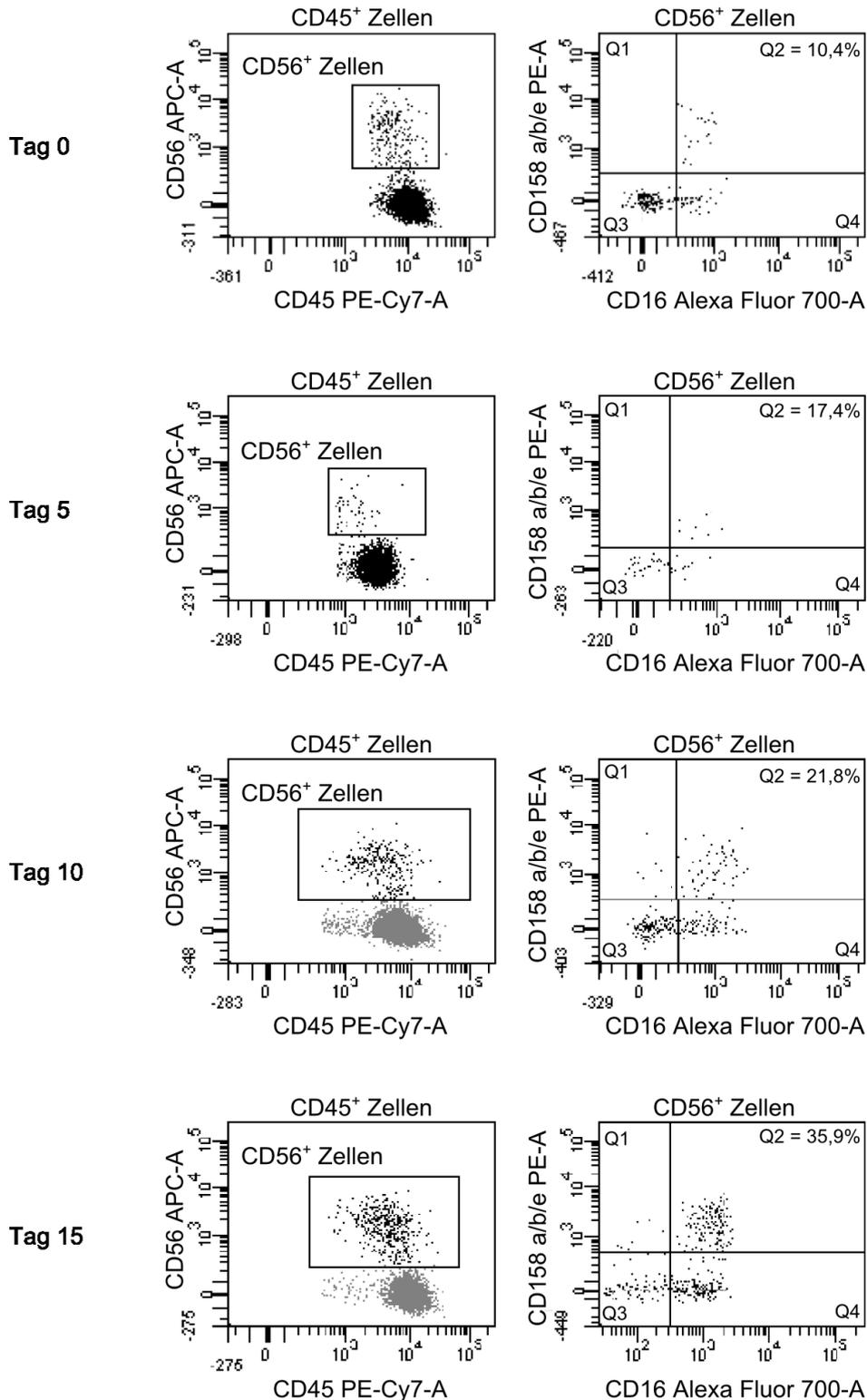


Abbildung 5: Die *in vivo* Stimulation von huNSG-Mäusen mit IL15/IL15R α induziert die phänotypische Ausreifung der NK Zellen

Die durchflusszytometrische Analyse von peripherem Blut an Tag 0, 5, 10 und 15 unter der Behandlung mit IL15/IL15R α zeigt im Verlauf eine Akquisition von CD16 und KIR innerhalb der CD56^{lo} Population (rechte Spalte, Quadrant Q2). In der linken Spalte ist die Auswahl der CD56⁺ Population innerhalb der CD45⁺ Zellen gezeigt (n=6 huNSG-Mäuse in drei Versuchsreihen).

Eine Induktion der NK Zellen mittels K562-mbIL-15-41BBL-Zellen gelingt nicht

Analog zum Versuch der NK Zellaktivierung mittels IL15/IL15R α wurden NSG-Mäuse mit humanen Stammzellen transplantiert. Die Exposition der NK Zellen gegenüber IL15 erfolgte jetzt mittels der HLA Klasse I defizienten K562-mbIL-15-41BBL-Zelllinie. Für diese Zelllinie wurde bereits ein stimulierender Effekt auf Zellzyklus, Reifung und Zytotoxizität von NK Zellen *in vitro* beschrieben (Imai et al., 2005). Auch konnten *in vivo* anti-leukämische Effekte durch Injektion derart stimulierter NK Zellen in NSG-Mäuse erzielt werden (Fujisaki et al., 2009). Es zeigte sich im peripheren Blut eine geringere Zunahme der CD45⁺CD56⁺ Zellen als nach IL15/IL15R α Exposition sowie, bezogen auf die NK Zell-Subpopulationen, keine vermehrte Reifung (Abbildung 6). In der Analyse der huNSG-Mäuse zeigte sich in keinem der Organe eine wesentliche Zunahme der phänotypisch reiferen CD56^{lo}CD16⁺KIR⁺ NK Zell-Subpopulation (Abbildung 7). Eine Reifung der NK Zellen mittels K562-mbIL-15-41BBL-Zellen gelingt in huNSG-Mäusen nicht.

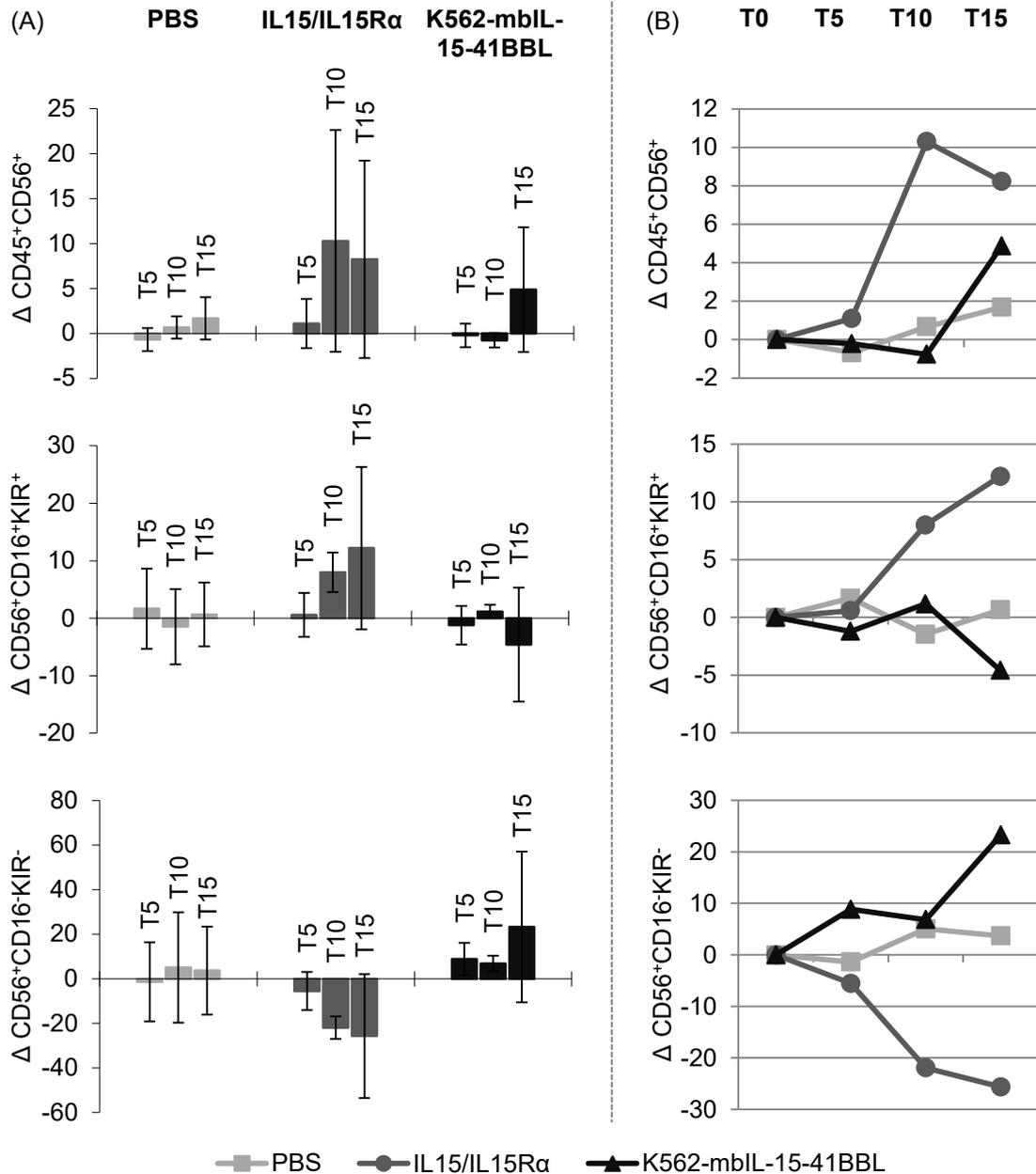


Abbildung 6: In der IL15/IL15Rα-Gruppe kann im Verlauf im peripheren Blut der huNSG-Mäuse eine phänotypische Ausreifung der NK Zellen gezeigt werden

Dargestellt ist die Veränderung der jeweiligen Population (CD45⁺CD56⁺, CD56⁺CD16⁺KIR⁺ und CD56⁺CD16⁻KIR⁻) in Prozentpunkten und normalisiert auf Tag 0. (A) zeigt die Gliederung nach Versuchsgruppe, (B) den Verlauf über die Tage 5, 10 und 15 im peripheren Blut von huNSG-Mäusen. Für die IL15/IL15Rα-Gruppe ist eine phänotypische Ausreifung der NK Zellen, im Gegensatz zur K562-mbIL-15-41BBL-Gruppe, nachweisbar (T=Tag; n=6 huNSG-Mäuse pro Versuchsgruppe).

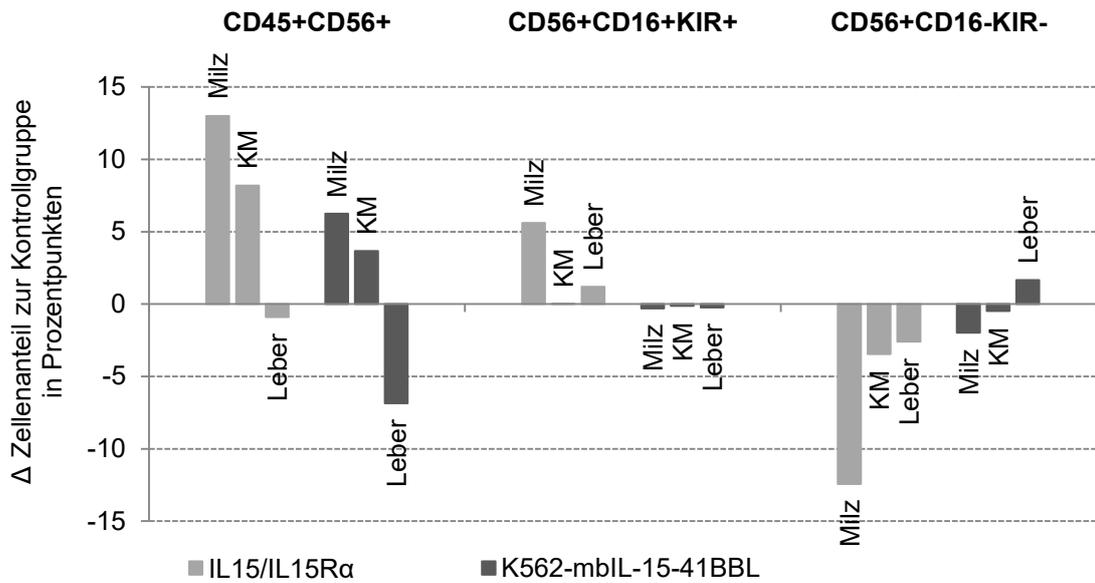


Abbildung 7: In der Organanalyse zeigt sich eine Ausreifung der NK Zellen unter IL15/IL15R α , nicht jedoch unter K562-mbIL-15-41BBL

Dargestellt ist die Differenz des Zellanteils der jeweiligen Population (CD45⁺CD56⁺, CD56⁺CD16⁺KIR⁺ oder CD56⁺CD16⁻KIR⁻) der Versuchsgruppen IL15/IL15R α und K562-mbIL-15-41BBL zur Kontrollgruppe PBS in Prozentpunkten an Tag 15 (n=6 huNSG-Mäuse pro Versuchsgruppe). Eine Reifung für die IL15/IL15R α -Gruppe kann gezeigt werden, für die K562-mbIL-15-41BBL-Gruppe nicht.

Eine phänotypische Reifung der NK Zellen in huNSG-Mäusen ist durch Gabe von IL15/IL15R α möglich. Eine Reifung mittels K562-mbIL-15-41BBL-Zellen gelingt nicht.

3.2 Leukämieinduktion im NSG-Mausmodell

Ein Transplantationsmodell, welches neben dem Engraftment eines humanen Spender-spezifischen Immunsystems auch die Induktion Patientenspezifischer Leukämien zulässt, ermöglicht die Untersuchung Patientenspender-spezifischer Transplantationssettings *in vivo*. Für das NSG-Mausmodell konnten bereits sehr hohe Engraftmentraten bei Induktion patientenspezifischer Leukämien gezeigt werden (Agliano et al., 2008; Sanchez et al., 2009). Es gibt bislang jedoch kaum fundierte Daten über die Vergleichbarkeit patientengewonnener Blasten und NSG-generierter Blasten desselben Patienten. Um dies zu untersuchen wurden durch die AG André Blasten von 24 verschiedenen Patienten (siehe Tabelle 4 im Anhang) in NSG-Mäuse injiziert und deren Wachstumskinetik untersucht. Im Weiteren wurden Blastenproben (human und NSG-generiert) von 9 der 24 Leukämien einer Genexpressionsanalyse unterzogen. Die Gesamtheit der hier dargestellten sowie weiterer vergleichender Analysen zum Phänotyp, zur MRD-Markerexpression und zu chromosomalen Aberrationen dieser Leukämien liegen in publizierter Form vor (Woiterski et al., 2013). Sie werden mit Erlaubnis als Ergänzung zu den eigenen Ergebnissen dargestellt und sind als solche gekennzeichnet.

