

Aus der

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

**Einfluss von $\gamma\delta$ T-Zellen auf die spontane Lysefähigkeit
und ADCC von NK-Zellen im Kontext der haploidenten
TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletierten hämatopoetischen Stammzell-
transplantation**

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

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

**vorgelegt von
Schilling, Anne**

2020

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. P. J. Lang

2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Haen

Tag der Disputation: 03.06.2020

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	1
1.1 Allogene Stammzelltransplantation	1
1.1.1 Die haploidente TcR $\alpha\beta$ /CD19- depletierte Stammzelltransplantation	3
1.2 NK-Zellen.....	4
1.3 $\gamma\delta$ T-Zellen.....	6
1.4 Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC)	9
1.5 Der CD19-Antikörper CD19-4G7SDIE AK.....	10
1.6 CH14.18	12
1.7 Zoledronsäure als Modulator der $\gamma\delta$ T-Zellaktivität.....	13
1.8 Interleukin 2	15
1.9 Interaktion zwischen $\gamma\delta$ T-Zellen und NK-Zellen	16
1.10 Malignomerkrankungen im Kindesalter.....	17
1.10.1 Die akute lymphatische Leukämie	18
1.10.2 Lymphome.....	20
1.10.3 Das Neuroblastom.....	20
1.11 Zielsetzung der Arbeit.....	21
2. MATERIAL UND METHODEN.....	23
2.1 Allgemeine Materialien und Programme.....	23
2.1.1 Geräte.....	23
2.1.2 Verbrauchsmaterialien, Glas- und Plastikwaren	23
2.1.3 Stammlösungen.....	24
2.1.4 Monoklonale Antikörper für Durchflusszytometrie.....	26
2.1.5 Software	27
2.2 Therapeutische Antikörper.....	27
2.2.1 CD19 Antikörper CD19-4G7SDIE AK.....	27
2.2.2 Anti-GD2 CH14.18.....	28

2.3 Zellmaterial	28
2.3.1 PBMC pädiatrischer Patienten nach Transplantation	29
2.4 Zellbiologische Methoden	30
2.4.1 Zellkultur	30
2.4.2 Passagieren von adhärenen Zelllinien	31
2.4.3 Lymphozytenseparation	31
2.4.4 Zytotoxizitätsassay mit CD107a und intrazellulärer Zytokinfärbung	32
2.4.5 Aktivierungs-Assay mit CD69 und CD137	34
2.4.6 Kill- Assay	34
2.4.7 Durchflusszytometrie	36
2.4.8 Depletion von $\gamma\delta$ T Zellen	39
2.4.9 Leukozytenstimulation mit IL2 und Zoledronsäure	41
2.4.10 Typischer Versuchsablauf mit PBMC	42
2.4.11 Isolation von NK-Zellen	42
2.4.12 Expansion von $\gamma\delta$ T-Zellen	44
2.4.13 Titration der Interaktion expandierter $\gamma\delta$ T-Zellen mit frisch isolierten NK-Zellen und Blockade von CD137	45
2.4.14 Echtzeit Zytotoxizitäts-Assay xCELLigence	46
2.4.15 Expansion von NK-Zellen	47
2.4.16 Luciferase-Assay	49
2.5 Statistische Auswertung	51
2.6 Ethikantrag	52
3. ERGEBNISSE	53
3.1 Untersuchung der ADCC von NK-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen durch CD19-4G7SDIE AK	53
3.2 CD19 Expression der Targetzellen	53
3.2.1 ADCC von NK-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen pädiatrischer Patienten nach SZT und gesunder Probanden durch den CD19-4G7SDIE AK	54
3.2.1.1 Messung der Aktivierung durch CD19-4G7SDIE AK mit dem Aktivitätsmarker CD69	54
3.2.1.2 Messung der Aktivierbarkeit von NK- und $\gamma\delta$ T-Zelle durch CD19-4G7SDIE AK mittels CD107a-Assay und ICS	55
3.2.1.3 Direkte Messung der ADCC im Kill-Assay	57

3.2.2	<i>Untersuchung der Aktivierbarkeit von NK-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen pädiatrischer Patienten nach haploidenter TcR$\alpha\beta$/CD19-depletierter SZT durch CD19-4G7SDIE AK</i>	58
3.2.2.1	<i>Aktivitätssteigerung von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen durch CD19-4G7SDIE AK</i>	58
3.2.2.2	<i>Direkte Messung der ADCC im Kill-Assay</i>	59
3.2.3	<i>Vergleich der Aktivierbarkeit von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen gesunder Probanden mit pädiatrischen Patienten nach haploidenter TcR$\alpha\beta$/CD19-depletierter SZT</i>	60
3.2.4	<i>Einfluss $\gamma\delta$ T-Zellen auf NK-Zellen in Bezug auf die spontane Lysefähigkeit und ADCC</i>	64
3.3	Einfluss von $\gamma\delta$ T-Zellen auf NK-Zellen unter Stimulation mit IL2 und Zoledronat	67
3.3.1	<i>Einfluss von IL2 und Zoledronat auf NK-Zellen</i>	67
3.3.1.1	<i>Einfluss der Prästimulation mit Zoledronat und IL2 auf NK-Zellen</i>	68
3.3.2	<i>Einfluss von IL2, Zoledronat und CD19-4G7SDIE AK auf Expression von CD69 auf $\gamma\delta$ T-Zellen</i>	72
3.3.2.1	<i>Einfluss der Prästimulation mit IL2 und Zoledronat auf $\gamma\delta$ T-Zellen</i>	73
3.3.3	<i>Einfluss von $\gamma\delta$ T-Zellen auf die Aktivierung von NK-Zellen unter Einfluss von Zoledronat</i>	76
3.4	Einfluss von CD137 auf die Interaktion zwischen NK- Zellen und expandierten $\gamma\delta$ T-Zellen	77
3.4.1	<i>CD137-Expression durch CD19-4G7SDIE AK und NALM-16</i>	77
3.4.2	<i>Expansion von $\gamma\delta$ T-Zellen</i>	78
3.4.3	<i>Titration des optimalen Verhältnisses von $\gamma\delta$ T-Zellen zu NK-Zellen</i>	79
3.4.4	<i>Blockade von CD137 mittels Antikörper</i>	80
3.4.5	<i>Wirkung von humanem IgG auf die CD137 Expression</i>	82
3.4.6	<i>Wirkung von humanem IgG und CD137-Blockade auf die Inkubation von NK-Zellen mit exp. $\gamma\delta$ T-Zellen</i>	84
	<i>Abb. 3-24 Mikroskopische Analyse der Wirkung von IgG und CD137-Blockade auf die Inkubation von NK-Zellen mit exp. $\gamma\delta$ T-Zellen</i>	84
3.4.7	<i>Analyse der Rolle von CD137 in der Interaktion zwischen NK-Zellen und exp. $\gamma\delta$ T-Zellen im CD107a-Assay mit ICS</i>	84
3.4.7.1	<i>Wirkung von humanem IgG auf die Aktivierbarkeit von NK-Zellen und exp. $\gamma\delta$ T-Zellen mit und ohne CD19-4G7SDIE AK</i>	84
3.4.7.2	<i>Wirkung exp. $\gamma\delta$ T-Zellen auf die Aktivierbarkeit von NK-Zellen</i>	85
3.4.7.3	<i>Wirkung von NK-Zellen auf die Aktivierbarkeit exp. $\gamma\delta$ T-Zellen</i>	87
3.4.7.4	<i>Wirkung einer CD137-Blockade auf Aktivierbarkeit von NK-Zellen und exp. $\gamma\delta$ T-Zellen</i>	89
3.4.8	<i>Echtzeitanalyse der spontanen Lysefähigkeit und ADCC von NK-Zellen und exp. $\gamma\delta$ T-Zellen mittels xCELLigence</i>	92
3.4.8.1	<i>Vergleich der spontanen Lysefähigkeit und ADCC von NK-Zellen und exp. $\gamma\delta$ T-Zellen</i>	93
3.4.8.2	<i>Wirkung einer CD137-Blockade auf die spontane Lysefähigkeit und ADCC von NK-Zellen und exp. $\gamma\delta$ T-Zellen</i>	94
3.4.9	<i>Analyse der spontane Lysefähigkeit von exp. $\gamma\delta$ T-Zellen mittels fluoreszierender Targetzellen</i>	97

IV

3.4.10	<i>Analyse der spontanen Lysefähigkeit und ADCC von exp. $\gamma\delta$ T-Zellen und exp. NK-Zellen im Luciferase-Assay</i>	99
4.	DISKUSSION	102
4.1	Auswahl der Targetzelllinien und Messparameter	104
4.2	Verhalten von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen unter Stimulation mit CD19-4G7SDIE AK	105
4.3	Verhalten von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen unter Stimulation mit IL2 und Zoledronat	111
4.4	Einfluss von $\gamma\delta$ T-Zellen auf NK-Zellen	118
4.5	Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen durch NK-Zellen	124
4.6	Targetzelllyse und ADCC durch NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen	128
4.7	Klinischer Bezug und Ausblick	132
5.	ZUSAMMENFASSUNG	135
6.	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	137
6.1	Abbildungsverzeichnis	137
6.2	Tabellenverzeichnis	139
7.	LITERATURVERZEICHNIS	140
8.	ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL	153
9.	ANHANG	154
9.1	Abbildungen	154
10.	VERÖFFENTLICHUNGEN	155
10.1	Publikation	155
10.2	Kongress	155
11.	DANKSAGUNG	156

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADCC	Antibody-dependent cellular cytotoxicity
AK	Antikörper
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Antigen presenting cell
BCP-ALL	B-cell precursor ALL
BNT3A1	Butyrophilin 3A1
cALL	Common acute lymphoblastic leukemia
Cat.No.	Catalog number
CD	Cluster of differentiation
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronische myeloische Leukämie
E:T-Ratio	Effector cell to target cell ratio
Exp.	Expandiert
FACS	Fluorescence activated cell scanning
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FppS	Farnesyl-pyrophosphat-Synthase
FSC	Forward light scatter
g	Relative Erdbeschleunigung
GvHD	Graft-versus-host disease
GvL	Graft-versus-leukemia
hIgG	Humanes IgG
HLA	Humane Leukozyten Antigen
HMBPP	(E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
IE	Internationale Einheiten
IPP	Isopentenyl pyrophosphate
IFN- γ	Interferon- γ

VI Abkürzungsverzeichnis

Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KIR	Killer cell immunoglobulin-like receptor
KM-Blasten	Blasten aus dem Knochenmark
KMT	Knochenmarktransplantation
MHC	Major histocompatibility complex g
MRD	Minimal residual disease
MSC	Mesenchymale Stammzelle
n	Anzahl der Einzelmessungen
NKT-Zelle	Natürliche Killer T-Zelle
NKR	NK-Rezeptor
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
PBS	Phosphat buffered saline
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PE	Phycoerythrin
PerCp	Peridinin-Chlorophyll Protein
PFA	Paraformaldehyde
R	Bremse
RhoB	Ras homolog gene family, member B
RT	Raumtemperatur
SD	Standard deviation
SSC	Sideward light scatter
SZT	Stammzelltransplantation
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose Faktor
Treg	Regulatorische T-Zelle
TRM	Transplant-related mortality
TZ	T-Zelle

1. EINLEITUNG

1.1 **Allogene Stammzelltransplantation**

Die erste erfolgreiche Stammzelltransplantation (SZT) bei pädiatrischen Patienten wurde bereits 1981 durchgeführt (1). Heute bietet die SZT bei akuten Leukämien und weiteren hämatologischen Erkrankungen eine potente Therapieoption. Sie kann auch bei verschiedenen anderen malignen Erkrankungen im Kindesalter, wie beispielsweise dem Neuroblastom, erfolgreich angewendet werden (2-5). Die SZT wird in Transplantationszentren routinemäßig angeboten und ist bei Hochrisikoleukämien auch als Firstline-Therapie zugelassen (6). Bei akuten Leukämien kommt die SZT vor allem bei pädiatrischen Patienten zum Einsatz, die auf die initiale Therapie nicht ansprechen, ein Rezidiv erleiden oder bei denen die Standardtbehandlung keine Aussicht auf Heilung bietet (7). Bei diesen Patienten ist die SZT oft die einzige kurative Therapie (8). Die SZT stellt somit zwar einen wichtigen Therapiebaustein dar, dennoch bergen posttransplant Infektionen oder Rezidive ein enormes Risiko, besonders in der Zeit der Immunrekonstitution nach Transplantation. Vor allen Dingen das Rezidiv ist eine prognoseentscheidende Gefahr, da eine erneute Transplantation aufgrund der hohen Toxizität frühestens nach 6-12 Monaten erneut möglich ist (9). Dennoch konnte das 5-Jahres-gesamt-Überleben bei akuter lymphatischer Leukämie (ALL) nach SZT durch deutliche Reduktion der transplantationsassoziierten Mortalität (TRM) von 28% auf 65% gesteigert werden (10). Weiterentwicklungen der Stammzelltransplantation sind dennoch nötig, um die TRM weiter zu senken.

Das Prinzip der SZT beruht darauf, das Immunsystem eines Patienten durch das eines gesunden Spenders zu ersetzen. Dafür ist zunächst die Konditionierung des Empfängers notwendig, bei der die hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark durch Ganzkörperbestrahlung oder myeloablativer Chemotherapie abgetötet werden. Die Stammzellen können vom Spender aus dem Knochenmark

oder nach Stimulation mit Granulozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (Granulocyte-Colony Stimulating Factor, G-CSF) aus dem peripheren Blut gewonnen und transplantiert werden (11, 12). Die Stammzellen siedeln sich im Knochenmark des Patienten an, teilen sich hier und übernehmen die Blutbildung.

Für das Gelingen einer SZT spielt das humane Leukozyten Antigen -System (HLA-System) bzw. der Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex = MHC) eine wichtige Rolle, wobei jeder Mensch zwei HLA-Haplotypen besitzt. T-Zellen können zwischen fremden und körpereigenen MHC-Molekülen unterscheiden und so bei einer Interaktion mit körperfremden Zellen, wie beispielsweise einem Transplantat mit anderem HLA-Haplotyp, eine Immunreaktion auslösen. Diese wird als Graft-versus-Host Reaktion (GvH-Reaktion) bezeichnet und stellt eine potentiell lebensbedrohliche Komplikation dar (13, 14). Daher wurden ursprünglich nur Stammzellen/Knochenmark von Spendern mit identischen HLA-Haplotypen transplantiert. In 30% der Fälle kann ein Fremdsponder mit identischem HLA-Typ gefunden werden (15). Geschwister weisen mit einer Wahrscheinlichkeit von 25% denselben HLA-Typ auf (15). Da auf diesem Weg nicht für alle Patienten ein Spender gefunden werden kann, gibt es alternativ auch noch die Möglichkeit der haploidenten Transplantation, an deren Entwicklung auch die Universitätsklinik Tübingen beteiligt war. Hierbei stimmt nur ein HLA-Haplotyp zwischen Spender und Empfänger überein, womit in jedem Fall Eltern und eigene Kinder oder Geschwister als Spender in Frage kommen. So steht beinahe für jeden Patienten ein Spender zur Verfügung (12). Haploidente SZT bergen allerdings auch aufgrund ihrer HLA-Disparität ein erhöhtes Risiko für Transplantatabstoßung und GvH-Reaktionen (16, 17).

Um das Risiko bei haploidenter SZT zu senken, wurden anfangs nur Stammzellen nach CD34-Anreicherung transplantiert (16, 18-20). Später kam man zu dem Schluss, auch Immunzellen mitzutransplantieren, um die Zeit der Immunrekonstitution zu überbrücken und das Engraftment zu verbessern (7, 21, 22). Allerdings können nicht alle Immunzellen bei der haploidenten Transplantation problemlos transplantiert werden. So lösen $\alpha\beta$ T-Zellen die GvH-Reaktion aus. Die Transplantation von CD19⁺ B-Zellen steht mit EBV assoziierter lymphoproliferativer Erkrankung in Verbindung (19, 21). Die Verwendung CD3/CD19-

depletierter Transplantate ermöglicht neben CD34⁺ Stammzellen, auch Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Dendritische-Zellen im Transplantat zu belassen (23-25), während B- und T-Zellen entfernt werden. Als problematisch zeigte sich allerdings, dass CD3/CD19-depletierte Transplantate trotz CD3-Depletion einen 10-fach höheren Gehalt an T-Zellen aufweisen, als bei CD34-Positivselektion und somit ein erhöhtes GvH-Risiko besteht (26). Eine Weiterentwicklung war die haploidente TcR $\alpha\beta$ /CD19- depletierte SZT.

1.1.1 Die haploidente TcR $\alpha\beta$ /CD19- depletierte Stammzelltransplantation

Bei der haploidenten TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletierten SZT erfolgt eine Depletion an TcR $\alpha\beta$ ⁺ und CD19⁺ Zellen. Es zeigte sich mit der neuen Depeltionsmethode eine hocheffiziente Depletion (zuverlässig > 4 Logstufen) der unerwünschten $\alpha\beta$ T-Zellen, während $\gamma\delta$ T-Zellen im Transplantat verbleiben können (25, 27, 28). $\gamma\delta$ T-Zellen weisen nur indirekt ein Risiko für GvH-Reaktionen auf, können aber selbst zur Rezidivprophylaxe und Infektabwehr beitragen (28-32). Zudem legen die Forschungsergebnisse nahe, dass $\gamma\delta$ T-Zellen NK-Zellen aktivieren und mit ihnen in der Malignombekämpfung interagieren (33-36). Im Rahmen erster vielversprechender klinischer Studien an der Universitätskinderklinik Tübingen und dem Bambino Gesù Hospital in Rom zeigte sich nach haploidenter TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletierter SZT eine schnellere Immunrekonstitution und eine niedrige TRM-Rate (37, 38). Besonders NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen regenerieren sich gut und schnell, sodass in den ersten Wochen nach Transplantation $\gamma\delta$ T-Zellen die $\alpha\beta$ T-Zellen zahlenmäßig dominieren (37). 3 Monate nach SZT weisen Patienten, die eine TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletierte SZT erhalten haben, einen höheren Prozentsatz an $\gamma\delta$ T-Zellen auf als Patienten nach Erhalt CD34-angereicherter Transplantate (39). Die haploidente TcR $\alpha\beta$ /CD19- depletierte SZT könnte somit eine wichtige Innovation in der Verbesserung des Überlebens von Patienten nach SZT bedeuten.

1.2 NK-Zellen

Mit 5-15% aller Blutlymphozyten (40) sind NK-Zellen neben B- und T-Zellen eine eigenständige Lymphozytenpopulation. NK-Zellen kommen im Blut und in allen lymphatischen Geweben wie der Milz und dem Knochenmark vor, aber sie sind auch in nicht-lymphatischen Geweben zu finden (41). NK-Zellen bilden besonders in der Abwehr virusinfizierter oder maligner Zellen (42) einen unabdingbaren Teil der angeborenen Immunabwehr, indem sie zur Produktion von Zytokinen und direkter Zytotoxizität befähigt sind (43). Zudem wird NK-Zellen eine Funktion als Bindeglied zum adaptiven Immunsystem zugeschrieben, da sie mit T-Zellen, Monozyten und Dendritischen Zellen kommunizieren und eine regulatorische Funktion ausüben können (44, 45). Ob und wie stark eine NK-Zelle aktiviert wird, ist abhängig davon, welche Signale im komplexen Zusammenspiel inhibitorischer, aktivierender und kostimulatorischer Rezeptoren überwiegen. Die Zusammensetzung der von den NK-Zellen exprimierten Rezeptoren ist nicht konstant, sondern wird u.a. durch Milieufaktoren oder dem Reifegrad der NK-Zelle beeinflusst (46). Um dies genauer zu erläutern, können beispielhaft die „Missing self-“ und die „Induced self-Hypothese“ angeführt werden, die eine entscheidende Rolle in der NK-Zellfunktion spielen (47) und in Abb. 1-1 grafisch dargestellt sind. Bei der „Missing self-Hypothese“ geht es darum, dass NK-Zellen durch das Erkennen von MHC-Klasse I Molekülen, „eigen“ („self“) und „fremd“ unterscheiden können. Treffen NK-Zellen auf eine Zelle, die kein oder wenig MHC I trägt, wie es bei maligne entarteten oder virusinfizierten Zellen der Fall ist, wird die Zelle als Ziel erkannt und lysiert (48). Die „Induced self-Hypothese“ hingegen beschreibt den Mechanismus, bei dem aktivierende Rezeptoren der NK-Zellen, wie NKG2D, Oberflächenantigene auf entarteten oder infizierten Zellen erkennen (MICA/B, ULBP1-6). Die Erkennung von NKG2D-Liganden auf Zellen führt zuverlässig zur Lyse der Zielzelle (49). Die Lyse von Zielzellen durch NK-Zellen erfolgt in der Regel über die Freisetzung von Perforin bzw. Granzym oder über das FAS/FAS-L- bzw. Trail-System (50).

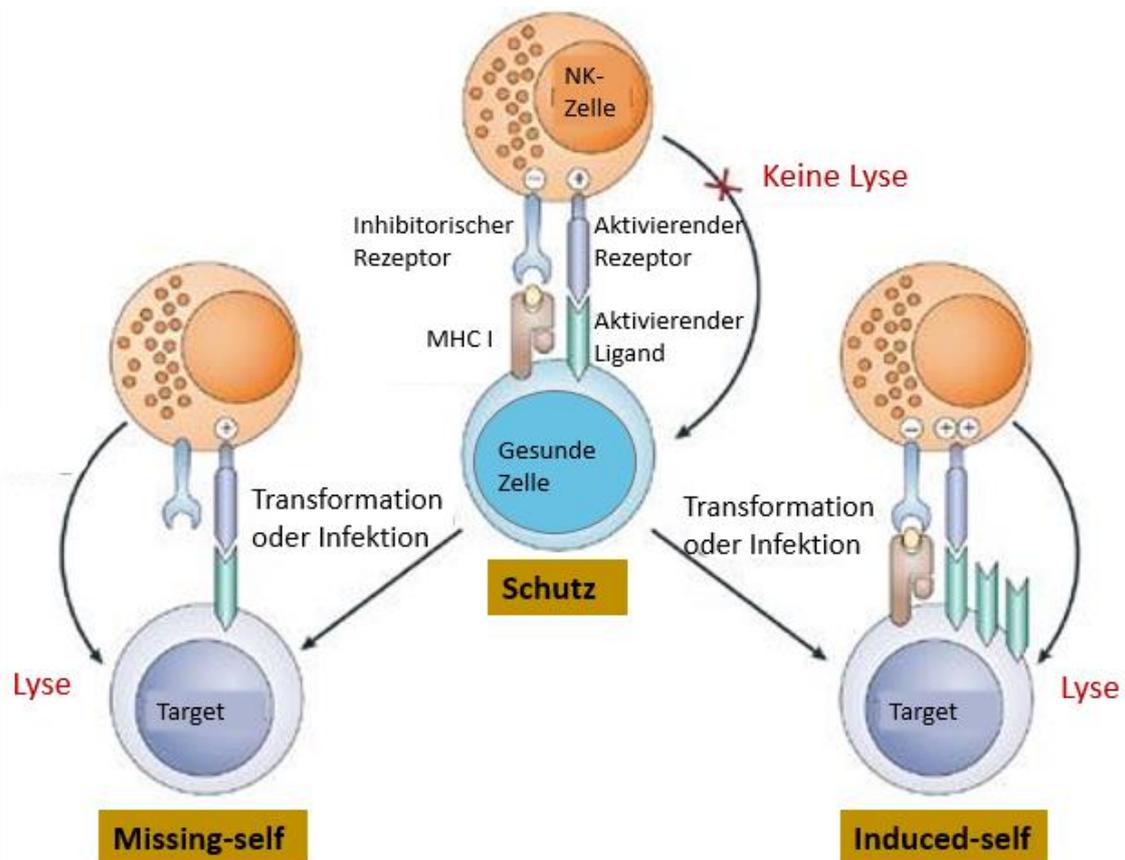


Abb. 1-1 Die Induced- self- und Missing-self-Hypothese von NK-Zellen

Gesunde Zellen werden von NK-Zellen nicht lysiert, da sich inhibierende Signale, übermittelt durch Bindung von MHC I -Molekülen, und stimulierende Signale, übermittelt von aktivierenden Rezeptoren wie NKGD2, ausbalancieren. Die "Missing-self-Hypothese" kommt zu der Anwendung, wenn Targetzellen durch Infektion oder maligne Transformation, keine oder weniger MHC I-Moleküle exprimieren. Durch das daraus resultierende Ausbleiben inhibitorischer Signale überwiegen aktivierende Stimuli und die Targetzelle wird lysiert. Durch maligne Transformation oder Infektion von Targetzellen kann es auch zu einer erhöhten Expression von aktivierenden Liganden auf der Targetzelloberfläche kommen. Binden NK-Zellen an diese Liganden, ist das vermittelte aktivierende Signal stärker als das inhibitorische durch MHC I-Bindung. Es kommt zu einer Lyse der Targetzelle. Dieser Mechanismus wird als "Induced-self-Hypothese" bezeichnet. Es ist auch eine Kombination der "Induced-self -" und der „Missing-self-Hypothese“ bei der Erkennung infizierter oder maligne transformierter Zellen durch NK-Zellen möglich (49). Modifiziert nach Raulet et al., Nature reviews Immunology 2006 (49).

NK-Zellen werden nicht wie T-Zellen geprimt und sind nicht MHC-restringiert. Nach Reifung und erfolgtem Licensing/Education, können NK-Zellen veränderte Zellen erkennen, wirken zytotoxisch oder setzen Zytokine frei (41). NK-Zellen sezernieren besonders Zytokine mit proinflammatorischer Wirkung (INF- γ , TNF- α , G-CSF, GM-CSF, IL3), aber auch solche mit antiinflammatorischer Wirkung (IL5, IL10 IL13) (51). Die freigesetzten Zytokine wirken dabei auto- und parakrin, wodurch NK-Zellen vielfältige immunregulatorische Effekte besitzen. NK-Zellen werden selbst auch durch Zytokine reguliert, wobei IL1, IL2, IL12, IL15, IL18, IL21 und INF γ / β ihre sekretorischen, zytolytischen, proliferativen und antitumorösen Eigenschaften fördern (52, 53). Überdies wird die Aktivität der NK-Zellen auch durch Zell-Zellkontakt zu Targetzellen oder anderen Immunzellen moduliert (49).

NK-Zellen lassen sich anhand ihrer Oberflächenantigene von anderen Lymphozyten differenzieren und sind als CD56⁺CD3⁻ definiert (41). Innerhalb der NK-Zellen lassen sich zwei Hauptpopulationen mit unterschiedlichen Funktionen definieren. Den größeren Anteil mit ca. 60-90 % der NK-Zellen sind im Blut CD56^{dim}CD16⁺ NK-Zellen. Sie sind besonders zytotoxisch (54, 55). Die CD56^{high}CD16⁻ NK-Zellen repräsentieren mit 10-40 % den kleineren Anteil im Blut, aber dafür den Hauptanteil der NK-Zellen in den sekundär lymphatischen Organen. Sie üben durch Zytokinsekretion hauptsächlich immunregulatorische Funktionen aus (55, 56). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass NK-Zellen neben einer Vielzahl an immunologischen Funktionen auch einen klinisch relevanten antileukämischen Effekt aufweisen, der auch im Kontext der SZT von großer Bedeutung ist (57, 58).

1.3 $\gamma\delta$ T-Zellen

Mitte der 1980er Jahre wurden die $\gamma\delta$ T-Zellen als neue Untergruppe der T-Zellen erstmals beschrieben (59). $\gamma\delta$ T-Zellen machen 1-5 % aller CD3⁺ Zellen im Blut aus. In Oberflächengeweben, wie beispielsweise Darm oder Haut, stellen sie aber mit 50-90% den Hauptanteil der T-Zellen (60). Zwar sind die Funktionen der $\gamma\delta$ T-Zellen noch nicht vollständig aufgeklärt, aber sie scheinen ein breites Aufgabenspektrum abzudecken, das neben MHC-unabhängiger Tumor- und Infektabwehr auch beispielsweise Wundheilung umfasst (61, 62). $\gamma\delta$ T-Zellen reifen im

Thymus und entwickeln dort wie alle T-Zellen ihren T-Zellrezeptor (t cell receptor, TCR) durch V(D)J-Rekombination (63). Der TCR besteht aus Heterodimeren einer γ und einer δ Kette, wobei sich je nach Art der δ -Kette, Subgruppen definieren lassen. 50-95% der im Blut zirkulierenden $\gamma\delta$ T-Zellen exprimieren einen TCR, der aus einer V δ 2- und einer Vy9-Kette besteht, sogenannte Vy9V δ 2 T-Zellen. $\gamma\delta$ T-Zellen mit einem TCR bestehend aus einer V δ 1-Kette und einer nicht spezifisch definierten Vy-Kette, sogenannte V δ 1, kommen eher in Haut, Leber, Milz, Epithelien und soliden Tumoren vor (62).

Die Funktionen und Liganden der V δ 1-T-Zellen sind nicht vollständig geklärt. Sie scheinen aber eine Rolle in der Tumorerkennung und Infektabwehr zu spielen, indem sie über NKG2D auf Targetzellen MICA/B (64) oder ULBP3 (65) erkennen, sowie Zytokine wie INF γ und TNF α produzieren (62) und über Chemokine wie CCL3-5 andere Immunzellen wie Makrophagen rekrutieren können (66).

Über die Funktionen der Vy9V δ 2-TZ ist mehr bekannt. Auch sie sind potente Effektoren in der Infekt- und Tumorabwehr. Über ihren Vy9V δ 2-Rezeptor können sie eine Akkumulation von Pyrophosphate in Zellen, die von Bakterien, Parasiten oder Protozoen produziert werden, z.B. HMBPP ((E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate) oder akkumuliertes IPP (isopentenyl pyrophosphate), das von Körperzellen produziert wird, erkennen und dadurch aktiviert werden (67-70). IPP akkumuliert in malignen entarteten Zellen, die so von den Vy9V δ 2-TZ erkannt und über die Freisetzung von Granzym und Perforin lysiert werden können (71). Eine intrazelluläre Akkumulation von IPP führt zu einer Konformationsänderung von Butyrophilin3A1 (BTN3A1), einem transmuralen Oberflächenmolekül, das zur Familie der Immunglobulinrezeptoren gehört und nach Konformationsänderung an den Vy9V δ 2-TcR binden kann (72).

Des Weiteren besitzen Vy9V δ 2-TZ auch natural killer cell receptors (NKR) und NKG2D, die Vy9V δ 2-T-Zellen im Rahmen der Tumorzellerkennung stimulieren können (73, 74). Die Lyse bzw. Apoptose von Targetzellen erfolgt analog zu NK-Zellen sowohl über die Freisetzung von Granzym und Perforin als auch über das FAS/FAS-L- bzw. das Trail-System (71). In den letzten Jahren wurde zudem bekannt, dass $\gamma\delta$ T-Zellen nach Aktivierung auch als Antigen-präsentierende-Zellen (antigen presenting cells, APC) fungieren können (75). Sie können somit dazu

beitragen eine antigen-spezifische Immunantwort durch $\alpha\beta$ T-Zellen zu initiieren. Mithilfe der vielfältigen Effektorfunktionen bilden $\gamma\delta$ T-Zellen eine Brücke zwischen adaptivem und angeborenem Immunsystem (76). Aktivierte Vy9V δ 2-TZ üben zudem immunregulatorische bzw. aktivierende Funktionen über die Freisetzung großer Mengen an Zytokinen, wie INF γ , TNF α und IL17 aus (62, 77-79). Abb. 1-2 gibt eine Übersicht über die Rezeptoren und Funktionen von Vy9V δ 2-T-Zellen.

Einerseits besitzen $\gamma\delta$ T-Zellen einen durch V(D)J-Rekombination entstandenen TCR, ein Merkmal der adaptiven Immunabwehr. Andererseits setzen sie ihn aber wie einen „Pattern Recognising Receptor“ ein, und besitzen auch sonst klassische „Pattern Recognising Receptors“ wie Toll-like-Rezeptoren (80, 81), ein Charakteristikum der angeborenen Immunabwehr. Zusammengefasst präsentieren sich die $\gamma\delta$ T-Zellen als effiziente Effektoren in der Tumor- und Infektabwehr mit einer großen Bandbreite an Funktionen, wie Zytokin- und Chemokinproduktion, immunregulatorischem Potential, Antigenpräsentation und der Fähigkeit zu direkter Zytotoxizität. All diese Funktionen machen $\gamma\delta$ T-Zellen hochinteressant für den Einsatz in der Behandlung von Tumorerkrankungen.