Patientenspezifische AML, BCP-ALL und T-ALL Zellen engraften in NSG-Mäusen

Es wurden 4 verschiedene AMLs in insgesamt 29 NSG-Mäuse, 16 verschiedene BCP-ALLs in insgesamt 116 NSG-Mäuse und 4 verschiedene T-ALLs in insgesamt 34 NSG-Mäuse injiziert (Patientendaten mit Spezifizierung der Leukämien siehe Tabelle 4 im Anhang). Ein Anteil humaner CD45⁺ Zellen von $\geq 0,3\%$ innerhalb von 20 Wochen wurde als „Engraftment“ gewertet. Nach diesen Kriterien wiesen für die AML 26 der 29 NSG-Mäuse (90%) ein Engraftment auf. Für die BCP-ALL waren es 100 von 116 NSG-Mäusen (86%) und für die T-ALL 31 von 34 NSG-Mäusen (91%) (Abbildung 8). Auch zeigte sich für alle drei Leukämierihen eine ähnliche zeitliche Dynamik. So lag die durchschnittliche Zeitdauer bis zu einem Engraftment in 50% der NSG-Mäuse bei 6,5 Wochen (AML), 8,6 Wochen (BCP-ALL) und 8 Wochen (T-ALL).

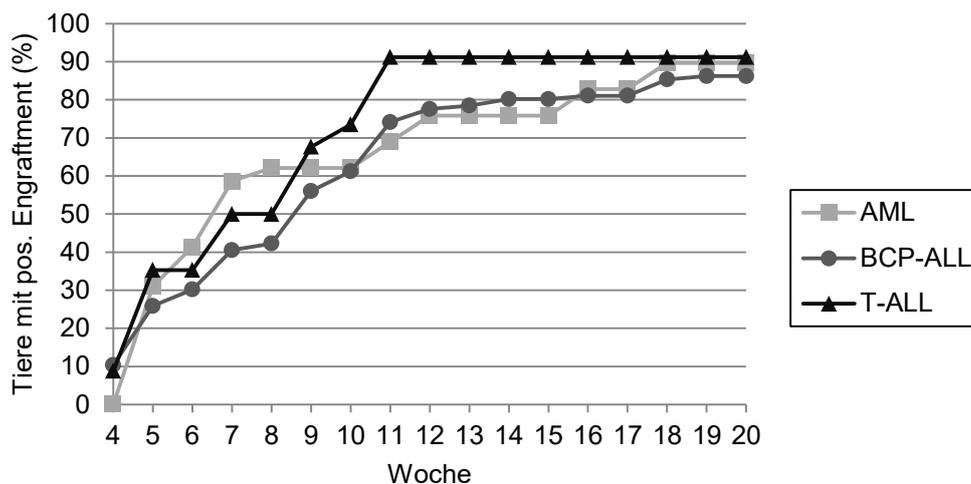


Abbildung 8: Unterschiedliche kindliche Leukämien zeigen nach Injektion in NSG-Mäuse ein sehr gutes Engraftment

Gezeigt ist der prozentuale Anteil der NSG-Mäuse, bei denen innerhalb von 20 Wochen nach Blasteninjektion ein Anteil $CD45^+$ Zellen von $\geq 0,3\%$ im peripheren Blut mittels FACS-Analyse gemessen wurde. Im Durchschnitt über alle drei Leukämierihen engrafteten nach 20 Wochen 89% der NSG-Mäuse nach Blasteninjektion.

Betrachtet man das Ausmaß der leukämischen Infiltration, neigten einige Leukämien zur frühen und teilweise massiven Blastenexpansion, unabhängig davon welcher Reihe sie abstammten (Abbildung 9A). Der Median des im peripheren Blut der NSG-Mäuse gemessenen Anteils $CD45^+$ humaner Zellen lag für die AML bei 37,4%, für die BCP-ALL bei 23,4% und für die T-ALL bei 16,9%. Um eine Aussage bezüglich leukämischer Infiltration des Organismus treffen zu können, ist der Anteil leukämischer Zellen im peripheren Blut nur bedingt geeignet. Daher wurden zur Analyse des Organbefalls Knochenmark (KM), Milz, Leber und Thymus in Woche 20 (bei Blastenanteil $>60\%$ oder Krankheitszeichen auch früher) durchflusszytometrisch untersucht. Im Knochenmark zeigte sich die leukämische Infiltration am deutlichsten (Abbildung 9B). Das mediane Engraftment lag hier bei 91,2% (AML), 71,8% (BCP-ALL) und 97,4% (T-ALL). Für die Milz ergaben sich Raten von 38,8% (AML), 59,2% (BCP-ALL) und 43,0% (T-ALL). Die Werte für Leber und Thymus lagen über die Leukämien hinweg bei unter 17% (Leber) bzw. 3% (Thymus) $CD45^+$ Zellen.

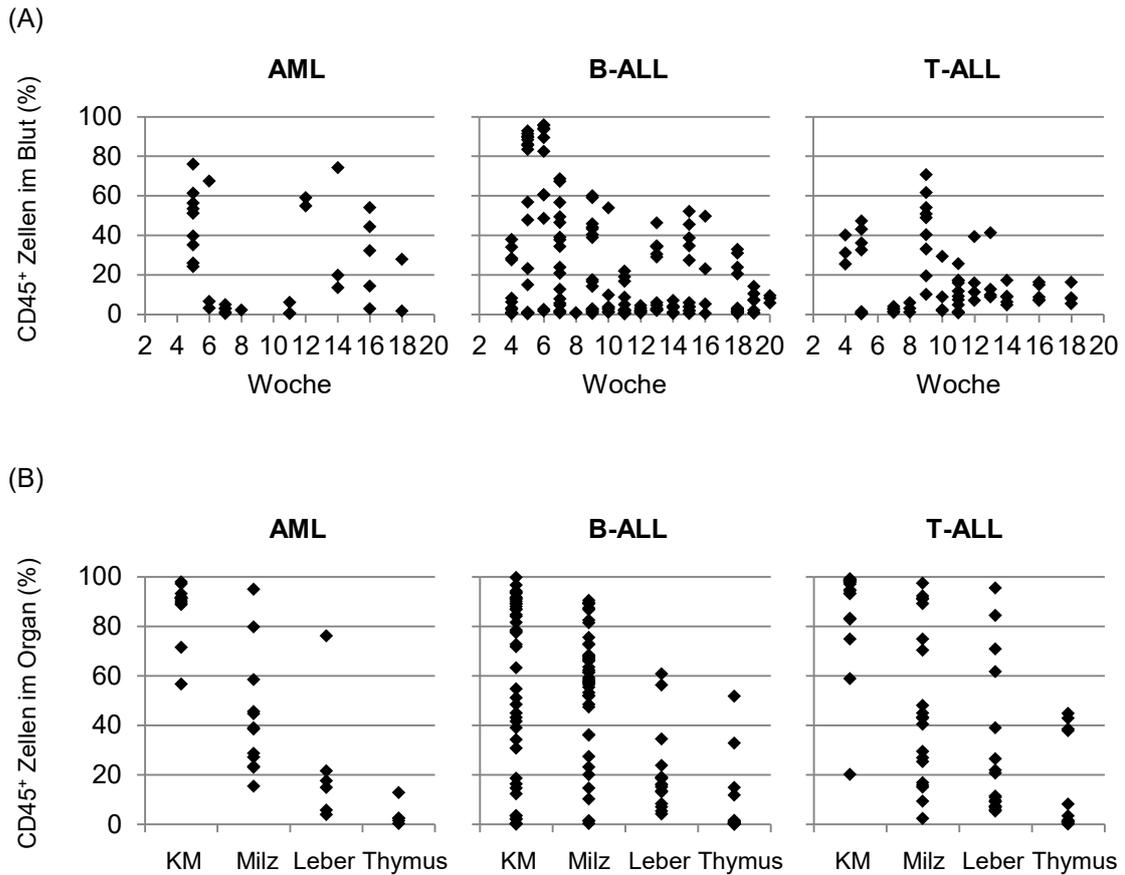


Abbildung 9: Höhe des Engraftments humaner CD45⁺ Zellen im zeitlichen Verlauf

Jeder Punkt entspricht einer Messung. (A) Gezeigt ist der Anteil CD45⁺ Zellen im peripheren Blut zur angegebenen Zeit. Es zeigte sich bei Induktion aller drei Leukämierien eine frühe, teils ausgeprägte Expansion CD45⁺ Zellen. (B) Dargestellt ist der Anteil CD45⁺ Zellen im angegebenen Organ. Es zeigte sich, dass das Knochenmark (KM), unabhängig von der induzierten Leukämieart, die bevorzugte Lokalisation zur Expansion humaner CD45⁺ Zellen darstellt.

NSG-generierte Blasten entsprechen in ihrem Genexpressionsmuster den humanen Vergleichsproben

In diesem Versuchsteil wurden die molekularen Charakteristika Patientengewonnener und NSG-gewonnener Blasten auf Ebene der Genexpression verglichen. Der Eigenanteil an diesem Versuchsteil beschränkt sich auf Recherchen zu Kandidatengenomen der Leukämieentstehung für die Auswahl zur Transkriptomanalyse in Zusammenarbeit mit *Herrn PD Dr. med. Martin Ebinger*, Universitätskinderklinik Tübingen. Diese und weitere Daten liegen bereits publiziert vor (Woiterski et al., 2013). „Es wurden je drei Leukämien jeder Reihe in NSG-Mäuse transplantiert und die so gewonnenen Blasten mit primären Blasten des jeweiligen Patienten verglichen (Patienten P3B, P7E, P12K, P15M, P16P, P17R, P18R, P20S und P21S aus Tabelle 4 im Anhang). Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, wurden nur Blasten aus Knochenmarksproben (humanen und murinen Ursprungs) untersucht, da der Vergleich von peripher gewonnenen Blutproben mit Knochenmarksproben keine zuverlässigen Daten liefert. An der durchgeführten Hauptkomponentenanalyse (dargestellt im 3-dimensionalen Raum) zeigte sich für zwei der drei Blastenpaare der BCP-ALL-Reihe eine deutliche räumliche Nähe, welche auf ein ähnliches Genexpressionsmuster schließen lässt. Lediglich ein Blastenpaar liegt etwas weiter auseinander. Für die AML und T-ALL-Reihe war die räumliche Nähe für alle jeweiligen Blastenpaare deutlich erkennbar (Abbildung 10A-C). Neben der Hauptkomponentenanalyse wurde auch eine hierarchische Clusteranalyse ausgewählter Gene durchgeführt. Für diese Gene ist bekannt, dass sie im Zusammenhang mit der Leukämogenese von Bedeutung sind. Es handelt sich hierbei um Tumorsuppressorgene, Apoptose-regulierende Gene, Protoonkogene, Protein Tyrosinkinase Gene und Gene für Homeobox Transkriptionsfaktoren oder andere Transkriptionsfaktoren (Details siehe Tabelle 5 im Anhang). Es zeigte sich, dass diese Gene in den NSG-generierten Proben in vergleichbarem Umfang exprimiert waren, wie in den humanen Vergleichsproben, unabhängig davon welcher Reihe sie angehörten (Abbildung 10D-F).“ Der obige Abschnitt wurde aus Rohentwürfen der Publikation Woiterski et al. (2013) übersetzt und übernommen.

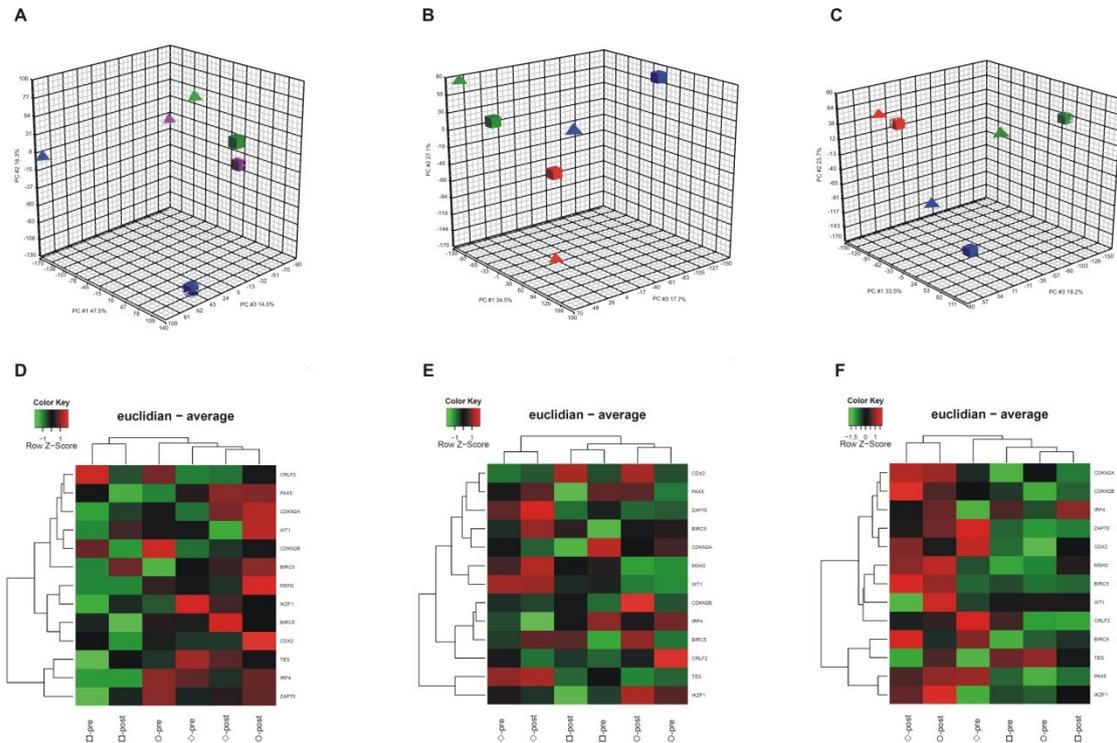


Abbildung 10: Patientenblasten und ihre Korrelate aus damit transplantierten NSG-Mäusen weisen sehr ähnliche Genexpressionsmuster auf

„(A-C) Die Hauptkomponentenanalyse zeigt die Nähe der zu Linearkombinationen genäherten Genexpressionsmuster im dreidimensionalen Raum. Dargestellt sind die Daten von Patienten und NSG-generierten Knochenmarksproben einer BCP-ALL (A), AML (B) und T-ALL (C) (n=9). Je näher sich die Punkte sind, umso wahrscheinlicher ist ein ähnliches Genexpressionsmuster der einzelnen Proben (Δ = Blasten aus NSG-Maus; \square = Blasten aus Patient).

(D-F) Dargestellt ist eine euklidische Clusterheatmap bestimmter Gene, die für die Leukämogenese der BCP-ALL (D), AML (E) und T-ALL (F) von Bedeutung sind (\square = Probenpaar 1, \circ = Probenpaar 2, \diamond = Probenpaar 3, pre = Blasten aus Patient, post = Blasten aus NSG-Maus). Rot zeigt höhere, grün zeigt niedrigere Expression im Vergleich zu Patienten-gewonnenen Blasten. Die hierarchische Clusteranalyse zeigt, dass wichtige Gene der Leukämogenese in NSG-generierten Blasten in ähnlichem Umfang exprimiert werden, wie in Blasten des Patienten.“ Daten, Abbildung und Legende übernommen bzw. übersetzt aus Rohentwürfen der Publikation Woiterski et al. (2013).