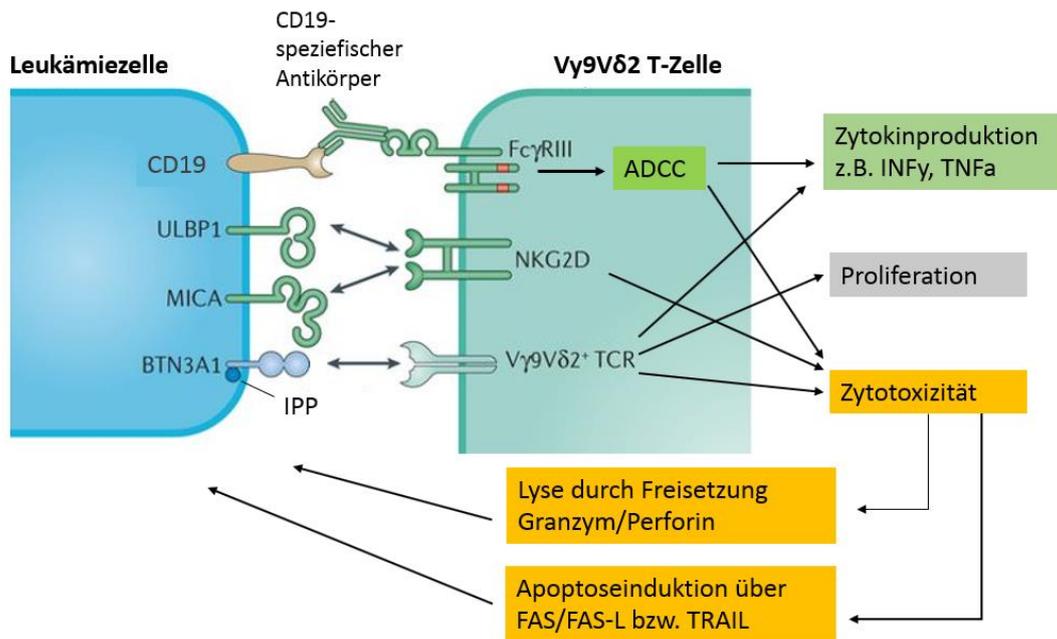


Abb. 1-2 Interaktion von Vy9Vδ2-T-Zellen mit Leukämiezellen

Über den T-Zellrezeptor (TcR) können Vy9Vδ2-T-Zellen Leukämiezellen anhand einer intrazellulären Akkumulation von Isopentylpyrophosphat (IPP) erkennen, die in einer Konformationsänderung von BTN3A1, einem Liganden des Vy9Vδ2-TcR, resultiert (72). Vy9Vδ2-T-Zellen exprimieren auch Natürliche -Killer-Zell-Rezeptoren wie NKG2D und können so bei Bindung von MICA oder ULBP1 auf Tumorzellen aktiviert werden. Über FcγRIII (CD16) kann durch Bindung tumorzellspezifischer therapeutischer IgG-Antikörper ADCC vermittelt werden. Ein Beispiel hierfür könnten CD19-Antikörper wie CD19-4G7SDIE AK sein, die in der Therapie der Leukämie eingesetzt werden. Die Interaktion mit Leukämiezellen über die hier aufgeführten Rezeptoren resultiert in einer Aktivitätssteigerung, die mit einer gesteigerten Zytokinfreisetzung, Proliferation oder Zytotoxizität einhergehen kann. Der zytotoxische Effekt wird dabei über die Freisetzung von Granzym- bzw. Perforingranula oder über das FAS/FAS-L bzw. TRAIL-System vermittelt (62, 82). ADCC: antibody dependend cellular cytotoxicity; BTN3A1: butyrophilin 3A1; MICA: MHC class I-related chain A; ULBP, UL16-binding protein. Modifiziert nach Silva-Santos et al., Nature Reviews Immunology 2015 (62)

1.4 Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC)

In der ADCC macht man sich die Fähigkeit von Immunzellen zu Nutze, durch Immunglobuline Tumorzellen für FcR-tragende Immunzellen erkennbar zu machen. Hierdurch können Targetzellen rasch und gezielt eliminiert werden. Eine Vielzahl verschiedener Immunzellen exprimiert einen Fcγ-Rezeptor (FcγR), der zirkulierende Immunglobuline G (IgG) über ihren Fc-Teil binden kann (5, 83, 84).

Die Bindung von IgG an diesen Rezeptor kann in den Immunzellen, je nach Fc-Rezeptorgruppe, ein aktivierendes (u.a. FcγRIIIa/CD16a bzw. FcγRIIc/CD32c) oder inhibierendes Signal (FcγRIIb/CD32b) auslösen (85). NK-Zellen bzw. CD56dimCD16⁺ NK-Zellen tragen als einzige Immunzelle keinen FcγRIIb, sondern nur FcγRIIIa und FcγRIIc (40, 83). Daher stellen sie eine potente Effektorzellgruppe in der Ausübung der ADCC dar. Da die Aktivität einer NK-Zelle durch ein komplexes Zusammenspiel aktivierender und inhibierender Rezeptoren reguliert wird, kann die Bindung von IgG an den FcγRIIIa-Rezeptor zu einem Überwiegen der aktivierenden Signale führen. NK-Zellen werden durch gebundene Antikörper aktiviert, lysieren Targetzellen und schütten Zytokine aus, insbesondere INFγ und TNFα (83).

Auch γδ T-Zellen bzw. ihre im Blut prädominant vorkommende Subpopulation der Vy9Vδ2 T-Zellen (86) tragen FcγRIIIa Rezeptoren. Durch Bindung von IgG an diesen Rezeptor sind auch sie zur ADCC befähigt, die wie bei den NK-Zellen zu Zytokinausschüttung und Lyse der Targetzellen führen kann. Die Fähigkeit der NK- und γδ T-Zellen zur ADCC kann man sich in der Tumorthherapie zu Nutze machen, indem man Patienten IgG-Antikörper appliziert, die an spezifische Tumorantigene binden und somit die Effektorzellen zu den Targetzellen führen können (87). Solche Antikörper kommen beispielsweise in der Brustkrebstherapie (Trastuzumab) (88, 89) oder, wie in dieser Arbeit verwendet, in der ALL-Therapie (CD19-4G7SDIE AK) zum Einsatz (90).

1.5 Der CD19-Antikörper CD19-4G7SDIE AK

Der CD19-4G7SDIE AK ist ein Fc-optimierter ,monoklonaler ,chimärer CD19 IgG1 Antikörper der dritten Generation. CD19 kann als Oberflächenmarker für B-Zellen (BZ) verwendet werden, da er nahezu während der gesamten Maturation einer B-Zelle, mit Ausnahme sehr früher Progenitorzellen und der reifen Plasmazellen, exprimiert wird (91). Da die meisten maligne entarteten B-Zellen CD19 hoch und stabil exprimieren, kann CD19 als Marker für B-Zelllymphome, B-ALL oder chronisch lymphatische BZ-Leukämie (B-CLL) verwendet werden (91, 92). Bindet der CD19-4G7SDIE AK an CD19-positive Zellen, können diese durch

Fc γ IIIa-Rezeptoren tragende Zellen wie NK- oder $\gamma\delta$ T-Zellen erkannt werden und über den oben beschriebenen Mechanismus der ADCC lysiert werden. Allerdings hängt das Ausmaß der ADCC davon ab wie stark die Affinität des Fc-Teils eines Antikörpers zum Fc γ IIIa Rezeptor ist, da dies entscheidend für die Stärke der Interaktion ist (93, 94). Eine Möglichkeit die Bindungsaffinität zu erhöhen ist anstatt muriner Antikörper, humanisierte oder chimäre Antikörper zu verwenden. Bei der Verwendung humanisierter oder chimärer Antikörper kann zudem ein schneller Abbau der Antikörper sowie gravierende Nebenwirkungen durch hohe Dosen an Fremdproteinen, wie allergische Reaktionen, verhindert werden. Bei der Chimärisierung werden die konstanten Domänen des murinen Antikörpers durch die eines humanen Antikörpers ausgetauscht. Der murine variable Bereich und somit die Spezifität des Antikörpers bleibt jedoch erhalten (95).

Ein weiteres Mittel die Rezeptoraffinität zu erhöhen ist die Veränderung der Aminosäuresequenz des Fc-Teils des Antikörpers (96), wie beispielsweise durch die SDIE-Modifikation (90). Darunter versteht man den Austausch von zwei Aminosäuren in der CH2-Domäne (S239D and I332E) (97, 98), wie in Abb. 1-3 grafisch dargestellt ist. Somit kann CD19-4G7SDIE AK eine verstärkte ADCC durch NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen bewirken, wie in *in-vitro* Studien gezeigt wurde (82, 90). *In vivo* wurde der Antikörper bereits erfolgreich im Rahmen von Einzelheilversuchen bei Hochrisikopatienten an der Universitätskinderklinik Tübingen angewandt. Er führte zu einer Reduktion der MRD (minimal residual disease) (90).

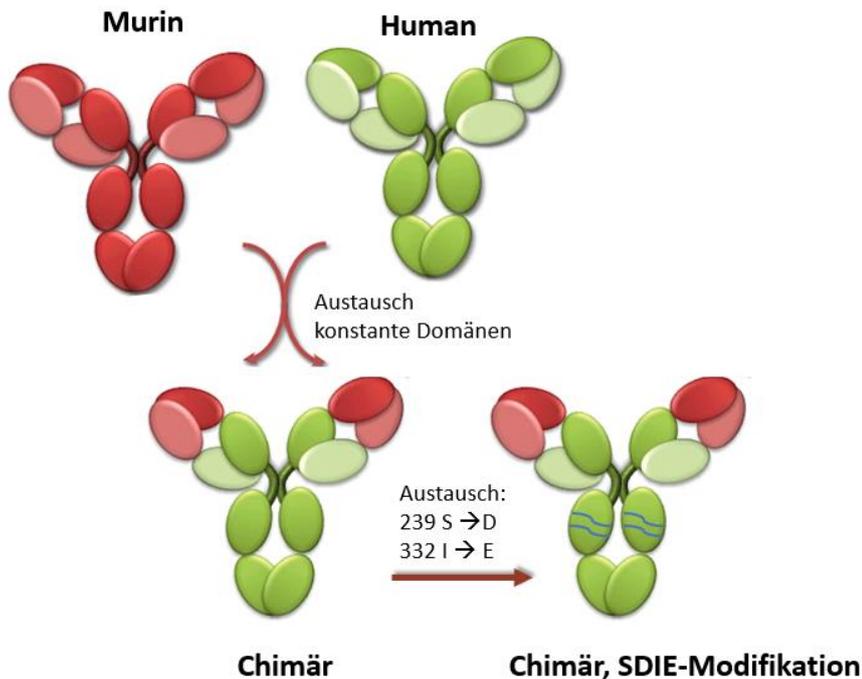


Abb. 1-3 Chimärisierung und SDIE-Modifikation von Antikörpern

Um einen Antikörper zu chimärisieren werden den konstanten Domänen eines humanen Antikörpers (grün) die variablen Domänen eines Mausantikörpers (rot) angefügt. Im Rahmen einer SDIE-Modifikation erfolgt zusätzlich in der humanen CH2-Domäne ein Austausch von Aminosäuren an Position 239 und 332 (blaue Linien) (97). Modifiziert nach Chames et al., British journal of pharmacology 2009 (99)

1.6 CH14.18

CH14.18 ist ein chimärer, monoklonaler GD2 Antikörper (100), der als Dinutuximab beta käuflich erworben werden kann. GD2 ist ein Disialogangliosid, das überwiegend auf der Oberfläche von Tumorzellen exprimiert wird, jedoch in geringerer Expression auch auf gesundem neuronalem Gewebe exprimiert wird (101). Zu den GD2-exprimierenden Malignomen gehört das Neuroblastom, aber auch das Melanom und teilweise das Osteosarkom (101). CH14.18 kann CD16⁺ Effektorzellen, wie beispielsweise NK-Zellen, rekrutieren und so eine ADCC gegen GD2-positive Neuroblastomzellen induzieren. Zudem führt CH14.18 zu einer Aktivierung des Komplementsystems über den klassischen Reaktionsweg (100). Im Rahmen einer multinationalen klinischen Phase-III-Studie konnte CH14.18 bei Hochrisiko-Neuroblastompatienten das Gesamtüberleben nach 5 Jahren von

57% auf 74% signifikant steigern und ist heute somit ein integraler Teil der Standardtherapie (102).

1.7 Zoledronsäure als Modulator der $\gamma\delta$ T-Zellaktivität

Synthetische Amino-Bisphosphonate wie Zoledronsäure (Zoledronat) sind aufgrund ihrer Osteoklasten-hemmenden Wirkung (103) für die Behandlung osteoporotischer Erkrankungen (104) sowie für die Behandlung und Prävention von Knochenmetastasen, beispielsweise bei Mamma- oder Prostatakarzinom (105, 106), zugelassen. Zufällig wurde bei mit Bisphosphonaten behandelten Patienten ein Anstieg der $\gamma\delta$ -Zellzahl festgestellt und durch Kunzmann et. A. 1999 erstmals beschrieben (107). Nach heutigen Erkenntnissen inhibieren Bisphosphonate die Farnesyl-pyrophosphat-Synthase (FppS) im Mevalonatweg, welcher in p53-mutierten Tumorzellen gesteigert ist (108). Als Folge kommt es zu einer intrazellulären Akkumulation von IPP, da es nicht mehr abgebaut werden kann (109-111).

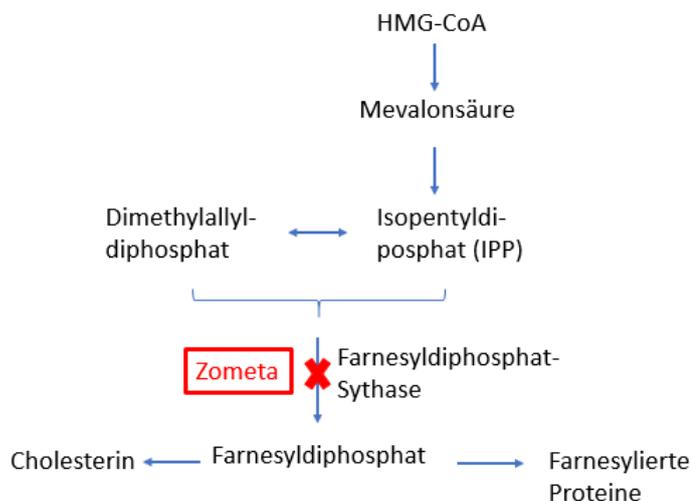


Abb. 1-4 Wirkung von Zoledronat im Mevalonatweg

Bisphosphonate, wie Zoledronat, können im Mevalonatweg für die Cholesterinbiosynthese die Farnesylidiphosphat-Synthase inhibieren. Die Folge ist eine Akkumulation von Isopentylidiphosphat (IPP). (110)

Wie in Abschnitt 1.5 beschrieben, kann eine intrazelluläre Akkumulation von IPP Vy9V δ 2-TZ über BTN3A1 erkannt werden. Eine intrazelluläre Akkumulation von IPP führt zu einer Aktivierung der GTPase RhoB (Ras homolog gene family member B) und deren Freisetzung aus dem Zellkern in Zellmembran-nahe Bereiche. Hier kann RhoB an die intrazelluläre Domäne von BTN3A1 binden. Daraus resultiert eine stabile Fixation von BTN3A1 an der Zellmembran durch das Zytoskelett. Eine intrazelluläre Akkumulation von IPP führt desweiteren zu einer Bindung von IPP an die intrazellulären Bereiche von BTN3A1, woraufhin RhoB dissoziiert. Die Bindung von IPP an BTN3A1 ruft eine Konformationsänderung der extrazellulären Domäne von BTN3A1 hervor, die eine Interaktion mit dem Vy9V δ 2-TcR ermöglicht (72). Dieser Mechanismus wird in Abb. 1-5 grafisch verdeutlicht.

Durch Bindung von BTN3A1 an den TcR wird ein aktivierendes Signal an die Vy9V δ 2-TZ vermittelt (112, 113). Durch den Anstieg von IPP können Bisphosphonate somit zu einer Aktivierung der Vy9V δ 2-TZ führen, was mit erhöhter INF γ und TNF α -Produktion, sowie einem gesteigerten Antitumoreffekt einhergeht (114-116). Es kommt zudem unter IL2-Einfluss zu einer Expansion der Vy9V δ 2-TZ *in vitro* und *in vivo* (29, 114, 117).

Die Expansion und Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen durch Bisphosphonate kann auch in Abwesenheit von Tumorzellen erfolgen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass neben Tumorzellen auch Monozyten Bisphosphonate effektiv aufnehmen können (67, 118, 119). Die Inhibition der FppS führt in Monozyten schon innerhalb von 2 Stunden zu einer relevanten Akkumulation von IPP. Über Zell-Zellkontakt zwischen BTN3A1 und dem TcR können Vy9V δ 2-TZ die Akkumulation von IPP in Monozyten erkennen (112, 113) und werden hierdurch aktiviert und zur Proliferation angeregt (119).

Synthetische Bisphosphonate werden deshalb in der Therapie verschiedener Tumorerkrankungen eingesetzt, um $\gamma\delta$ T-Zellen im Patienten zu expandieren und eine antitumorale Wirkung zu erzielen. Bislang gibt es eindeutige Nachweise für die *in vivo* Proliferation von $\gamma\delta$ T-Zellen im Patienten durch Zoledronat, jedoch keinen eindeutigen Hinweis auf ein verbessertes Gesamtüberleben (120, 191,193).

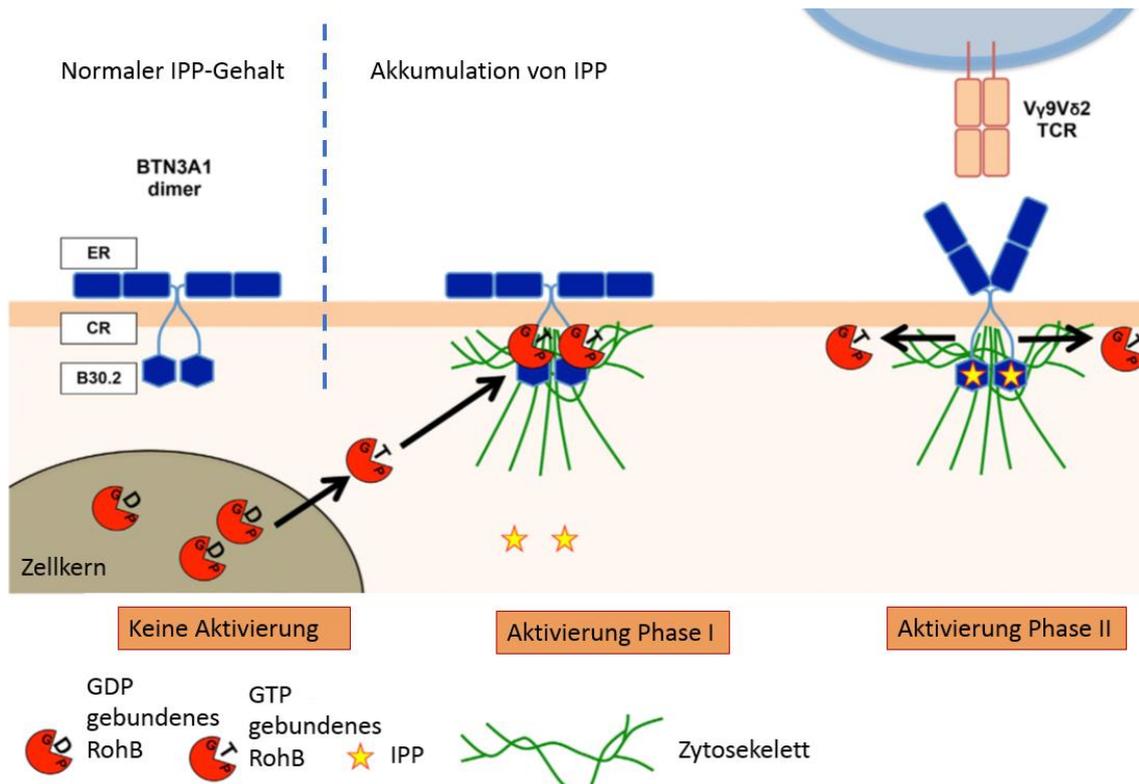


Abb. 1-5 Übermittlung der intrazellulären Akkumulation von IPP an Vy9Vδ2-Zellen

Keine Aktivierung: ohne Akkumulation von Isopentenylpyrophosphat (IPP, Sterne) verbleibt an GDP gebundenes RhoB (orangener Kreis) im Zellkern

Aktivierung Phase I: Durch Akkumulation von IPP durch Dysregulation des Mevalonatwegs in malignen Zellen oder unter Einfluss von Zoledronat, wird GTP-gebundenes RohB aktiviert und in Zellmembran nahe Bereiche verlagert. Durch Bindung von RohB an die intrazellulären Regionen (CR) von Butyrophilin3A1 (BTN3A1), wird BTN3A1 durch das Zytoskelett (grüne Linien) in der Zellmembran fixiert.

Aktivierung Phase II: IPP wir an die intrazellulären Bereiche von BTN3A1 gebunden. RhoB dissoziiert. IPP ruft eine Konformationsänderung der extrazellulären Bereiche (ER) von BTN3A1 hervor. Nun können Vy9Vδ2-Zellen mittels TcR an BTN3A1 binden und aktiviert werden (72). Modifiziert nach Sebestyen et al., Cell reports 2016 (72).

1.8 Interleukin 2

Interleukin 2 (IL2) ist ein von Immunzellen sezerniertes proinflammatorisches Peptidhormon und stellt eines der besterforschtesten Interleukine dar. Es wurde bereits in den 1970iger Jahren entdeckt (120, 121). Wurde IL2 damals noch als T-Zell Wachstumsfaktor (T cell growth factor, TCGF) beschrieben, weiß man heute, dass IL2 auch andere Immunzellen beeinflusst (122). IL2 wird vorwiegend von aktivierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie Dendritischen Zellen sezerniert, zügig nach Aktivierung (120, 122). Dabei bewirkt es zum einen durch autokrine Stimulation eine Steigerung der klonalen Proliferation von T-Zellen, hat aber auch

einen stimulierenden Effekt auf andere Immunzellen (120, 123). Bei T-Zellen wird besonders die Proliferation, Effektordifferenzierung und die Zytokinproduktion von TNF α und INF γ gefördert, bei CD8⁺ T-Zellen auch die Zytotoxizität (120, 124-126). Auf B-Zellen wirkt sich IL2 stimulierend auf die Proliferation und Antikörpersekretion aus (127). Auch NK-Zellen werden von IL2 aktiviert und zu Proliferation und Zytokinproduktion angeregt und in ihren zytotoxischen Eigenschaften gesteigert (120, 126, 128, 129). Diesen Effekt kann man sich in der Tumorthherapie zunutze machen. Bisher kommt IL2 besonders in der Therapie des Melanoms und Nierenzellkarzinoms zum Einsatz (130-132). Im Rahmen klinischer Studien wird die klinische Wirksamkeit auch in Bezug auf andere onkologische Erkrankungen wie das Neuroblastom, das Mammakarzinom und Leukämien evaluiert (120, 130, 131).

1.9 Interaktion zwischen $\gamma\delta$ T-Zellen und NK-Zellen

Wie oben beschrieben, können sowohl $\gamma\delta$ T-Zellen als auch NK-Zellen über verschiedene Wege einen Antitumoreffekt ausüben und haben beide das Potential zur ADCC. Manier et. al (33) publizierten 2010, dass auch ein kooperativer Antitumoreffekt zwischen $\gamma\delta$ T-Zellen und NK-Zellen besteht – präziser, dass $\gamma\delta$ T-Zellen die Zytotoxizität von NK-Zellen steigern können. Es konnte gezeigt werden, dass frisch isolierte NK-Zellen, die mit expandierten (exp.) $\gamma\delta$ T-Zellen kokultiviert wurden, eine höhere Aktivität gegenüber Tumorzelllinien zeigen (33). Hierzu war eine Präaktivierung der NK-Zellen mit IgG1 notwendig. Es konnte zudem gezeigt werden, dass für diese Aktivitätssteigerung ein Zell-Zellkontakt nötig ist und dabei die Bindung von CD137 auf den NK-Zellen an CD137L auf den $\gamma\delta$ T-Zellen eine Rolle spielt. Durch eine Blockade dieser Rezeptoren blieb die gesteigerte NK-Zellaktivität zumindest teilweise aus. Nach Aktivierung der NK-Zellen über CD137 wird die Expression von NKG2D erhöht, was die gesteigerte Zytotoxizität der NK-Zellen erklärt (33). CD137 oder auch als 4-1BB bezeichnet, gehört zu der Familie der TNF-Rezeptoren. CD137 wird als kostimulatorischer Rezeptor auf T-Zellen, insbesondere CD8⁺ T-Zellen exprimiert (133), aber auch auf anderen Immunzellen wie beispielsweise aktivierten NK-Zellen (134). Als Ligand dient CD137L, welcher beispielsweise von APZ und $\gamma\delta$ T-Zellen exprimiert

wird (33, 135). Seine Bindung kann eine Erhöhung der Zellproliferation, Zytokinsekretion und ein verlängertes Zellüberleben initiieren (133, 134).

Zhang et al. konnten in Versuchen zeigen, dass auch NK-Zellen $\gamma\delta$ T-Zellen beeinflussen, indem sie sie zur Proliferation anregen können. Mit Mykobakterium Tuberkulosis koninkubierte $\gamma\delta$ T-Zellen zeigten in Gegenwart von NK-Zellen eine gesteigerte Proliferation (35). An Untersuchungen ob NK-Zellen $\gamma\delta$ T-Zellen, besonders in Zusammenhang mit Malignomen stimulieren, mangelt es bisher leider. Eine mögliche Interaktion von $\gamma\delta$ -T-Zellen und NK-Zellen in der Abwehr von Tumorzellen, scheint wahrscheinlich.

1.10 Malignomerkrankungen im Kindesalter

Im Jahr 2016 wurde bei über 2000 Kindern in Deutschland die Diagnose einer Krebserkrankung gestellt. Besonders betroffen ist die Gruppe der unter 5-jährigen, wobei das Altersspektrum auch stark von der Diagnose abhängig ist (136). In Abb.1-6 sind die häufigsten Malignomerkrankungen im Kindesalter aufgeführt. Für die Kinder bedeutet diese Diagnose und die damit verbundene Therapie eine enorme gesundheitliche und psychische Belastung (137). Die Therapie beinhaltet meist eine Chemotherapie, welche aufgrund ihrer Toxizität mit starken Nebenwirkungen und einem lebenslang erhöhten Zweitmalignomrisiko verbunden ist (136). Die Überlebensrate nach 15-Jahren konnte sich zwar von etwa 65% vor 1990 auf ein durchschnittliches Überleben von etwa 82% heutzutage verbessern, dennoch stellen Krebserkrankungen die häufigste natürliche Todesursache bei Kindern unter 15 Jahren dar (136, 138).

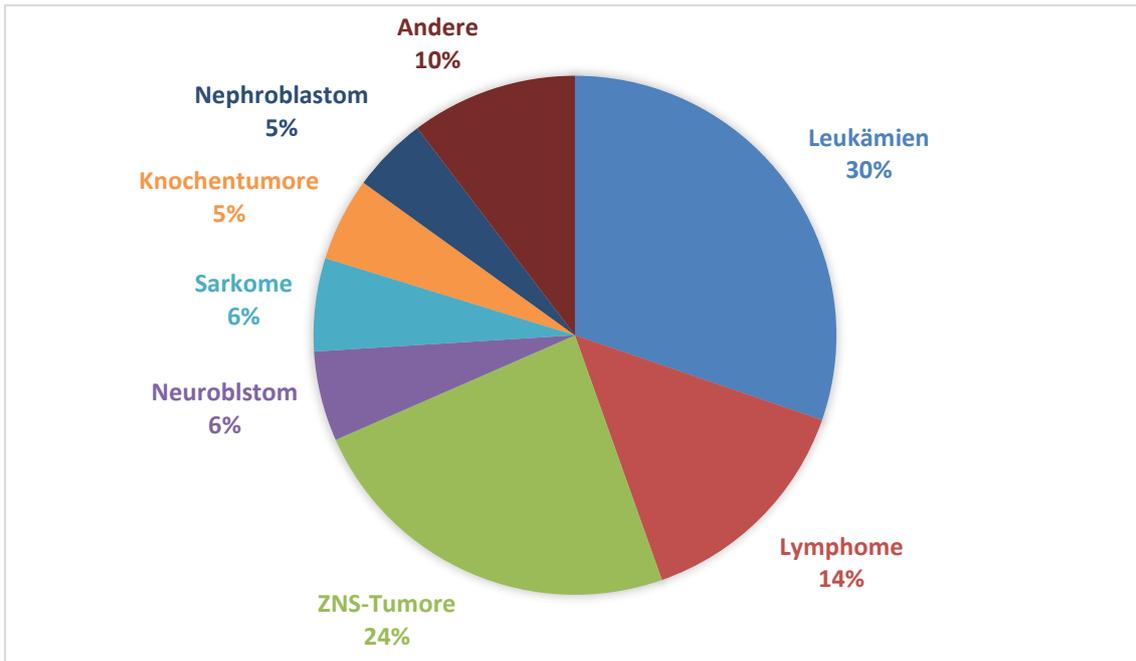


Abb. 1-6 Malignomerkrankungen im Kindesalter

Es ist die Verteilung der Maligomarten bei Kindern unter 18-Jahren in den Jahren 2009-2016 dargestellt. Die Daten sind dem deutschen Kinderkrebsregister entnommen (136). Unter den Neuroblastomen sind in dieser Darstellung andere maligne periphere Nervenzelltumoren eingeschlossen. * ZNS= zentrales Nervensystem.

1.10.1 Die akute lymphatische Leukämie

Leukämien, bei denen es zu einer malignen Entartung der lymphatischen Zellreihen des blutbildenden Systems kommt, sind mit 25 % die am häufigsten vorkommende maligne Erkrankung bei Kindern im Alter von 0-14 Jahren. Hierbei überwiegen die akuten lymphatischen Leukämieformen, wobei die Leukämie der B-Vorläuferzellen (B-cell precursor ALL, BCP-ALL) mit knapp 98 % am häufigsten auftritt. Ihren Gipfel erreicht die Inzidenzrate bei Kindern im Alter von 2-4 Jahren, wobei Jungen mit einem Verhältnis von 1,2:1 etwas häufiger betroffen sind (139). Durch maligne Transformation hämatopoetischer Stamm- oder Vorläuferzellen kommt es bei Leukämien zu einer raschen, überschießenden Proliferation dieser unreifen, funktionsunfähigen Zellen, leukämische Blasten genannt. Dies hat zur Folge, dass die Hämatopoese der restlichen Zellreihen unterdrückt wird. Die dadurch bedingte Zytopenie führt zu einem erhöhten Infekt- und Blutungsrisiko, sowie zu Anämie. Die leukämischen Blasten sammeln sich im Knochenmark und

können hier frühzeitig durch Knochenmarkpunktion mikroskopisch detektiert werden. Die Blasten können zudem in das Blut ausgeschwemmt werden und sich auch in lymphatischen und nicht-lymphatischen Organen sammeln und diese schädigen.

Galt die Erkrankung in den 1960iger Jahren mit einem Langzeitüberleben von 11 % noch als unheilbar und führt unbehandelt innerhalb von Monaten zum Tod, stellt sie heute in Industrieländern mit einer 15-Jahres-Langzeitüberlebensrate von 90 % eine der malignen Erkrankungen mit der besten Prognose dar (139, 140). Diese beachtliche Prognoseverbesserung ist der konsequenten Anwendung von Studienprotokollen in der Therapie von pädiatrischen Patienten seit Anfang der 1980iger Jahre zu verdanken. Dank der guten Organisation konnte hierunter die Therapie stetig verbessert und angepasst werden (141).