NSG-generierte Blasten und humane Blasten besitzen vergleichbare immunologische, genetische und chromosomale Charakteristika

Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse zur Immunphänotypenanalyse, MRD-Markeranalyse und Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung wurden im Rahmen weiterführender Versuche durch *Frau Dr. rer. nat. Jeanette Woiterski* und *Herrn PD Dr. med. Martin Ebinger* (Universitätskinderklinik Tübingen) gewonnen und stellen keine selbst erhobenen Daten dar (Woiterski et al., 2013). Als Koautor dieser Publikation und nach Genehmigung der Erst- und Seniorautoren wurden die Ergebnisse in diese Dissertation aufgenommen. Es handelt sich um Untersuchungen, die ergänzend zur Genexpressionsanalyse die Vergleichbarkeit humaner und NSG-generierter Blasten in Bezug auf Immunphänotyp, MRD-Markereexpression und chromosomalen Aberrationen zeigen. Verwendet wurden Blasten aus NSG-Mäusen, die im Rahmen der Leukämieinduktionsversuche generiert wurden (siehe oben).

Immunphänotypenanalyse

„Es wurden für die jeweilige Leukämie charakteristische immunphänotypische Marker auf Patienten-gewonnenen und NSG-generierten Blasten verglichen (Marker siehe Tabelle 6 im Anhang). Auch wenn eine gewisse Variabilität des Expressionslevels beobachtet werden konnte, zeigte sich, dass die für die einzelnen Leukämien charakteristischen Marker auf NSG-generierten Blasten größtenteils erhalten bleiben. Typische immunologische Marker für BCP-ALL und T-ALL waren in den Patientenproben (sowohl bei Erstdiagnose als auch im Rezidiv) und in vergleichbarem Ausmaß in Knochenmarksproben leukämie-induzierter NSG-Mäuse (auch nach Re-Transplantation NSG-generierter Blasten) nachweisbar. Für die AML zeigte sich für wenige Proben eine Modulation des Phänotyps in Form einer Herab-Regulation von CD34, wie sie auch unter Therapie oder bei einem Rezidiv vorkommen kann.“ Der obige Abschnitt wurde aus Rohentwürfen der Publikation Woiterski et al. (2013) übersetzt und übernommen. Untersucht wurden Blasten der Patienten Nr. P2A, P3B, P7E, P8F, P9G, P10G, P13K, P15M, P16P, P17R, P18R, P19S, P20S, P21S, P22S, P23T sowie P24T aus Tabelle 4 im Anhang.

MRD-Markeranalyse

„Es wurden je zwei MRD-Marker an Blasten von 10 Patienten mit BCP-ALL (Patienten Nr. P2A, P3B, P8F, P9G, P10G, P13K, P14K, P19S, P21S und P22S aus Tabelle 4 im Anhang), sowie an Blasten der damit induzierten NSG-Mäuse mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass bei 8 dieser 10 Proben die klassischen MRD-Marker der humanen Blasten auch in NSG-generierten Blasten nachweisbar waren. In einer Patientenprobe (Patient Nr. P13K) mit fehlender klassischer MRD-Markerexpression war die Zahl der humanen Zellen in der NSG-Mausprobe vergleichsweise gering. In einer weiteren Probe (Patient Nr. P3B) konnte in NSG-generierten Blasten nur einer der beiden Marker nachgewiesen werden. Ein derartiger Markerverlust wird auch bei Patienten mit Rezidiv der ALL beobachtet.“ Der obige Abschnitt wurde aus Rohentwürfen der Publikation Woiterski et al. (2013) übersetzt und übernommen.

Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

„Die an BCP-ALL-Proben (Patienten Nr. P9G, P12K und P23T aus Tabelle 4 im Anhang) durchgeführte Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) zur Detektion chromosomaler Störungen ergab, dass häufig diagnostizierte Störungen (z.B. TEL/AML1 Genefusion, MLL-Rearrangement oder del5q15) auch in den NSG-generierten Blasten nachgewiesen werden können.“ Der obige Abschnitt wurde aus Rohentwürfen der Publikation Woiterski et al. (2013) übersetzt und übernommen.

Zusammenfassend belegen diese Daten, dass sich der NSG-Mausstamm aufgrund hoher Engraftmentraten und Beibehaltung der immunologischen, genetischen und chromosomalen Charakteristika als aussagefähiges *in vivo* Mausmodell zur Untersuchung Patienten-spezifischer Leukämien eignet.

3.3 Nach Injektion leukämischer Zellen in huNSG-Mäuse kommt es zu Graft-vs.-Leukemia-Effekten bei definierten KIR-KIRL-Konstellationen

Auf Grundlage der Ergebnisse zur NK Zellreifung nach HSCT und zur Leukämieinduktion konnten in weiterführenden Versuchen Patienten-Spender-spezifische Graft-vs.-Leukemia (GvL) Effekte im NSG-Mausmodell untersucht werden. Es wurden huNSG-Mäusen nach erfolgter NK Zellreifung mittels IL15/IL15R α (siehe oben) sowie naiven NSG-Mäusen gleiche Zahlen an primären Blasten injiziert. Ziel war es, zu untersuchen, ob sich in diesem Xenotransplantationsmodell GvL-Effekte mit unterschiedlichen Patienten-Spender-Konstellationen nachweisen lassen. Diese Konstellationen wiesen entweder einen KIR-KIRL Match oder einen KIR-KIRL Mismatch auf (Abbildung 11). Der Eigenanteil zu diesen Versuchen beinhaltet die Auswertung des HLA-Typs der verfügbaren Stammzellen und Blasten mit Erstellung von KIR-KIRL Match/Mismatch-Tabellen zur Ermittlung geeigneter Versuchskombinationen sowie die Auswertung und Aufbereitung der aus diesen Versuchen gewonnenen Rohdaten für diese Dissertation. Die letztendliche Stammzell- und Blastenauswahl, die Entwicklung des Versuchsdesigns sowie die Datenerhebung erfolgte durch *Frau PD Dr. med. Dr. rer. nat. Maya Caroline André*, Universitätskinderklinik Tübingen. Die Daten aus diesen Versuchen liegen teilweise in publizierter Form vor (Kübler et al., 2014). Die HLA-Daten stammen von der Typisierung der Patienten und Spender zum Zeitpunkt der geplanten Stammzelltransplantation. Zwischen Blastenspender und Stammzellspender der hier verwendeten Zellen besteht keine Verwandtschaft.

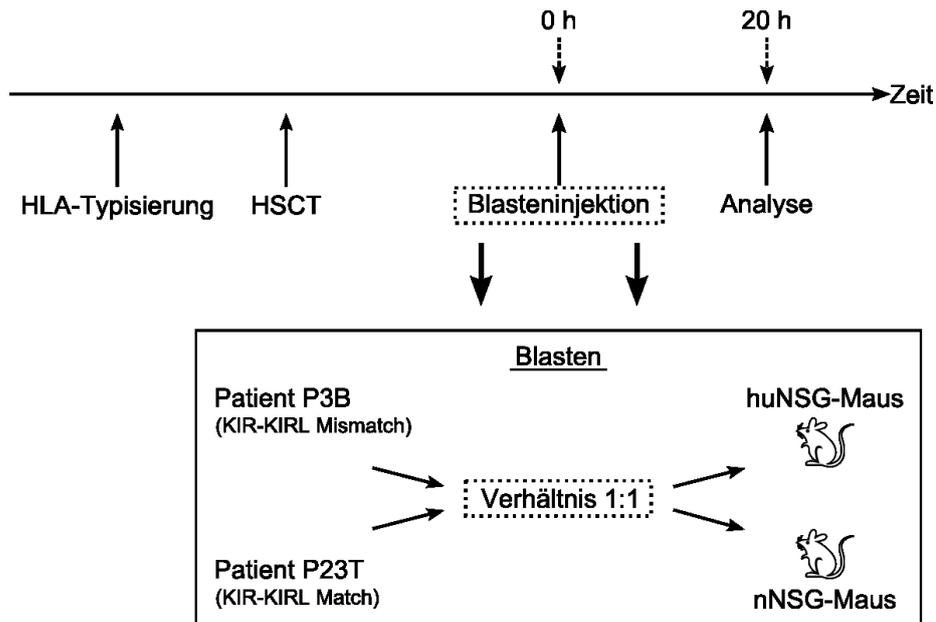


Abbildung 11: Experimenteller Plan zur Untersuchung von GvL-Effekten in huNSG-Mäusen in Abhängigkeit bestimmter KIR-KIRL Mismatch bzw. Match Situationen

Nach HLA-Typisierung von Patienten bzw. Stammzellspendern wurden die Konstellationen zwischen Donor und Patienten so ausgewählt, dass entweder eine KIR-KIRL Mismatch oder Match Situation vorlag. Nach HSCT in NSG-Mäuse und NK Zell-Aktivierung mittels IL15/IL15R α , erhielt jedes Tier der Versuchsgruppe (huNSG-Mäuse) bzw. der Kontrollgruppe (naive NSG-Mäuse) gleiche Zellzahlen beider Leukämien injiziert. 20 Stunden später wurde durchflusszytometrisch der prozentuale Blastenanteil der jeweiligen Leukämie in der Versuchsgruppe ermittelt und auf den prozentualen Blastenanteil der Kontrollgruppe normiert (nNSG=naive NSG-Maus, huNSG=humanisierte NSG-Maus; nNSG n=2 Mäuse; huNSG n=4 Mäuse).

Die Auswahl der verwendeten Stammzellen und der Blasten richtete sich (im Rahmen der Verfügbarkeit) sowohl nach dem HLA- und KIR-Status als auch nach der Zugehörigkeit zu den KIRL-Gruppen. Der Stammzellspender unterscheidet sich im HLA-Expressionsmuster von dem der beiden Patienten in 8 von 10 HLA-Allelen. Gegenüber Patient P3B bestehen die gemeinsamen Allele HLA-A*02 und C*07, gegenüber Patient P23T HLA-C*07 und DQB1*06. Nach der Einteilung der jeweiligen HLA-Allele in die KIRL-Gruppen HLA-Bw4, HLA-C1 und HLA-C2 ist Patient P3B homozygot für die HLA-C1 Gruppe sowie für das HLA-Bw6 Epitop, für das kein KIR existiert. Patient P23T ist homozygot für die HLA-Bw4 Gruppe und heterozygot für die Gruppe HLA-C1 und HLA-C2. Der Stammzellspender weist bezüglich seiner HLA-Allele die gleiche Gruppenzugehörigkeit auf wie Patient P23T und besitzt auf DNA-Ebene die Allele für die Rezeptoren KIR2DL3 für die Gruppe HLA-C1, KIR2DL1 für die

Gruppe HLA-C2 und KIR3DL1 für die Gruppe HLA-Bw4. In der Kombination von Stammzellspender mit Patient P23T ergibt sich ein kompletter KIR-KIRL Match, da jeder KIR einen KIRL binden kann. Für die Kombination von Stammzellspender mit Patient P3B ergibt sich nur ein Match für die HLA-C1 Gruppe. Für die KIRs der Gruppe HLA-C2 und HLA-Bw4 finden sich in Patient P3B keine Liganden. Es liegt ein (partieller) KIR-KIRL Mismatch vor. Genannte Charakteristika sind in Tabelle 3 und Abbildung 12 dargestellt. Patientendetails siehe Tabelle 4 im Anhang, KIR-Allele des Stammzellspenders siehe Tabelle 7 im Anhang.

Tabelle 3: HLA-Status und KIR-KIRL-Zuordnung der Stammzellen und Blasten im oben dargestellten GvL-Versuch

Dargestellt ist der HLA- und KIR-Status des Stammzellspenders sowie der HLA-Status mit Zuordnung zur entsprechenden KIRL-Gruppe der Patienten, deren Blasten verwendet wurden. Der Spender weist gegenüber beiden Patienten nur in 2 von 10 HLA-Loci eine Übereinstimmung auf. Ein KIR-KIRL Mismatch besteht zwischen Spender und Patient P3B, ein KIR-KIRL Match zwischen Spender und Patient P23T. Es besteht keine Verwandtschaft zwischen Spender und Patienten. Daten aus Rohentwürfen der Publikation Kübler et al. (2014).

	HLA-Klasse I						HLA-Klasse II			
	A*		B*		Cw*		DRB1*		DQB1*	
Stammzell-spender	02	01	44	37	07	06	0701	1501	0202	0602
KIR-Allele	-	-	3DL1	3DL1	2DL3	2DL1	-	-	-	-
Erkennt KIRL-Gruppe	-	-	Bw4	Bw4	C1	C2	-	-	-	-
Patient P3B	0201	2601	1801	1401	0701	0802	0401	0402	0302	0302
Zuordnung KIRL-Gruppe	-	-	Bw6	Bw6	C1	C1	-	-	-	-
Patient P23T	2402	2402	4901	5101	0202	0701	1302	1303	0301	0604
Zuordnung KIRL-Gruppe	-	-	Bw4	Bw4	C2	C1	-	-	-	-

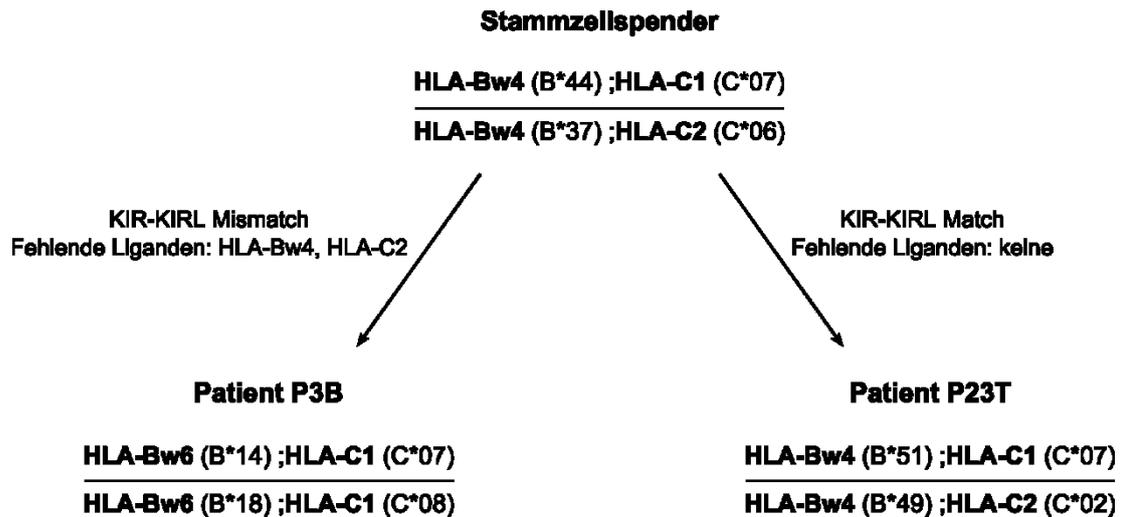


Abbildung 12: KIR-KIRL Match bzw. Mismatch zwischen Stammzellspender und Patient für den GvL-Versuch

Dargestellt sind die KIR-KIRL Konstellationen der HLA-Allele B* und Cw* die sich aus dem HLA-Status von Stammzellspender, Patient P3B und Patient P23T ergeben. Den Blasten von Patient P3B fehlen die HLA-Allele der Gruppen HLA-Bw4 und HLA-C2, die zur Interaktion mit den KIRs der NK Zellen des Stammzellspenders erforderlich wären. Lediglich für die KIRs der HLA-Allele der Gruppe HLA-C1 sind Liganden vorhanden. Die Blasten von Patient P23T besitzen alle Allele, die für eine vollständige Interaktion mit dem KIR-Repertoire des Spenders erforderlich sind.