Grundsätzlich stehen Chemotherapie und Stammzelltransplantation (SZT) zur Verfügung, wobei die risikoadaptierte Polychemotherapie heute immer noch die First-Line-Therapie darstellt (142). Bei Hochrisiko-Leukämien oder therapierefraktären Verläufen, bietet die SZT aber eine potente und wichtige Therapieoption (16). Trotz der guten Prognose stellt die Leukämie mit 30,4 % die häufigste krebsassoziierte Todesursache bei Kindern und Jugendlichen dar (141). Darunter fallen besonders Kinder, die zu den 10-15 % gehören, die ein Rezidiv erleiden oder primärrefraktär sind und mit 10-50 % Heilungsrate eine sehr schlechte Prognose haben (9, 143). Für Hochrisiko-Patienten oder solche, bei denen die herkömmlichen Therapiemethoden ausgeschöpft sind, besteht ein dringender Bedarf an neuen Therapieoptionen. Gegenstand der aktuellen Forschung sind dabei therapeutische Antikörper, Tumorstimmungsreaktion, CAR-T Zellen und weitere zelluläre Immuntherapien, die nicht nur therapeutisch sondern auch prophylaktisch zu der Verhinderung eines Rezidivs eingesetzt werden können und zudem weniger toxisch sind als die konventionelle Chemotherapie (143-146). Auch die Weiterentwicklung und Verbesserung der SZT ist ein wichtiger Pfeiler in der Verbesserung des Überlebens von Leukämiepatienten.

1.10.2 Lymphome

Bei Lymphomen handelt es sich um eine maligne klonale Neoplasie, die zumeist von B- oder T-Lymphozyten des lymphatischen Gewebes ausgehen (147). Lymphome stellen die dritthäufigste Krebserkrankung im Kindesalter dar, mit einem mittleren Erkrankungsalter von knapp 11 Jahren (136).

Lymphome können in Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome unterteilt werden (147), wobei bei Kindern das Hodgkinlymphom als häufigstes, und das Burkitt-Lymphom, ein Non-Hodgkinlymphom, als zweithäufigstes Lymphom auftritt. Von Hodgkin-Lymphomen sind besonders Jugendliche in der Altersgruppe der über 10-Jährigen betroffen (136). An einem Burkitt-Lymphom, das zu den aggressiven Lymphomen mit hoher Proliferationsrate zählt (147), erkranken Jungen fünfmal häufiger als Mädchen und dies in einem mittleren Alter von knapp 8 Jahren (136). Als Therapieformen werden in der Regel Chemo- und Strahlentherapie angewendet (147). Bei refraktären schweren Verläufen kann auch die SZT eine Therapieoption darstellen (148, 149). Das durchschnittliche Überleben nach 15 Jahren ist mit 92 % gut, allerdings kommt es bei 17% zu einem überdurchschnittlich hohen Auftreten von Sekundärneoplasien innerhalb von 30 Jahren nach Diagnosestellung (136). Diese sind auch zum Teil durch die Toxizität der Therapie bedingt (150), sodass auch bei Lymphomen die Anwendung weniger toxischer Therapievarianten, wie Immuntherapien, die Langzeitprognose verbessern könnte.

1.10.3 Das Neuroblastom

Das Neuroblastom nimmt aktuell, den fünften Platz unter den häufigsten Krebserkrankungen im Kindesalter ein, bei den unter Einjährigen sogar den ersten (136). Es handelt sich dabei um einen embryonalen Tumor des sympathischen Nervensystems, der meist paravertebral lokalisiert ist (4). Betroffen sind besonders Kleinkinder unter fünf Jahren, wobei ein Erkrankungsgipfel im ersten Lebensjahr besteht (136). Der Verlauf der Erkrankung unterliegt dabei einer großen klinischen Variabilität, sodass sowohl spontane Regression als auch ein unaufhaltsamer Progress, möglich sind. Das Therapiespektrum reicht daher von abwartendem Beobachten bis zu einer intensiven Chemotherapie (4). Bei schweren

Verläufen kann auch eine SZT therapeutisch eingesetzt werden (4). Insgesamt hat das Neuroblastom mit einem 15-Jahresüberleben von 76 % eine, im Vergleich zu den Leukämien und Lymphomen, schlechtere Prognose (136). Bei Hochrisikopatienten liegt die 5-Jahresüberlebensprognose sogar nur bei 40 % (151). Leider gibt es Patienten, bei denen die herkömmlichen Therapien keinen ausreichenden Erfolg zeigen. Immuntherapeutische Strategien, wie der therapeutische GD2-Antikörper CH14.18, bieten eine wirksame Erweiterung der Therapie (151).

1.11 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es den Einfluss von $\gamma\delta$ T-Zellen auf die Aktivierbarkeit, spontane Lysefähigkeit und ADCC von NK-Zellen zu evaluieren und Möglichkeiten zu finden, diese zu beeinflussen. Diese Untersuchung wurde im Kontext der haploidenten TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletierten SZT durchgeführt. Bei dieser innovativen Graft-Manipulation werden $\gamma\delta$ T-Zellen im Transplantat belassen, was zu einer schnellen und guten Regeneration von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen führt (37). Die Interaktion von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen könnte den Antitumoreffekt steigern und somit einen wichtigen immunologischen Beitrag in der Verhinderung eines Rezidivs leisten. Zunächst soll die spontane Lysefähigkeit und ADCC von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen getrennt voneinander untersucht werden, unter Verwendung der Zelllinien NALM-16, RAJI und K562, die ein breites Spektrum hämatologischer Neoplasien repräsentieren. Die ADCC soll unter Verwendung des CD19-4G7SDIE AK evaluiert werden. Da diese Arbeit im Kontext der haploidenten TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletierten SZT steht, soll getestet werden, wie sich die spontane Lysefähigkeit und ADCC der NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen von Patienten nach TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletierten SZT verhält und ein Vergleich zu gesunden Spendern gezogen werden. Um zu untersuchen, ob $\gamma\delta$ T-Zellen Einfluss auf die ADCC der NK-Zellen haben, soll die spontane Lysefähigkeit und ADCC von NK-Zellen in An- und Abwesenheit von $\gamma\delta$ T-Zellen gemessen und verglichen werden. Des Weiteren soll untersucht werden, inwiefern sich NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen durch IL2 und Zoledronat aktivieren lassen, und ob dabei synergistische Effekte zwischen NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen objektivierbar sind. Mit exp. $\gamma\delta$ T-Zellen und frischen NK-Zellen soll untersucht

werden, ob das Verhältnis der Effektorzellpopulationen zueinander einen Einfluss auf die Effektorfunktionen hat, und welches Verhältnis von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen zueinander zu einem Wirkungsoptimum führt. Überdies soll die beschriebene Interaktion von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen durch CD137-Rezeptor und CD137-Ligand untersucht werden im Hinblick auf die gegenseitige Aktivierung, Lyse und Zytokinproduktion. Mithilfe des Echtzeit-Zytotoxizitäts-Assays xCELLigence bzw. dem Luciferase-Assay soll die direkte Zytotoxizität der $\gamma\delta$ T-Zellen gegenüber Neuroblastom- und Leukämiezellen quantifiziert und mit der Targetzelllyse durch NK-Zellen und der Kombination von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen verglichen werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Allgemeine Materialien und Programme

2.1.1 Geräte

Materialbezeichnung	Hersteller
Sicherheitswerkbank HERAsafe	ThermoScientific, Waltham, USA
Brutschrank HERAcell	ThermoScientific, Waltham, USA
Standzentrifuge ROTANTA 46 RSC	Hettich, Tuttlingen
Standzentrifuge ROTINA 420R	Hettich, Tuttlingen
Eismaschine	Scotsman, Vernon Hills, USA
Gefrierschrank Premium NoFrost	Liebherr, Bulle, Schweiz
Kühlschrank, Profiline	Liebherr, Bulle, Schweiz
Wasserbad, beheizbar	Memmert, Schwabach
Vortexer Reax Top	Heidolph, Schwabach
Pipettiergerät PIPETBOY acu	IntegraBiosciences, Fernwald
Mehrkanalpipette Transferringpipette 20 – 200 µl	Abimed, Langenfeld
Pipette: Research: 2,5 µl	Gilson, Middleton, USA
Pipetten: Pipetman: 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Blutzellanalysegerät: ADVIA 120	Siemens, München
Blutgasanalysegerät: ABL800 Flex	Radiometer, Krefeld
Blutanalysegerät ABX Micros CRP 200	Horiba, Neuhausen
Mikroskop: Olympus CX40	Olympus, Tokio, Japan

2.1.2 Verbrauchsmaterialien, Glas- und Plastikwaren

Materialbezeichnung	Hersteller	Materialnummer
Zellkulturflaschen, steril: 50 ml 250 ml 550 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen	690160 658175 660160
Falkonröhrchen, Polypropylen (PP), steril: 15 ml 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen	188271 227201

FACS Analyseröhrchen Rundboden, (PS) 5 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen	352008
Mikrotiterplatte Rundboden 96-well, steril	Greiner Bio-One, Frickenhausen	650180
Mikrotiterplatte Flachboden 96-well, steril	Greiner Bio-One, Frickenhausen	655180
Mikrotiterplatte Flachboden 96-well, weiß	Greiner Bio-One, Frickenhausen	655083
Zellkulturplatten Flachboden 6-well, steril	Greiner Bio-One, Frickenhausen	657160
Zellkulturplatten, Flachboden 48-well, steril	Corning Incorporated, Corning, USA	3548
Zellkulturplatten Flachboden 24-well, steril	Corning Incorporated, Corning, USA	3524
Einmalpipetten, Plastik, steril: 2 ml 5 ml 10 ml 25 ml 50 ml	Corning Incorporated, Corning, USA	4021 4051 4101 4251 4501
Pipettenspitzen: 20 µl 200 µl 1000 µl	Ratiolab, Dreieich Sarstedt, Nürnberg Sarstedt, Nürnberg	2500170 70760 70762
Einmalspritzen, steril: 20 ml 50 ml	B.Braun, Melsungen BD, Heidelberg	4606205V 300137
Butterfly, Safety-Multifly-Set	Sarstedt, Nürnberg	851638235
Desinfektionsspray Softasept	B.Braun, Melsungen	3887138
Einmalhandschuhe Peha-soft Nitrile	Hartmann, Heidenheim	9422111
Zellsieb, 40 µm	BD, Heidelberg	352340

2.1.3 Stammlösungen

Stammlösung A: Medium für die Expansion von Zelllinien

500ml	RPMI 1640 Medium	Biochrom, Berlin	F1215
50ml	Gibco Fetales Kälberserum (FCS)	ThermoScientific, Wal- tham, USA	10270-106
5ml	L-Glutamin (200 mM)	Biochrom, Berlin	K028
5ml	Penicillin (10.000 U/ml) / Streptomycin (10.000 µg/ml)	Biochrom, Berlin	A2213

Stammlösung B: Medium für die Expansion von $\gamma\delta$ T-Zellen:

	Stammlösung A	
150 IE/ml	Interleukin-2 (IL2) Proleukin 2x10 ⁶ IE/ml	Universitätsapotheke

Stammlösung C: Medium zur Inkubation z.B. für das CD107a-/Kill-Assay:

500ml	RPMI 1640 Medium	Biochrom, Berlin	F1215
50ml	Gibco Fetales Kälberserum (FCS)	ThermoScientific, Waltham, USA	10270-106
5ml	L-Glutamin (200 mM)	Biochrom, Berlin	K028
5ml	Penicillin (10 000 U/ml)/ Streptomycin (10 000 μ g/ml)	Biochrom, Berlin	A2213
5ml	Natrium Pyrovat 100mM	Biochrom, Berlin	L0437
5ml	Nicht essentielle Aminosäuren 100x	Biochrom, Berlin	K0293
50 μ M	2-Mercaptoethanol 99p.a.	CarlRoth, Karlsruhe	42271

Stammlösung D: FACS-Puffer

500ml	Phosphat buffered saline (PBS)	Sigma Aldrich, St. Louis USA	D8537
2mM	EDTA	AppliChem, Darmstadt	A1103
50ml	Gibco fetales Kälberserum (FCS)	ThermoScientific, Waltham, USA	10270-106
0,5 ml	Na-Azid 10%	Alliquotiert	

Stammlösung E: Permwash

500ml	Phosphat buffered saline (PBS)	Sigma Aldrich, St. Louis USA	D8537
2mM	Saponin	Sigma Aldrich, St. Louis USA	S7900
50ml	Bovine Serum Albumin (BSA-3059)	Sigma Aldrich, St. Louis USA	A3059
1 ml	Na-Azid 10%	Alliquotiert	

Stammlösung F: EDTA

500ml	Phosphat buffered saline (PBS)	Sigma Aldrich, St. Louis USA	D8537
2mM	EDTA	AppliChem, Darmstadt	A1103

Stammlösung G: PFA

	Stammlösung D		
1%	Formalinlösung (37 %)	AppliChem, Darmstadt	A0823

2.1.4 Monoklonale Antikörper für Durchflusszytometrie

Spezifität	Subtyp	Fluorochrom	Klon	Hersteller	Cat.No.
hum INF- γ	IgG ₁	BV 711	4S.B3	Biologend, Fell	502540
hum TNF- α	IgG ₁	PB	Mab11	Biologend, Fell	502920
hum TCR $\gamma\delta$	IgG ₁	FITC	11F2	BD, Heidelberg	347903
hum CD107a	IgG ₁	APC	H4A3	Biologend	328620
hum CD69	IgG ₁	APC	L78	BD, Heidelberg	340560
	IgG ₁	APC/Cy7	FN50	Biologend, Fell	310914
hum CD56	IgG ₁	PE/Cy7	HCD56	Biologend, Fell	318318
	IgG ₁	PE	B159	BD, Heidelberg	555516
hum CD19	IgG ₁	APC	HIB19	BD, Heidelberg	555415
hum CD10	IgG ₁	PE	ALB1	Beckman coulter, Marseille	A07760
		PerCp	MEM-78	Exbio, Vestec	PC209T100
hum CD3	IgG ₁	PerCP	SK7	Biologend, Fell	344814
	IgG _{2b}	PB	17A2	Biologend, Fell	100214
	IgG ₁	APC	SK7	BD, Heidelberg	340661
hum CD137	IgG ₁	PE	4B4-1	BD, Heidelberg	555956
hum CD33	IgG ₁	PE	P67.6	BD, Heidelberg	345799
Lebend/Tod		Aqua		Thermo Fisher, Waltham, USA	L34957
		7-AAD		Thermo Fisher, Waltham, USA	A1310

2.1.5 Software

FCS Express 4.0	De Novo Software
GraphPad Prism 5	Statcon
RTCA 1.2.1	Roche Diagnostics
Excel 2016	Microsoft
PowerPoint 2016	Microsoft
Word 2016	Microsoft

2.2 Therapeutische Antikörper

2.2.1 CD19 Antikörper CD19-4G7SDIE AK

Fc-optimierter monoklonaler CD19 Antikörper: CD19-4G7SDIE AK	Dr. L. Grosse-Hovest, Prof. Dr. G. Jung, Universität Tübingen
-----------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------

Der Fc-optimierte monoklonale CD19 Antikörper CD19-4G7SDIE AK wird von Fc-Rezeptor tragenden Effektorzellen erkannt und vermittelt eine gesteigerte ADCC z.B. durch FcγRIIIa exprimierende NK-Zellen und γδ T-Zellen (90). Der in dieser Arbeit eingesetzte CD19-4G7SDIE AK wurde an der Kinderklinik Tübingen im Rahmen von individuellen Heilversuchen bei Hochrisiko-Patienten nach SZT zur Rezidivprophylaxe sowie zur Reduktion von residualen Leukämiezellen (Minimale Resterkrankung, MRD) eingesetzt. In den Versuchen wurde der Antikörper in einer Konzentration von 1 µg/ml verwendet.

Erstmalig wurde der murine CD19 Antikörperklon 4G7 im Jahr 1984 an der Universität Stanford isoliert und charakterisiert (152). Die hier eingesetzte, weiterentwickelte Form des 4G7-Antikörpers wurde am Institut für Zellbiologie der Universität Tübingen generiert. Es handelt sich um einen chimären Antikörper (murin-human) mit einem Austausch der Aminosäuren S239D/I332E, welche zu einer erhöhten Fc-Rezeptorbindung führt und entsprechend des Austauschs der Aminosäuren als SDIE-Modifikation bezeichnet wird (90, 153). Die Herstellung erfolgte in den Reinräumen der Universität Tübingen unter GMP-Bedingungen.

2.2.2 Anti-GD2 CH14.18

Monoklonaler GD2 Antikörper: CH14.18	Polymun scientific, Klosterneuburg, Österreich
--------------------------------------	------------------------------------------------

Der murin-humane, chimäre, monoklonale GD2 Antikörper CH14.18 (Dinutuximab beta) rekrutiert Fc-Rezeptor tragende Effektorzellen, beispielsweise NK-Zellen sowie $\gamma\delta$ T-Zellen, und vermittelt ADCC gegen GD2-positive Tumore, z.B. dem Neuroblastom. Zudem führt CH14.18 zu einer Aktivierung des Komplementsystems über den klassischen Reaktionsweg (100). An der Universitätsklinik Tübingen wurde der Antikörper im Rahmen einer klinischen Phase I/II Studie (NCT02258815) zur Behandlung des rezidivierenden Stadium IV Neuroblastoms bei pädiatrischen Patienten nach haploidentischer Stammzelltransplantation zur Konsolidierung der Remission eingesetzt. In den Versuchen wurde der Antikörper in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ verwendet.

2.3 Zellmaterial

Zellart	Spenderangaben	Herkunft
<u>Aus peripherem Vollblut gewonnene:</u> - PBMC - NK- Zellen - $\gamma\delta$ T-Zellen	Gesunde, freiwillige, erwachsene Spender bzw. pädiatrische, freiwillige Spender nach TcR $\alpha\beta$ /CD19- depletierter, haploidenter SZT	Patienten bzw. Mitarbeiter der Universitätskinderklinik Tübingen
<u>Zelllinien:</u> - Erythroleukämische CML- Zelllinie K562 (ACC 10)	Aus dem Pleuraerguss einer 53-jährigen Frau	Leibniz-Institut DSMZ- Deutsche Sammlung
- pädiatrische Burkitt-Lymphom- Zelllinie Raji (ACC 319)	Aus der rechten Maxilla eines 12-jährigen Jungen	von Mikroorganismen und Zell-Kulturen,
- pädiatrische BCP -ALL- Zelllinie NALM-16 (ACC 680)	Aus Vollblut eines 12-jährigen Mädchens	Braunschweig

- pädiatrische Neuroblastom-Zelllinie LS (ACC 675)	Aus dem abdominalen Tumor eines 16-monatigen Mädchens	
<u>Luciferase/mCherry transduzierte Zelllinien:</u>		Dr. P. Schlegel Universitätsklinik für Kinder und Jugendmedizin, Tübingen
- pädiatrische BCP-ALL- Zelllinie NALM-16 mCherry-Luc (ACC 128)	Aus Vollblut eines 12-jährigen Mädchens	
- adulte B-ALL- Zelllinie NALM-16 mCherry-Luc (ACC 680)	Aus dem Vollblut eines 19-jährigen Mannes	
- pädiatrische Neuroblastom-Zelllinie LS mCherry-Luc (ACC 675)	Aus dem abdominalen Tumor eines 16-monatigen Mädchens	
Transduzierte Feederzelllinie: - K562-mb15-41BBL	Aus dem Pleuraerguss einer 53-jährigen Frau	Dr. D. Campana MD, National University Cancer Institute, Singapore

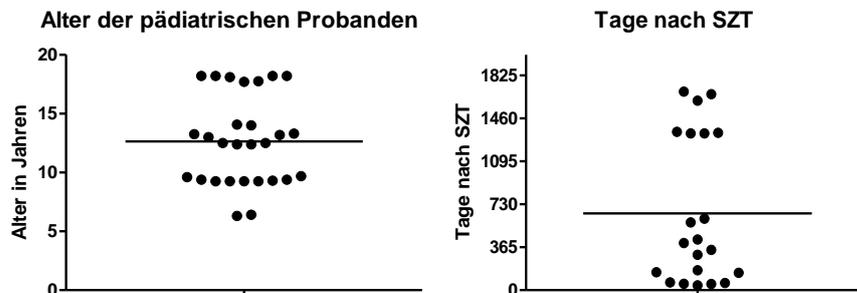
2.3.1 PBMC pädiatrischer Patienten nach Transplantation

In den Experimenten wurden unter anderem PBMC pädiatrischer Patienten verwendet. Dabei handelte es sich um Patienten der Universitätskinderklinik Tübingen im Alter zwischen 6 und 18 Jahren. Alle Patienten wurden in Tübingen mit einer haploidenten CD19/TcR $\alpha\beta$ depletierten SZT therapiert. Zum Versuchszeitpunkt lag die Transplantation dabei zwischen 41 und 1687 Tage zurück. Als Grund für die Transplantation wiesen die Patienten unterschiedliche Diagnosen auf (Tab.2-1). Alle Patienten bzw. deren Erziehungsberechtigte gaben ihr schriftliches Einverständnis (Informed-consent) zur Entnahme der Blutproben und deren Verwendung für die Durchführung von *in vitro* Experimenten. Es liegt ein Ethikvotum mit der Nummer 761/2015B02 (SFB 685, Projekt C03) vor.

Tab. 2-1 Diagnosen der Patienten

Auflistung der Diagnosen, die bei den pädiatrischen Patienten, deren Zellen in den Experimenten verwendet wurden, zu einer CD19/TcR $\alpha\beta$ depletierten SZT geführt haben.

Diagnose	Anzahl der Patienten
cALL	4
AML-M1	1
rezidivierendes Neuroblastom IV	1
Alveoläres Rhabdomyosarkom	1
SAA, atypisches Kawasaki	1
Ewing-Sarkom	1

**Abb. 2-1 Alter der Patienten und Tage posttransplant**

In den Graphiken ist dargestellt, wie alt die Patienten zum Zeitpunkt der Experimente waren und wie viele Tage die haploidente CD19/TcR $\alpha\beta$ depletierte SZT zurücklag.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Zellkultur

Die Zellkultur der Zelllinien erfolgte in Stammlösung A in einem Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit. Alle Arbeiten mit den Zelllinien wurden an einer sterilen Werkbank unter Verwendung von sterilen Einmalartikeln vorgenommen. Eine Kontamination der Zellkultur mit Bakterien oder Pilzen wurde regelmäßig durch Mikroskopie ausgeschlossen. Die Vitalität und Morphologie der Zellen wurde in der Neubauerzählkammer unter dem Lichtmikroskop nach 1:1 Anfärben der Zellen mit 0,4 % Trypanblau beurteilt. Tote Zellen nehmen den

Farbstoff auf und färben sich dunkelblau. Die Zelldichte wurde mit Hilfe des Blutanalysegerät ABX Micros CRP 200 von Horriba unter Verwendung von ca. 8 µl Zellsuspension bestimmt, um die Zellen auf eine für ihr Wachstum optimale Dichte einzustellen.

Erfolgt eine pH-Änderung, schlägt die Farbe des verwendeten Mediums von Rot auf Gelb um. Das Medium sollte dann zum Teil durch frisches ersetzt werden. Die Zellpflege erfolgte alle 2-3 Tage.

2.4.2 Passagieren von adhärennten Zelllinien

Bei der pädiatrischen Neuroblastom-Zelllinie LS handelt es sich um eine adhärennte Zelllinie. Alle 2-3 Tage erfolgte eine Ablösung und Passage der Zellen. Hierfür wurde das Medium aus den Zellkulturflaschen abpipettiert und verworfen. Anschließend wurde die Flasche mit 10 ml PBS gespült und danach 2-3 ml Trypsin hineingegeben, um die Zellen abzulösen. Nach einer Inkubation für 2 min im Brutschrank bei 37 °C, wurden 8 ml Medium in die Kulturflasche gegeben. Nach leichtem Beklopfen des Flaschenbodens, erfolgte die Überführung der Zellsuspension in einen 15 ml Falcon und die Zentrifugation für 5 min bei 200 g. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in frischem Medium gelöst.

2.4.3 Lymphozytenseparation

Peripheres Vollblut	Gesunde Spender bzw. pädiatrische Patienten	
Heparin-Natrium-25.000-ratiopharm	Ratiopharm, Ulm	3029843
Biocoll Separating Solution	Biochrom, Berlin	L6115
Dulbecco's Phosphat buffered saline (PBS)	PAA Laboratories, Cölbe	D8537

Hintergrund:

Bei der Ficoll Dichtegradientenzentrifugation nach der Verfahrensweise von Böyum (154) können durch die besonderen Dichteigenschaften der Ficoll-Hypaque, die mit einer Siebfunktion vergleichbar sind, periphere mononukleäre Stammzellen (PBMCs) aus heparinisierem Blut isoliert werden. Mit 1,077 g/ml

liegt die Dichte der Ficoll-Lösung genau zwischen der von Erythrozyten und PBMCs, sodass die Ficoll-Lösung bei Zentrifugation Leukozyten und Monozyten von den restlichen Blutbestandteilen trennt.

Durchführung:

In einem 50 ml Falconröhrchen wurden 15 ml Ficoll-Lösung vorgelegt. Heparinisiertes Vollblut wurde 1:1 mit PBS-Puffer gemischt und 30 ml davon vorsichtig von oben auf die Ficoll-Lösung geschichtet, sodass zwei deutlich getrennte Phasen entstanden. Es folgte eine Zentrifugation für 30 min mit 800 g, Bremse 0 (B0), Beschleunigung 0 (R0) und Raumtemperatur (RT). Nach der Zentrifugation sollten vier Schichten abgrenzbar sein: unten befinden sich die Erythrozyten und Granulozyten, dann die klare Ficoll-Lösung, darauf in einem dünnen milchigen Ring die PBMC und obenauf die gelbliche Serumphase mit Thrombozyten. Das Serum wurde bis auf 1 cm über dem Leukozytenring abgenommen und verworfen. Anschließend wurde mit einer sterilen Pipette in kreisenden Bewegungen der PBMC-Ring abgenommen und in ein neues 50 ml Falconröhrchen überführt und mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Zum Waschen der Zellen folgte eine Zentrifugation mit 500 g für 10 min bei RT, B7, R5. Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt, das Zellpellet in PBS gelöst und erneut mit gleicher Vorgehensweise gewaschen. Abhängig vom weiteren Verwendungszweck wurden die PBMC in Medium oder MACS-Puffer aufgenommen und maschinell mit dem Blutzellanalysegerät ADVIA 120 von Siemens gezählt.

2.4.4 Zytotoxizitätsassay mit CD107a und intrazellulärer Zytokinfärbung

GolgiStop	BD, Heidelberg	554724
Ionomycin from Streptomyces conglobatus >98%	Sigma Aldrich, St. Louis USA	I9657
Berfeldin A	Sigma Aldrich, St. Louis USA	B6542
Phorbol12myristate13acetate (PMA)	Sigma Aldrich, St. Louis USA	P8139

Hintergrund:

Effektorzellen, wie beispielsweise NK-Zellen, können durch Freisetzung von Granzym und Perforin aus Vesikeln die Apoptose von Targetzellen bewirken. Im

Rahmen der Degranulation wird das in der Vesikelmembran enthaltene CD107a transient an der Effektorzelloberfläche nachweisbar. CD107a kann mit Antikörpern markiert und durchflusszytometrisch erfasst werden. Es wird als Degranulationsmarker/Aktivitätsmarker von Effektorzellen verwendet (155). Um eine Internalisierung des exprimierten CD107a nach Ablauf der Degranulation zu verhindern, wird dem Versuchsansatz Brefeldin A und GolgiStop zugesetzt. Diese Substanzen verhindern die Internalisierung, indem sie den Proteintransport zum Golgiapparat inhibieren oder ihn zerstören. So kann auch die Freisetzung von Zytokinen inhibiert werden, welche ebenfalls in der Interaktion mit Targetzellen von den Effektoren gebildet werden, und somit auch als Aktivitätsmarker mittels Intrazellulärfärbung (intracellular staining, ICS) gemessen werden können.

Durchführung:

Der Versuchsansatz erfolgte in 96-well-round-bottom Platten. Alle Zellen wurden vorher in Stammlösung C aufgenommen. In jedes Well wurden $0,5 \times 10^6$ oder $0,25 \times 10^6$ Effektoren vorgelegt. Hinzugefügt wurden des Weiteren Targets in der Effektor Target-Ratio (E:T) von 1:1, sowie, wenn gewünscht, stimulierende Antikörper, IL2 (100 IE/ml) oder Zoledronat (5 μ M/l). Bei den Versuchen mit exp. $\gamma\delta$ T-Zellen, wurden auch E:T von 4:1 – 0,125:1 verwendet. Um später eine Positivkontrolle für CD107a zu erhalten, wurden einem Well mit Effektoren PMA (50 ng/ml) und Ionomycin (1 μ M) zugesetzt. Als Negativkontrolle wurde zudem jeweils ein Well angesetzt, das nur Effektoren ohne Targets beinhaltete. Alle Wells wurden mit 2 μ l CD107a-APC gefärbt. Um die zellulären Transportprozesse zu inhibieren, wurde allen Wells zusätzlich Brefeldin A (10 μ g/ml) und GolgiStop (2 μ M) zugesetzt. Anschließend wurden alle Wells mit Stammmedium C auf 200 μ l aufgefüllt, gut durchmischt und die Platte im Brutschrank bei 37 °C für 8 bzw. 14 h inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte eine FACS-Färbung mit intrazellulärer Zytokinfärbung (intracellular cytokine staining, ICS) und eine Analyse mittels Durchflusszytometrie.

2.4.5 Aktivierungs-Assay mit CD69 und CD137

Durchführung:

Der Versuchsansatz erfolgte in 96-well-flat-bottom Platten. Alle Zellen wurden vorher in Stammlösung C aufgenommen. In jedes Well wurden 0.25×10^6 Effektoren vorgelegt. Hinzugefügt wurden des Weiteren Targets in der Effektor Target-Ratio (E:T) von 1:1, sowie, wenn gewünscht, stimulierende Antikörper, IL2 (100 IE/ml) oder Zoledronat (5 μ M/l). Anschließend wurden alle Wells mit Stammlösung C auf 200 μ l aufgefüllt, gut durchmischt und der Versuchsansatz im Brutschrank bei 37 °C für 14 h inkubiert. Nach der Inkubation wurden für die durchflusszytometrische Analyse CD69 und CD137 mittels FACS-Antikörpern angefärbt.

2.4.6 Kill- Assay

Comp Beads Negative Control	BD, Heidelberg	552843
-----------------------------	----------------	--------

Hintergrund:

Mit diesem Assay soll die spezifische Lyse von Targetzellen durch Effektorzellen gemessen werden, indem analysiert wird, wie viele Targets ohne Einfluss von Effektoren nach Versuchsende gemessen werden können und um wieviel Prozent sich dies unter Einfluss von Effektoren verringert. Um Störfaktoren bei der Messdauer rechnerisch eliminieren zu können, wurde jeder Kondition eine standardisierte Anzahl an Beads zugesetzt, deren durchflusszytometrisch gemessene Zahl mit der Zahl der gemessenen Effektoren bzw. Targets verrechnet werden konnte.

Durchführung:

Der Versuchsansatz erfolgte in 96-well-flat-bottom Platten. Alle Zellen wurden vorher in Stammlösung C aufgenommen. In jedes Well wurden $0,25 \times 10^6$ Effektoren vorgelegt. Hinzugefügt wurden des Weiteren Targets in der Effektor Target-Ratio (E:T) von 1:1, sowie, wenn gewünscht, stimulierende Antikörper, IL2 (100 IE/ml) oder Zoledronat (5 μ M/l). Anschließend wurden alle Wells mit Stamm-

lösung C auf 200µl aufgefüllt, gut durchmischt und der Versuchsansatz im Brutschrank bei 37 °C für 14 h inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte eine FACS-Färbung. Um, wie oben beschrieben eine standardisierte Lyse zu berechnen, wurde das Zellpellet nach Abschluss der Färbung in 100µl Bead-Suspension gelöst. Diese wurde hergestellt, indem zu je 1 ml PFA-Lösung je 2 Tropfen Negative Control Comp Beads gegeben wurden. Der Versuchsansatz wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dabei wurden in der FCS/SCC-Darstellung die Beads als Population in einem Gate gezählt, sowie die Zahl der noch vorhandenen lebenden Targets bestimmt.