Vergleicht man den Blastenanteil in den huNSG-Mäusen (n=4) mit dem mittleren Blastenanteil in den naiven NSG-Mäusen (n=2) zeigt sich für den KIR-KIRL Mismatch (Spenderstammzellen vs. Blasten Patient P3B) ein geringerer Blastenanteil bei den huNSG-Mäusen als bei den naiven NSG-Mäusen (Milz: -33,4% (SD 68,0%); KM: -70,8% (SD 29,2%)). Im Gegensatz dazu ist der Blastenanteil bei KIR-KIRL Match (Spenderstammzellen vs. Blasten Patient P23T) in den huNSG-Mäusen deutlich höher als in den naiven NSG-Mäusen (Milz: +99,2% (SD 121,2%); KM: +71,3% (SD 124,7%)) (Abbildung 13).

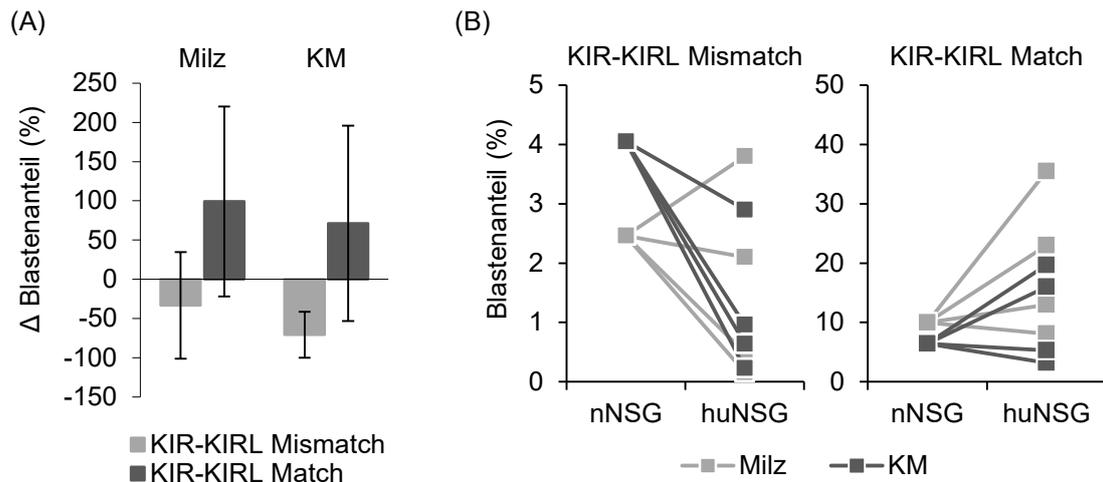


Abbildung 13: Bei KIR-KIRL Mismatch reduziert sich der Blastenanteil, bei KIR-KIRL Match erhöht er sich in der huNSG-Maus

(A) Bei Vorliegen eines KIR-KIRL Mismatch reduziert sich der Blastenanteil in der huNSG-Maus im Vergleich zur naiven NSG-Maus in Milz und Knochenmark (KM). Bei KIR-KIRL Match zeigt sich eine gegenläufige Entwicklung. (B) Darstellung von Einzeltier und Organ für huNSG-Mäuse sowie Mittelwert und Organ für nNSG-Mäuse. (nNSG=naive NSG-Maus; huNSG=humanisierte NSG-Maus). Dargestellt sind nNSG n=2 und huNSG n=4 Mäuse.

Um individuelle Unterschiede in der Kinetik (Aggressivität) einzelner Leukämien zu berücksichtigen, wurde der Anteil der jeweiligen Leukämie in der huNSG-Maus auf ihr Korrelat in der naiven NSG-Maus normalisiert. Es zeigt sich in den naiven NSG-Mäusen ein 4,1-fach (Milz) bzw. 1,6-fach (KM) höherer Blastenanteil für die Leukämie von Patient P23T gegenüber der Leukämie von Patient P3B. In den huNSG-Mäusen konnte ein 12,2-fach (Milz) bzw. 9,3-fach (KM) höherer Blastenanteil für die Leukämie von Patient P23T gegenüber der Leukämie von Patient P3B gemessen werden. Nach Herausrechnen der Leukämie-spezifischen Unterschiede ergibt sich weiterhin ein 3,0-fach (Milz) bzw. 5,9-fach (KM) höherer Blastenanteil für die Leukämie von Patient P23T (KIR-KIRL Match) gegenüber der Leukämie von Patient P3B (KIR-KIRL Mismatch), welcher nicht in der charakteristischen Kinetik der Leukämie begründet ist (Abbildung 14).

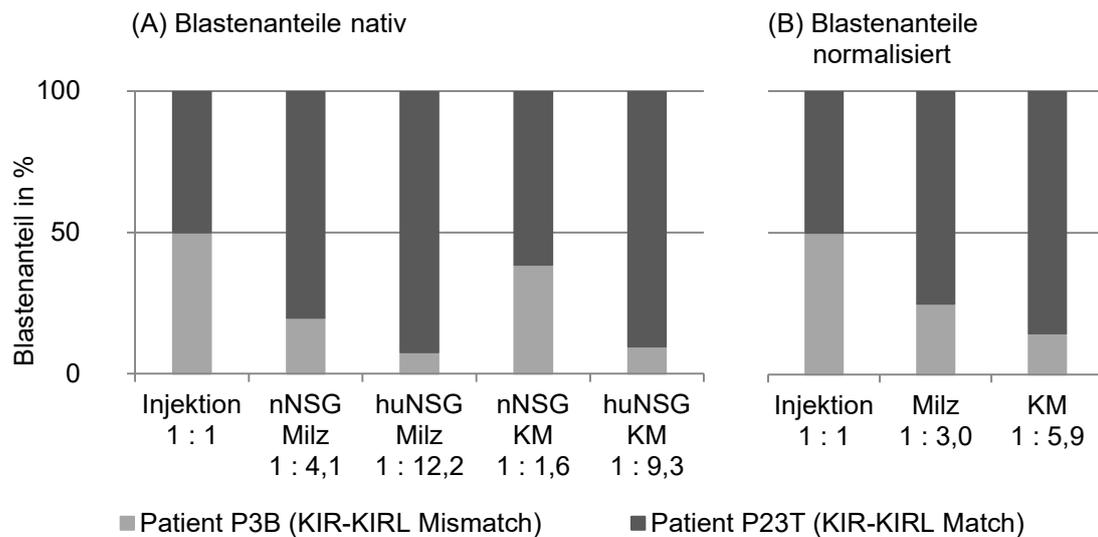


Abbildung 14: Nach Normalisierung der Leukämie-spezifischen Kinetik auf die naiven NSG-Mäuse resultiert ein deutlich niedrigerer Blastenanteil in den huNSG-Mäusen bei KIR-KIRL Mismatch als bei KIR-KIRL Match

Das Diagramm zeigt die Anteile der jeweiligen Leukämie zum Zeitpunkt der Injektion sowie 20 Stunden später in Milz und Knochenmark (KM) von Versuchs- und Kontrollmäusen (nNSG=naive NSG-Maus, huNSG=humanisierte NSG-Maus). Die Leukämie mit KIR-KIRL Match (Patient P23T) weist deutlich größere Anteile auf (A), die sich auch nach Normalisierung auf die Kinetik in den Kontrollmäusen nicht relativiert (B).

Zusammenfassend deuten diese Daten darauf hin, dass, wenn auch in sehr komplexer Art, das NSG-Mausmodell als *in vivo* Surrogat-Modell zur Untersuchung NK Zell- und Leukämie-spezifischer Fragestellungen geeignet ist.

4 Diskussion

4.1 IL15/IL15R α induziert reife NK Zellen aus peripher mobilisierten Blutstammzellen im NSG-Mausmodell

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine Entwicklung humaner NK Zellen in huNSG-Mäusen von der unreiferen CD56^{hi}CD16⁻KIR⁻ zur reiferen CD56^{lo}CD16⁺KIR⁺ Subpopulation durch die Applikation von IL15/IL15R α . Grundsätzlich sind Mausmodelle mit NOD Hintergrund anderen Mausmodellen ohne NOD Hintergrund (z.B. BALB/c Mausstämme) bezüglich Engraftment humaner HSCs überlegen (Brehm et al., 2010; Strowig et al., 2010). Die Ursache dafür liegt u.a. in der CD47/SIRP- α Interaktion zwischen humanen und murinen Zellen. Beim Menschen dient die CD47/SIRP- α Interaktion der Selbsttoleranz. Hierbei vermittelt das auf humanen Zellen ubiquitär vorkommende CD47 über den SIRP- α Rezeptor auf phagozytierenden Zellen des Immunsystems ein inhibierendes „don't-eat-me“-Signal, ähnlich der KIR/MHC Klasse I-Interaktion bei NK Zellen (Oldenborg et al., 2000; Barclay, 2009; Barclay et al., 2014). Ein Polymorphismus des SIRP- α Gens bei NOD-Mäusen ermöglicht dem SIRP- α Rezeptor auf murinen Makrophagen die Bindung humaner CD47⁺ Zellen und hat eine Inhibition der murinen Makrophagen zur Folge (Takenaka et al., 2007). Da das NSG-Mausmodell neben einem NOD-Hintergrund weitere Mutationen (SCID, IL2R γ ^{-/-}) aufweist, ist es für die Entwicklung eines murinen Surrogatmodells der humanen Hämatopoese sehr gut geeignet und es zeigten sich nach Transplantation humaner CD34⁺ PBSCs und wöchentlicher Gabe von Fc-IL7 Fusionsprotein hohe Engraftmentraten (Shultz et al., 2005). Aus diesem Grund wurde das NSG-Mausmodell für die vorliegende Arbeit innerhalb der AG André, wie auch für bereits im Vorfeld durchgeführte Untersuchungen der AG André, verwendet. In diesen Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass die Transplantation von Stammzellen aus Nabelschnurblut (UCB-HSC) zu einem schnelleren Engraftment CD45⁺ Zellen führt als die Transplantation mit PBSCs (André et al., 2010). Nach ca. 16 Wochen zeigten sich jedoch vergleichbare Raten an CD45⁺ Zellen sowie eine vergleichbare Zelllinien Differenzierung für beide Stammzellquellen (André et al., 2010). In diesen Vorarbeiten konnte aber auch

gezeigt werden, dass die NK Zellen phänotypisch unreif waren und gegenüber Zielzellen keine zytotoxischen Reaktionen zeigten (André et al., 2010). Ein Grund für die mangelnde Reifung war u.a. das Fehlen humaner Zytokine, allen voran IL15. *In vitro* bzw. *ex vivo* konnte der Einfluss von IL15 auf die Reifung von NK Zellen bereits gezeigt werden (Ozdemir et al., 2005; Strowig et al., 2010). Huntington und Kollegen konnten am BALB/c Rag2^{-/-}γc^{-/-} Mausmodell eine Ausreifung der NK Zellen durch IL15 *in vivo* erreichen. Die mit HSCs aus fetalem Lebergewebe humanisierten Mäuse bekamen IL15 im Komplex mit IL15Rα appliziert (Huntington et al., 2009). Diese Form der Trans-Präsentation von IL15/IL15Rα hatte gegenüber der alleinigen Gabe von IL15 eine deutlich bessere Ausreifung der NK Zellen zur Folge und ermöglichte Zytotoxizität gegenüber Zielzellen. Von der AG André wird bereits an einem Surrogatmodell gearbeitet, in welchem sich valide Spender-Patientenspezifische Untersuchungen *in vivo* durchführen lassen. Das Ziel der AG André ist es, GvL-Effekte im Rahmen von HSCT bei kindlichen Leukämien zu optimieren. Damit Spender-Patientenspezifische GvL-Effekte *in vivo* untersucht werden können ist es essentiell huNSG-Mäuse mit reifen NK Zellen aus PBSCs generieren zu können, da UCB-HSCs eines Stammzellspenders nur in den seltensten Fällen verfügbar sind und HSCs aus fetalem Lebergewebe von keinem lebenden Stammzellspender vorliegen. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Daten zeigen, dass sich der beschriebene Reifungsstopp der NSG-generierten NK Zellen aus PBSCs durch die Trans-Präsentation von IL15/IL15Rα aufheben lässt. Eine Zunahme der phänotypisch reiferen CD56^{lo}CD16⁺KIR⁺ NK Zell-Subpopulation zeigt sich sowohl im Blut als auch in Milz und Leber von huNSG-Mäusen nach der Applikation von IL15/IL15Rα. Die Subpopulation der phänotypisch unreiferen NK Zellen (CD56^{hi}CD16⁻KIR⁻) verringert sich unter dieser Behandlung. Diese Ergebnisse passen zu der von Huntington gezeigten NK Zell Reifung unter IL15/IL15Rα mit einer Veränderung der NK Zell-Subpopulation von CD56^{hi}CD16⁻KIR⁻ zur reiferen CD56^{lo}CD16⁺KIR⁺ NK Zell-Subpopulation (Huntington et al., 2009). Die Resultate dieser Arbeit zeigen, dass dieser Reifungsschritt auch in huNSG-Mäusen nach HSCT mit PBSCs induzierbar ist. Experimente zum Nachweis einer gesteigerten

Zytotoxizität der generierten CD56^{lo}CD16⁺KIR⁺ NK Zellen wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Es galt bislang als allgemein anerkannt, dass diese reifere Subpopulation über ein deutlich größeres zytotoxisches Potential verfügt als die unreiferen Vorstufen (Cooper et al., 2001; Caligiuri, 2008; Beziat et al., 2011; Malhotra et al., 2011). In einer Publikation konnte allerdings auch eine relevante Zytotoxizität KIR⁻ NK Zellen gegenüber CMV-infizierten Mauszellen gezeigt werden, welche am ehesten auf eine relevante Zytokinfreisetzung durch die Virusinfektion zurückzuführen ist (Orr et al., 2010). Das zeigt, dass eine Zytokin-Stimulation unter bestimmten Bedingungen auch bei KIR⁻ NK Zellen zu zytotoxischen Reaktionen führen kann. Auch neuere Daten der AG André zeigen, dass die unreiferen KIR⁻ NK Zellen gegenüber BCP-ALL Blasten über ein gewisses zytotoxisches Potential verfügen und zudem die Population der KIR⁺ NK Zellen verhältnismäßig gering ist (Kübler et al., 2014). Eine qualitative und quantitative Charakterisierung dieser KIR⁺ und KIR⁻ Populationen erscheint daher sinnvoll und wichtig. Mögliche Defizite durch das murine Milieu von NSG-Mäusen, welches nicht ausreichend supportiv für die Entwicklung und das Wachstum humaner Zellen ist, konnten teilweise durch exogene Gaben humaner Zytokine z.B. IL7 beseitigt werden (André et al., 2010). Die in dieser Arbeit gezeigte funktionelle Reifung durch IL15 ist ein weiterer Schritt zur Optimierung des NSG-Mausmodells. Zukünftig könnten die Induktion relevanter Bystander Zellen wie z.B. Dendritische Zellen sowie genetische Veränderungen des NSG-Mausmodells, z.B. durch Transduktion von Genen für humane Zytokine weitere wichtige Schritte darstellen.

Alternativ zur Methode der Trans-Präsentation von IL15/IL15R α wurde untersucht, ob durch die Applikation IL15-exprimierender Zellen in NSG-Mäuse ähnliche Ergebnisse erzielt werden können. Analog zur Trans-Präsentation wurde durch Injektion der K562-mbIL-15-41BBL Zelllinie in huNSG-Mäuse in dieser Arbeit versucht, die Reifung von NK Zellen *in vivo* zu stimulieren. Von der Tumorzelllinie K562 ist seit langem bekannt, dass der Kontakt mit NK Zellen zu ausgeprägter NK Zell-Aktivierung und Zytotoxizität führt (Lozzio et al., 1979). Durch Transfektion der K562-Zelllinie mit den Genen für IL15 und den

4-1BB-Rezeptorliganden (4-1BBL) werden diese membrangebunden exprimiert (Imai et al., 2005). Der 4-1BB Rezeptor aus der Superfamilie der Tumornekrose-Faktor Rezeptoren ist auf NK Zellen u.a. durch IL15 induzierbar und vermittelt bei Bindung des 4-1BBL ein Zellzyklus-aktivierendes Signal (Lin et al., 2008; Baessler et al., 2010). Durch die Ko-Expression von IL15 und 4-1BBL auf K562 Zellen werden starke und synergistische NK Zell-stimulierende Signale vermittelt (Shook et al., 2011). Die so generierte K562-mbIL-15-41BBL Zelllinie ist *in vitro* fähig, in Ko-Kultur mit NK Zellen deren Expansion und Reifung zu stimulieren und ermöglicht die Generierung großer Mengen zytotoxischer NK Zellen (Fujisaki et al., 2009). Diese zytotoxischen NK Zellen behalten nach Injektion in NSG-Mäuse ihr zytotoxisches Potential und zeigen im Mausmodell anti-leukämische Aktivität (Imai et al., 2005; Fujisaki et al., 2009; Shook et al., 2011). Ein Ziel dieser Arbeit war es aber, *in vivo* in huNSG-Mäusen reife, zytotoxische NK Zellen zu generieren. Bis dato (03/2016) gibt es keine Literatur über NK Zell-Expansion und Reifung *in vivo* durch Injektion von K562-mbIL-15-41BBL Zellen in Mausmodelle. Parallel zu den Experimenten zur IL15/IL15R α Trans-Präsentation wurde untersucht, ob die direkte intravenöse Applikation von bestrahlten K562-mbIL-15-41BBL Zellen in huNSG-Mäusen zu einer *in vivo* Stimulation von NK Zellen führt. Die intravenöse Injektion der Zellen führt gegenüber der intraperitonealen Gabe zu deutlich höheren Konzentrationen intravasal und sollte damit den Zell-Zell Kontakt zwischen NK Zellen und K562-mbIL-15-41BBL Zellen vereinfachen. Bei erfolgreicher Interaktion würde man sowohl eine deutliche Zunahme der NK Zell-Population erwarten, als auch eine Reifung mit Veränderung des Rezeptorrepertoires. Die Ergebnisse zeigen jedoch nur eine geringe Zunahme der CD45⁺CD56⁺ Zellen im peripheren Blut nach 15 Tagen, die noch unter dem Niveau der IL15/IL15R α -Gruppe liegt. Betrachtet man die NK Zell-Subpopulationen zeigt sich sogar eine gegenläufige Entwicklung mit Rückgang der reiferen CD56^{lo}CD16⁺KIR⁺ NK Zell-Subpopulation und Zunahme der unreiferen CD56^{hi}CD16⁻KIR⁻ NK Zell-Subpopulation. Auch in der Organanalyse wurde nur eine geringere Zunahme der CD45⁺CD56⁺ Zellen als in der IL15/IL15R α -Gruppe gemessen. Die Rezeptoranalyse ergibt ein indifferentes Bild ohne wesentliche Zu- oder

Abnahme der Sub-Populationen. Die gemessene Expansion der NK Zellen spricht für einen vorhandenen Stimulus durch die K562-mbIL-15-41BBL Zellen, der aber nicht an die Wirkung von IL15/IL15R α heranreicht und deutlich unter dem Niveau dessen liegt, was *in vitro* mit dieser Zelllinie erreicht wird. Möglicherweise ist diese Zellzahlerhöhung lediglich als Reaktion auf die K562 Zellen an sich zurückzuführen und weniger auf die Interaktion zwischen NK Zelle und IL15 bzw. 4-1BBL auf der Zelloberfläche. Für eine ausbleibende Stimulation durch IL15 und 4-1BBL würde auch die fehlende Zunahme des CD56^{lo}CD16⁺KIR⁺ NK Zell-Phänotyp sprechen. Die Vermutung ist, dass der nötige intime Kontakt zwischen NK Zellen und K562-mbIL-15-41BBL Zellen nicht zustande gekommen ist. Ein „homing“ der K562-mbIL-15-41BBL Zellen im Knochenmark findet evtl. nicht oder nur unzureichend statt und könnte dort zu einer zu geringen Zellzahl führen. Eine Erhöhung der K562-mbIL-15-41BBL-Zellzahl wäre eine Option, inwieweit dadurch allerdings das „homing“ verbessert wird ist unklar. Möglicherweise würde man mit einer direkten intrafemorale Gabe bessere Ergebnisse erzielen können, da hierbei hohe Konzentrationen am Ort der NK Zell-Entwicklung zu Verfügung stehen würden.

4.2 Patienten-spezifische Leukämieinduktion ist in NSG-Mäusen möglich

Eine Analyse der Daten der AG André zeigt, dass die Induktion kindlicher AML, BCP-ALL und T-ALL in NSG-Mäusen bei hohen Engraftmentraten und Beibehaltung ihrer phänotypischen und genetischen Charakteristika möglich ist. NSG-Mäuse verfügen durch ihre hochgradige Immundefizienz über sehr gute Voraussetzungen zur Transplantation leukämischer Zellen. Sowohl etablierte Leukämie-Zelllinien als auch primäre Leukämieproben (AML und ALL) wurden bereits in NSG-Mäuse injiziert und zeigten hohe Engraftmentraten (Ishikawa et al., 2007; Agliano et al., 2008; Sanchez et al., 2009; Morisot et al., 2010). Allerdings unterscheiden sich Material und Methoden dieser Studien deutlich. Die für das geplante Xenotransplantationsmodell erforderliche Validität bezüglich genetischer und phänotypischer Vergleichbarkeit NSG-generierter Blasten mit kindlichen Blasten war zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht gegeben. Daher wurden durch die AG André erstmalig kindliche Leukämien aller drei Reihen (AML, BCP-ALL und T-ALL) in NSG-Mäuse injiziert und morphologisch sowie molekulargenetisch analysiert (Woiterski et al., 2013). Die vorbeschriebenen hohen Engraftmentraten konnten in diesen Untersuchungen bestätigt werden und erreichen 89% gemittelt über alle drei Reihen. Das zeigt, dass das NSG-Mausmodell hochpermissiv gegenüber Zellen humanen Ursprungs ist, auch wenn das murine Milieu mit dem Fehlen von humanen Umgebungsbedingungen möglicherweise dazu beigetragen hat, dass einzelne (weniger aggressive) Leukämien nicht engraften konnten. Unter Umständen spielt auch die Anzahl Leukämie-induzierender Stammzellen bei weniger aggressiven Leukämien eine Rolle. Zudem beinhalteten die injizierten Proben neben den Blasten naturgemäß auch andere humane Komponenten unterschiedlicher Art und Menge (Wachstumsfaktoren, T Zellen, Zytokine usw.). Da bei Leukämieinduktion lediglich die Blastenzahl berücksichtigt wurde, in der Regel aber keine Zellen depletiert wurden (T Zell-Depletion nur bei Anteil >10%), wies jede Patientenprobe eine unterschiedliche und individuelle Zusammensetzung auf. Diese Zusammensetzung kann ebenfalls Auswirkungen auf das Engraftment in NSG-Mäusen haben. Weitere Daten der AG André bezüglich der Aggressivität einer Leukämie zeigen interessanterweise eine

Korrelation des klinischen Verlaufs von Patienten mit kindlicher Leukämie und der Engraftmenthöhe im NSG-Mausmodell, wenn die Leukämie durch geringe Blastenzahlen induziert wird. Demnach zeigen Blasten von Patienten mit ungünstigem Verlauf der Erkrankung deutlich höhere Engraftmentraten und ein schnelleres Engraftment in NSG-Mäusen als Blasten von Patienten mit günstigerem Verlauf (Woiterski et al., 2013). Wichtige Erkenntnisse konnten auch durch Analyse der NSG-generierten Blasten und den Original-Patientenproben gewonnen werden. Der Vergleich immunologischer und genetischer Merkmale der Patientenproben mit ihrem NSG-generierten Gegenstück ergibt auch nach mehreren Re-Transplantationen einen gleichbleibenden Phänotyp der Leukämien. Die beobachtete Herunterregulation von CD34 bei wenigen AML-Proben der NSG-generierten Blasten stellt in diesem Zusammenhang keine Besonderheit des vorliegenden Mausmodells dar, sondern ist ein Phänomen, welches auch unter Therapie oder bei Rezidiven im Patienten beobachtet werden kann. Gleiches gilt für den beobachteten Verlust einer der beiden MRD-Marker einer BCP-ALL in den NSG-generierten Blasten. Darüber hinaus ergab eine durchgeführte Genexpressionsanalyse (Hauptkomponentenanalyse) NSG-generierter Blasten aller drei Leukämierihen ein vergleichbares Expressionsmuster wie die Analyse der Patienten-gewonnenen Blasten. Auch bei der gezielten hierarchischen Clusteranalyse von Genen mit Assoziation zu Leukämien sind vergleichbare Expressionsmuster in Patienten-gewonnenen Blasten und NSG-generierten Blasten messbar (Gene siehe Tabelle 5 im Anhang). Diese Ergebnisse passen zu einer Untersuchung der Genexpression NGS-generierter BCP-ALL Blasten im Vergleich zu den humanen Original-Blasten (Morisot et al., 2010). Insgesamt zeigt sich das NSG-Mausmodell durch seine hochgradige Immundefizienz als sehr geeignet für die Induktion Patienten-spezifischer Leukämien. Die Erhaltung der Krankheitscharakteristika und das hohe Engraftment in NSG-Mäusen erlaubt die individuelle Untersuchung einzelner Leukämien und bietet damit großes Potential als *in vivo* Surrogatmodell.

4.3 Bei einem KIR-KIRL Mismatch zeigt sich ein gesteigerter GvL-Effekt im NSG-Mausmodell

Die Auswertung von Daten der AG André für diese Arbeit zeigt, dass die Injektion von primären BCP-ALL Blasten mit KIR-KIRL Mismatch in huNSG-Mäuse zu einer geringeren Blastenlast führt als die Injektion von primären BCP-ALL Blasten mit KIR-KIRL Match. Der potentielle Nutzen alloreaktiver NK Zellen im Rahmen von HSCT wurde bereits Ende der neunziger Jahre für die adulte AML beschrieben und konnte in darauf folgenden Studien bestätigt werden (Ruggeri et al., 1999; 2002; 2007). Das hierbei zugrunde liegende Modell des Ligand-Ligand Mismatches zeigte ein längeres rezidiv-freies Überleben, wenn bei fehlenden KIRL im Patienten diese KIRL beim Spender vorhanden waren. Handgretinger und Kollegen konnten 2004 für kindliche Leukämien zeigen, dass es weniger auf die KIRL des Spenders ankommt, sondern auf die tatsächlich vorhandenen KIRs (Leung et al., 2004). Für dieses Modell des Rezeptor-Liganden Mismatches zeigte sich sowohl für die kindliche AML als auch erstmals für die kindliche ALL ein positiver Effekt auf das Rezidivrisiko bei KIR-KIRL Mismatch (Leung et al., 2004). Im Gegensatz zur adulten ALL, für die bislang keine Daten zu gesteigerten GvL-Reaktionen durch NK Zellen publiziert wurden (Stand 03/2016), erwies sich die kindliche ALL auch in weiteren Studien *in vivo* und *in vitro* als prinzipiell angreifbar durch alloreaktive NK Zellen (Pfeiffer et al., 2007; Feuchtinger et al., 2009; Pende et al., 2009). Als mögliche Gründe hierfür werden die unterschiedliche Expression von Adhäsionsmolekülen und NK Zell-Liganden sowie die Dichte der Expression von HLA-Merkmalen diskutiert (Ruggeri et al., 1999; Mengarelli et al., 2001; Pfeiffer et al., 2007; Feuchtinger et al., 2009). In keiner der zuvor genannten Studien kam es zu einer relevanten GvHD durch alloreaktive NK Zellen. Diese bisherigen Daten deuten auf eine Relevanz eines KIR-KIRL Mismatch bei HSCT hin, lassen aber aufgrund geringer Fallzahlen der klinischen Studien sowie schlechter Übertragbarkeit der experimentellen Laborstudien auf die Situation im Patienten keine klare Aussage zu. Ein Ziel der AG André war unter anderem, die Untersuchung des in dieser Arbeit beschriebenen huNSG-Mausmodells auf gesteigerte GvL-Reaktionen nach Blasteninjektion durch gezieltes KIR-KIRL

Mismatching. Hierfür wurden im Verhältnis 1:1 primäre Blasten mit KIR-KIRL Match und KIR-KIRL Mismatch in huNSG-Mäuse und nNSG-Mäuse injiziert. Nach 20 Stunden wurden Knochenmark und Milz der Tiere analysiert (Kübler et al., 2014). Diese für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellten Daten zeigen bei KIR-KIRL Mismatch geringere Blastenzahlen als bei einem KIR-KIRL Match. Auch nach Normalisierung der individuellen Wachstumskinetiken der beiden Leukämien zeigt sich ein 3,0-fach (Milz) bzw. 5,9-fach (KM) höherer Blastenanteil bei KIR-KIRL Match im Vergleich zum Mismatch. Der frühe Analysezeitpunkt nach 20 Stunden sowie der deutlich höhere Blastenanteil bei KIR-KIRL Match trotz ausgeprägter HLA-Differenz sprechen sehr für eine NK Zell-vermittelte und gegen eine T Zell-vermittelte Reaktion. Weitere Untersuchungen an diesen NSG-generierten und IL15-stimulierten NK Zellen durch die AG André zeigen jedoch geringe Raten an KIR⁺ Zellen und darüber hinaus interessanterweise auch zytotoxische Reaktionen von KIR⁻ NK Zellen gegenüber BCP-ALL Blasten *in vivo* (Kübler et al., 2014). Das physiologische Vorkommen KIR⁻ aber dennoch selbsttoleranter NK Zellen wurde zuvor bereits beschrieben, wobei dieser Subpopulation nur ein geringes Maß an Funktionalität zugeschrieben wurde (Fernandez et al., 2005; Yawata et al., 2008). Die Arbeitsgruppe um Lanier et al. konnte diese Daten erweitern und zeigen, dass die Abwehr einer murinen CMV-Infektion vorrangig über eine Population unlizenzierter KIR⁻ NK Zellen erfolgte (Orr et al., 2010). Für die vorliegende Arbeit kann daher kein endgültiger Nachweis erbracht werden, dass die gesteigerten GvL-Reaktionen auf den vorliegenden KIR-KIRL Mismatch zurückzuführen sind und nicht (zumindest teilweise) auch auf anderem Wege zustande kommen. Denkbar wären z.B. andere, evtl. noch unbekannte Rezeptor-Liganden Interaktionen zwischen NK Zellen und Blasten. In Anbetracht der unklaren, teils kontroversen Datenlage bedarf es weiterer Forschung, um zu klären, unter welchen Umständen ein KIR-KIRL Mismatch zu effektiven GvL-Reaktionen führt und welches zusätzliche Potential möglicherweise von KIR⁻ NK Zellen ausgeht.