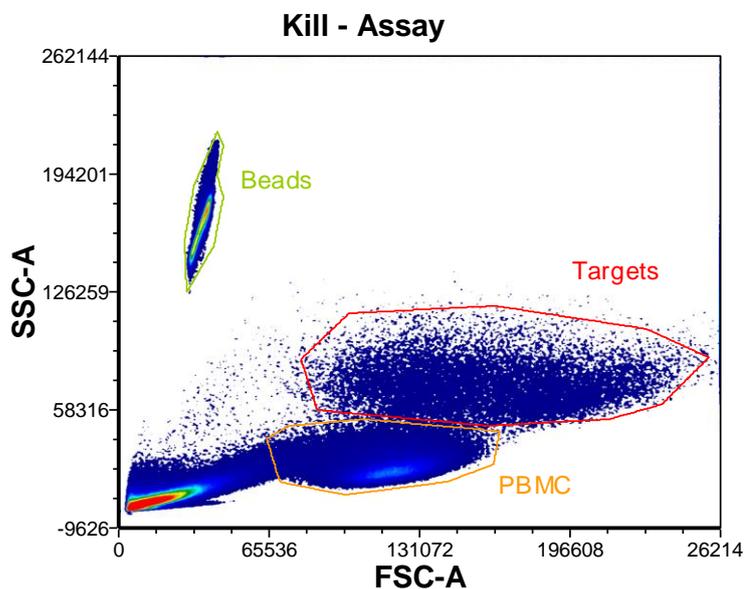


Abb. 2-2 FACS-Analyse des Kill-Assay

In der Graphik ist exemplarisch ein Auszug aus der Auswertestrategie des Kill-Assays dargestellt. Die gemessene Probe beinhaltete PBMC von Proband 1, sowie NALM-16 als Targets und Beads. Diese 3 Populationen können in der SSC/FSC-Darstellung gegeneinander abgegrenzt werden. Die Zahl der Beads kann schon in dieser Darstellung bestimmt werden. Die genaue Zahl der Targets zur Berechnung der Zelllyse wird erst durch Ausschluss toter Zellen und Gating eines Targetzell-spezifischen Oberflächenmarkes, z.B. CD19, bestimmt.

Um die spezifische Lyse zu berechnen, wurde der Quotient aus Targets und Beads in den Wells, in denen sich während der Inkubation nur Targets (Zahl der Targetzellen nativ= T_n ; bzw. Zahl der Beads nativ= B_n) im Medium befanden, mit den Wells in Beziehung gesetzt, in denen sich auch Effektoren und etwaige andere Zusätze befanden (Zahl der Targetzellen in Kondition x = T_x ; bzw. Zahl der

Beads in Kondition x= Bx). Die spezifische Lyse (%) konnte nun nach der folgenden Formel berechnet werden:

$$\text{Spezifische Lyse (\%)} = 100 - \left(\frac{\frac{\text{Zahl der Targets } T_x}{\text{Zahl der Beads } B_x}}{\frac{\text{Zahl der Targets } T_n}{\text{Zahl der Beads } B_n}} \times 100 \right)$$

2.4.7 Durchflusszytometrie

Cytofix/Cytoperm	BD, Heidelberg	2090K2
BD LSR II Flow Cytometer	BD, Heidelberg	
Angeschlossene Hardware, PC	Hewlett-Packard	
BD FACS Calibur	BD, Heidelberg	
Angeschlossene Hardware, PC	Apple	

Hintergrund:

Bei der Durchflusszytometrie (fluorescence activated cell scanning, FACS) können Zellen mit Hilfe eines Laserstrahls aufgrund ihrer Eigenschaften und durch Markierung mit Fluorochrom gekoppelten Antikörpern genauer charakterisiert werden.

In der Vorbereitung wurden daher die Zellen mit Fluorochrom markierten Antikörpern versetzt, die sowohl an Oberflächenmarker als auch intrazellulär an Zytokine binden können. Um die Vitalität der Zellen beurteilen zu können, wurde zudem eine Fluorochrom markierte aminbindende Substanz zugegeben. Da tote Zellen eine erhöhte Durchlässigkeit ihrer Zellmembran aufweisen, können intrazelluläre Amine angefärbt und die Zellen somit als tot markiert werden.

In der Durchflusszytometrie kann das entstehende Streulicht und die Fluoreszenz der Fluorochrome gemessen werden. Das Seitstreulicht (sideward light scatter, SSC) lässt auf die intrazelluläre Granularität schließen und das Vorwärtsstreulicht (forward side scatter, FSC) auf die Größe der passierenden Zellen. Die Fluorochrome der gebundenen Antikörper werden durch den Laserstrahl angeregt und emittieren Licht. Dieses kann durch Interferenzfilter und Lichtsensoren auf seine Wellenlänge hin analysiert werden. Die Fluoreszenzfarbstoffkombinationen sind so zu wählen, dass sie später in verschiedenen Kanälen gemessen werden

können bzw. ein unterschiedliches Emissionsmaxima haben. So können die zu messenden Antigene später voneinander unterschieden werden. Mit Hilfe einer Software zur Auswertung, hier FCS-Express, können die gemessenen Daten graphisch dargestellt werden, z.B. jede Zelle als Einzelpunkt.

Durchführung:

Die Färbung der zu analysierenden Zellen erfolgte in 96-Well-Platten bzw. FACS-Röhrchen. Während des gesamten Versuchsablaufs wurde auf Eis gearbeitet. Die Zentrifugationsschritte erfolgten immer bei 4 °C mit 625 g für 2 min, B9 und R9.

Die Zellen wurden zweimal in PBSE gewaschen und der Überstand vorsichtig komplett abgekippt. Für die Färbung toter Zellen wurden je 40 µl in PBSE 1:400 verdünnter Lebend/Tot-Farbstoff Aqua bzw. 20 µl 7-AAD zugegeben, dekantiert und für 20 min im Kühlschrank inkubiert. Gemäß der entsprechenden AK-Verdünnungsreihe wurde ein passender Antikörpermix für die Anfärbung der gewünschten Oberflächenmoleküle in FACS-Puffer angesetzt, wobei die optimale Verdünnung der Antikörper dabei zwischen 1:5 – 1:200 lag. Nach der lebend/Tod-Färbung wurden die Zellen zweimal in FACS-Puffer gewaschen, der Überstand vorsichtig abgekippt und 40µl des Antikörpermix zur Oberflächenantigenfärbung zugegeben. Es folgte eine 20-minütige Inkubation in dem Kühlschrank und zweimaliges Waschen in FACS-Puffer. Sollte ein ICS, wie beispielsweise bei dem CD107a-Assay erfolgen, war eine Permeabilisierung der Zellmembran mit je 100 µl Cytifix/Cytoperm nötig. Die Zellen wurden für 20 min im Kühlschrank inkubiert und zweimal mit Permash gewaschen. Nach dem vollständigen Abkippen des Überstandes wurden 40µl Antikörpermix zugegeben, der gemäß der AK-Verdünnungsreihe der gewünschten intrazellulären FACS-Antikörper in Permash angesetzt wurde. Es folgte eine 20-minütige Inkubation im Kühlschrank und zweimaliges Waschen mit Permash. Das Zellpellet wurde in 100 µl PFA-Lösung bzw. Beadmix (siehe Abschnitt 2.4.6) fixiert und bis zur Messung im Kühlschrank aufbewahrt.

Teilweise wurde auch die Targetzelllinie NALM-16 mCherry verwendet, die eine Eigenfluoreszenz aufweist. Diese Zellen müssen folglich nicht mittels Fluorochrom markierten Antikörpern angefärbt werden, sondern können direkt in der durchflusszytometrischen Messung verwendet werden.

Messung:

Für die Probenanalyse wurde der Durchflusszytometer BD LSR II Flow Cytometer zur Messung von Versuchsansätzen und das BD FACS Calibur zur Reinheitskontrolle nach Depletion bzw. Zellexpansion verwendet. Die Daten wurden mit der Software FCS-Express 5 ausgewertet. Um eine optimale und gängige Darstellung der Zellverteilung zu erreichen, wurde vor der Messung die Verstärkerspannung des SSC (Ordinate) und FSC (Abszisse) durch Messung ungefärbter Zellen angepasst. Es folgte die Messung der Proben in FACS-Röhrchen.

Auswertung:

Zur Auswertung der Daten wurden zwei verschiedene Kanäle als Diagramm gegeneinander aufgetragen und die gewünschten Populationen durch Gates markiert; oder der Graph wurde in Quadranten mit doppelt positiven, doppelt negativen/einfach positiven Populationen aufgeteilt. So konnte automatisch die quantitative und prozentuale Anzahl der markierten Zellen bestimmt werden. Die Gates bzw. markierten Quadranten konnten dann auf weitere Fluorochrome hin untersucht werden. Da die Zellen von sich aus eine Eigenfluoreszenz besitzen, wurden ungefärbte Zellen gemessen, um Eigenfluoreszenz von der Fluoreszenz der Fluorochrome abgrenzen zu können.

In der Gatingstrategie wurden zunächst in der FSC/SSC-Darstellung die Lymphozyten- und Targetzell-Populationen bestimmt und davon die Doubletten in der FSC-H/FSC-A-Darstellung ausgegrenzt. Weiter wurden mit Hilfe der Lebend-Tot-Färbung die lebenden Zellen selektioniert und anschließend mit Hilfe von Oberflächenmarkern die verschiedenen Zellpopulationen genauer differenziert und quantifiziert. Dann konnten diese hinsichtlich ihrer Aktivierung untersucht werden.

Definition der Zellpopulationen:

NK-Zellen wurden als CD3⁻/CD56⁺- Zellen definiert. $\gamma\delta$ T-Zellen wurden als CD3⁺/TcR $\gamma\delta$ ⁺-Zellen definiert.

2.4.8 Depletion von $\gamma\delta$ T Zellen

Clini MACS PBS/EDTA Buffer	MiltenyiBiotec, BergischGladbach	700-29
auto MACS pro	MiltenyiBiotec, BergischGladbach	
Anti- $\gamma\delta$ MicroBeads Kit	MiltenyiBiotec, BergischGladbach	130-050-701
BD FACS Calibur	BD, Heidelberg	
Angeschlossene Hardware, PC	Apple	

Hintergrund:

In den Experimenten wurde die MACS-Technik der Firma Milteny verwendet. Um mit dieser Methode eine Anreicherung oder negativ Depletion spezifischer Zellpopulationen aus PBMCs zu erreichen, können diese mit speziellen Antikörpern versetzt werden. Diese binden an die spezifischen Oberflächenmoleküle der Zielzellen z.B. den TcR $\gamma\delta$ -Rezeptor. Die Antikörper sind mit einem Eisendioxidpartikel gekoppelt bzw. werden über einen Sekundärantikörper an einen solchen Partikel gekoppelt. Lässt man die Suspension nun ein Magnetfeld passieren, werden die markierten Zellen vom Magnetfeld angezogen, zurückgehalten und können so aus der Zellssuspension separiert werden. Dies kann wie im folgenden Experiment maschinell mit dem autoMACS oder, wie in Abschnitt 2.4.10 beschrieben, manuell mit einem Magneten geschehen.

Durchführung:

Nach der Leukozytenseparation wurde das Zellpellet in einem 15 ml Falkonröhrchen in 40 μ l gekühltem MACS-Puffer pro 10^7 Leukozyten gelöst und zu gleichen Teilen auf zwei Falkonröhrchen aufgeteilt, wobei ein Falkonröhrchen maximal 10^8 Leukozyten enthalten durfte. Röhrchen 1 wurde für die Depletion der $\gamma\delta$ T-Zellen verwendet, während Röhrchen 2 einer Mock-Depletion unterzogen wurde (siehe

unten). Für die folgenden Schritte wurden nur im Kühlschrank vorgekühlte Substanzen verwendet, um ein unspezifisches Labeling oder ein Lösen der Antikörper von der Zelloberfläche zu verhindern.

Nach der Zugabe von 10 µl Anti-TCR $\gamma\delta$ -Hapten-Antibody pro 10⁷ Leukozyten, wurde die Zellsuspension dekantiert und 10 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden 30 µl MACS-Puffer und 20 µl Anti-Hapten MicroBeads-FITC pro 10⁷ Leukozyten zugegeben und gut dekantiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei 4 °C, wurden 2 ml MACS-Puffer pro 10⁷ Zellen zugegeben und die Zellsuspension für 10 min mit 300 g und 4 °C, B7, R5 zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgekippt und das Zellpellet in 500 µl MACS-Puffer gelöst. Die Falconröhrchen wurden in einem vorgekühlten Ständer im autoMACS von MiltenyiBiotec angebracht und das Gerät wurde in dem Programm "Posseld2" gestartet. Nach Ende des Programms wurde eine maschinelle Zellzahlbestimmung durchgeführt.

Im weiteren Versuchsverlauf sollte das Verhalten von Leukozyten mit dem der $\gamma\delta$ T-Zell depletierten Leukozyten verglichen werden. Um zu verhindern, dass Unterschiede zwischen den beiden Proben auf die Depletion zurückzuführen sein könnten, wurden die Leukozyten in Röhrchen 2 einer Mock-Depletion unterzogen. Dies bedeutet, dass mit diesen Zellen alle für Röhrchen 1 beschriebenen Schritte der Depletion durchgeführt wurden. Allerdings wurde nur MACS-Puffer statt den Depletionsantikörpern Anti-TCR $\gamma\delta$ -Hapten-Antibody und Anti-Hapten MicroBeads-FITC zugegeben. Im autoMACS wurden so keine Zellen depletiert, die Mock-depletieren Leukozyten konnten allerdings einen vergleichbaren Prozess durchlaufen.

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie erfolgt eine Kontrolle, ob die Depletion erfolgreich war. Die Depletion wurde als erfolgreich gewertet, wenn sich der Anteil der $\gamma\delta$ T-Zellen an den T-Zellen um den Faktor 10 reduziert hatte. Nur bei Proband 5, der einen exorbitant hohen Anteil von 81 % bzw. 86 % an $\gamma\delta$ T-Zellen hatte, wurde es toleriert, dass sich der Anteil der $\gamma\delta$ T-Zellen auf 46 % bzw. 16% reduziert hatte (Abb.2-3).

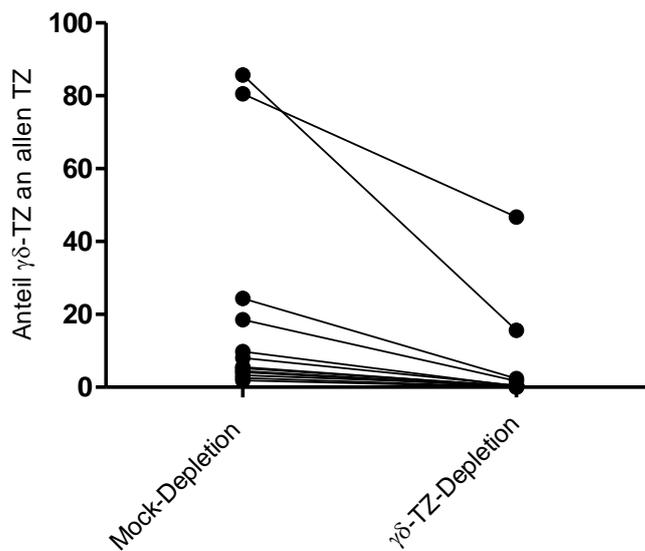


Abb. 2-3 Anteil der $\gamma\delta$ T-Zellen nach Depletion

In der Graphik ist dargestellt wie hoch der Anteil der $\gamma\delta$ T-Zellen an den T-Zellen in der FACS-Analyse nach TcR $\gamma\delta$ - bzw. Mock-Depletion von PBMC war

2.4.9 Leukozytenstimulation mit IL2 und Zoledronsäure

Interleukin-2 (IL2) Proleukin 2x10 ⁶ IE/ml	Universitätsapotheke
Zoledronsäure 4 mg/100 ml (147,01 nM)	Hexal, Holzkirchen

Theorie:

IL2 stimuliert verschiedene Subpopulationen der Lymphozyten, wie B- und T-Zellen oder NK-Zellen und kann so ihre Zytokinproduktion, Zytotoxizität oder Proliferation anregen (120). Synthetische Aminobisphosphonate wie Zoledronsäure (Zoledronat) stimulierten $\gamma\delta$ T-Zellen bzw. die Subpopulation V γ 9V δ 2 (117).

Durchführung:

Der Versuchsansatz erfolgte in 96-well-round-bottom Platten, in deren Wells jeweils 0,5 x 10⁶ bzw. 0,25 x 10⁶ in Stammmedium C gelöste Effektoren vorgelegt wurden. Zur Stimulation wurden in ausgewählte Wells IL2 (100 IE/ml), Zoledronat (5 μ M/l), beide Substanzen oder nur Medium gegeben. Alle Wells wurden mit Stammmedium C auf 200 μ l aufgefüllt und für 24h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 %

Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. Anschließend folgte die Weiterverwendung im CD107a- bzw. Kill-Assay (Abschnitt 2.4.4 bzw. 2.4.5) erneuter Zugabe von IL2 und/oder Zoledronat.

2.4.10 Typischer Versuchsablauf mit PBMC

Nach der Leukozytenseparation aus Vollblut wurden die Leukozyten entweder gleich weiterverwendet oder einer $\gamma\delta$ T-Zell-Depletion unterzogen. Anschließend wurde mit den so erhaltenen Zellen ein CD107a- bzw. Kill-Assay mit einer E:T von 1:1 angesetzt, wobei ausgewählten Wells IL2, Zoledronat oder 4G7-AK zugesetzt wurde.

2.4.11 Isolation von NK-Zellen

auto MACS pro	MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach	
CD56 MicroBeads	MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach	130-050-401
CD3 Dynabeads	Invitrogen life technologies, Carlsbad	11151D
Magnet mit Plastikhalterung für 15ml Falcons	MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach	
BD FACS Calibur	BD, Heidelberg	
Angeschlossene Hardware, MAC	Apple	

Hintergrund: siehe Abschnitt 2.4.7

Durchführung:

Für die Isolierung von NK-Zellen wurden aus den Leukozyten zunächst CD56⁺-Zellen angereichert und daraus anschließend CD3⁺-Zellen depletiert. Für die folgenden Schritte wurden nur im Kühlschrank vorgekühlte Substanzen verwendet, um ein unspezifisches Labeling oder ein Lösen der Antikörper von der Zelloberfläche zu verhindern.

Nach der Separation von Leukozyten aus 400-600 ml Vollblut wurde das Zellpellet in 80 μ l MACS-Puffer pro 10^7 Leukozyten resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf 15 ml Falkonröhrchen aufgeteilt, sodass sich maximal $1,4 \times 10^8$ Leu-

kozyten in jedem Röhrchen befanden. Anschließend wurden 20 µl CD56 Micro-Beads pro 10^7 Leukozyten zugegeben und die Zelluspension gut gemischt. Nach einer 15-minütigen Inkubation im Kühlschrank, erfolgte die Zugabe von 1-2 ml MACS-Puffer pro 10^7 Leukozyten und die Zentrifugation für 10 min mit 300 g und 4 °C, B7, R5. Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt und das Zellpellet in 500 µl MACS-Puffer pro 10^8 Leukozyten resuspendiert. Danach wurden die Falkonröhrchen in einem vorgekühlten Ständer im autoMACS von MiltenyiBiotec angebracht und das Gerät im Programm "Posseld2" gestartet.

Nach der Anreicherung wurden die CD56⁺-Zellen mit dem Blutzellanalysegerät ADVIA 120 von Siemens gezählt und auf 10^7 Zellen/ml eingestellt. Für die Depletion der CD3⁺-Zellen müssen die dafür verwendeten CD3-Dynabeads erst gewaschen werden. Hierfür wurde das Behältnis der Beads für 30 s gevortext und dann 50 µl Beadflüssigkeit für je 10^7 Zellen daraus entnommen und in ein 15 ml Falkonröhrchen gefüllt. Der Falkon wurde anschließend für 1 min an einen Magneten gehalten, sodass die braunen magnetischen Dynabeads an der Röhrchenwand auf Magnethöhe hängen bleiben konnten. Nun konnte der Überstand aus dem Falkonröhrchen pipettiert werden, ohne die Beads miteinzusaugen. Anschließend wurden in das Röhrchen 50 µl MACS-Puffer pro 10^7 zur Depletion geplanten Zellen zugeben und der Vorgang des Waschens der Beads wiederholt.

Im Weiteren wurden dann je 50 µl vorbereitete Beadlösung zu je 10^7 Zellen gegeben und im Kühlraum bei 4 °C unter ständiger Durchmischung im Rotator für 30 min inkubiert. Nach Abschluss wurde das Falkonröhrchen erneut an den Magneten gehalten, sodass die magnetischen Beads an der Röhrchenwand hängen blieben. Der Überstand wurde vorsichtig in ein neues Falkonröhrchen überführt und nach Zugabe von 1 ml MACS-Puffer vorsichtig dekantiert. Das Röhrchen wurde dann wieder an den Magneten gehalten und der Vorgang weitere 2-3-mal wiederholt, bis keine bräunlichen Beads mehr in der klaren Zellsuspension sichtbar waren. Die verbleibenden CD56⁺CD3⁻ NK-Zellen wurden gezählt und mittels Durchflusszytometrie auf ihre Reinheit geprüft, die mindestens 96% aller lebenden Leukozyten betrug.

2.4.12 Expansion von $\gamma\delta$ T-Zellen

Theorie:

In diesem Experiment sollen $\gamma\delta$ T-Zellen aus PBMC expandiert werden. Dazu wird den PBMC IL2 und Zoledronsäure (Zoledronat), ein synthetisches Aminobisphosphonat zugesetzt. Während IL2 in zahlreichen Lymphozyten wie T- oder B-Zellen ein Wachstumssignal induziert, stimuliert Zoledronat spezifisch das Wachstum von $\gamma\delta$ T Zellen bzw. deren Subpopulation V γ 9V δ 2 (156).

Durchführung:

Frisch aus Vollblut isolierte PBMC wurden in Stammmedium C auf eine Konzentration $1,1 \times 10^6$ Lymphozyten/ml eingestellt. Danach erfolgte die einmalige Zugabe von 1 μ Mol/l Zoledronsäure. Die Zellsuspension wurde in einer sterilen Kulturflasche im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Zellpflege:

Die Zellpflege erfolgte stets unter sterilen Bedingungen. Es erfolgten tägliche mikroskopische Kontrollen der Kultur auf Kontamination durch Pilze oder Bakterien. Vor jeder Zellpflege wurde eine maschinelle Bestimmung der Zellzahl und Zellzusammensetzung mit dem Blutzellanalysegerät ADVIA 120 durchgeführt. Zudem erfolgte vor und nach der Zellpflege eine Messung des pH, der Glucose- und Laktatkonzentration des Zellmediums mit dem Blutgasanalysegerät ABL 800 Flex.

Tag 3 und 6: Die Zellpflege erfolgte in dieser Phase der Expansion alle drei Tage. Der Expansionsansatz wurde für 10 min bei 300 g, RT, B7, R5 zentrifugiert und danach, die Hälfte des Überstandes abpipettiert und durch frisches Expansionsmedium ersetzt. Anschließend wurden die Zellen wieder vorsichtig resuspendiert. In dieser Phase der Expansion erhöht sich der Leukozytenanteil und die Zellen bilden Aggregate, allerdings verläuft das Wachstum der Gesamtzellzahl noch vergleichsweise langsam.

Tag 9- 14: Da das Zellwachstum und somit auch der Mediumverbrauch in der zweiten Woche schneller erfolgte, war eine tägliche Zellpflege notwendig. Betrug die maschinell gemessene Zellzahl $< 2,7 \times 10^6$ Zellen/ml, wurden die Zellen zent-

rifugiert und 2/3 des Mediums durch frisches ersetzt. Betrug die bestimmte Zellzahl $> 2,7 \times 10^6$ Zellen /ml, wurde die Menge des Mediums durch Zugabe von frischem Medium verdoppelt. Nach etwa 12 - 14 Tagen konnte die Expansion für Versuche verwendet werden.

2.4.13 Titration der Interaktion expandierter $\gamma\delta$ T-Zellen mit frisch isolierten NK-Zellen und Blockade von CD137

Privigen (normales Immunglobulin vom Mensch)	CSL Behring, Pennsylvania USA	
Monoklonal CD137 Antibody (BKK2), IgG1	ThermoFisher scientific, Waltham, USA	MA5-13739

Durchführung:

Für diesen Versuch wurden exp. $\gamma\delta$ T-Zellen und frisch aus Vollblut isolierte NK-Zellen verwendet, die in Stammmedium C gelöst wurden. Für die weitere Verwendung in Versuchen, sollte ein Teil der Zellen unbehandelt bleiben, ein Teil mit humanem IgG aktiviert und ein weiterer Teil mit IgG aktiviert und gleichzeitig mit einem CD137- Blockade-AK versetzt werden. Für die Aktivierung mit IgG wurde in eine 48-well-Flachbodenplatte in PBS gelöstes humanes IgG ($2,5 \mu\text{g/ml}$) gegeben, sodass der Well-Boden bedeckt war. Nach einer Inkubation von 24 h bei 4°C wurde die Flüssigkeit aus der Platte abgekippt, wobei das an den Plastikboden adhärenste IgG in der Platte verblieb. Nun konnten die $\gamma\delta$ T-Zellen und die NK-Zellen entweder separat oder gemischt in die Wells gegeben werden. Dabei betrug das Mischungsverhältnis von NK-Zellen zu $\gamma\delta$ T-Zellen 1:4 – 1:0,125. Die Zahl der NK-Zellen blieb dabei immer bei 250.000 Zellen/Well, während die Zahl der $\gamma\delta$ T-Zellen abhängig von dem gewünschten Verhältnis variierte. Sollte CD137 blockiert werden, wurde der oben genannte Antikörper in der Konzentration $2,5 \mu\text{g/ml}$ in die entsprechenden Wells gegeben. Am Ende wurden alle Wells mit Stammmedium C aufgefüllt, sodass sich eine Konzentration von 5×10^6 NK-Zellen/ml bzw. in den Well mit nur $\gamma\delta$ T-Zellen 5×10^6 $\gamma\delta$ T-Zellen befanden. Der Ansatz wurde für 24h im Brutschrank inkubiert, wobei nach 12h die Mediumfarbe der einzelnen Wells kontrolliert wurde. Hatte ein Farbumschlag auf gelb stattge-

gefunden, wurde vorsichtig ein Teil des Mediums abgesaugt und durch frisches ersetzt, allerdings ohne die Zellen miteinzusaugen oder die entstandenen Zellkluster zu zerstören. Nach 24h wurden die Zellen resuspendiert und im CD107a-Assay bzw. xCelligence weiterverwendet.

2.4.14 Echtzeit Zytotoxizitäts-Assay xCELLigence

xCELLigence RTCA Roche	AceaBiosciences Inc., San Diego, USA	
Angeschlossene Hardware, PC	Hewlett-Packard	
E-Plate 96-Well für xCELLigence SP	AceaBiosciences Inc., San Diego, USA	2801035

Hintergrund:

Das xCELLigence-System von Roche erlaubt eine dynamische Beobachtung des Wachstums und der Zellyse adhärenter Zelllinien in Echtzeit. Dafür werden mit Elektroden ausgestattete 96-well E-Plates verwendet, an welche ein leichtes elektrisches Feld angelegt wird. In definierten Zeitabständen wird die Impedanz der einzelnen Wells gemessen und diese in einen dimensionslosen Zellindex (ZI) umgerechnet. Die Impedanz wird maßgeblich durch die Zahl der am Boden adhärenen Zellen beeinflusst. Somit kann ein Wachstum dieser Zellen sowie ihre Zellyse, die zu einem Ablösen der Zellen vom Boden führt, gemessen werden.

Durchführung:

Vor Versuchsbeginn muss das xCELLigence-Messgerät kalibriert werden, um die Hintergrundimpedanz zu bestimmen. Dazu wurde in alle Wells der E-Platte 50 µl Stammmedium A vorgelegt und eine Kalibrierungsmessung bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit durchgeführt. Danach konnten je 15.000 Targets in 100 µl Stammmedium A in die Wells gegeben werden. Die Platte wurde dann, im an das Messgerät angeschlossenen Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit für 24h inkubiert, um die Targetzellen an dem Plastikboden adhären zu lassen, wobei alle 30 min eine Impedanzmessung erfolgte. Nach 24 h sollte ein Zellindex (ZI) von 1 erreicht sein. Dann konnten die Effektoren in der gewünschten E:T dazugegeben werden, sowie in ausgewählte Wells CH14.18.-

AK in der Konzentration von 1 µg/ml. Alle Wells wurden mit Medium auf ein Gesamtvolumen von 200µl aufgefüllt und die Platte zur Messung für 24 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit in dem angeschlossenen Brutschrank inkubiert. Eine Impedanzmessung wurde alle 30 min automatisch durchgeführt. Zur Kontrolle des Versuchsergebnisses sollten immer Wells enthalten sein, die nur Medium bzw. nur Targets enthalten.

Nach Abschluss der Messung konnte der Versuch unter Verwendung der Software RTCA 1.2.1 von Roche Diagnostics ausgewertet werden und die spezifische Lyse nach folgender Formel berechnet werden (ZI=Zellindex):

$$\text{Spezifische Lyse (\%)} = 100 - \frac{\text{ZI Probe}}{\text{ZI Targets only}} \times 100$$

2.4.15 Expansion von NK-Zellen

Bestrahlungsgerät GammaCell 1 000 Elite	Nordion
Interleukin-2 (IL2) Proleukin 2x10 ⁶ IE/ml	Universitätsapotheke

Theorie:

NK-Zellen können mit Hilfe der Feederzelllinie K562-mb15-41BBL unter Zugabe von IL2 expandiert werden. Die Herstellung dieser Feederzelllinie erfolgt durch Transduktion der erythroleukämischen Zelllinie K562, sodass sie den Liganden 4-1BBL (CD137L) und membrangebundenes IL15 exprimiert. Die Zelllinie K562-mb15-41BBL wurde uns freundlicherweise von Dr. D. Campana MD, National University Cancer Institute, Singapore, zur Verfügung gestellt (199). Koinkubiert man PBMC mit 100 Gy bestrahlten K562-mb15-41BBL und IL2-haltigem Medium 100 IE/mL, erfolgt eine massive Expansion von NK-Zellen um 3-6 Logstufen (202). Andere Zellfraktionen der PBMC werden überwacht. Die Induktion der Zellproliferation erfolgt hierbei über den CD137-Rezeptor und den IL2/IL15-Rezeptor-Complex (CD122/CD132) (199,200).

Durchführung:

Ansatz:

Die Feederzellen K562-mb15-41BBL wurden bei einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml mit 100 Gy bestrahlt. Der Ansatz erfolgte aus frisch isolierten PBMC und bestrahlten K562-mb15-41BBL im Verhältnis 1:15 in sterilen Zellkulturflaschen. Die Zellen bei einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in Stammmedium A, dem 100 IE/ml IL2 zugegeben wurde, resuspendiert und koinkubiert.

Zellpflege:

Die Zugabe von frischem IL2-haltigem Medium erfolgte Glucose/Laktat-gesteuert alle 1-3 Tage, je nach Wachstumsphase der Zellen. Es wurde eine tägliche Zellkulturbeobachtung durchgeführt, bei der die Notwendigkeit eines früheren Mediumwechsels anhand folgender Parameter beurteilt wurde:

- Mediumfarbe: Ein Farbumschlag des Kulturmediums von Rot auf Gelb zeigt einen hohen Mediumverbrauch an und die Notwendigkeit des Mediumwechsels.
- Analyse des Mediums im BGA-Gerät: Es wurde das ABL 800 Flex Radiometer verwendet. Die Laktatkonzentration wurde streng unter 15 mmol/l gehalten, der pH-Wert über 7 betragen und der Glucosegehalt nicht unter 100 mg/dl sinken.
- Zellzahlmessung: Die Zellzahl sollte in den ersten 7 Tagen in etwa 1×10^6 Zellen/ml betragen. Bei abweichender Zellzahl wurde die Zielzellkonzentration durch Zentrifugation und Anpassung der Mediummenge erreicht. Dabei durfte maximal 50% des verbrauchten Mediums verworfen werden, um das Zytokinmilieu zu erhalten. Ab Tag 7 kam der Zellkonzentration eine untergeordnete Rolle zu, sodass das Medium bei der Zellpflege in der Regel verdoppelt wurde.
- Zellcluster: Zu Beginn kommt es zu einer Gruppierung von PBMC und Feederzellen zu Zellclustern. Lösen sich diese auf signalisiert dies, dass die exp. NK-Zellen sich für Versuche eignen.