5 Zusammenfassung

Das Hauptziel dieser Arbeit ist die Induktion der phänotypischen Reifung Natürlicher Killer Zellen in einem humanisierten NOD/LtSz-scid IL2Rg^{-/-} Mausmodell (huNSG-Mausmodell) mittels Interleukin-15 (IL15/IL15R α). Die größten Defizite von Mausmodellen zur Untersuchung humaner Pathologien liegen im Bereich mangelnder humaner Umgebungsbedingungen durch ein vorherrschend murines Milieu und der damit einhergehenden schlechten Übertragbarkeit von *in vivo* Resultaten aus diesen Modellen auf die *in vivo* Situation im Patienten. Daher gibt es große Bestrebungen zur Optimierung sogenannter humanisierter Mausmodelle, so auch für das huNSG-Mausmodell. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass ein Arrest der funktionellen Reifung humaner NK Zellen in huNSG-Mäusen durch die Applikation von IL15/IL15R α überwunden werden kann und phänotypisch reifere CD56^{lo}CD16⁺KIR⁺ NK Zellen induziert werden können. Dieser Population wird ein großes zytotoxisches Potential zugeschrieben, welches für Abwehr maligner Erkrankungen im Allgemeinen und für potente GvL-Reaktionen im Speziellen von großer Bedeutung ist. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Möglichkeit zur Induktion dieser Population in huNSG-Mäusen ist ein wichtiger Baustein für die durch die AG André angestrebte Optimierung dieses Mausmodells für die Untersuchung Patienten-spezifischer Fragestellungen. Im Weiteren wurden durch die AG André auch Aspekte der Leukämieinduktion in NSG-Mäusen untersucht. Die daraus entstandenen Daten sind in dieser Arbeit ebenfalls dargestellt und zusammengefasst. Es zeigt sich, dass die in NSG-Mäusen induzierten Leukämien (AML, BCP-ALL und T-ALL) auch nach mehreren Re-Transplantationen in weitere NSG-Mäuse immunologisch und genetisch ihren ursprünglichen Proben gleichen und damit ihre krankheitsspezifischen Charakteristika beibehalten. Das hat insbesondere vor dem Hintergrund Patienten/Stammzellspender-spezifischer Fragestellungen Relevanz und ist unabdingbar für das durch die AG André in Etablierung befindliche NSG-Mausmodell. Dieses soll neben einer humanen Stammzellspender-spezifischen Hämatopoese auch die Induktion Patienten-spezifischer Leukämien ermöglichen. Erste Versuchsreihen mit diesem Modell wurden bereits durch die

AG André durchgeführt und ein Teil dieser Daten für diese Arbeit ausgewertet und interpretiert. Es wurde untersucht, ob sich durch einen gezielten KIR-KIRL Mismatch zwischen Patientenblasten und Spenderstammzellen in huNSG-Mäusen ein verstärkter GvL-Effekt nachweisen lassen kann. Die Ergebnisse zeigen, dass ein KIR-KIRL Mismatch deutlich geringere Blastenzahlen zur Folge hat, als ein KIR-KIRL Match. Zum derzeitigen Zeitpunkt kann allerdings nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob diese Blastenreduktion tatsächlich auf den KIR-KIRL Mismatch zurückzuführen ist. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass noch andere Mechanismen, z.B. Rezeptor-Liganden Interaktionen zwischen Leukämie und NK Zelle einen Anteil an dem beobachteten Phänomen haben. Grundsätzlich erweist sich das NSG-Mausmodell in der vorliegenden Form als geeignetes Surrogat-Modell und ermöglicht Experimente *in vivo* wie sie in Patientenstudien nicht möglich wären. Weitere Optimierungen über die Gabe von IL15 hinaus, bringen das Potential mit sich, zukünftig valide und klinisch relevante Patienten/Spender-spezifische Untersuchungen (z.B. neue Ansätze des Spender-matching) in einem immer Menschen-ähnlicherem Milieu zu ermöglichen. Denkbar wäre hier z.B. die Transduktion humaner Zytokin-Gene oder die ausreichende zur Verfügungstellung relevanter Bystander Zellen wie z.B. Dendritische Zellen im NSG-Mausmodell.

Literaturverzeichnis

Agliano, A., Martin-Padura, I., Mancuso, P., Marighetti, P., Rabascio, C., Pruneri, G., Shultz, L. D. und Bertolini, F. (2008). "Human acute leukemia cells injected in NOD/LtSz-scid/IL-2Rgamma null mice generate a faster and more efficient disease compared to other NOD/scid-related strains." Int J Cancer **123**(9): 2222-2227.

André, M. C., Erbacher, A., Gille, C., Schmauke, V., Goecke, B., Hohberger, A., Mang, P., Wilhelm, A., Mueller, I., Herr, W., Lang, P., Handgretinger, R. und Hartwig, U. F. (2010). "Long-term human CD34+ stem cell-engrafted nonobese diabetic/SCID/IL-2R gamma(null) mice show impaired CD8+ T cell maintenance and a functional arrest of immature NK cells." J Immunol **185**(5): 2710-2720.

Anfossi, N., Andre, P., Guia, S., Falk, C. S., Roetynck, S., Stewart, C. A., Bresó, V., Frassati, C., Reviron, D., Middleton, D., Romagne, F., Ugolini, S. und Vivier, E. (2006). "Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I." Immunity **25**(2): 331-342.

Baessler, T., Charton, J. E., Schmiedel, B. J., Grunebach, F., Krusch, M., Wacker, A., Rammensee, H. G. und Salih, H. R. (2010). "CD137 ligand mediates opposite effects in human and mouse NK cells and impairs NK-cell reactivity against human acute myeloid leukemia cells." Blood **115**(15): 3058-3069.

Barclay, A. N. (2009). "Signal regulatory protein alpha (SIRPalpha)/CD47 interaction and function." Curr Opin Immunol **21**(1): 47-52.

Barclay, A. N. und Van den Berg, T. K. (2014). "The interaction between signal regulatory protein alpha (SIRPalpha) and CD47: structure, function, and therapeutic target." Annu Rev Immunol **32**: 25-50.

Baxter, A. G. und Cooke, A. (1993). "Complement lytic activity has no role in the pathogenesis of autoimmune diabetes in NOD mice." Diabetes **42**(11): 1574-1578.

Beziat, V., Duffy, D., Quoc, S. N., Le Garff-Tavernier, M., Decocq, J., Combadiere, B., Debre, P. und Vieillard, V. (2011). "CD56brightCD16+ NK cells: a functional intermediate stage of NK cell differentiation." J Immunol **186**(12): 6753-6761.

Biassoni, R. (2008). "Natural killer cell receptors." Adv Exp Med Biol **640**: 35-52.

Bosma, G. C., Custer, R. P. und Bosma, M. J. (1983). "A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse." Nature **301**(5900): 527-530.

Brehm, M. A., Cuthbert, A., Yang, C., Miller, D. M., Dilorio, P., Laning, J., Burzenski, L., Gott, B., Foreman, O., Kavirayani, A., Herlihy, M., Rossini, A. A., Shultz, L. D. und Greiner, D. L. (2010). "Parameters for establishing humanized mouse models to study human immunity: analysis of human hematopoietic stem cell engraftment in three immunodeficient strains of mice bearing the IL2rgamma(null) mutation." Clin Immunol **135**(1): 84-98.

Brodin, P., Karre, K. und Hoglund, P. (2009). "NK cell education: not an on-off switch but a tunable rheostat." Trends Immunol **30**(4): 143-149.

Caligiuri, M. A. (2008). "Human natural killer cells." Blood **112**(3): 461-469.

Cao, X., Shores, E. W., Hu-Li, J., Anver, M. R., Kelsall, B. L., Russell, S. M., Drago, J., Noguchi, M., Grinberg, A., Bloom, E. T. und et al. (1995). "Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain." Immunity **2**(3): 223-238.

Carson, W. E., Fehniger, T. A., Haldar, S., Eckhert, K., Lindemann, M. J., Lai, C. F., Croce, C. M., Baumann, H. und Caligiuri, M. A. (1997). "A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival." J Clin Invest **99**(5): 937-943.

Cerwenka, A. und Lanier, L. L. (2001). "Natural killer cells, viruses and cancer." Nat Rev Immunol **1**(1): 41-49.

Chan, H. W., Kurago, Z. B., Stewart, C. A., Wilson, M. J., Martin, M. P., Mace, B. E., Carrington, M., Trowsdale, J. und Lutz, C. T. (2003). "DNA methylation maintains allele-specific KIR gene expression in human natural killer cells." J Exp Med **197**(2): 245-255.

Conter, V., Bartram, C. R., Valsecchi, M. G., Schrauder, A., Panzer-Grumayer, R., Moricke, A., Arico, M., Zimmermann, M., Mann, G., De Rossi, G., Stanulla, M., Locatelli, F., Basso, G., Niggli, F., Barisone, E., Henze, G., Ludwig, W. D., Haas, O. A., Cazzaniga, G., Koehler, R., Silvestri, D., Bradtke, J., Parasole, R., Beier, R., van Dongen, J. J., Biondi, A. und Schrappe, M. (2010). "Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study." Blood **115**(16): 3206-3214.

Cooper, M. A., Fehniger, T. A. und Caligiuri, M. A. (2001). "The biology of human natural killer-cell subsets." Trends Immunol **22**(11): 633-640.

Di Santo, J. P. (2006). "Natural killer cell developmental pathways: a question of balance." Annu Rev Immunol **24**: 257-286.

Di Santo, J. P. und Vosshenrich, C. A. (2006). "Bone marrow versus thymic pathways of natural killer cell development." Immunol Rev **214**: 35-46.

Faguet, G. B. und Agee, J. F. (1988). "Transplantation of human hairy cell leukemia in radiation-preconditioned nude mice: characterization of the model by histological, histochemical, phenotypic, and tumor kinetic studies." Blood **71**(6): 1511-1517.

Ferlazzo, G., Thomas, D., Lin, S. L., Goodman, K., Morandi, B., Muller, W. A., Moretta, A. und Munz, C. (2004). "The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic." J Immunol **172**(3): 1455-1462.

Fernandez, N. C., Treiner, E., Vance, R. E., Jamieson, A. M., Lemieux, S. und Raulat, D. H. (2005). "A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules." Blood **105**(11): 4416-4423.

Feuchtinger, T., Pfeiffer, M., Pfaffle, A., Teltschik, H. M., Wernet, D., Schumm, M., Lotfi, R., Handgretinger, R. und Lang, P. (2009). "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 **43**(11): 875-881.

Flanagan, S. P. (1966). "'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse." Genet Res **8**(3): 295-309.

Flohr, T., Schrauder, A., Cazzaniga, G., Panzer-Grumayer, R., van der Velden, V., Fischer, S., Stanulla, M., Basso, G., Niggli, F. K., Schafer, B. W., Sutton, R., Koehler, R., Zimmermann, M., Valsecchi, M. G., Gardner, H., Masera, G., Schrappe, M., van Dongen, J. J., Biondi, A., Bartram, C. R. und International, B. F. M. S. G. (2008). "Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia." Leukemia **22**(4): 771-782.

Freud, A. G., Yokohama, A., Becknell, B., Lee, M. T., Mao, H. C., Ferketich, A. K. und Caligiuri, M. A. (2006). "Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo." J Exp Med **203**(4): 1033-1043.

Fujisaki, H., Kakuda, H., Shimasaki, N., Imai, C., Ma, J., Lockey, T., Eldridge, P., Leung, W. H. und Campana, D. (2009). "Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy." Cancer Res **69**(9): 4010-4017.

Greaves, M. (2006). "Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia." Nat Rev Cancer **6**(3): 193-203.

Gregoire, C., Chasson, L., Luci, C., Tomasello, E., Geissmann, F., Vivier, E. und Walzer, T. (2007). "The trafficking of natural killer cells." Immunol Rev **220**: 169-182.

Greiner, D. L., Shultz, L. D., Yates, J., Appel, M. C., Perdrizet, G., Hesselton, R. M., Schweitzer, I., Beamer, W. G., Shultz, K. L., Pelsue, S. C. und et al. (1995). "Improved engraftment of human spleen cells in NOD/LtSz-scid/scid mice as compared with C.B-17-scid/scid mice." Am J Pathol **146**(4): 888-902.

Haller, O. und Wigzell, H. (1977). "Suppression of natural killer cell activity with radioactive strontium: effector cells are marrow dependent." J Immunol **118**(4): 1503-1506.

Hallett, W. H. und Murphy, W. J. (2004). "Natural killer cells: biology and clinical use in cancer therapy." Cell Mol Immunol **1**(1): 12-21.

Hotfilder, M., Rottgers, S., Rosemann, A., Schrauder, A., Schrappe, M., Pieters, R., Jurgens, H., Harbott, J. und Vormoor, J. (2005). "Leukemic stem cells in childhood high-risk ALL/t(9;22) and t(4;11) are present in primitive lymphoid-restricted CD34+CD19- cells." Cancer Res **65**(4): 1442-1449.

Hudson, W. A., Li, Q., Le, C. und Kersey, J. H. (1998). "Xenotransplantation of human lymphoid malignancies is optimized in mice with multiple immunologic defects." Leukemia **12**(12): 2029-2033.

Huntington, N. D., Legrand, N., Alves, N. L., Jaron, B., Weijer, K., Plet, A., Corcuff, E., Mortier, E., Jacques, Y., Spits, H. und Di Santo, J. P. (2009). "IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo." J Exp Med **206**(1): 25-34.

Imai, C., Iwamoto, S. und Campana, D. (2005). "Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells." Blood **106**(1): 376-383.

Ishikawa, F., Yoshida, S., Saito, Y., Hijikata, A., Kitamura, H., Tanaka, S., Nakamura, R., Tanaka, T., Tomiyama, H., Saito, N., Fukata, M., Miyamoto, T., Lyons, B., Ohshima, K., Uchida, N., Taniguchi, S., Ohara, O., Akashi, K., Harada, M. und Shultz, L. D. (2007). "Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region." Nat Biotechnol **25**(11): 1315-1321.

Kaatsch, P. und Spix, C. (2014). "German Childhood Cancer Registry - Report 2013/14 (1980-2013)." Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz.

Kärre, K., Ljunggren, H. G., Piontek, G. und Kiessling, R. (1986). "Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy." Nature **319**(6055): 675-678.

Kataoka, S., Satoh, J., Fujiya, H., Toyota, T., Suzuki, R., Itoh, K. und Kumagai, K. (1983). "Immunologic aspects of the nonobese diabetic (NOD) mouse. Abnormalities of cellular immunity." Diabetes **32**(3): 247-253.

Kiessling, R., Klein, E. und Wigzell, H. (1975). "'Natural' killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype." Eur J Immunol **5**(2): 112-117.

Kübler, A., Woiterski, J., Witte, K. E., Bühring, H. J., Hartwig, U. F., Ebinger, M., Oevermann, L., Mezger, M., Herr, W., Lang, P., Handgretinger, R., Münz, C. und André, M. C. (2014). "Both mature KIR+ and immature KIR- NK cells control pediatric acute B-cell precursor leukemia in NOD.Cg-Prkdcscid IL2rgtmWjl/Sz mice." Blood **124**(26): 3914-3923.