Ende der Kultur:

Nach 8-14 Tagen können die exp. NK-Zellen für Versuche verwendet werden.

2.4.16 Luciferase-Assay

D-Luciferin synthetic	Sigma Aldrich, St. Louis USA	L9504
Mikrotiterplatte Flachboden 96-well, weiß	Greiner Bio-One, Frickenhausen	655083
Victor 1420 Multilabelcounter	Perkin Elmer, Waltham USA	
Angeschlossene Hardware, PC	Compaq	

Theorie:

Die Enzymklasse der Luciferasen setzen Luciferine in einer chemischen Reaktion unter Emission von Photonen um. Die Reaktion benötigt Sauerstoff und ATP sowie Magnesium als Cofaktor (157):



Das meist untersuchte Luciferaseenzym, ist das firefly-Luciferin (Luc) des nord-amerikanischen Leuchtkäfers *Photinus pyralis*, welcher D-Luciferin als Substrat nutzt und es zu einer Emission von Licht mit einer maximalen Wellenlänge von $\lambda=537$ nm kommt (158).

Werden Tumorzelllinien stabil transduziert, sodass sie das Luciferase-Gen integriert haben, kann die beschriebene Reaktion quantifiziert werden und anhand des emittierten Lichts nach Zugabe von D-Luciferin mit dem Photometer gemessen werden. Die Lichtintensität ist abhängig von der Luciferaseaktivität, welche proportional zu den lebenden Zellen ist, da die Reaktion aufgrund des ATP-Bedarfs nur in lebenden Zellen abläuft.

Durchführung:

Die Effektoren wurden in Medium resuspendiert und je 0.1×10^6 Zellen in 50 μ l Medium in die Wells einer weißen 94-well-Platte pipettiert. Als Effektoren wurden

Auswertung:

Die Messwerte wurden mithilfe eines zeitabhängigen Korrekturfaktors normalisiert. Anhand des erhaltenen Korrekturfaktor KF_{BL} und dem Zeitintervall t konnte die korrigierte Biolumineszenz BL_{korr} in jedem Well mit folgender Formel berechnet werden:

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

Auf jeder Platte wurde eine Titrationsreihe mit genau definierten Zellzahlen erstellt, um die Biolumineszenzwerte einordnen zu können. Mittels dieser Titrationsreihe wurde erneut eine Ausgleichsgerade berechnet, anhand deren Steigung der Lysefaktor LF erhalten werden konnte sowie über den y-Achsenabschnitt die Biolumineszenz BL_0 ohne Zellen. Mit Hilfe dieser Parameter wurde die Anzahl der lebenden Zellen n bestimmt.

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

Da die ursprüngliche Targetzellzahl je Well 100.000 Zellen betrug, folgt daraus:

$$Vitalität = \frac{n}{100000}$$

$$Lyse = 1 - Vitalität$$

2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der Software GraphPad Prism 5. In den Versuchsansätzen wurden von jeder Kondition 3 technische Replikate angesetzt, wobei zur statistischen Analyse der Mittelwert, der erhaltenen Messwerte gebildet wurde. Bei den Versuchen mit exp. $\gamma\delta$ T-Zellen, die in dem Ergebnissteil in Abschnitt 3.3.5-3.3.7 beschrieben sind, wurden für die statistische Analyse nicht die Mittelwerte der technischen Replikate der Versuche verwendet, sondern alle Messwerte verwendet. N gibt die Anzahl der durchgeführten Versuche an. Für die statistische Auswertung wurden der (gepaarte) t-Test oder der 1way

(repeated measures) ANOVA mit dem Posttest Tukey verwendet. In den Balkendiagrammen ist immer der Mittelwert mit dem zugehörigen Standardfehler des Mittelwertes dargestellt.

2.6 Ethikantrag

Die gesamte Doktorarbeit, sowie die Blutentnahme von pädiatrischen Patienten der Universitätsklinik Tübingen bzw. freiwilligen erwachsenen Spendern, inklusive der Verwendung ihrer Leukozyten für alle durchgeführten *in vitro* Experimente wurde vom Ethikkomitee Tübingen genehmigt. (SFB 685, Projekt C03, 761/2015B02)

3. ERGEBNISSE

3.1 **Untersuchung der ADCC von NK-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen durch CD19-4G7SDIE AK**

Für die folgenden Versuche wurden frische, aus Vollblut isolierte PBMC verwendet. Diese stammten zu einem Teil von gesunden, erwachsenen Probanden, der andere Teil stammte von pädiatrischen Patienten der Universitätskinderklinik Tübingen nach haploidenter TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletierter SZT. Genauere Angaben zu den Probanden sind Abschnitt 2.3.1 zu entnehmen. In den Versuchen des Abschnittes 3.1 wurden die Proben der pädiatrischen Patienten und der gesunden Probanden bewusst zu einem Gesamtkollektiv zusammengefasst. In den Abschnitten 3.1.3 und 3.1.4 wird auf beide Teilkollektive gesondert eingegangen.

3.2 **CD19 Expression der Targetzellen**

Da es sich bei CD19-4G7SDIE AK um einen Fc-optimierten monoklonalen chimeren CD19 Antikörper handelt, ist eine Oberflächenexpression von CD19 auf den Targetzellen essentiell für die Funktion des Antikörpers. Um die ADCC von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen mittels CD19-4G7SDIE AK zu evaluieren, wurden daher die Leukämie- bzw. Lymphom-Zelllinien NALM-16 und RAJI verwendet, welche hochpositiv für CD19 sind. In **Abb.3.1** ist eine exemplarische FACS-Analyse beider Zelllinien zur Demonstration der CD19 Expression gezeigt. 98% der Zellen der Leukämiezelllinie NALM-16 und 97% der Burkittlymphom-Zelllinie RAJI waren positiv für CD19. In dieser Arbeit wurde desweiteren die Leukämie-Zelllinie K562 verwendet. Da K562 keine Oberflächenexpression von CD19 aufweist, wie ebenfalls exemplarisch in **Abb.3-1** gezeigt, hat diese Zelllinie in der Untersuchung der ADCC mittels CD19-4G7SDIE AK keine Verwendung gefunden.

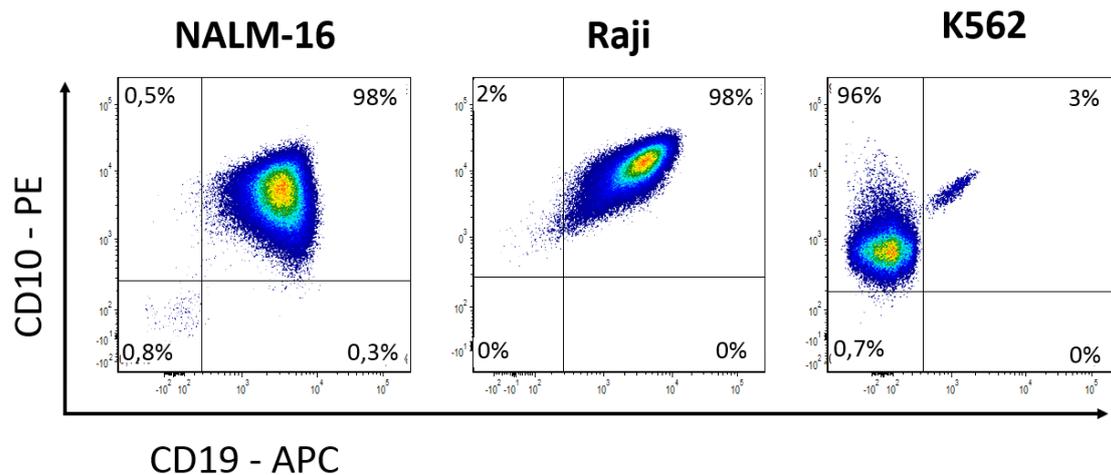


Abb. 3-1 CD19 Expression der Targetzelllinien

Es sind exemplarische Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der Oberflächenrezeptoren der Targetzelllinien NALM-16, Raji und K562 als Density Plot dargestellt. CD10 auf der y-Achse wurde in PE gefärbt. NALM-16 und RAJI sind mit je 98% hochpositiv für CD19, hier in APC gefärbt, auf der x-Achse. K562 ist negativ für CD19.

3.2.1 ADCC von NK-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen pädiatrischer Patienten nach SZT und gesunder Probanden durch den CD19-4G7SDIE AK

3.2.1.1 *Messung der Aktivierung durch CD19-4G7SDIE AK mit dem Aktivitätsmarker CD69*

Das Oberflächenmolekül CD69 wird früh im Aktivierungsprozess von Lymphozyten exprimiert. In diesem Versuch wurden frisch isolierte PBMC aus Vollblut mit der Targetzelllinie NALM-16 unter Zugabe von CD19-4G7SDIE AK für 14 Stunden inkubiert. Mittels Durchflusszytometrie wurde anschließend die CD69-Expression auf NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen gemessen. Wie **Abb.3-2** zu entnehmen ist, zeigte sich bei den NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen ein signifikanter Anstieg der CD69-Expression durch CD19-4G7SDIE AK im gepaarten t-Test mit $p < 0,0001$ bei den NK-Zellen bzw. $p = 0,0005$ bei den $\gamma\delta$ T-Zellen.

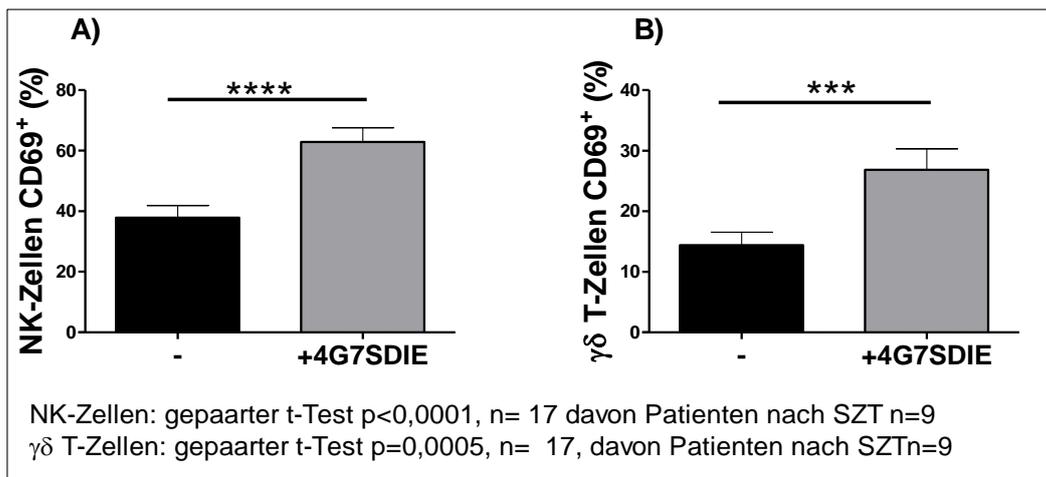


Abb. 3-2 CD69-Expression auf NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen durch CD19-4G7SDIE AK

Frisch isolierte PBMC wurden mit NALM 16 mit einer E:T von 1:1, mit und ohne CD19-4G7SDIE AK für 14h inkubiert. Anschließend wurde in der durchflusszytometrischen Analyse die CD69 Expression auf den **A)** NK-Zellen und **B)** $\gamma\delta$ T-Zellen quantifiziert. CD19-4G7SDIE AK steigerte die CD69-Expression auf beiden Zelltypen signifikant.

3.2.1.2 *Messung der Aktivierbarkeit von NK- und $\gamma\delta$ T-Zelle durch CD19-4G7SDIE AK mittels CD107a-Assay und ICS*

Die Zytotoxizität von NK-Zellen lässt sich indirekt über die Expression von CD107a messen. Ein weiteres Maß für die Quantifizierung der ADCC stellt die Ausschüttung der Zytokine TNF α und INF γ dar, welche in diesem Versuch intrazellulär angefärbt wurden. Als Targetzelllinie wurde NALM-16 verwendet. Wie in **Abb.3-3A** gezeigt, konnte die CD107a-Expression der NK-Zellen signifikant durch CD19-4G7SDIE AK gesteigert werden ($p < 0,0001$). Auch die Produktion der Zytokine TNF α und INF γ durch die NK-Zellen konnte mittels CD19-4G7SDIE AK signifikant angeregt werden ($p < 0,0001$). Analog zu den NK-Zellen konnte die CD107a-Expression der $\gamma\delta$ T-Zellen durch CD19-4G7SDIE AK ebenfalls signifikant erhöht werden, wie in **Abb.3-3B** zu sehen ist. Auch die Zytokinproduktion der $\gamma\delta$ T-Zellen zeigte nach Zugabe von CD19-4G7SDIE AK einen signifikanten Anstieg.

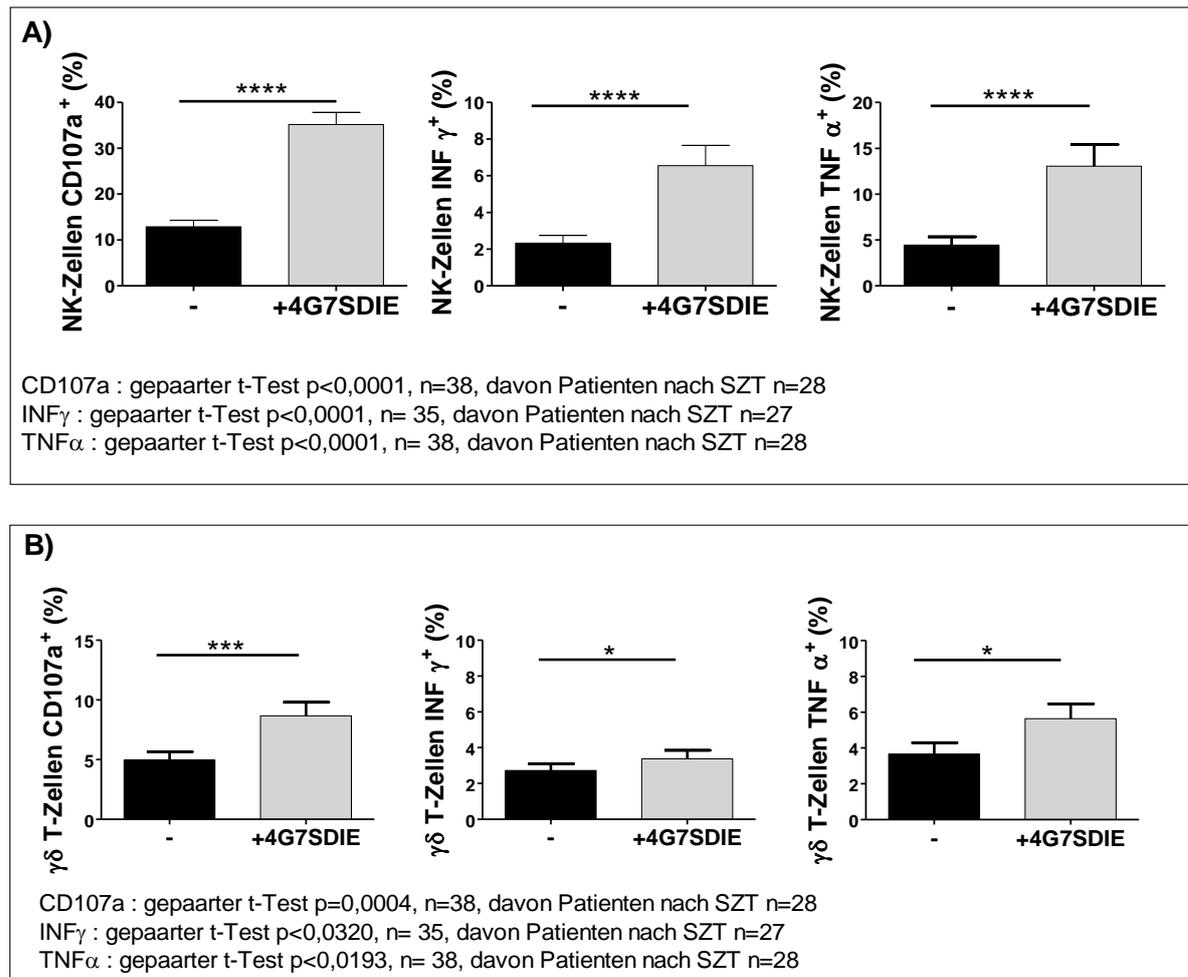


Abb. 3-3 Messung der Aktivierbarkeit von NK- und $\gamma\delta$ T-Zelle durch CD19-4G7SDIE AK

Frisch isolierte PBMC wurden im Rahmen eines 14-stündigen CD107a-Assays mit ICS gegen das Target NALM-16 bei einer E:T von 1:1 getestet, jeweils mit und ohne Zugabe des CD19 Antikörpers CD19-4G7SDIE AK. Die ADCC der NK-Zellen in **A)** und der $\gamma\delta$ T-Zellen in **B)** wurde indirekt über die CD107a-Expression und die Ausschüttung von INF γ und TNF α bestimmt, welche durchflusszytometrisch gemessen wurden. Alle drei Messparameter zeigten nach Zugabe von CD19-4G7SDIE AK sowohl bei den NK-Zellen als auch bei den $\gamma\delta$ T-Zellen einen signifikanten Anstieg.

Abb.3-3 lässt auch einen Vergleich zwischen NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen über die Höhe der CD19-4G7SDIE AK induzierten Aktivität zu. CD19-4G7SDIE AK führte bei allen gemessenen Parametern zu einem höheren Wert bei den NK-Zellen als bei den $\gamma\delta$ T-Zellen. So lag der Mittelwert der CD107a-Expression der NK-Zellen nach Stimulation mit CD19-4G7SDIE AK bei 35%, bei $\gamma\delta$ T-Zellen lag er nur bei 9%. Bei der TNF α -Sekretion erzielten die NK-Zellen einen Mittelwert von 13% im Vergleich zu 7% bei den $\gamma\delta$ T-Zellen. Den größten Unterschied gab es allerdings

bei der CD69-Expression, hier lag der Mittelwert der CD69-Expression der NK-Zellen bei 63%, der der $\gamma\delta$ T-Zellen bei 27%, siehe **Abb.3-2**.

3.2.1.3 Direkte Messung der ADCC im Kill-Assay

Mit Hilfe des Kill-Assays kann die direkte Lyse der Targetzellen durch die Effektorzellen bestimmt werden und so auch die ADCC der NK-Zellen durch CD19-4G7SDIE AK. Es wurden frisch isolierte PBMC gegen das Target NALM-16 mit und ohne Zugabe von CD19-4G7SDIE AK getestet. Die Lyse wurde nach einem Inkubationszeitraum von 14 Stunden ermittelt. Wie in **Abb. 3-4** dargestellt, konnte CD19-4G7SDIE AK den Mittelwert der erzielten Lyse von 24% auf 42% signifikant anheben ($p=0,0003$). Dabei handelt es sich um die Gesamtyse und ADCC von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen bzw. der PBMC zusammen. Eine nach Zellart aufgeschlüsselte Betrachtung ist in diesem Fall nicht möglich, da der Versuch mit PBMC und nicht mit den separierten Zellarten durchgeführt wurde.

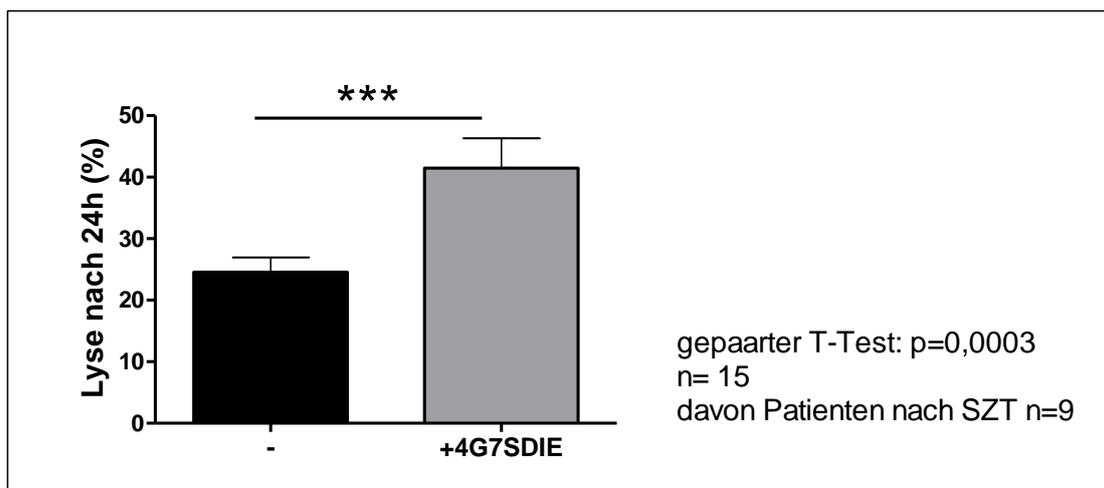


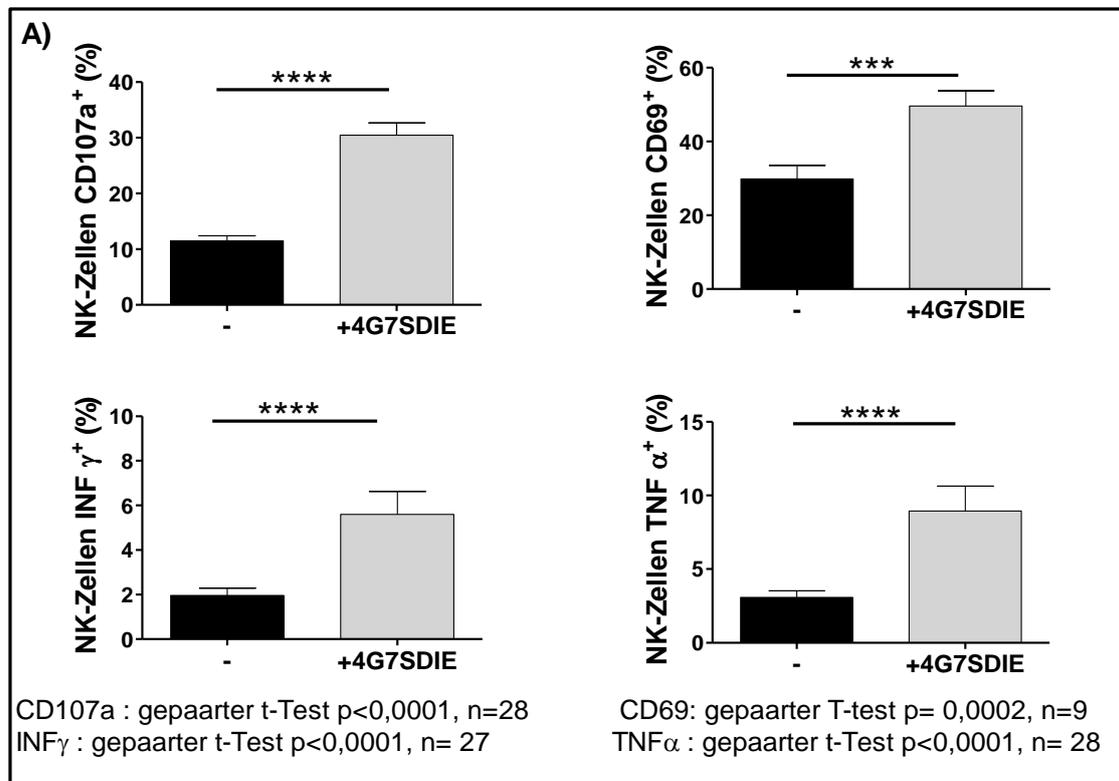
Abb. 3-4 Direkte Messung der ADCC im Kill-Assay

Die Lyse von NALM-16 durch frisch isolierte PBMC, bzw. die darin als Haupteffektoren enthaltenen NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen, wurden nach einer Inkubationszeit von 14 Stunden bei einer E:T von 1:1, im Rahmen eines Kill-Assays ermittelt. Die Inkubation fand mit und ohne CD19-4G7SDIE AK statt, sodass die Höhe der Lyse beider Konditionen verglichen werden konnte. Unter Zugabe von CD19-4G7SDIE AK kam es zu einem signifikanten Anstieg der Lyse.

3.2.2 Untersuchung der Aktivierbarkeit von NK-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen pädiatrischer Patienten nach haploidenter TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletierter SZT durch CD19-4G7SDIE AK

3.2.2.1 *Aktivitätssteigerung von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen durch CD19-4G7SDIE AK*

Um die Fähigkeit von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen pädiatrischer Patienten nach haploidenter TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletierter SZT zu ADCC zu messen, wurden frisch isolierte PBMC dieser Patienten in einem Aktivierungs- bzw. CD107a-Assay mit ICS auf ihr Ansprechen auf CD19-4G7SDIE AK getestet. Als Target dienten NALM-16. Bei den NK-Zellen der Patienten nach SZT zeigte sich sowohl bei der CD107a- und CD69-Expression als auch in der Zytokinsekretion ein signifikanter Anstieg durch CD19-4G7SDIE AK, siehe **Abb. 3-5A**. Wie in **Abb. 3-5B** dargestellt, erhöhte CD19-4G7SDIE AK bei den $\gamma\delta$ T-Zellen der Patienten die Expression von CD107a und CD69 ebenfalls signifikant. Die Zytokinausschüttung der $\gamma\delta$ T-Zellen bewegte sich jedoch in einem niedrigen Prozentbereich.



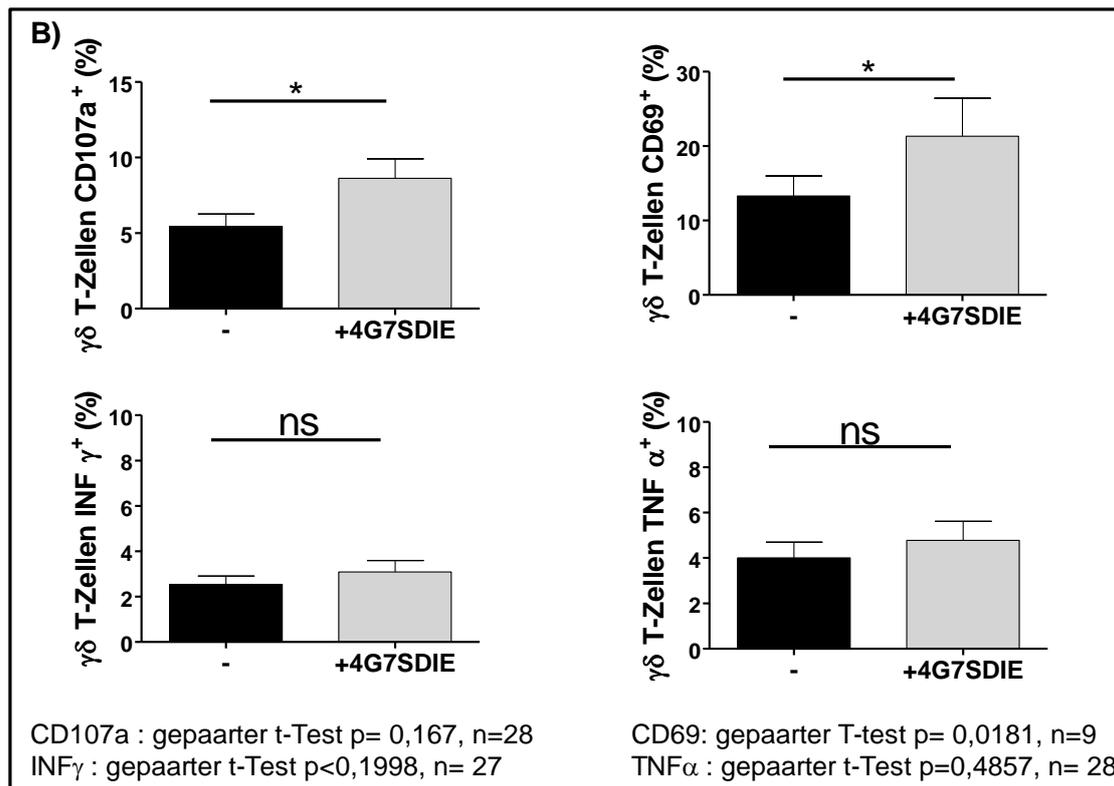


Abb. 3-5 Aktivierbarkeit von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen pädiatrischer Patienten nach SZT durch CD19-4G7SDIE AK

Die Messung der Aktivierbarkeit von NK- bzw. $\gamma\delta$ T-Zellen pädiatrischer Patienten nach haploidenter TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletierter SZT durch CD19-4G7SDIE AK wurde mit frisch isolierten PBMC dieser Patienten gegen NALM-16 bei einer E:T von 1:1 im Rahmen eines 14-stündigen Aktivierungs- und CD107a-Assays mit ICS getestet. In **A)** sind die Ergebnisse für die NK-Zellen, in **B)** die der $\gamma\delta$ T-Zellen dargestellt.

3.2.2.2 *Direkte Messung der ADCC im Kill-Assay*

Die Fähigkeit von PBMC bzw. der darin enthaltenen NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen pädiatrischer Patienten nach haploidenter TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletierter SZT zu ADCC, kann anhand der Targetzelllyse in einem Kill-Assay direkt bestimmt werden. Die ADCC wurde mittels CD19-4G7SDIE AK und der Targetzelllinie NALM-16 nach einer Inkubationszeit von 14 Stunden getestet. Wie **Abb.3-6** zu entnehmen ist, konnte CD19-4G7SDIE AK die Lyse von NALM-16 von einem Mittelwert von 22% auf 41% signifikant erhöhen (p=0,0069).

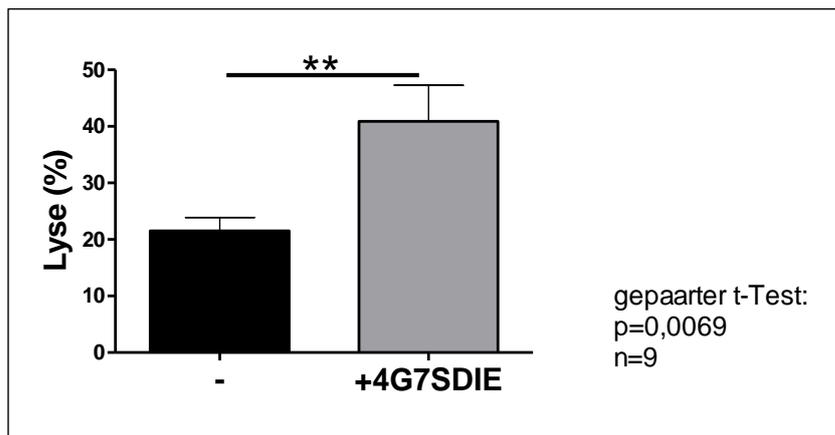


Abb. 3-6 Messung der ADCC durch PBMC pädiatrischer Patienten nach SZT im Kill-Assay

Die Lyse von NALM-16 durch frisch isolierte PBMC bzw. die darin als Haupteffektoren enthaltenen NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen, wurde nach einer Inkubationszeit von 14 Stunden im Kill-Assay ermittelt. Die PBMC wurden aus dem Blut pädiatrischer Patienten nach haploidenter TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletierter SZT isoliert und bei einer E:T von 1:1 eingesetzt. Die Inkubation fand mit und ohne CD19-4G7SDIE AK statt, sodass die Höhe der Lyse beider Konditionen verglichen werden konnte. Unter Zugabe von CD19-4G7SDIE AK kam es zu einem signifikanten Anstieg der Lyse.

3.2.3 Vergleich der Aktivierbarkeit von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen gesunder Probanden mit pädiatrischen Patienten nach haploidenter TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletierter SZT

In Abschnitt 3.1.2 wurden die Messwerte für die Beurteilung der ADCC durch NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen der gesunden Probanden und der pädiatrischer Patienten nach haploidenter TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletierter SZT zu einem Kollektiv zusammengefasst. Im Folgenden wurde überprüft, ob Unterschiede in der Aktivierbarkeit von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen zwischen den gesunden Probanden und den Patienten nach SZT bestehen. Dafür wurden die Messwerte aus der Abschnitte 3.1.2.1-3.1.2.3 in die beiden Gruppen aufgeschlüsselt und miteinander verglichen. Es wurde dabei nicht nur die Aktivierung durch den Antikörper zwischen den Gruppen verglichen, sondern auch die Aktivierbarkeit durch NALM-16 ohne Antikörper.

Bei der Aktivierbarkeit der NK-Zellen von Patienten nach Transplantation durch NALM-16 zeigten sich im Vergleich zu den gesunden Probanden im Hinblick auf

die CD107a-Expression und Ausschüttung von TNF α und INF γ keine signifikanten Unterschiede, siehe **Abb.3-7**. Nur der Frühaktivierungsmarker CD69 wurde von den gesunden Probanden signifikant höher exprimiert mit $p=0,0297$ im ungepaarten t-Test. Im Hinblick auf die Aktivierbarkeit durch CD19-4G7SDIE AK im Rahmen der ADCC konnte in Abschnitt 3.1.3 gezeigt werden, dass die NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen von Patienten nach Transplantation ein signifikantes Ansprechen zeigen. In dem in **Abb.3-7** dargestellten Vergleich mit gesunden Probanden zeigten die NK-Zellen der Patienten aber eine geringere Aktivierbarkeit durch CD19-4G7SDIE AK. Mit Ausnahme der INF γ -Sekretion ist dieser Unterschied mit $p=0,0023$ bei der CD107a-Expression, $p=0,0005$ in der CD69-Expression und $p=0,0229$ in der TNF α -Sekretion im ungepaarten t-Test signifikant.

In **Abb.3-8** wird auf die ADCC und Aktivität der $\gamma\delta$ T-Zellen von Patienten nach SZT im Vergleich zu gesunden Probanden gegenüber NALM-16 eingegangen. Im Hinblick auf die Aktivierbarkeit durch NALM-16 zeigten sich mit Ausnahme der INF γ -Sekretion keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Kollektiven. INF γ wurde von den gesunden Probanden signifikant stärker sezerniert als von den Patienten nach SZT (ungepaarter t-Test $p=0,0035$), allerdings bewegte sich die INF γ -Sekretion beider Gruppen nur im niedrigen Prozentbereich. Ebenfalls in **Abb.3-8** dargestellt, ist das Ansprechen auf CD19-4G7SDIE AK der $\gamma\delta$ T-Zellen beider Gruppen. Auch hier ließen sich die $\gamma\delta$ T-Zellen der gesunden Probanden etwas stärker durch CD19-4G7SDIE AK aktivieren. Dieser Unterschied war im gepaarten t-Test nur bei der Sekretion von INF γ ($p=0,0145$) und TNF α ($p=0,0229$) signifikant.

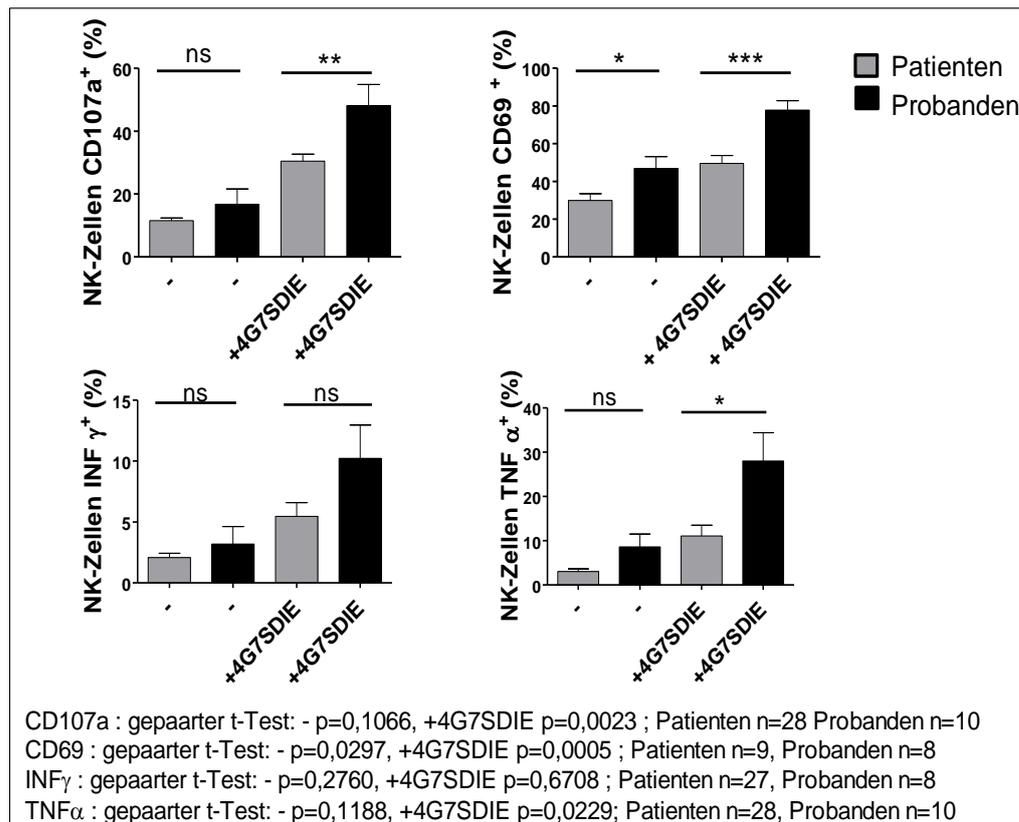


Abb. 3-7 Vergleich der Aktivierbarkeit von NK-Zellen gesunder Probanden und Patienten nach SZT durch NALM-16 und CD19-4G7SDIE AK

Die CD69- und CD107a Expression, sowie die Zytokinproduktion von NK-Zellen gesunder Probanden und pädiatrischer Patienten nach haploidenter TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletierter SZT wurden nach einem 14-stündigen Aktivierungs- bzw. CD107a-Assay durchflusszytometrisch gemessen und miteinander verglichen. Dabei wurde sowohl das Ansprechen auf die Targetzelllinie NALM-16 bei einer E:T von 1:1, als auch auf den Antikörper CD19-4G7SDIE AK zwischen den beiden Gruppen verglichen. Die NK-Zellen der gesunden Probanden zeigten dabei eine teils signifikant höhere Aktivität und Zytokinproduktion.

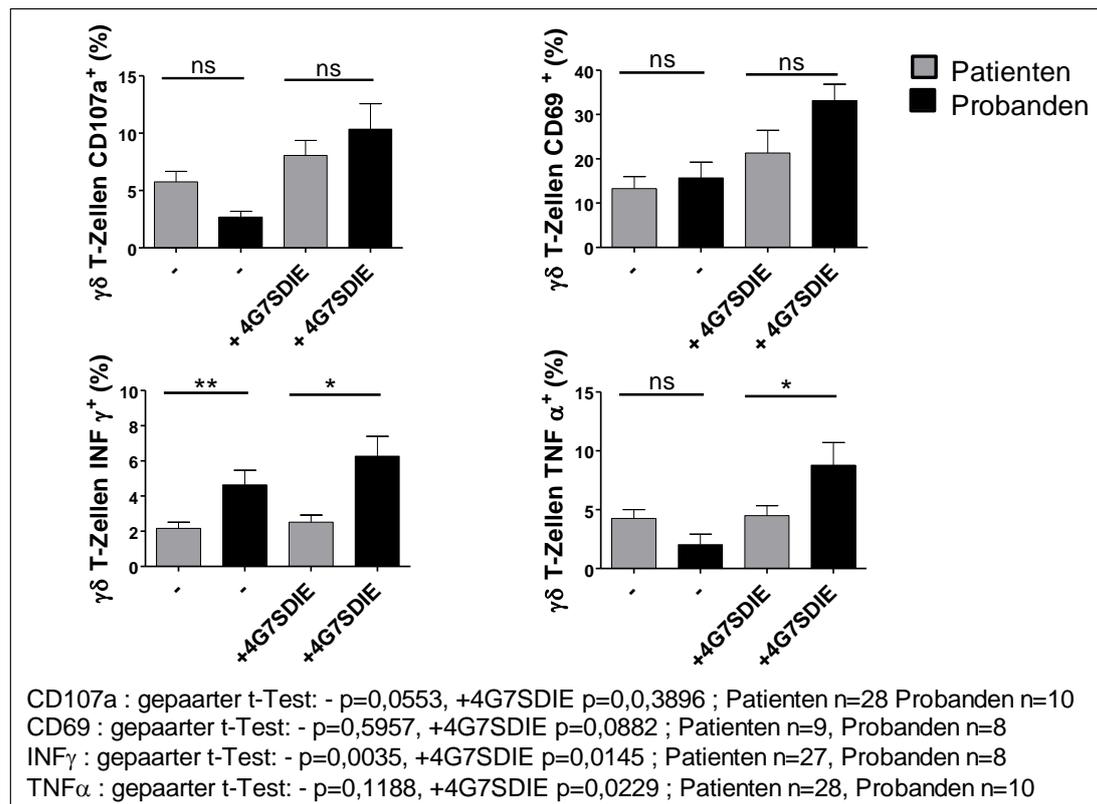


Abb. 3-8 Vergleich der Aktivierbarkeit von $\gamma\delta$ T-Zellen gesunder Probanden und Patienten nach SZT durch NALM-16 und CD19-4G7SDIE AK

$\gamma\delta$ T-Zellen gesunder Probanden und pädiatrischer Patienten nach haploidenter TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletierter SZT wurden nach einem 14-stündigen Aktivierungs- bzw. CD107a-Assays durchflusszytometrisch auf ihre CD69- und CD107a Expression, sowie die Zytokinproduktion getestet. Es wurde sowohl das Ansprechen auf die Targetzelllinie NALM-16 bei einer E:T von 1:1 als auch die Aktivierbarkeit durch CD19-4G7SDIE AK gemessen und zwischen den beiden Gruppen verglichen. Die $\gamma\delta$ T-Zellen der gesunden Probanden wiesen dabei überwiegend eine im ungepaarten t-Test signifikant höhere Zytokinproduktion auf. Im Hinblick auf die CD69 und CD107a-Expression bestanden keine signifikanten Unterschiede.

Abb.3-9 vergleicht die Lyse von NALM-16 mit und ohne CD19-4G7SDIE AK durch PBMC bzw. den darin enthaltenen NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen zwischen gesunden Probanden und Patienten nach SZT. Hier ließen sich weder bei der reinen Targetzelllyse nach 14 Stunden noch bei der ADCC signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen feststellen.

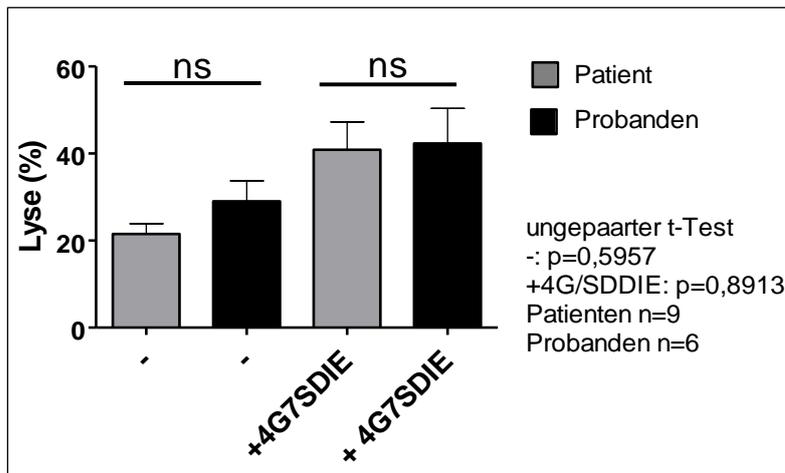


Abb. 3-9 Vergleich der spontanen Lysefähigkeit und ADCC zwischen PBMC gesunder Probanden und Patienten nach SZT

Es wurde die spontane Lysefähigkeit von NALM-16 bei einer E:T von 1:1 und die ADCC mittels CD19-4G7SDIE AK durch PBMC bzw. die darin enthaltenen NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen in einem 14-stündigen Kill-Assay gemessen. Dabei wurden PBMC gesunder Probanden und pädiatrischer Patienten nach haploidenter TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletierter SZT verwendet, um die Ergebnisse dieser beiden Gruppen miteinander zu vergleichen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen der Patienten nach SZT zeigten teilweise eine geringere Aktivierbarkeit durch CD19-4G7SDIE AK; in Abschnitt 3.1.3 konnte allerdings ein signifikantes Ansprechen auf CD19-4G7SDIE AK generell gemessen werden. Für die weiteren Versuche wurden gesunden Probanden und Patienten nach SZT gemeinsam ausgewertet.

3.2.4 Einfluss $\gamma\delta$ T-Zellen auf NK-Zellen in Bezug auf die spontane Lysefähigkeit und ADCC

Um zu evaluieren, ob $\gamma\delta$ T-Zellen einen Einfluss auf die spontane Lysefähigkeit und ADCC von NK-Zellen haben, wurden frisch isolierte PBMC TcR $\gamma\delta$ -depletiert und in einem CD107a bzw. Kill-Assay gegen mock-depletierte PBMC desselben Spenders getestet. Mock-depletiert bedeutet in diesem Kontext, dass die PBMC den Depletionsprozess durchlaufen haben, ohne Zugabe von Antikörpern für die Depletion. Es wurde hierdurch eine ungleiche mechanische Beanspruchung der Zellen durch den Depletionsprozess ausgeschlossen. Um den Erfolg dieser Maßnahme zu überprüfen, wurden Mock- und TcR $\gamma\delta$ -depletierte PBMC in dem CD107a Assay als Kontrolle ohne Targetzellen mitgeführt. **Abb.3-10A** zeigt das

Verhalten der PBMC gesunder Spender und von Patienten nach SZT mit und ohne TcR $\gamma\delta$ -Depletion. Es bestand zwischen den beiden Kontrollgruppen in keiner getesteten Kondition ein Unterschied.

Es zeigte sich zudem, dass es im Hinblick auf die CD107a-Expression und Zytokinausschüttung der NK-Zellen bei Inkubation mit der Targetzelllinie NALM-16 keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Konditionen gab. Bei Zugabe von CD19-4G7SDIE AK während der Inkubation zeigte sich jedoch, dass NK-Zellen in Anwesenheit von $\gamma\delta$ T-Zellen signifikant mehr CD107a exprimieren, als wenn die $\gamma\delta$ T-Zellen depletiert wurden. Auch bei der Ausschüttung von INF γ durch NK-Zellen erhöhte sich diese durch die Anwesenheit von $\gamma\delta$ T-Zellen von einem Mittelwert von 4% auf 6%. Dieser Unterschied war allerdings nicht signifikant und die INF γ -Sekretion bewegte sich im niedrigen Prozentbereich. Bei der TNF α - Ausschüttung bestand kein signifikanter Unterschied. **Abb.3-10B** zeigt die Ergebnisse der Versuche mit PBMC pädiatrischer Patienten nach TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletierter SZT separat. Die spontane Lyseaktivität und ADCC der Patienten-PBMC nach Transplantation entspricht der gesunder Spender und kann demnach zu weiteren Analysen in einem Gesamtkollektiv betrachtet werden.

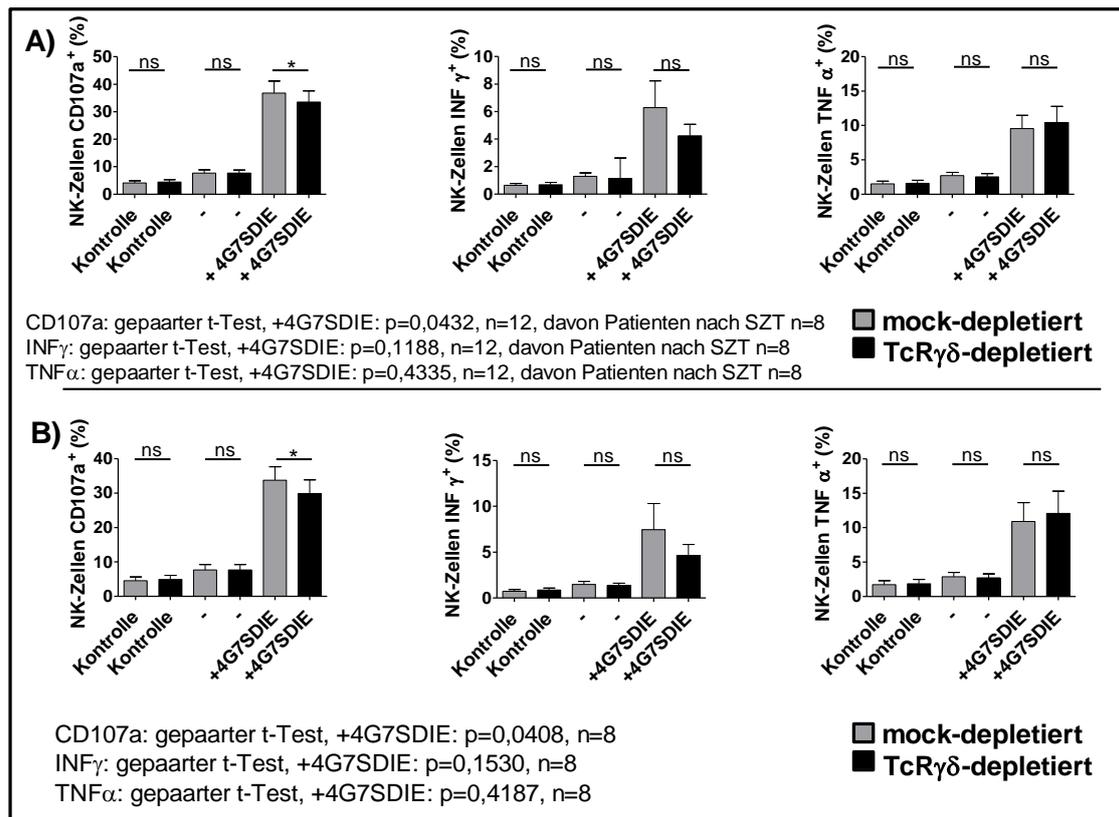


Abb. 3-10 Vergleich zwischen TcRγδ- und mock-depletierten PBMC im CD107a-Assay mit ICS

TcRγδ-depletierte (schwarz) und mock-depletierte (grau) PBMC derselben Spender wurden in einem 14-stündigen CD107a-Assay mit ICS gegen die Targetzelllinie NALM-16 bei einer E:T von 1:1, mit und ohne CD19-4G7SDIE AK getestet. Die Ergebnisse beider Gruppen wurden verglichen, um zu untersuchen, ob γδ T-Zellen die Aktivität von NK-Zellen steigern. In **A)** sind die Ergebnisse der PBMC gesunder Spender und Patienten nach SZT gemeinsam dargestellt, in **B)** die Ergebnisse der Patienten nach SZT separat.

Bei der in **Abb.3-11** abgebildeten Untersuchung der direkten Lyse der Targetzellen NALM-16, RAJI und K562 nach 14 Stunden wurden ebenfalls Mock- mit TcRγδ-depletierten PBMC als Effektoren bei einer E:T von 1:1 verglichen. In der spontanen Lyse der Targetzellen zeigte sich zwischen den beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied. Bei Inkubation mit CD19-4G7SDIE AK wiesen die mock-depletierten PBMC eine signifikant höhere Lyse gegenüber RAJI im Vergleich zu TcRγδ-depletierten PBMC im gepaarten t-Test mit p=0,0263 auf. In der ADCC gegenüber NALM-16 bestand hingegen kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

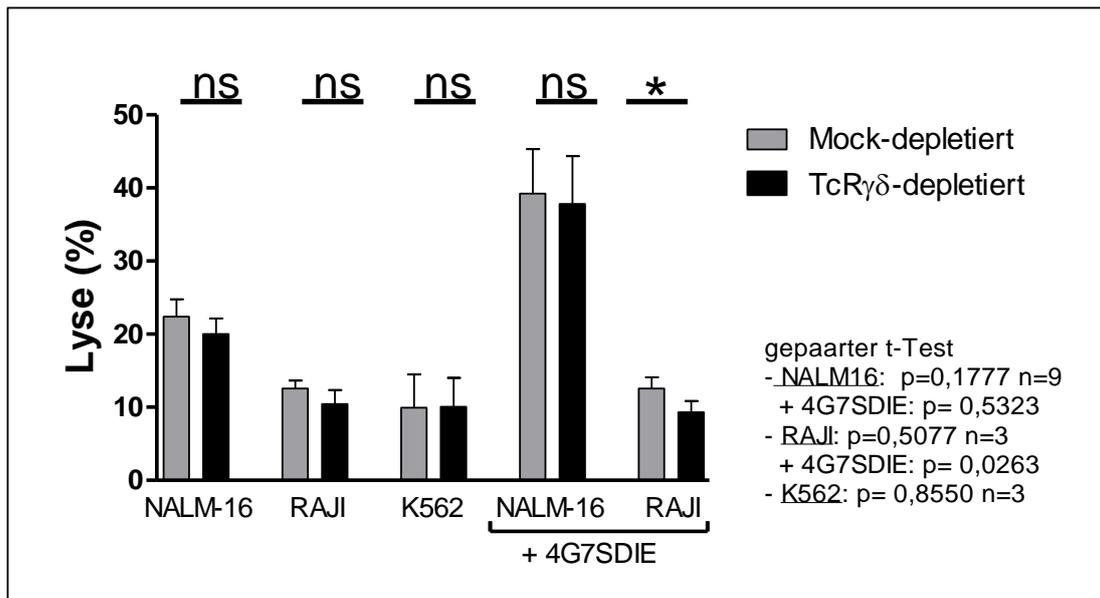


Abb.3-11 Vergleich der spontanen Lyse und ADCC zwischen TcR $\gamma\delta$ - und mock-depletierten PBMC

Im Kill-Assay wurde die Lyse in % nach 14 Stunden mit und ohne Antikörper CD19-4G7SDIE AK gegenüber den Targetzelllinien NALM-16, RAJI und K562 bei einer E:T von 1:1 gemessen. Als Effektoren wurden TcR $\gamma\delta$ -depletierten (schwarz) und mock-depletierten (grau) PBMC derselben Spender eingesetzt und die Ergebnisse miteinander verglichen.

Zusammengefasst ergeben die Versuche Hinweise darauf, dass die ADCC der NK-Zellen durch $\gamma\delta$ T-Zellen gesteigert wird, nicht aber die spontane Lysefähigkeit.

3.3 Einfluss von $\gamma\delta$ T-Zellen auf NK-Zellen unter Stimulation mit IL2 und Zoledronat

3.3.1 Einfluss von IL2 und Zoledronat auf NK-Zellen

Zunächst wurde untersucht welchen Einfluss Zoledronat und IL2 generell auf NK-Zellen haben. Für die Beurteilung wurde die Expression des Frühaktivierungsmarkers CD69 bei Koinkubation mit den Targetzelllinien NALM-16, RAJI und K562 herangezogen. Während eines 14-stündigen Aktivierungs-Assays mit frisch isolierten PBMC und wurden die Konditionen IL2 100IE/l oder 5 μ M/l Zoledronat getestet. **Abb.3-12** zeigt die Ergebnisse. Gegenüber aller drei Targetzelllinien

konnte die CD69-Expression auf den NK-Zellen durch IL2 signifikant gesteigert werden. Zoledronat führte hingegen zu keinem Anstieg der CD69- Expression.

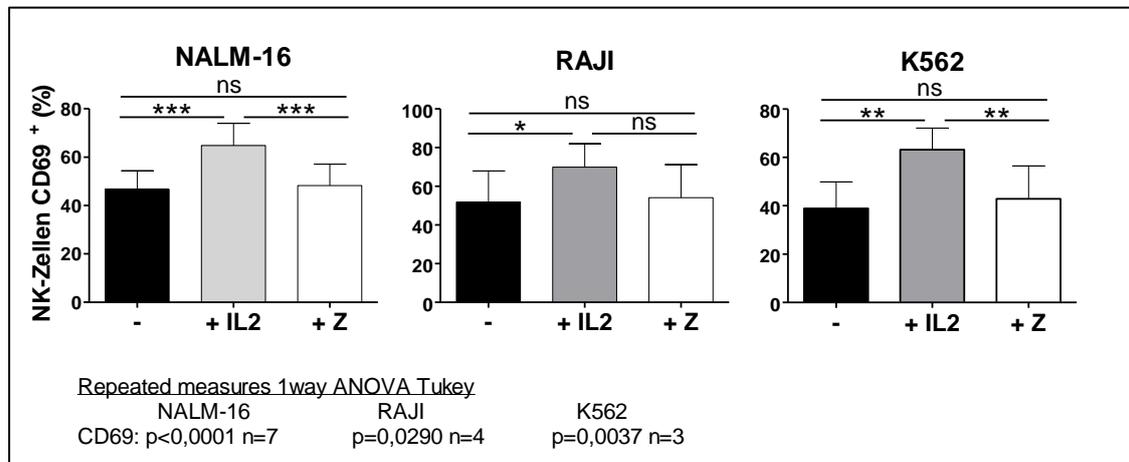


Abb. 3-12 Einfluss von IL2 und Zoledronat auf die CD69-Expression von NK-Zellen

In einem 14-stündigen Aktivierungs-Assay wurden frisch isolierte PBMC unter Zugabe von IL2 bzw. Zoledronat (Z) gegen die Targetzelllinien NALM-16, RAJI und K562 bei einer E:T von 1:1 auf die CD69-Expression auf NK-Zellen getestet. IL2 führt zu einem signifikanten Anstieg der CD69-Expression auf NK-Zellen.

3.3.1.1 Einfluss der Prästimulation mit Zoledronat und IL2 auf NK-Zellen

Da sich gegenüber der Targetzelllinie NALM-16 in dem vorherigen Abschnitt die besten Ergebnisse zeigten, wurde diese Zelllinie für die weitere Evaluation des Einflusses von IL2 und Zoledronat auf NK-Zellen verwendet. In einem weiteren Versuch wurden die PBMC für 24 Stunden mit IL2 und/oder Zoledronat ohne Targetzellen vorstimuliert, bevor ein Kill- bzw. Aktivierungs-Assay für weitere 14 Stunden wieder unter Zugabe von IL2 und Zoledronat angeschlossen wurde. Es wurden in diesem Versuch auch immer PBMC ohne Targetzellen als Kontrolle mitgeführt, um eine unspezifische Aktivierung der NK-Zellen durch IL2 und Zoledronat zu detektieren. Wie bereits in dem vorherigen Abschnitt beschrieben, zeigte sich wieder ein signifikanter Anstieg der CD69-Expression durch IL2, nicht aber durch Zoledronat, wie **Abb.3-13A** zeigt. Auch die CD137-Expression wies dieses Muster auf. Nach einer 24-stündigen Prästimulation mit IL2 bzw. Zoledronat, wie in **Abb.3-13B** dargestellt, zeigte sich nicht nur ein signifikanter Anstieg der CD69- und CD137-Expression durch IL2, sondern auch durch Zoledronat.

Abb.3-13B ist auch zu entnehmen, dass es nach Prästimulation zu einer signifikanten Aktivierung der NK-Zellen ohne Target durch Zoledronat im Hinblick auf CD137- und CD69-Expression kam.

IL2 führte lediglich bei der CD69-Expression zu einer Aktivierung der NK-Zellen ohne Targetzellen, welche sich ohne Prästimulation leicht signifikant und mit Prästimulation in gleichem Maße wie durch Zoledronat darstellte. In demselben Versuch wurde zudem analysiert, welchen Effekt die Zugabe von IL2 und Zoledronat gemeinsam auf NK-Zellen hatte.

Wie in **Abb.3-13C** zu sehen, zeigte sich nach Prästimulation mit beiden Substanzen eine deutlich höhere CD69- und CD137-Expression. Der Mittelwert der CD69-Expression stieg nach Präinkubation mit IL2 und Zoledronat von 55% auf 93%, bei der CD137-Expression stieg der Mittelwert von 21% auf 41%, diese Unterschiede waren allerdings nicht signifikant. Im Hinblick auf die Targetzelllyse, siehe **Abb.3-13B+C**, führte eine Präinkubation mit IL2 oder Zoledronat zu keinem signifikanten Effekt. Bei einer Vorinkubation mit IL2 und Zoledronat gemeinsam kam es jedoch zu einem signifikanten Anstieg der Lyse.

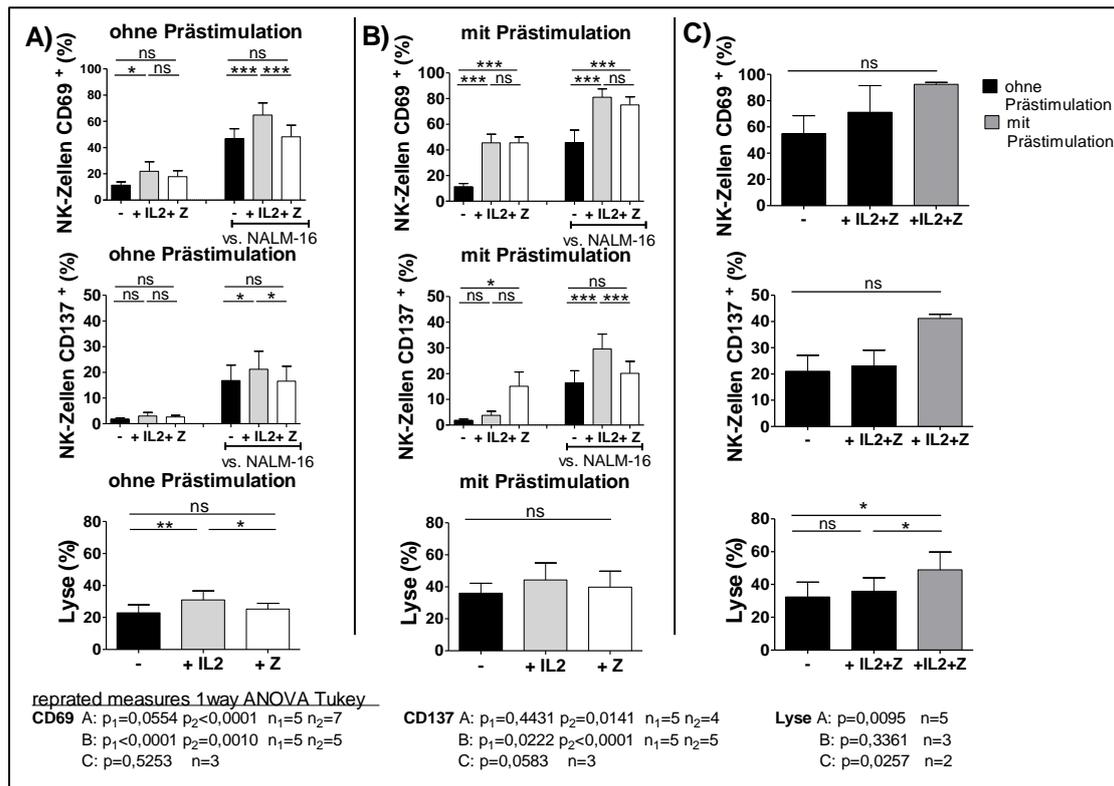


Abb. 3-13 Einfluss von Prästimulation mit IL2 und Zoledronat auf NK-Zellen in Kill- und Aktivierungs-Assay

Frisch isolierte PBMC wurden mit oder ohne IL2 und/oder Zoledronat (Z) für 24 Stunden vorstimuliert. Anschließend wurde ein 14-stündiger Kill- bzw. Aktivierungs-Assay mit NALM-16 bei einer ET:T von 1:1 unter erneuter Zugabe von IL2 und/oder Zoledronat durchgeführt. Als Kontrolle wurden PBMC ohne Targetzellen unter gleichen Bedingungen durchgeführt. In **A** sind die Ergebnisse ohne Prästimulation, in **B** die Ergebnisse mit Prästimulation mit Zoledronat bzw. IL2 gezeigt. **C** zeigt den Einfluss der Zugabe von IL2 und Zoledronat gemeinsam mit und ohne Prästimulation auf die NK-Zellen.