Kumar, V., Ben-Ezra, J., Bennett, M. und Sonnenfeld, G. (1979). "Natural killer cells in mice treated with 89strontium: normal target-binding cell numbers but inability to kill even after interferon administration." J Immunol **123**(4): 1832-1838.

Lanier, L. L. (2005). "NK cell recognition." Annu Rev Immunol **23**: 225-274.

Lanier, L. L., Phillips, J. H., Hackett, J., Jr., Tutt, M. und Kumar, V. (1986). "Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function." J Immunol **137**(9): 2735-2739.

Larochelle, A., Vormoor, J., Hanenberg, H., Wang, J. C., Bhatia, M., Lapidot, T., Moritz, T., Murdoch, B., Xiao, X. L., Kato, I., Williams, D. A. und Dick, J. E. (1996). "Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy." Nat Med **2**(12): 1329-1337.

Leung, W., Iyengar, R., Turner, V., Lang, P., Bader, P., Conn, P., Niethammer, D. und Handgretinger, R. (2004). "Determinants of antileukemia effects of allogeneic NK cells." J Immunol **172**(1): 644-650.

Lin, W., Voskens, C. J., Zhang, X., Schindler, D. G., Wood, A., Burch, E., Wei, Y., Chen, L., Tian, G., Tamada, K., Wang, L. X., Schulze, D. H., Mann, D. und Strome, S. E. (2008). "Fc-dependent expression of CD137 on human NK cells: insights into "agonistic" effects of anti-CD137 monoclonal antibodies." Blood **112**(3): 699-707.

Ljunggren, H. G. und Kärre, K. (1990). "In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition." Immunol Today **11**(7): 237-244.

Ljunggren, H. G. und Malmberg, K. J. (2007). "Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer." Nat Rev Immunol **7**(5): 329-339.

Lozzio, B. B. und Lozzio, C. B. (1979). "Properties and usefulness of the original K-562 human myelogenous leukemia cell line." Leuk Res **3**(6): 363-370.

Ma, A., Koka, R. und Burkett, P. (2006). "Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis." Annu Rev Immunol **24**: 657-679.

Malhotra, A. und Shanker, A. (2011). "NK cells: immune cross-talk and therapeutic implications." Immunotherapy **3**(10): 1143-1166.

Mengarelli, A., Zarcone, D., Caruso, R., Tenca, C., Rana, I., Pinto, R. M., Grossi, C. E. und De Rossi, G. (2001). "Adhesion molecule expression, clinical features and therapy outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia." Leuk Lymphoma **40**(5-6): 625-630.

Middleton, D. und Gonzelez, F. (2010). "The extensive polymorphism of KIR genes." Immunology **129**(1): 8-19.

Miller, J. S., Warren, E. H., van den Brink, M. R., Ritz, J., Shlomchik, W. D., Murphy, W. J., Barrett, A. J., Kolb, H. J., Giralto, S., Bishop, M. R., Blazar, B. R. und Falkenburg, J. H. (2010). "NCI First International Workshop on The Biology, Prevention, and Treatment of Relapse After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Report from the Committee on the Biology Underlying Recurrence of Malignant Disease following Allogeneic HSCT: Graft-versus-Tumor/Leukemia Reaction." Biol Blood Marrow Transplant **16**(5): 565-586.

Moffett-King, A. (2002). "Natural killer cells and pregnancy." Nat Rev Immunol **2**(9): 656-663.

Moretta, A., Locatelli, F. und Moretta, L. (2008). "Human NK cells: from HLA class I-specific killer Ig-like receptors to the therapy of acute leukemias." Immunol Rev **224**: 58-69.

Moretta, A., Tambussi, G., Bottino, C., Tripodi, G., Merli, A., Ciccone, E., Pantaleo, G. und Moretta, L. (1990). "A novel surface antigen expressed by a subset of human CD3- CD16+ natural killer cells. Role in cell activation and regulation of cytolytic function." J Exp Med **171**(3): 695-714.

Moretta, L., Locatelli, F., Pende, D., Marcenaro, E., Mingari, M. C. und Moretta, A. (2011). "Killer Ig-like receptor-mediated control of natural killer cell alloreactivity in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation." Blood **117**(3): 764-771.

Morisot, S., Wayne, A. S., Bohana-Kashtan, O., Kaplan, I. M., Gocke, C. D., Hildreth, R., Stetler-Stevenson, M., Walker, R. L., Davis, S., Meltzer, P. S., Wheelan, S. J., Brown, P., Jones, R. J., Shultz, L. D. und Civin, C. I. (2010). "High frequencies of leukemia stem cells in poor-outcome childhood precursor-B acute lymphoblastic leukemias." Leukemia **24**(11): 1859-1866.

Noguchi, M., Yi, H., Rosenblatt, H. M., Filipovich, A. H., Adelstein, S., Modi, W. S., McBride, O. W. und Leonard, W. J. (1993). "Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans." Cell **73**(1): 147-157.

Oldenborg, P. A., Zheleznyak, A., Fang, Y. F., Lagenaur, C. F., Gresham, H. D. und Lindberg, F. P. (2000). "Role of CD47 as a marker of self on red blood cells." Science **288**(5473): 2051-2054.

Orr, M. T., Murphy, W. J. und Lanier, L. L. (2010). "'Unlicensed' natural killer cells dominate the response to cytomegalovirus infection." Nat Immunol **11**(4): 321-327.

Ozdemir, O. und Savasan, S. (2005). "Combinational IL-2/IL-15 induction does not further enhance IL-15-induced lymphokine-activated killer cell cytotoxicity against human leukemia/lymphoma cells." Clin Immunol **115**(3): 240-249.

Pegram, H. J., Andrews, D. M., Smyth, M. J., Darcy, P. K. und Kershaw, M. H. (2011). "Activating and inhibitory receptors of natural killer cells." Immunol Cell Biol **89**(2): 216-224.

Pende, D., Marcenaro, S., Falco, M., Martini, S., Bernardo, M. E., Montagna, D., Romeo, E., Cognet, C., Martinetti, M., Maccario, R., Mingari, M. C., Vivier, E., Moretta, L., Locatelli, F. und Moretta, A. (2009). "Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity." Blood **113**(13): 3119-3129.

Pfeiffer, M., Schumm, M., Feuchtinger, T., Dietz, K., Handgretinger, R. und Lang, P. (2007). "Intensity of HLA class I expression and KIR-mismatch determine NK-cell mediated lysis of leukaemic blasts from children with acute lymphatic leukaemia." Br J Haematol **138**(1): 97-100.

Puel, A., Ziegler, S. F., Buckley, R. H. und Leonard, W. J. (1998). "Defective IL7R expression in T(-)B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency." Nat Genet **20**(4): 394-397.

Purdy, A. K. und Campbell, K. S. (2009). "Natural killer cells and cancer: regulation by the killer cell Ig-like receptors (KIR)." Cancer Biol Ther **8**(23): 2211-2220.

Robertson, M. J. und Ritz, J. (1990). "Biology and clinical relevance of human natural killer cells." Blood **76**(12): 2421-2438.

Rochman, Y., Spolski, R. und Leonard, W. J. (2009). "New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines." Nat Rev Immunol **9**(7): 480-490.

Rubnitz, J. E., Inaba, H., Ribeiro, R. C., Pounds, S., Rooney, B., Bell, T., Pui, C. H. und Leung, W. (2010). "NKAML: a pilot study to determine the safety and feasibility of haploidentical natural killer cell transplantation in childhood acute myeloid leukemia." J Clin Oncol **28**(6): 955-959.

Ruggeri, L., Aversa, F., Martelli, M. F. und Velardi, A. (2006). "Allogeneic hematopoietic transplantation and natural killer cell recognition of missing self." Immunol Rev **214**: 202-218.

Ruggeri, L., Capanni, M., Casucci, M., Volpi, I., Tosti, A., Perruccio, K., Urbani, E., Negrin, R. S., Martelli, M. F. und Velardi, A. (1999). "Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation." Blood **94**(1): 333-339.

Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W. D., Tosti, A., Posati, S., Rogaia, D., Frassoni, F., Aversa, F., Martelli, M. F. und Velardi, A. (2002). "Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants." Science **295**(5562): 2097-2100.

Ruggeri, L., Mancusi, A., Capanni, M., Urbani, E., Carotti, A., Aloisi, T., Stern, M., Pende, D., Perruccio, K., Burchielli, E., Topini, F., Bianchi, E., Aversa, F., Martelli, M. F. und Velardi, A. (2007). "Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value." Blood **110**(1): 433-440.

Samuels, A. L., Peeva, V. K., Papa, R. A., Firth, M. J., Francis, R. W., Beesley, A. H., Lock, R. B. und Kees, U. R. (2010). "Validation of a mouse xenograft model system for gene expression analysis of human acute lymphoblastic leukaemia." BMC Genomics **11**: 256.

Sanchez, P. V., Perry, R. L., Sarry, J. E., Perl, A. E., Murphy, K., Swider, C. R., Bagg, A., Choi, J. K., Biegel, J. A., Danet-Desnoyers, G. und Carroll, M. (2009). "A robust xenotransplantation model for acute myeloid leukemia." Leukemia **23**(11): 2109-2117.

Santourlidis, S., Trompeter, H. I., Weinhold, S., Eisermann, B., Meyer, K. L., Wernet, P. und Uhrberg, M. (2002). "Crucial role of DNA methylation in determination of clonally distributed killer cell Ig-like receptor expression patterns in NK cells." J Immunol **169**(8): 4253-4261.

Seaman, W. E., Blackman, M. A., Gindhart, T. D., Roubinian, J. R., Loeb, J. M. und Talal, N. (1978). "beta-Estradiol reduces natural killer cells in mice." J Immunol **121**(6): 2193-2198.

Serreze, D. V. und Leiter, E. H. (1988). "Defective activation of T suppressor cell function in nonobese diabetic mice. Potential relation to cytokine deficiencies." J Immunol **140**(11): 3801-3807.

Shilling, H. G., Guethlein, L. A., Cheng, N. W., Gardiner, C. M., Rodriguez, R., Tyan, D. und Parham, P. (2002a). "Allelic polymorphism synergizes with variable gene content to individualize human KIR genotype." J Immunol **168**(5): 2307-2315.

Shilling, H. G., Young, N., Guethlein, L. A., Cheng, N. W., Gardiner, C. M., Tyan, D. und Parham, P. (2002b). "Genetic control of human NK cell repertoire." J Immunol **169**(1): 239-247.

Shook, D. R. und Campana, D. (2011). "Natural killer cell engineering for cellular therapy of cancer." Tissue Antigens **78**(6): 409-415.

Shultz, L. D., Ishikawa, F. und Greiner, D. L. (2007). "Humanized mice in translational biomedical research." Nat Rev Immunol **7**(2): 118-130.

Shultz, L. D., Lang, P. A., Christianson, S. W., Gott, B., Lyons, B., Umeda, S., Leiter, E., Hesselton, R., Wagar, E. J., Leif, J. H., Kollet, O., Lapidot, T. und Greiner, D. L. (2000). "NOD/LtSz-Rag1null mice: an immunodeficient and radioresistant model for engraftment of human hematolymphoid cells, HIV infection, and adoptive transfer of NOD mouse diabetogenic T cells." J Immunol **164**(5): 2496-2507.

Shultz, L. D., Lyons, B. L., Burzenski, L. M., Gott, B., Chen, X., Chaleff, S., Kotb, M., Gillies, S. D., King, M., Mangada, J., Greiner, D. L. und Handgretinger, R. (2005). "Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells." J Immunol **174**(10): 6477-6489.

Shultz, L. D., Schweitzer, P. A., Christianson, S. W., Gott, B., Schweitzer, I. B., Tennent, B., McKenna, S., Mobraaten, L., Rajan, T. V., Greiner, D. L. und et al. (1995). "Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice." J Immunol **154**(1): 180-191.

Siegmund-Schultze, N. (2012). "Therapie von Leukämien bei Kindern: Optimierte Stammzelltransplantate." Dtsch Arztebl International **109**(16): 808-809.

Smyth, M. J., Hayakawa, Y., Takeda, K. und Yagita, H. (2002). "New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer." Nat Rev Cancer **2**(11): 850-861.

Spolski, R. und Leonard, W. J. (2008). "Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity." Annu Rev Immunol **26**: 57-79.

Strowig, T., Chijioko, O., Carrega, P., Arrey, F., Meixlsperger, S., Ramer, P. C., Ferlazzo, G. und Munz, C. (2010). "Human NK cells of mice with reconstituted human immune system components require preactivation to acquire functional competence." Blood **116**(20): 4158-4167.

Takenaka, K., Prasolava, T. K., Wang, J. C., Mortin-Toth, S. M., Khalouei, S., Gan, O. I., Dick, J. E. und Danska, J. S. (2007). "Polymorphism in Sirpa modulates engraftment of human hematopoietic stem cells." Nat Immunol **8**(12): 1313-1323.

Taussig, D. C., Vargaftig, J., Miraki-Moud, F., Griessinger, E., Sharrock, K., Luke, T., Lillington, D., Oakervee, H., Cavenagh, J., Agrawal, S. G., Lister, T. A., Gribben, J. G. und Bonnet, D. (2010). "Leukemia-initiating cells from some acute myeloid leukemia patients with mutated nucleophosmin reside in the CD34(-) fraction." Blood **115**(10): 1976-1984.

Trinchieri, G. (1989). "Biology of natural killer cells." Adv Immunol **47**: 187-376.

Valiante, N. M., Uhrberg, M., Shilling, H. G., Lienert-Weidenbach, K., Arnett, K. L., D'Andrea, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L. und Parham, P. (1997). "Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors." Immunity **7**(6): 739-751.

van der Velden, V. H., Panzer-Grumayer, E. R., Cazzaniga, G., Flohr, T., Sutton, R., Schrauder, A., Basso, G., Schrappe, M., Wijkhuijs, J. M., Konrad, M., Bartram, C. R., Masera, G., Biondi, A. und van Dongen, J. J. (2007). "Optimization of PCR-based minimal residual disease diagnostics for childhood acute lymphoblastic leukemia in a multi-center setting." Leukemia **21**(4): 706-713.

Velardi, A., Ruggeri, L., Mancusi, A., Aversa, F. und Christiansen, F. T. (2009). "Natural killer cell allorecognition of missing self in allogeneic hematopoietic transplantation: a tool for immunotherapy of leukemia." Curr Opin Immunol **21**(5): 525-530.

Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. und Ugolini, S. (2008). "Functions of natural killer cells." Nat Immunol **9**(5): 503-510.

Waldmann, T. A. (2006). "The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design." Nat Rev Immunol **6**(8): 595-601.

Woiterski, J., Ebinger, M., Witte, K. E., Goecke, B., Heininger, V., Philippek, M., Bonin, M., Schrauder, A., Rottgers, S., Herr, W., Lang, P., Handgretinger, R., Hartwig, U. F. und André, M. C. (2013). "Engraftment of low numbers of pediatric acute lymphoid and myeloid leukemias into NOD/SCID/IL2R γ null mice reflects individual leukemogenicity and highly correlates with clinical outcome." Int J Cancer **133**(7): 1547-1556.