Es wurde neben dem Kill-Assay ein CD107a-Assay mit ICS durchgeführt. Ohne Prästimulation, wie in **Abb.3-14A** zu sehen ist, kam es weder durch IL2 noch durch Zoledronat zu einer signifikanten Erhöhung der CD107a-Expression oder Zytokinsekretion. Eine Aktivierung ohne Targetzellen zeigte sich nicht. Mit Prästimulation führte IL2 zu einem signifikanten Anstieg der CD107a-Expression, wie **Abb.3-14B** zeigt. Im Hinblick auf die Zytokinproduktion zeigte sich zwar ein leichter Anstieg des Mittelwertes von 4% bei $\text{INF}\gamma$ bzw. 7% bei $\text{TNF}\alpha$, dies war allerdings nicht signifikant und gerade die $\text{INF}\gamma$ -Produktion bewegte sich im niedrigen Prozentbereich. Auch Zoledronat erhöhte den Mittelwert der CD107a-Expression

und INF γ -Sekretion um je 5%. Dies war jedoch ebenfalls nicht signifikant. Zudem zeigte sich, dass die Präinkubation mit Zoledronat zu keinem signifikanten Anstieg der CD107a-Expression und Zytokinsekretion der NK-Zellen ohne Zugabe von Targetzellen kam. Wie bereits in **Abb.3-13B** gezeigt wurde, führte weder IL2 noch Zoledronat, auch nicht in der Kondition mit Prästimulation, zu einem signifikanten Anstieg der Zytokinsekretion. Die Kombination beider Substanzen (IL2 und Zoledronat) führte jedoch zu einem signifikanten Anstieg der Ausschüttung von INF γ und TNF α , siehe **Abb.3-14C**.

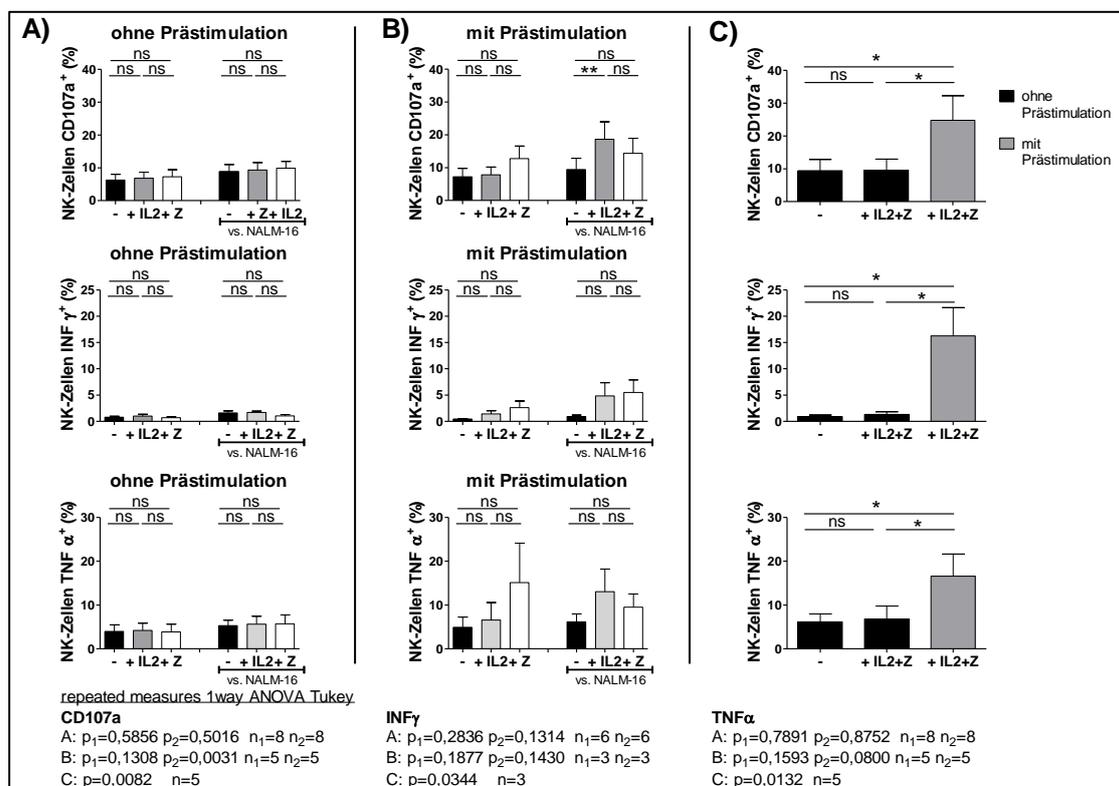


Abb. 3-14 Aktivierung von NK-Zellen durch IL2 und Zoledronat im CD107a-assay mit ICS

Es wurden frisch isolierte PBMC mit oder ohne IL2 und oder Zoledronat (Z) für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in einem 14-stündigen CD107a-Assay mit ICS mit NALM-16, bei einer E:T von 1:1 unter erneuter Zugabe von IL2 und/oder Zoledronat inkubiert. Als Kontrolle wurden PBMC ohne Targetzellen unter analogen Bedingungen mitgeführt. In **A** sind die Ergebnisse ohne IgG-Prästimulation, in **B** die Ergebnisse mit Prästimulation mit IL2 und Zoledronat gezeigt. **C** zeigt den Einfluss der Zugabe von IL2 und Zoledronat gemeinsam mit (grau) und ohne vorherige Prästimulation (schwarz) auf NK-Zellen.

3.3.2 Einfluss von IL2, Zoledronat und CD19-4G7SDIE AK auf Expression von CD69 auf $\gamma\delta$ T-Zellen

Um den Einfluss von IL2 und Zoledronat auf $\gamma\delta$ T-Zellen zu untersuchen, wurden frisch isolierte PBMC unter Zugabe von IL2, Zoledronat und CD19-4G7SDIE AK im Rahmen eines Kill-Assays gegen die Targetzelllinien NALM-16, RAJI und K562 verwendet und die $\gamma\delta$ T-Zellen durchflusszytometrisch auf die Expression des Frühaktivierungsmarkers CD69 untersucht. Hierbei zeigen die in **Abb.3-15** dargestellten Ergebnisse einen deutlichen Anstieg der CD69-Expression durch Zoledronat. Gegenüber den Targetzelllinien NALM-16 und RAJI war dieser Anstieg signifikant. Bei der Targetzelllinie NALM-16 wurde zusätzlich der Antikörper CD19-4G7SDIE AK eingesetzt, um die Aktivierung durch Zoledronat mit der durch CD19-4G7SDIE AK zu vergleichen. Hierbei zeigte sich, dass Zoledronat die CD69-Expression signifikant höher steigert als CD19-4G7SDIE AK. IL2 hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die CD69-Expression.

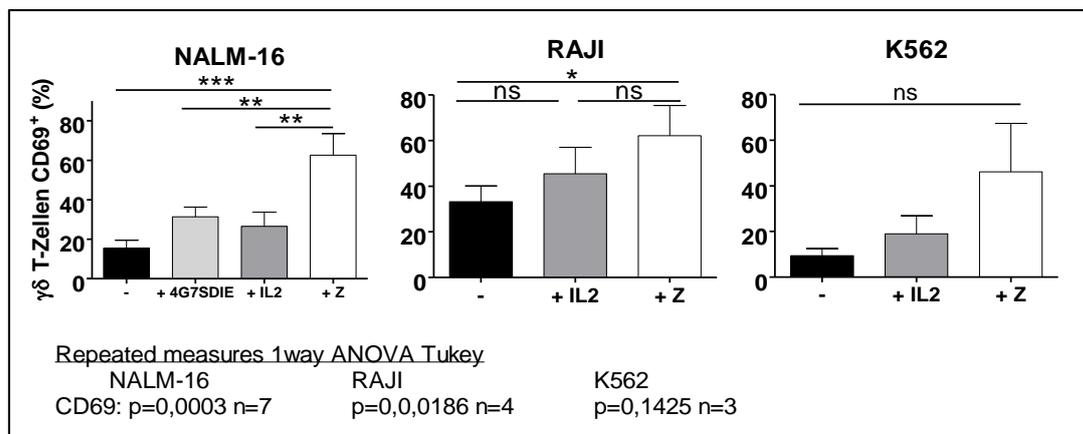


Abb. 3-15 Einfluss von IL2 und Zoledronat auf die CD69-Expression von $\gamma\delta$ T-Zellen

Die durchflusszytometrische Messung der CD69-Expression auf $\gamma\delta$ T-Zellen erfolgte nach 14-stündiger Inkubation frisch isolierter PBMC mit IL2 bzw. Zoledronat (Z) und den Targetzelllinien NALM-16, RAJI oder K562 bei einer E:T von 1:1. Bei NALM-16 wurde zudem der CD19-4G7SDIE AK zur Vermittlung von ADCC zur Antigen-spezifischen Stimulation verwendet.

3.3.2.1 *Einfluss der Prästimulation mit IL2 und Zoledronat auf $\gamma\delta$ T-Zellen*

In dem in Abschnitt 3.1.1.2 beschriebenen Kill-Assay wurde durchflusszytometrisch auch die CD69- sowie CD137-Expression der $\gamma\delta$ T-Zellen gemessen. Die Ergebnisse sind in **Abb.3-16** abgebildet. Zoledronat erhöhte die CD69- und CD137-Expression sowohl ohne (**Abb.3-16A**) als auch mit (**Abb. 3-16B**) Prästimulation signifikant. Allerdings führte Zoledronat auch ohne Zugabe von Targetzellen zu einer signifikanten Erhöhung beider Parameter unabhängig davon, ob eine Prästimulation erfolgte oder nicht. IL2 steigerte die CD69 und CD137-Expression nicht signifikant, allerdings wurde bei der CD69-Expression nach Vorstimulation mit IL2 ein Anstieg des Mittelwertes um 25% gemessen. Durch IL2 und Zoledronat gemeinsam war, wie in **Abb.3-16C** dargestellt, bereits ohne Prästimulation ein signifikanter Anstieg der CD69-CD137 Expression festzustellen. Vergleicht man diesen mit der Expression beider Parameter unter Einfluss von Zoledronat ohne Vorstimulation, zeigte sich ein Anstieg des Mittelwertes um 13% bei der CD69- Expression und um 16% bei der CD137-Expression.

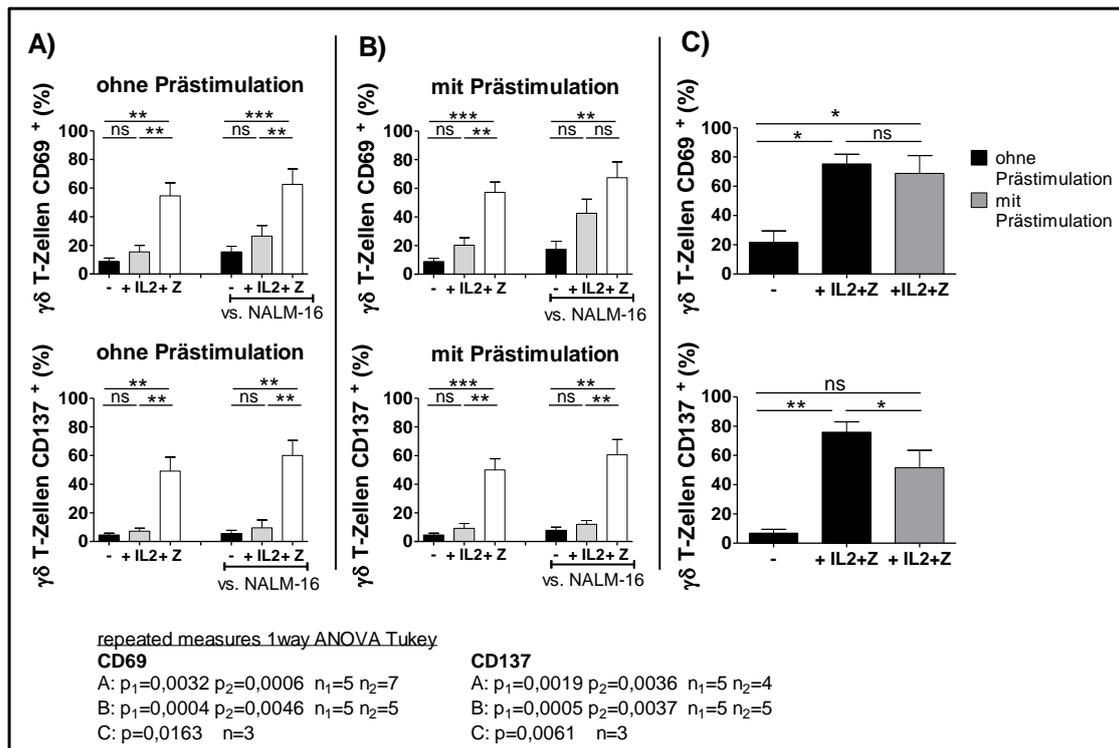


Abb. 3-16 Einfluss einer Prästimulation mit IL2 und Zoledronat auf $\gamma\delta$ T-Zellen im Kill-Assay

Frisch isolierte PBMC wurden mit oder ohne IL2 und/oder Zoledronat (Z) für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde ein 14-stündiger Kill Assay mit NALM-16 bei einer E:T von 1:1 unter erneuter Zugabe von IL2 und/oder Zoledronat durchgeführt. Als Kontrolle wurden PBMC ohne Targetzellen unter gleichen Bedingungen durchgeführt. In **A** sind die Ergebnisse ohne Prästimulation, in **B** die Ergebnisse mit Prästimulation mit Zoledronat und IL2 gezeigt. **C** zeigt den Einfluss der Zugabe von IL2 und Zoledronat gemeinsam mit (grau) und ohne (schwarz) Prästimulation auf $\gamma\delta$ T-Zellen.

In dem in Abschnitt 3.1.1.2 ebenfalls beschriebenen CD107a-Assay mit ICS wurden durchflusszytometrisch $\gamma\delta$ T-Zellen auf ihre CD107a-Expression und Zytokinsekretion untersucht. Anders als bei der CD69- oder CD137-Expression, wie in **Abb.3-16** dargestellt, zeigte sich bei der CD107a-Expression und Zytokinsekretion, dargestellt in **Abb.3-17A**, ohne Prästimulation kein signifikanter Anstieg durch Zoledronat. Nur bei der CD107a-Expression fand sich ohne Zugabe von Targetzellen ein signifikanter Anstieg durch Zoledronat. Mit Prästimulation, wie **Abb.3-17B** zu entnehmen ist, zeigte sich durch Zoledronat ein hoch signifikanter Anstieg der CD107a-Expression und der Zytokinsekretion. Auch hier wurde ohne Zugabe von Targetzellen eine Aktivierung der $\gamma\delta$ T-Zellen durch Zoledronat fest-

gestellt, die allerdings weniger ausgeprägt war als der Aktivitätsanstieg bei Zugabe von NALM-16. IL2 zeigte keinen Anstieg der gemessenen Parameter unabhängig davon, ob eine Prästimulation erfolgte oder nicht. Wurden die PBMC mit IL2 und Zoledronat gemeinsam inkubiert, wie in **Abb.3-17C** dargestellt, kam es erst nach einer Prästimulation mit beiden Substanzen zu einem signifikanten Anstieg der CD107a-Expression und Zytokinfreisetzung. Dieser Anstieg ist vergleichbar mit dem Anstieg durch die Prästimulation mit Zoledronat alleine.

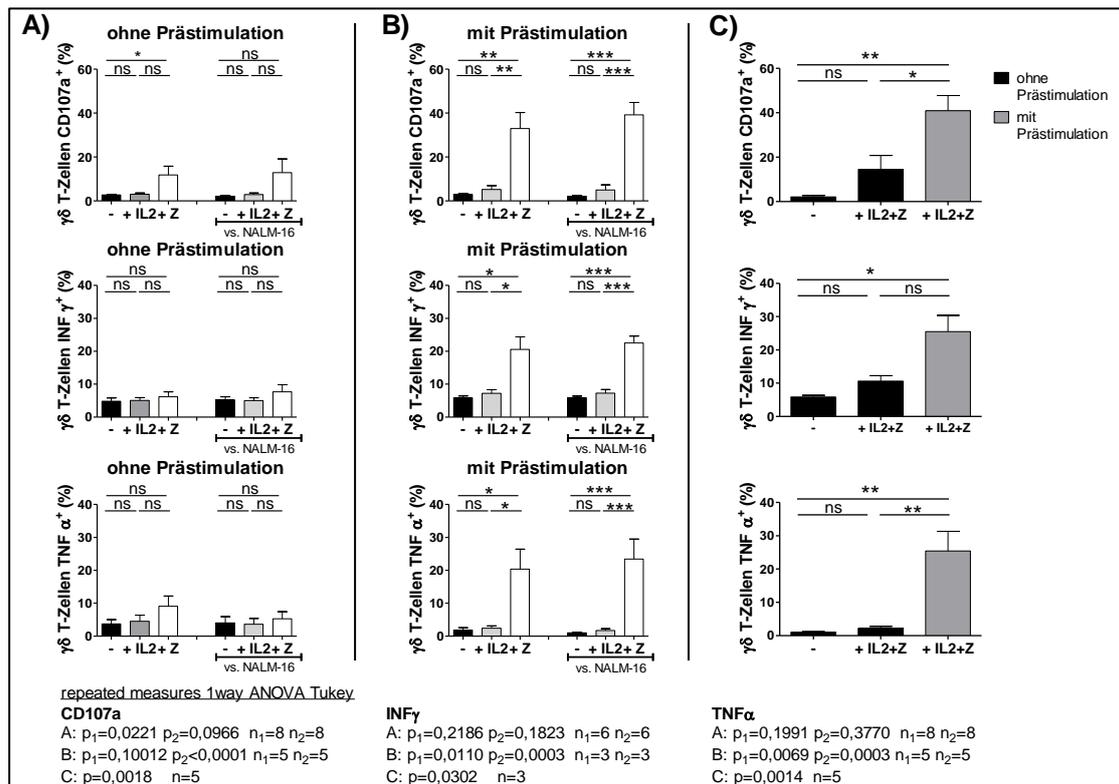


Abb. 3-17 Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen durch IL2 und Zoledronat im CD107a-Assay mit ICS

Es wurden frisch isolierte PBMC mit oder ohne IL2 und/oder Zoledronat (Z) für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in einem 14-stündigen CD107a-Assay mit ICS gegen NALM-16 bei einer E:T von 1:1 unter erneuter Zugabe von IL2 und/oder Zoledronat weiterverwendet. Als Kontrolle wurden PBMC ohne Targetzellen unter gleichen Bedingungen durchgeführt. In **A** sind die Ergebnisse ohne Prästimulation, in **B** die Ergebnisse mit Prästimulation mit Zoledronat und IL2 gezeigt. **C** zeigt den Einfluss der Zugabe von IL2 und Zoledronat gemeinsam mit (grau) und ohne Prästimulation (schwarz) auf $\gamma\delta$ T-Zellen.

3.3.3 Einfluss von $\gamma\delta$ T-Zellen auf die Aktivierung von NK-Zellen unter Einfluss von Zoledronat

In Abschnitt 3.1.1.2 zeigte sich nach Prästimulation von PBMC mit Zoledronat ein teils signifikanter Anstieg der NK-Zellaktivität. Da es sich bei Zoledronat um ein Stimulanz von $\gamma\delta$ T-Zellen handelt, wurde im folgenden Versuch untersucht, ob die NK-Aktivität durch $\gamma\delta$ T-Zellen beeinflusst wird. Dazu wurden frisch isolierte PBMC TcR $\gamma\delta$ -depletiert bzw. mock-depletiert. Es erfolgte eine 24-stündige Inkubation mit Zoledronat, bevor die beiden Zellgruppen unter erneuter Zugabe von Zoledronat gegen NALM-16 in einem CD107a-Assay mit ICS weiterverwendet wurden. Der Aktivierungs-Assay wurde direkt ohne Prästimulation angesetzt. Bei allen gemessenen Parametern wurde die Differenz der Aktivität mit und ohne Zoledronat gebildet. Die so erhaltene Aktivitätszunahme durch Zoledronat wurde zwischen den TcR $\gamma\delta$ - und mock-depletierten PBMC verglichen. Wie in **Abb.3-18A** dargestellt führte eine Depletion von $\gamma\delta$ T-Zellen zu einer signifikant schlechteren Zunahme der CD107a-Expression der NK-Zellen durch Zoledronat. Auch eine geringere Zunahme der CD69-Expression (**Abb.3-18B**) sowie Zytokinausschüttung der NK-Zellen durch Zoledronat war ohne $\gamma\delta$ T-Zellen festzustellen. Dies war nicht signifikant.

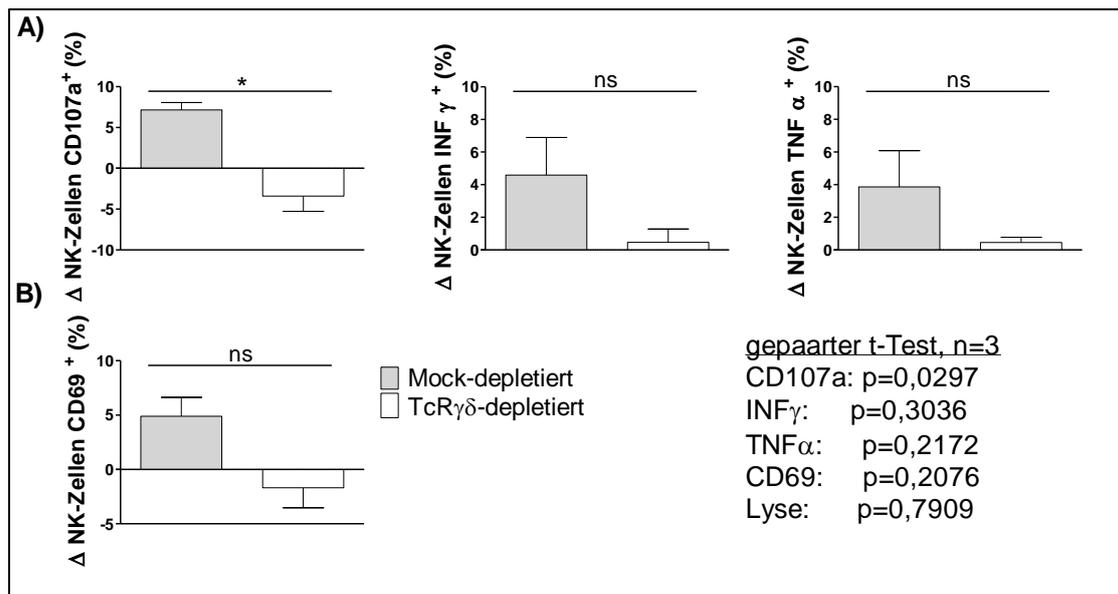


Abb. 3-18 Einfluss von $\gamma\delta$ T-Zellen auf die Aktivierung von NK-Zellen unter Einfluss von Zoledronat

Frisch isolierte PBMC wurden TcR $\gamma\delta$ - bzw. mock-depletiert. NALM-16 diente als Target mit einer E:T von 1:1. In **A** sind die Ergebnisse der 14-stündigen CD107a-Assays mit ICS unter Zugabe von Zoledronat dargestellt. Vor dem Versuch wurden die PBMC 24 Stunden mit Zoledronat vorstimuliert. **B** zeigt die Ergebnisse eines 14-stündigen Aktivierungs-Assays mit CD69-Färbung unter Zugabe von Zoledronat. In **A** und **B** ist die Differenz der Aktivitätszunahme der NK-Zellen durch Zoledronat auf der Ordinate dargestellt. Die Aktivitätszunahme der NK-Zellen der TcR $\gamma\delta$ -depletierten PBMC (weiß) wurde mit den NK-Zellen der mock-depletiereten PBMC (Grau) verglichen.

3.4 Einfluss von CD137 auf die Interaktion zwischen NK-Zellen und expandierten $\gamma\delta$ T-Zellen

3.4.1 CD137-Expression durch CD19-4G7SDIE AK und NALM-16

Um testen zu können, welche Rolle die CD137-Expression in der Interaktion zwischen NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen spielt, wurde im Vorfeld untersucht, wie die Targetzelllinie NALM-16 und der CD19 AK 4G7SDIE die CD137-Expression beeinflusst. Wie die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse in **Abb.3-19** zeigen, kam es nach einer 14-stündigen gemeinsamen Inkubationszeit frisch isolierter PBMC und NALM-16 im repeated measures ANOVA Tukey zu einem signifikanten Anstieg der CD137-Expression auf NK-Zellen. Durch Zugabe von CD19-4G7SDIE AK erhöhte sich die CD137-Expression nochmals signifikant. Auf den

$\gamma\delta$ T-Zellen steigerte sich die CD137-Expression durch Zugabe von NALM-16 von einem Mittelwert von 4% nur leicht auf 7%. Durch CD19-4G7SDIE AK kam es zu einem deutlichen Anstieg auf 19%.

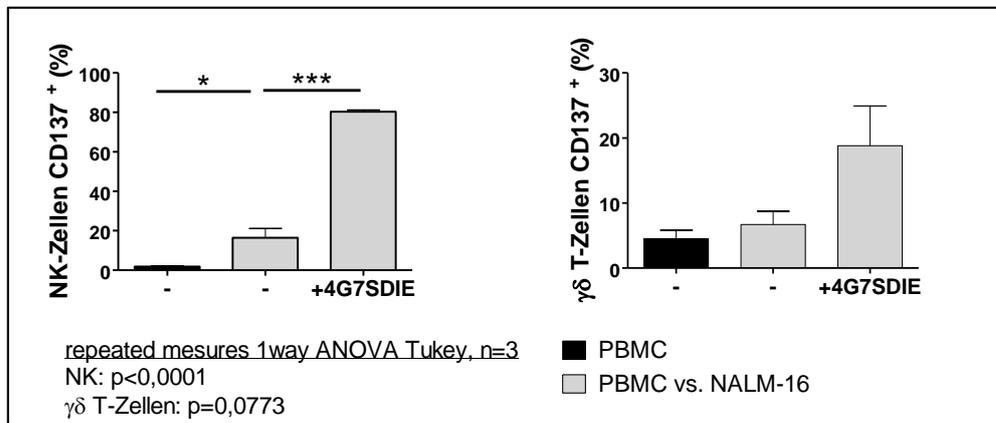


Abb. 3-19 Einfluss von NALM-16 und CD19-4G7SDIE AK auf Expression von CD137

Aus Vollblut isolierte PBMC wurden mit NALM-16 bei einer E:T von 1:1 sowohl mit als auch ohne Zugabe von CD19-4G7SDIE AK für 14 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Expression von CD137 auf den NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen durchflusszytometrisch gemessen.

3.4.2 Expansion von $\gamma\delta$ T-Zellen

Da $\gamma\delta$ T-Zellen nur einen geringen Teil der im Blut enthaltenen T-Zellen ausmachen, war es nicht möglich, eine für die Versuche ausreichende Zahl an $\gamma\delta$ T-Zellen, aus Vollblut zu isolieren. Daher wurden $\gamma\delta$ T-Zellen aus 30-50ml Vollblut gewonnenen PBMC expandiert.

Um den Erfolg der Expansion zu kontrollieren, wurde eine Woche nach Beginn der Expansion vor Verwendung der Zellen im Experiment der prozentuale Anteil der $\gamma\delta$ T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Dabei betrug der Anteil der $\gamma\delta$ T-Zellen zu Beginn der Kultur 1,1-3,7 % der T-Zellen. Nach Abschluss der Expansion betrug der Anteil der $\gamma\delta$ T-Zellen 86-98% bezogen auf alle T-Zellen bzw. 82-96% der lebenden Zellen in Kultur.

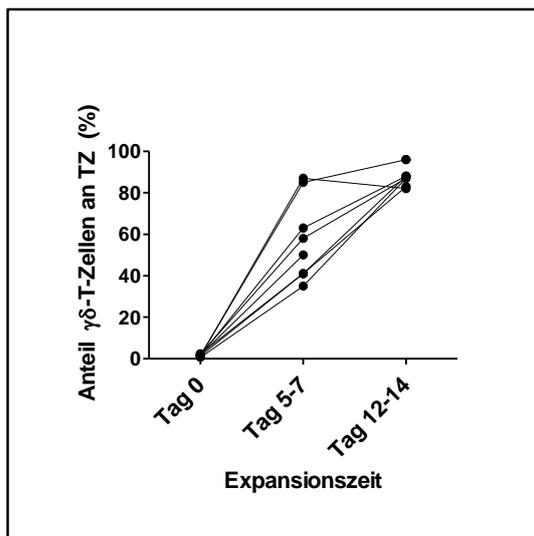


Abb. 3-20 Durchflusszytometrische Kontrolle der Expansion von $\gamma\delta$ T Zellen

Es sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Kontrollen unter $\gamma\delta$ T-Zell-Expansionen zusammengefasst dargestellt (n=8). Die Bestimmung des prozentualen Anteils an $\gamma\delta$ T-Zellen erfolgte zu Beginn der Expansion, nach einer Woche und mit Abschluss der Expansion.

3.4.3 Titration des optimalen Verhältnisses von $\gamma\delta$ T-Zellen zu NK-Zellen

Um in weiteren Versuchen die Interaktion zwischen NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen gut untersuchen zu können, wurde in einem Vorversuch getestet, ob das Verhältnis der beiden Zellengruppen zueinander Auswirkung auf die spontane Lysefähigkeit zeigt. Dazu wurden frisch isolierte NK-Zellen mit expandierten $\gamma\delta$ T-Zellen desselben Spenders in einem Verhältnis von 1:4, 1:1, 0,5:1, 0,25:1, 0,125:1 kokultiviert. Die Menge der NK-Zellen blieb dabei mit 100.000 Zellen/Well gleich; die Zahl der exp. $\gamma\delta$ T-Zellen, die hinzugegeben wurde variiert. Als Target diente bei diesem 8-stündigen CD107a-Assay NALM-16. In **Abb.3-21** ist der Mittelwert der CD107a-Expression auf NK-Zellen, zu denen keine $\gamma\delta$ T-Zellen gegeben wurden, mit einem grauen Strich als Referenzlinie eingezeichnet, um besser erkennen zu können, ob die Zugabe von $\gamma\delta$ T-Zellen die CD107a-Expression verändert. Wurden vierfach so viele $\gamma\delta$ T-Zellen wie NK-Zellen zugegeben, sank die CD107a-Expression. Lag das Verhältnis der exp. $\gamma\delta$ T-Zellen zu den NK-Zellen bei 0,5:1 oder darunter, kam es zu einem leichten Anstieg der CD107a-Expression. Die CD107a-Expression der exp. $\gamma\delta$ T-

Zellen stieg durch Zugabe von NK-Zellen an und das umso stärker, je geringer das Verhältnis von $\gamma\delta$ T-Zellen zu NK-Zellen war. Da sich Unterschiede in der CD107a-Expression abhängig vom Verhältnis von NK-Zellen zu exp. $\gamma\delta$ T-Zellen zueinander gezeigt hatten, wurden in den weiteren Versuchen die Verhältnisse von 4:1, 0,5:1, 0,125:1 $\gamma\delta$ T-Zellen zu NK-Zellen weiter untersucht. Diese Konditionen wurden ausgewählt, da sie die Veränderungen durch Varianz der Zahl der $\gamma\delta$ T-Zellen auf die CD107a-Expression am besten darstellten.