Yawata, M., Yawata, N., Draghi, M., Little, A. M., Partheniou, F. und Parham, P. (2006). "Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function." J Exp Med **203**(3): 633-645.

Yawata, M., Yawata, N., Draghi, M., Partheniou, F., Little, A. M. und Parham, P. (2008). "MHC class I-specific inhibitory receptors and their ligands structure diverse human NK-cell repertoires toward a balance of missing self-response." Blood **112**(6): 2369-2380.

Yokoyama, W. M. und Kim, S. (2006). "Licensing of natural killer cells by self-major histocompatibility complex class I." Immunol Rev **214**: 143-154.

Zhang, Y., Wallace, D. L., de Lara, C. M., Ghattas, H., Asquith, B., Worth, A., Griffin, G. E., Taylor, G. P., Tough, D. F., Beverley, P. C. und Macallan, D. C. (2007). "In vivo kinetics of human natural killer cells: the effects of ageing and acute and chronic viral infection." Immunology **121**(2): 258-265.

Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die vorliegende Arbeit wurde in der Universitätskinderklinik Tübingen unter Betreuung von *Herrn Prof. Dr. med. Rupert Handgretinger*, Ärztlicher Direktor der Universitätskinderklinik Tübingen durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch *Frau PD Dr. med. Dr. rer. nat. Maya Caroline André*, Leiterin der AG André an der Universitätskinderklinik Tübingen.

Die Gewinnung, Aufbereitung und Konservierung der Stammzellen wurde von Mitarbeitern des Knochenmarktransplantationslabors der Universitätskinderklinik Tübingen durchgeführt. Die Blut- und Knochenmarksentnahmen zur Gewinnung von leukämischen Zellen (Blasten) von Patienten wurden von Klinikpersonal der jeweiligen Station der Universitätskinderklinik Tübingen durchgeführt. Die Aufbereitung der Stammzellen und Blasten zur Analyse oder zur Injektion in Versuchstiere sowie sämtliche Injektionen und Blutabnahmen an Versuchsmäusen sowie deren Tötung mit anschließender Organentnahme erfolgten durch *Frau Dipl. biol. Vanessa Heininger*, *Frau MTA Barbara Goecke* und *Frau PD Dr. med. Dr. rer. nat. Maya Caroline André*.

Zellzahlbestimmungen erfolgten durch mich sowie durch *Frau Dipl. biol. Vanessa Heininger*, *Frau MTA Barbara Goecke* und *Frau PD Dr. med. Dr. rer. nat. Maya Caroline André*. Die im Rahmen der IL15/IL15R α und K562-mbIL-15-41BBL-Versuchreihe gewonnenen Blutproben und Organe wurden durch mich, teils in Zusammenarbeit mit *Frau Dipl. biol. Vanessa Heininger*, *Frau MTA Barbara Goecke* und *Frau PD Dr. med. Dr. rer. nat. Maya Caroline André* aufbereitet und zur Zellanalyse vorbereitet. Die Vorbereitung und Durchführung der durchflusszytometrischen Analyse (FACS) sowie die Aufbereitung und Interpretation der gewonnenen Daten erfolgte durch mich, teils in Zusammenarbeit mit *Frau PD Dr. med. Dr. rer. nat. Maya Caroline André*.

Die Vorbereitung und Durchführung der Analyse von Blasten aus Mausproben erfolgte durch *Herrn Dipl. biol. Kai Witte* und Mitarbeitern des entsprechenden Labors sowie durch *Frau PD Dr. med. Dr. rer. nat. Maya Caroline André*. Die Durchführung der Genexpressionsanalyse inkl. deren Interpretation sowie die Erstellung von Abbildung 10 erfolgte durch *Herrn Dr. med. Michael Bonin* der Microarray Facility der Abteilung für Medizinische Genetik an der Universität Tübingen. Die Recherchen zu Kandidatengenomen der Leukämieentstehung und deren Auswahl zur Genexpressionsanalyse erfolgten durch mich zusammen mit *Herrn PD Dr. med. Martin Ebinger*, *Herrn Dr. med. Michael Bonin* und *Frau PD Dr. med. Dr. rer. nat. Maya Caroline André*. Die Minimal Residual Disease (MRD) Quantifizierung wurde durch *Herrn Dr. med. André Schrauder* der Kinderklinik der Universitätsklinik Schleswig-Holstein, Campus Kiel durchgeführt. Die Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)-Analyse wurde durch *Frau Dipl. biol. Silja Röttgers* des onkogenetischen Labors der Abteilung für Kinderhämatologie und Onkologie der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt. Textpassagen zur Genexpressionsanalyse, Immunphänotypenanalyse, MRD-Quantifizierung und zur FISH-Analyse wurden mit Erlaubnis zum Teil aus Rohentwürfen der englischen Originalpublikation frei übersetzt und übernommen. Die Analyse, Aufbereitung und Interpretation der Rohdaten zum Leukämieengraftment in NSG-Mäusen für diese Arbeit erfolgte durch mich, in weiten Teilen unabhängig von deren Analyse, Aufbereitung und Interpretation für die Publikation Woiterski et al. (2013) durch die jeweiligen Autoren.

Die gesamte Datengewinnung zur GvL-Versuchsreihe erfolgte durch *Frau Dr. rer. nat. Aylene Kübler*, *Frau Dr. rer. nat. Jeanette Woiterski* und *Frau PD Dr. med. Dr. rer. nat. Maya Caroline André* sowie weiteren Mitarbeitern der AG André. Die Analyse, Aufbereitung und Interpretation der Rohdaten aus den GvL-Versuchen für diese Arbeit erfolgte durch mich, unabhängig von deren Aufbereitung und Interpretation für die Publikation Kübler et al. (2014) durch die jeweiligen Autoren.

Die statistische Auswertung erfolgte teils eigenständig und teils nach Beratung durch das Institut für Biometrie der Universität Tübingen sowie nach Anleitung von *Frau PD Dr. med. Dr. rer. nat. Maya Caroline André*, durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig nach Anleitung und Betreuung durch *Frau PD Dr. med. Dr. rer. nat. Maya Caroline André* verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Ort, Datum

Martin Philippek

Anhang

Patientencharakteristika	73
Ausgewählte Gene für die Genexpressionsanalyse	74
Klassische immunologische Marker kindlicher Leukämien	74
KIR-Charakteristika des Stammzellspenders aus dem GvL-Versuch.....	75
Aktivierende und inhibierende NK Zell Rezeptoren	76

Patientencharakteristika

Tabelle 4: Patientencharakteristika

Die Tabelle beinhaltet Angaben zu den Patienten deren Blasten im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.

ED: Erstdiagnose; FAB: French-American-British; MRD: Minimal residual disease; SR/MR/HR: Standard/mittleres/hohes Risiko;

CR: Komplette Remission; * Patient hat zusätzlich ein Trisomie 21 Syndrom.

Patientencode	Geschlecht	Diagnose	Alter bei ED	FAB-Klassifikation	MRD Tag 33	Mutationen	Risiko	Status
P1A	weiblich	BCP-ALL	2	L1 + L2	-		SR	CR1
P2A	weiblich	BCP-ALL	11	L1	neg.		SR	CR1
P3B	weiblich	BCP-ALL	1	L1	10 ⁻⁴		HR	CR1
P4B	weiblich	BCP-ALL	12	L1 + L2	neg.		MR	CR1
P5D	männlich	T-ALL	8	L2	-		HR	CR2
P6D	weiblich	AML	10	M0	-		HR	CR2
P7E	weiblich	BCP-ALL	11	L2	neg.		SR	CR2
P8F	weiblich	BCP-ALL	4	L1	neg.		MR	verstorben
P9G	weiblich	BCP-ALL	2	L1	neg.	TEL/AML1	SR	CR1
P10G	männlich	BCP-ALL	12	L2	10 ⁻³		HR	CR1
P11H	weiblich	BCP-ALL	7	L1	-		MR	CR2
P12K*	männlich	AML	1	M5	-	GATA1; 5p15; CEP7	-	CR2
P13K	männlich	BCP-ALL	14	L1 + L2	10 ⁻³		MR	CR2
P14K	männlich	BCP-ALL	10	L1	10 ⁻²	BCR/ABL	HR	verstorben
P15M	männlich	Prä-T-ALL	7	L1	-		HR	CR1
P16P	männlich	T-ALL	4	L1	neg.		SR	CR2
P17R	männlich	AML	3	M5	-		-	verstorben
P18R	weiblich	AML	1	M0	-		-	verstorben
P19S	weiblich	BCP-ALL	2	L1	neg.		SR	CR1
P20S	männlich	T-ALL	2	L2	10 ⁻⁴		HR	CR2
P21S	weiblich	BCP-ALL	3	L1	-		SR	CR1
P22S	männlich	BCP-ALL	3	L1 + L2	10 ⁻⁴	TEL/AML1	MR	CR1
P23T	männlich	BCP-ALL	1	L2	-	MLL (t9;11;17)	-	verstorben
P24T	weiblich	BCP-ALL	13	L2 (unklar)	10 ⁻⁴		HR	1. Rezidiv

Ausgewählte Gene für die Genexpressionsanalyse

Tabelle 5: Ausgewählte Gene für die Genexpressionsanalyse

Gen	Beschreibung
BIRC5	Apoptosis inhibitor survivin
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CDKN2B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B
CDX2	Caudal type homeobox 2
CRLF2	Cytokine Receptor
IKZF1	IKAROS family zinc finger 1 (Ikaros)
IRF4	Interferon regulatory factor 4
MSH2	DNA mismatch repair protein
PAX5	B-cell-specific transcription factor
TES	Testis derived transcript
WT1	Wilms tumor 1
ZAP70	Zeta-chain (TCR) associated protein kinase

Klassische immunologische Marker kindlicher Leukämien

Tabelle 6: Klassische immunologische Marker kindlicher Leukämien
Marker übernommen aus Woiterski et al. (2013).

AML	BCP-ALL	T-ALL
CD13	CD10	CD3
CD15	CD19	CD5
CD33	CD34	CD7
CD34	CD38	CD38
CD38	CD58	CD117
CD117		nTdT
CD133		

KIR-Charakteristika des Stammzellspenders aus dem GvL-Versuch

Tabelle 7: Spezifizierung der KIR-Allele des Stammzellspenders aus dem GvL-Versuch auf DNA-Ebene

Angegeben sind die KIR-Allele (vorhanden oder nicht vorhanden) des Stammzellspenders auf DNA-Ebene. Die Daten stammen von der AG André und liegen teilweise auch publiziert vor (Kübler et al., 2014).

Merkmal	Stammzellspender
2DL1	vorhanden
2DL2	nicht vorhanden
2DL3	vorhanden
2DL4	vorhanden
2DL5	vorhanden
3DL1	vorhanden
3DL2	vorhanden
3DL3	vorhanden
2DS1	vorhanden
2DS2	nicht vorhanden
2DS3	nicht vorhanden
2DS4	vorhanden
2DS5	vorhanden
3DS1	vorhanden
2DP1	vorhanden
3DP1f1	nicht vorhanden
3DP1f2	vorhanden

Aktivierende und inhibierende NK Zell Rezeptoren

Tabelle 8: Aktivierende und inhibierende NK Zell Rezeptoren

Aus Ljunggren et al. (2007), ergänzt aus Lanier (2005); Vivier et al. (2008), Moretta et al. (2011) und Pegram et al. (2011).

	Rezeptoren	Ligand	Kommentar
Aktivierend	NKG2D	ULBP1–ULBP4, MICA und MICB	Homodimer
	CD94-NKG2C/E/H*	HLA-E	* H = Splicevariante von E
	NKp30	pp65, BAT-3, HSPG, B7-H6	
	NKp44	Virale Hämagglutinine	
	NKp46	Virale Hämagglutinine, HSPG	
	NKp80	AICL	
	DNAM1 (CD226)	PVR und Nectin-2	
	CD96	PVR und Nectin-2	
	CD16 (FcγRIIIA)	IgG	
	KIR2DS1	HLA-C ^{Lys80} (C2 Epitop)	Niedrige Affinität
	KIR2DS2	HLA-C ^{Asn80} (C1 Epitop), HLA-A11	
	KIR2DS3	?	
	KIR2DS4	HLA-A11	
	KIR2DS5	?	
	KIR3DS1	?	Peptidabhängigkeit?
	BY55 (CD160)	HLA-C	
	CD2	LFA-3 (CD58)	
Inhibierend	CD94-NKG2A/B*	HLA-E	* B = Splicevariante von A
	KIR2DL1	HLA-C ^{Lys80} (C2 Epitop)	
	KIR2DL2 / KIR2DL3	HLA-C ^{Asn80} (C1 Epitop)	
	KIR2DL5	?	
	KIR3DL1	HLA-B ^{Bw4} , HLA-A ^{Bw4}	
	KIR3DL2	HLA-A3, -A11 und CpG ODN	
	KIR3DL3	?	
	LILRB1 (LIR-1, ILT-2)	MHC Klasse I, HLA-G und UL18	
	KLRG1	Cadherine	
	NKR-P1A (KLRB1)	LLT1 (CLEC2D)	T Zell-stimulatorisch
Siglec3, 7 und 9	Sialinsäure		
Beides	2B4 (CD244)	CD48	Funktion vom assoziierten Signalmolekül abhängig
	NTB-A	NTB-A	
	KIR2DL4	HLA-G	

Danksagung

An erster Stelle möchte ich *Frau PD Dr. med. Dr. rer. nat. Maya Caroline André* für ihre unermüdliche und bedingungslose Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit danken. Bei Fragen war sie jederzeit bereit zu helfen, zu erklären und zu betreuen. Ihre fachliche, vor allem aber auch ihre menschliche Kompetenz hat wesentlich zur Fertigstellung dieser Dissertation beigetragen.

Darüber hinaus danke ich meinem Doktorvater *Herrn Prof. Dr. med. Rupert Handgretinger* für seine großzügige Bereitschaft meine Dissertation zu betreuen und zu unterstützen.

Frau Dr. rer. nat. Jeanette Woiterski und *Herrn PD Dr. med. Martin Ebinger* sowie *Frau Dr. rer. nat. Ayline Kübler* danke ich ganz herzlich für die großzügige zur Verfügungstellung ihrer Daten zur Leukämieinduktion und zu den KIR-KIRL Versuchen für die Verwendung und Interpretation in meiner Dissertation. *Herrn Dr. med. Matthias Pfeiffer* danke ich für wertvolle Hilfe bei der Auswertung der KIR-Daten zu dieser Arbeit. Außerdem bin ich glücklich mit *Frau MTA Barbara Goecke* und *Frau Dipl. biol. Vanessa Heining* zwei ausgezeichnete und hilfsbereite Fachkräfte bei der Durchführung der Experimente im Labor gehabt zu haben. Ich danke außerdem allen Mitarbeitern der AG André sowie den Mitarbeitern in den Laboren der Universitätskinderklinik Tübingen, die mich in der experimentellen Phase methodisch und fachlich unterstützt haben.

Abschließend und von ganzem Herzen möchte ich meiner Familie danken. Meiner liebevollen Frau für ihre Nachsicht und Geduld mit mir sowie meinen wunderbaren Kindern für ihre bedingungslose Liebe, auch wenn Studium, Beruf und auch diese Dissertation einmal mehr Zeit und Nerven geraubt haben.

Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft gefördert (KFO 183 / TP4).