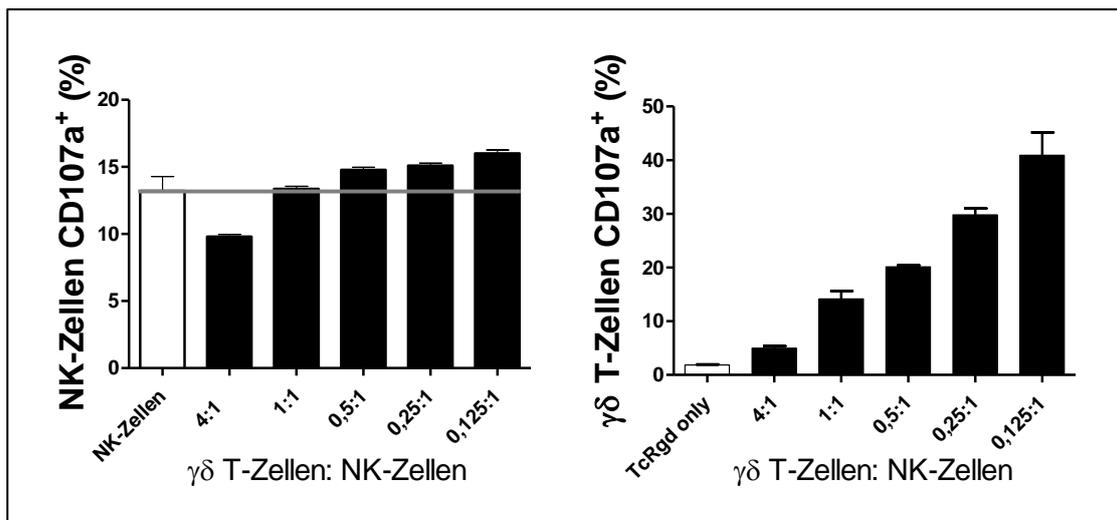


Abb. 3-21 Vorversuch: Abhängigkeit der CD107a-Expression von dem Verhältnis von NK-Zellen zu exp. $\gamma\delta$ T-Zellen

Es sind die exemplarischen Daten eines Vorversuches eines Spenders dargestellt, bei dem für jede Kondition 3 technische Replikate angefertigt wurden. In einem 8-stündigen CD107a-Assay mit der Targetzelllinie NALM-16 wurden die Auswirkungen der Zugabe expandierter $\gamma\delta$ T-Zellen zu isolierten NK-Zellen auf die CD107a-Expression getestet. Zu je 100.000 NK-Zellen wurde eine definierte Anzahl expandierter $\gamma\delta$ T-Zellen gegeben, sodass sich ein Verhältnis der beiden Zellgruppen zueinander von 4:1-0,125:1 ($\gamma\delta$ T-Zellen:NK-Zellen) ergab. Wurden nur NK- oder $\gamma\delta$ T-Zellen als Kondition ohne die jeweils andere Zellgruppe verwendet, so betrug ihre Zahl immer 100.000/Well. Die Zahl der Targetzellen betrug stets 100.000. Der graue Strich markiert den Mittelwert der CD107a Expression der NK-Zellen alleine (weiß), damit Unterschiede durch die Zugabe von $\gamma\delta$ T-Zellen besser erkannt werden können.

3.4.4 Blockade von CD137 mittels Antikörper

Damit untersucht werden kann, welche Rolle CD137 in der Interaktion von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen spielt, wurde dieses Oberflächenmolekül in den folgenden Experimenten blockiert. Dazu erfolgte eine 24-stündige Inkubation der NK-Zellen und

oder exp. $\gamma\delta$ T-Zellen mit oder ohne einen CD137 blockierenden Antikörper auf mit humanem IgG (hIgG) beschichteten Platten. Danach folgte die Weiterverwendung der Zellen in CD107a-Assays oder xCELLigence. Um eine Bindung des Antikörpers an CD137 und somit die Blockade dieses Oberflächenmoleküls nach Versuchsablauf sicherzustellen, wurde die Anfärbarkeit von CD137 nach Assay Ende auf den NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen durchflusszytometrisch kontrolliert. **Abb.3-22** zeigt exemplarische Ergebnisse dieser FACS-Analyse. Ohne CD137 blockierenden Antikörper lässt sich in **Abb.3-22A** in den rechten oberen Quadranten erkennen, dass NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen CD137 exprimierten. Im dargestellten Beispiel waren dies 47% der NK Zellen und 51% der $\gamma\delta$ T-Zellen. Nach Blockade mit dem CD137-Antikörper ließ sich CD137 nicht mehr anfärben. Somit ist davon auszugehen, dass die Blockade erfolgreich war und CD137 nicht mehr an der Zell-Zell-Interaktion teilnehmen konnte.

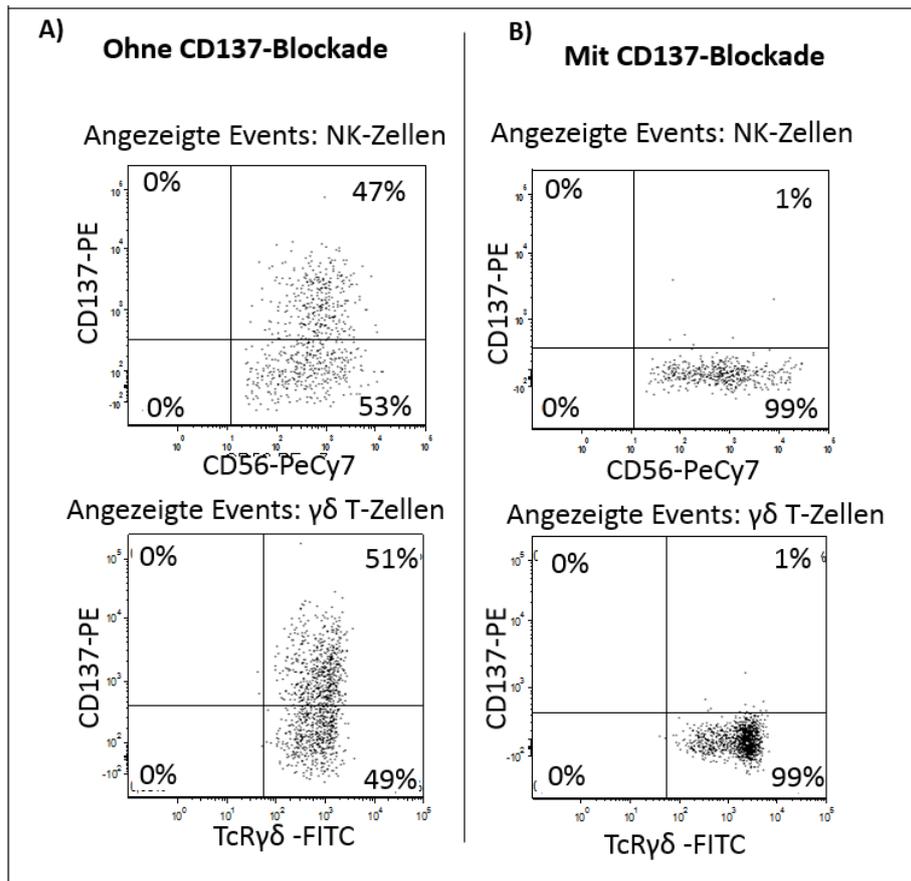


Abb. 3-22 Durchflusszytometrische Kontrolle der CD137-Blockade mittels Antikörper

Expandierte $\gamma\delta$ T-Zellen und aus Vollblut isolierte NK-Zellen wurden für 24 Stunden mit oder ohne CD137 blockierenden Antikörper auf hlgG beschichteten Platten inkubiert und anschließend in einem 107a-Assay gemessen. In einer angeschlossenen durchflusszytometrischen Messung wurde die Anfärbbarkeit von CD137 auf NK- und exp. $\gamma\delta$ T-Zellen kontrolliert, um eine erfolgreiche Blockade sicherzustellen. In der Auswertung wurden aus der PBMC-Wolke die lebenden Zellen weiter analysiert und NK-Zellen als CD56⁺/CD3⁻ Zellen, $\gamma\delta$ T-Zellen als CD3⁺/TcR $\gamma\delta$ ⁺ Zellen definiert. In einem Scatterplot wurde CD137 gegen CD56 bzw. TcR $\gamma\delta$ aufgetragen und mittels Quadranten der Anteil der CD137⁺/CD56⁺ bzw. TcR $\gamma\delta$ ⁺ Population bestimmt. **A** zeigt die Analyse von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen, die ohne CD137-Blockadeantikörper inkubiert wurden, **B** zeigt die Analyse von Zellen mit CD137-Blockade.

NK-Zellen in den in Abschnitt 3.3.3 ausgewählten Mischungsverhältnissen für 24-Stunden auf beschichtete und unbeschichtete Platten gegeben. Wie die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse in **Abb.3-23** zeigen, erhöhte die Inkubation mit hlgG die CD137-Expression auf den NK-Zellen signifikant. NK-

Zellen wiesen durch die alleinige Inkubation mit $\gamma\delta$ T-Zellen ohne hlgG keine erhöhte Expression von CD137 auf. Auf den exp. $\gamma\delta$ T-Zellen erhöhte sich die Expression von CD137 ebenfalls durch hlgG, was jedoch nur bei einem Verhältnis von 4:1 ($\gamma\delta$ T-Zellen:NK-Zellen) im Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test signifikant war. Die Höhe der CD137-Expression der $\gamma\delta$ T-Zellen unter Einfluss von hlgG variierte in ihrer Höhe abhängig vom Verhältnis zu den zugesetzten NK-Zellen. Bei einem Verhältnis von 0,5:1 ($\gamma\delta$ T-Zellen:NK-Zelle) kam es zu der höchsten CD137-Expression mit einem Mittelwert von 26%. Hinzu kam, dass die Inkubation von $\gamma\delta$ T-Zellen mit NK-Zellen in einem Verhältnis von 0,5:1 und 0,125:1 ohne Zugabe von hlgG auch zu einem Anstieg der CD137-Expression führte. Am höchsten war diese bei einem Verhältnis von $\gamma\delta$ T-Zellen zu NK-Zellen von 0,5:1 mit einem Mittelwert von 17,7%. Frisch isolierte NK-Zellen wiesen ohne Stimulation mit hlgG im Mittelwert eine CD137-Expression von unter 1% auf (Anhang Abb.9-1).

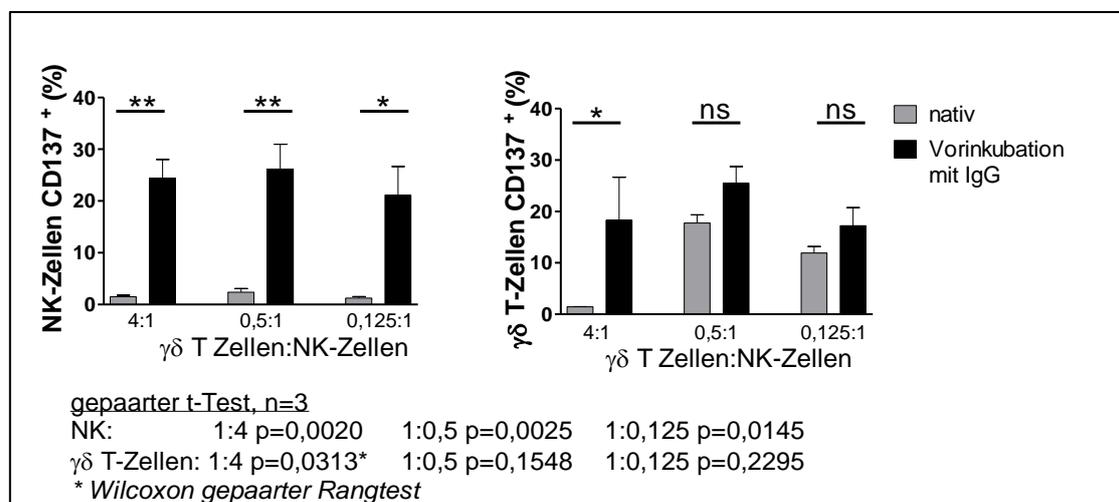


Abb. 3-23 Wirkung von humanem IgG auf die CD137-Expression

Zu 250.000 frisch isolierten NK-Zellen wurden exp. $\gamma\delta$ T-Zellen in dem Verhältnis von 1:4-1:0,125 gegeben und die Zellmischung auf unbeschichteten (grau) oder mit humanem IgG beschichteten (schwarz) Platten für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde in einem 8-stündigen Aktivierungs-Assay die CD137-Expression auf den NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen gemessen und verglichen, wie sich die Inkubation mit IgG auswirkt.

3.4.6 Wirkung von humanem IgG und CD137-Blockade auf die Inkubation von NK-Zellen mit exp. $\gamma\delta$ T-Zellen

Während der 24-stündigen Inkubation von NK-Zellen mit exp. $\gamma\delta$ T-Zellen auf unbeschichteten und hlgG beschichteten Platten mit und ohne Zugabe von CD137 blockierendem Antikörper wurden die Zellsuspensionen mikroskopisch begutachtet und die Resultate fotografisch bei 40-facher Vergrößerung festgehalten. Abb.3-24 zeigt die exemplarischen Aufnahmen von NK-Zellen, die mit exp. $\gamma\delta$ T-Zellen in einem Mischungsverhältnis von 1:4 inkubiert wurden. Auf den unbeschichteten Platten sind mehrere Zellcluster zu sehen. Auf der hlgG-beschichteten Platte nimmt die Clusterbildung zu, während auf der hlgG-beschichteten Platte unter Zugabe von CD137 blockierenden Antikörper keine Zellclusterbildung zu erkennen ist.



Abb. 3-24 Mikroskopische Analyse der Wirkung von IgG und CD137-Blockade auf die Inkubation von NK-Zellen mit exp. $\gamma\delta$ T-Zellen

Frisch isolierte NK-Zellen wurden mit 4-fach so vielen exp. $\gamma\delta$ T-Zellen für 24 Stunden inkubiert. Ein Teil auf unbeschichteten Platten, ein Teil auf mit humanem IgG (hlgG) beschichteten Platten mit und ohne Zugabe von CD137 blockierendem Antikörper. Die entstanden Zellsuspensionen wurde während der Inkubation mikroskopisch bei 40-facher Vergrößerung beurteilt und fotografiert.

3.4.7.1 *Wirkung von humanem IgG auf die Aktivierbarkeit von NK-Zellen und exp. $\gamma\delta$ T-Zellen mit und ohne CD19-4G7SDIE AK*

Frisch isolierte NK-Zellen und exp. $\gamma\delta$ T-Zellen wurden auf unbeschichteten oder hlgG-beschichteten Platten für 24 Stunden inkubiert und anschließend einem

CD107a-Assay mit der Targetzelllinie NALM-16 zugeführt. Abb.3-25 zeigt, dass die CD107a-Expression und Zytokinsekretion der NK-Zellen gegenüber NALM-16 nach Inkubation mit hlgG im gepaarten t-Test signifikant erhöht war. Auch exp. $\gamma\delta$ T-Zellen zeigten eine gesteigerte CD107a-Expression und Zytokinsekretion nach Inkubation mit hlgG. Diese war allerdings nur in Bezug auf die CD107a-Expression signifikant. Unter Zugabe von CD19-4G7SDIE AK zeigten die NK-Zellen nach Inkubation mit hlgG allerdings keine Erhöhung der gemessenen Parameter. Im Hinblick auf die exp. $\gamma\delta$ T-Zellen erhöhte sich nach Zugabe von CD19-4G7SDIE AK die CD107a-Expression durch Inkubation mit hlgG hingegen signifikant, während die TNF α -Sekretion signifikant sank.

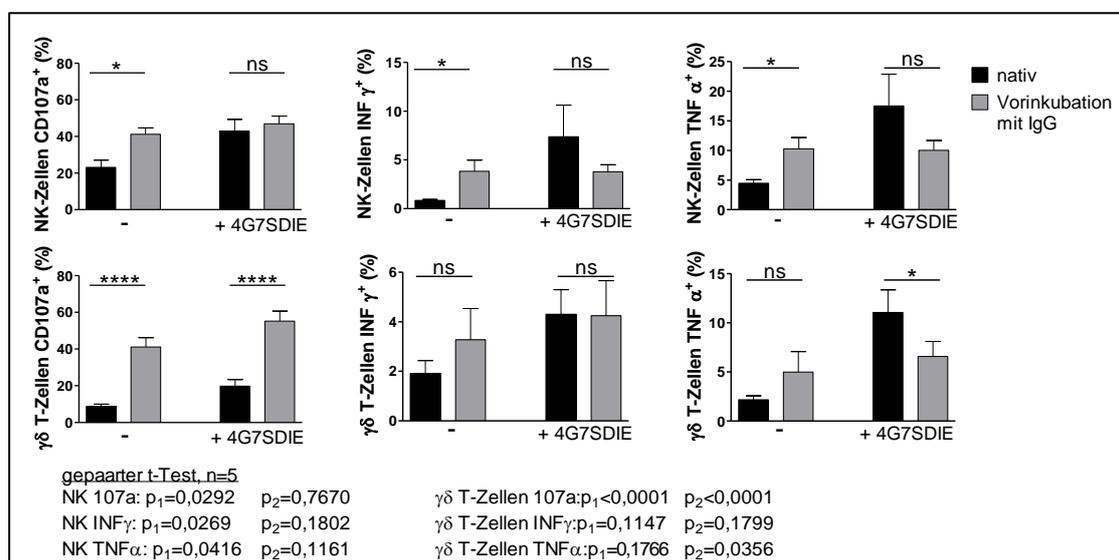


Abb. 3-25 Wirkung von IgG auf NK- und exp. $\gamma\delta$ T-Zellen im CD107a-Assay mit ICS

NK-Zellen und exp. $\gamma\delta$ T-Zellen wurden für 24 Stunden auf unbeschichteten oder hlgG beschichteten Platten inkubiert und anschließend in einem 8-stündigen CD107a Assay mit ICS gegen NALM-16 bei einer E:T von 1:1 und der Verwendung von CD19-4G7SDIE AK getestet. Mit IgG-inkubierte Zellen (grau) wurden dabei mit den auf unbeschichteten Platten inkubierten, also nativen Zellen (schwarz), verglichen.

3.4.7.2 Wirkung exp. $\gamma\delta$ T-Zellen auf die Aktivierbarkeit von NK-Zellen

Wie bereits in den vorangehenden Abschnitten beschrieben, wurden frisch isolierte NK-Zellen und exp. $\gamma\delta$ T-Zellen alleine und in verschiedenen Mischungsverhältnissen miteinander (siehe Abschnitt 3.3.3.) auf unbeschichteten oder hlgG

beschichteten Platten mit und ohne CD137 blockierenden Antikörper für 24 Stunden inkubiert. Anschließend folgte ein CD107a-Assay für 8 Stunden unter Verwendung von NALM-16 als Targetzelllinie und CD19-4G7SDIE AK für die Evaluation der ADCC. **Abb.3-26** zeigt die Ergebnisse des CD107a-Assays für die NK-Zellen. Sowohl ohne Präinkubation mit hlgG (nativ) (**Abb.3-26A**) als auch mit Präinkubation mit hlgG unter zusätzlicher CD137-Blockade (**Abb.3-26C**) zeigte sich kein signifikanter Anstieg der CD107a-Expression durch Zugabe von exp. $\gamma\delta$ T-Zellen. Erfolgte jedoch eine Präinkubation mit hlgG ohne CD137-Blockade, wie in **Abb.3-26B** zu sehen ist, steigerten exp. $\gamma\delta$ T-Zellen in einem Mischungsverhältnis von 0,5:1 bzw. 0,125:1 (exp. $\gamma\delta$ T-Zellen:NK-Zellen) die CD107a-Expression der NK-Zellen unter Zugabe von CD19-4G7SDIE AK signifikant. Allerdings scheint dieser Effekt nicht zwingend von Targetzellen abhängig zu sein, da durch diese Konzentrationen an exp. $\gamma\delta$ T-Zellen auch die CD107a-Expression auf NK-Zellen signifikant stieg, die in der Kontrolle ohne Target und CD19-4G7SDIE AK inkubiert worden waren. Auf die Zytokinsekretion der NK-Zellen hatte die Zugabe von exp. $\gamma\delta$ T-Zellen in allen drei geprüften Konditionen keinen positiven Effekt. Wurden hohe Konzentrationen an exp. $\gamma\delta$ T-Zellen, in diesem Fall vierfach so viele, zu den NK-Zellen gegeben, erfolgte immer eine Minderung der CD107a-Expression und Zytokinproduktion.

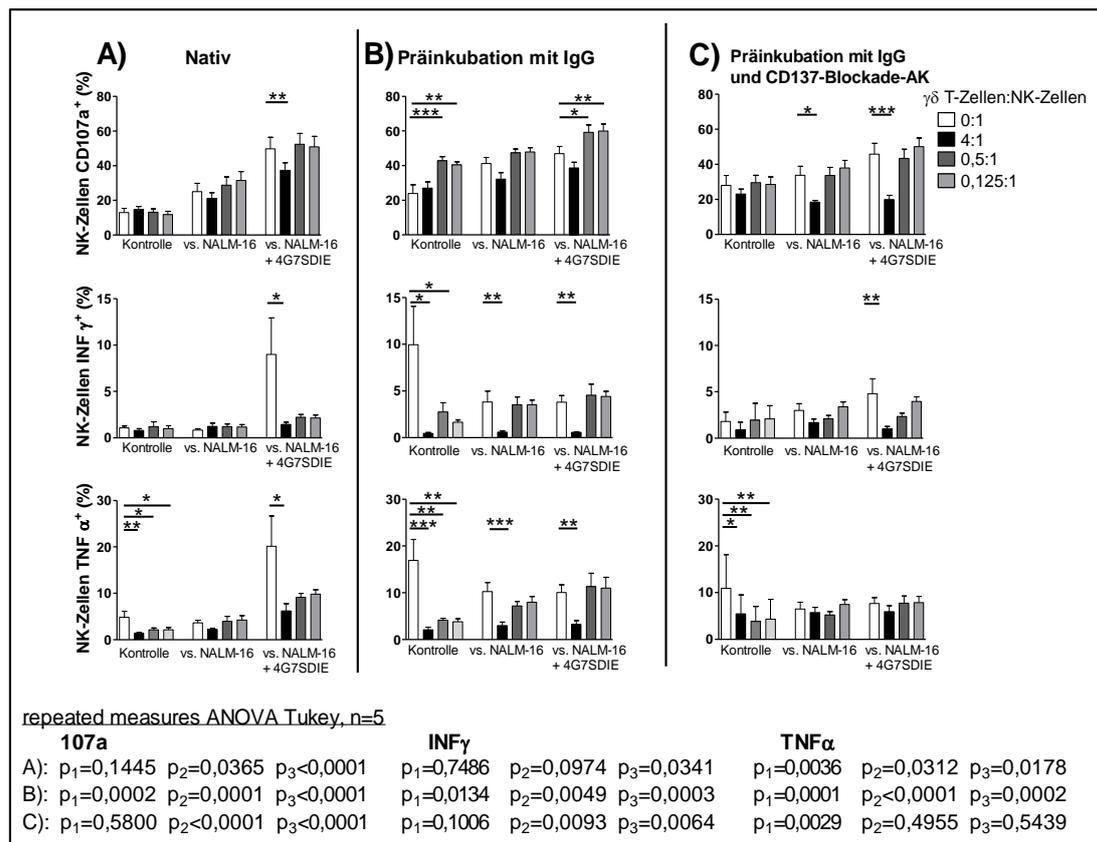


Abb. 3-26 Wirkung verschiedener Konzentrationen exp. $\gamma\delta$ T-Zellen auf NK-Zellen

Frisch isolierte NK-Zellen wurden in verschiedenen Mischungsverhältnissen mit exp. $\gamma\delta$ T-Zellen inkubiert und anschließend einem 8-stündigen CD107a-Assay mit ICS unter Verwendung von NALM-16 und CD19-4G7SDIE AK zugeführt. Die Zahl der NK-Zellen und Targets betrug dabei stets 250.000/Well, während die exp. $\gamma\delta$ T-Zellen in variabler Zahl in einem Verhältnis von 4:1, 0,5:1 und 1:0,125 zu den NK-Zellen hinzugegeben wurden. Die dem Assay vorangehende 24-stündige Inkubation ohne Targetzellen erfolgte auf unbeschichteten Platten (A) oder auf hIgG beschichteten Platten (B) oder auf hIgG-Beschichteten Platten unter Zugabe von CD137 blockierenden Antikörper (C). Als Kontrolle für eine unspezifische Aktivierung wurde für alle Konditionen auch je 250.000 NK-Zellen/Well ohne Zugabe von NALM-16 mitgeführt. Da analysiert werden sollte, wie die Zugabe von exp. $\gamma\delta$ T-Zellen die NK-Zellen beeinflusst, wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nur die relevanten Signifikanzen zwischen NK-Zellen pur und NK-Zellen mit Zugabe exp. $\gamma\delta$ T-Zellen eingetragen.

3.4.7.3 Wirkung von NK-Zellen auf die Aktivierbarkeit exp. $\gamma\delta$ T-Zellen

Identisch zu dem in Abschnitt 3.3.7.2 beschrieben Versuch erfolgte die Auswertung der Aktivität exp. $\gamma\delta$ T-Zellen. Die Ergebnisse sind in **Abb.3-27** dargestellt. Hier zeigte sich, dass frisch isolierte NK-Zellen exp. $\gamma\delta$ T-Zellen stimulieren. So wurde die CD107a-Expression und Zytokinproduktion der exp. $\gamma\delta$ T-Zellen nicht

nur mit Präinkubation mit hlgG (**Abb.3-27B**), sondern auch ohne Präinkubation mit hlgG (**Abb.3-27A**) durch die Zugabe von NK-Zellen signifikant erhöht. Dieser Effekt zeigte sich mit und ohne CD19-4G7SDIE AK, aber auch in der Kontrolle ohne Target. Unter CD137-Blockade (**Abb.3-27C**) konnten NK-Zellen die CD107a-Expression und Zytokinproduktion der exp. $\gamma\delta$ T-Zellen ebenfalls signifikant steigern. Hier zeigte sich insgesamt eine geringere, aber teils dennoch signifikante unspezifische Aktivierung der exp. $\gamma\delta$ T-Zellen in der Kontrollgruppe. Unter allen untersuchten Konditionen wiesen die exp. $\gamma\delta$ T-Zellen die höchste Stimulation durch die NK-Zellen bei einem niedrigen Mischungsverhältnis von 0,5:1 und 0,125:1 (exp. $\gamma\delta$ T-Zellen:NK-Zellen) auf. Betrug das Verhältnis 4:1, zeigten die exp. $\gamma\delta$ T-Zellen keine signifikant reduzierte Aktivität, sondern meist eine gleich hohe oder leicht höhere CD107a-Expression bzw. Zytokinsekretion im Vergleich zu exp. $\gamma\delta$ T-Zellen ohne Zusatz von NK-Zellen.

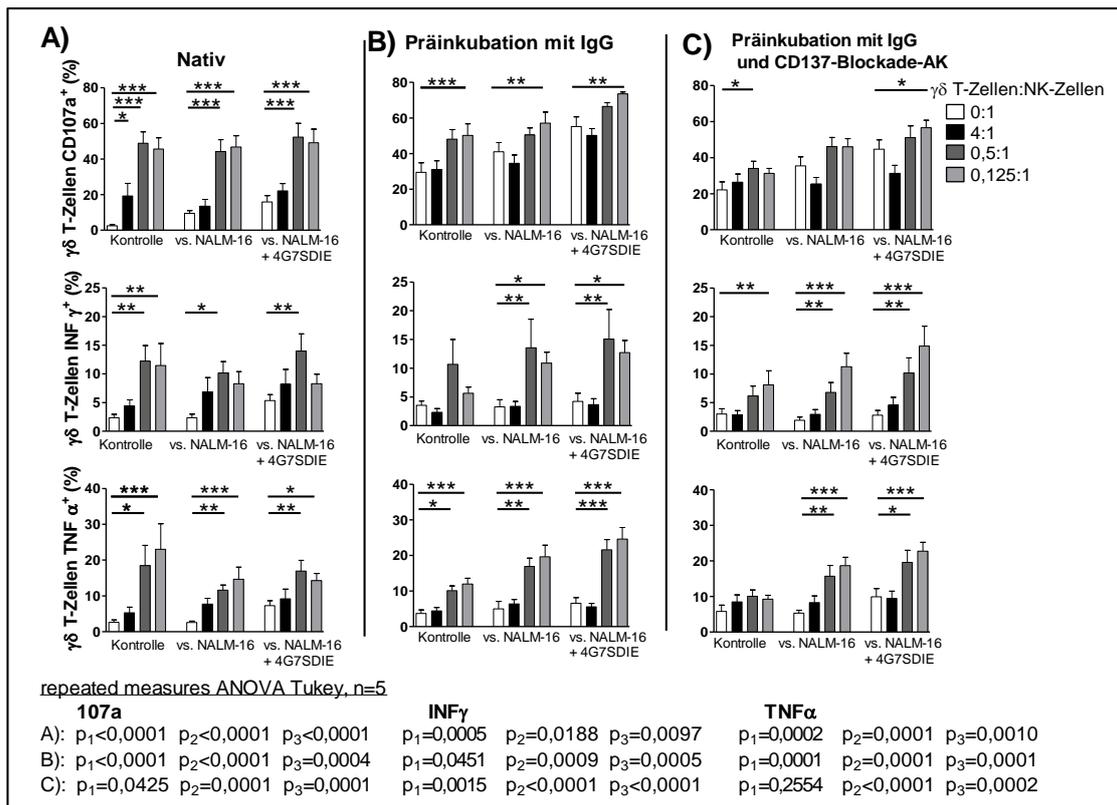


Abb. 3-27 Wirkung verschiedener Konzentrationen von NK-Zellen auf exp. $\gamma\delta$ T-Zellen

Exp. $\gamma\delta$ T-Zellen wurden in verschiedenen Mischungsverhältnissen mit frisch isolierten NK-Zellen inkubiert und anschließend einem 8-stündigen CD107a-Assay mit ICS unter Verwendung von NALM-16 und CD19-4G7SDIE AK zugeführt. Die Zahl der NK-Zellen und Targets betrug dabei

stets 250.000/Well, während die exp. $\gamma\delta$ T-Zellen in variabler Zahl in einem Verhältnis von 4:1, 0,5:1 und 0,125:1 zu den NK-Zellen hinzugegeben wurden. Die dem Assay vorangehende 24-stündige Inkubation erfolgte auf unbeschichteten Platten **A** oder auf hIgG beschichteten Platten **B** oder auf hIgG-beschichteten Platten unter Zugabe von CD137 blockierenden Antikörper **C**. Als Kontrolle für eine unspezifische Aktivierung wurden für alle Konditionen auch je 250.000 exp. $\gamma\delta$ T-Zellen/Well ohne Zugabe von NALM-16 mitgeführt. Da analysiert werden sollte, wie die Zugabe von NK-Zellen exp. $\gamma\delta$ T-Zellen in ihrer Aktivität beeinflusst, wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nur die relevanten Signifikanzen zwischen $\gamma\delta$ T-Zellen pur und NK-Zellen mit Zugabe exp. $\gamma\delta$ T-Zellen eingezeichnet.

3.4.7.4 *Wirkung einer CD137-Blockade auf Aktivierbarkeit von NK-Zellen und exp. $\gamma\delta$ T-Zellen*

Um den Effekt der CD137-Blockade genauer zu bestimmen, wurden die Ergebnisse des CD107a-Assays mit ICS der Zellen, die nur mit hIgG inkubiert wurden (schwarz), mit denen verglichen, die zusätzlich noch eine CD137-Blockade erhielten (grau). **Abb.3-28** zeigt den Effekt der CD137-Blockade auf die NK-Zellen, **Abb.3-29** auf die exp. $\gamma\delta$ T-Zellen. Durch eine CD137-Blockade wurde die Aktivität der NK-Zellen und exp. $\gamma\delta$ T-Zellen ohne die Zugabe der jeweiligen anderen Zellgruppe im Hinblick auf CD107a-Expression und Zytokinproduktion nicht signifikant reduziert, außer bei den exp. $\gamma\delta$ T-Zellen unter Zusatz von CD19-4G7SDIE AK. Hier zeigte sich nach CD137-Blockade eine signifikant geringere CD107a-Expression. Generell zeigten besonders exp. $\gamma\delta$ T-Zellen ohne NK-Zellen unter CD137-Blockade eine verminderte CD107a-Expression. Ansonsten führte eine CD137-Blockade unter Zugabe von exp. $\gamma\delta$ T-Zellen zu einer geringeren CD107a-Expression der NK-Zellen sowohl in der Kontrolle als auch unter Zugabe von Targetzellen sowie unter Zugabe von CD19-4G7SDIE AK. In Hinblick auf die Zytokinsekretion ergab sich durch die CD137-Blockade kein eindeutig gerichtetes Bild. Auch auf die Zytokinsekretion der exp. $\gamma\delta$ T-Zellen hatte die CD137-Blockade keine signifikante Wirkung. Die CD107a-Expression der exp. $\gamma\delta$ T-Zellen durch Koinkubation mit NK-Zellen wurde durch CD137-Blockade reduziert.

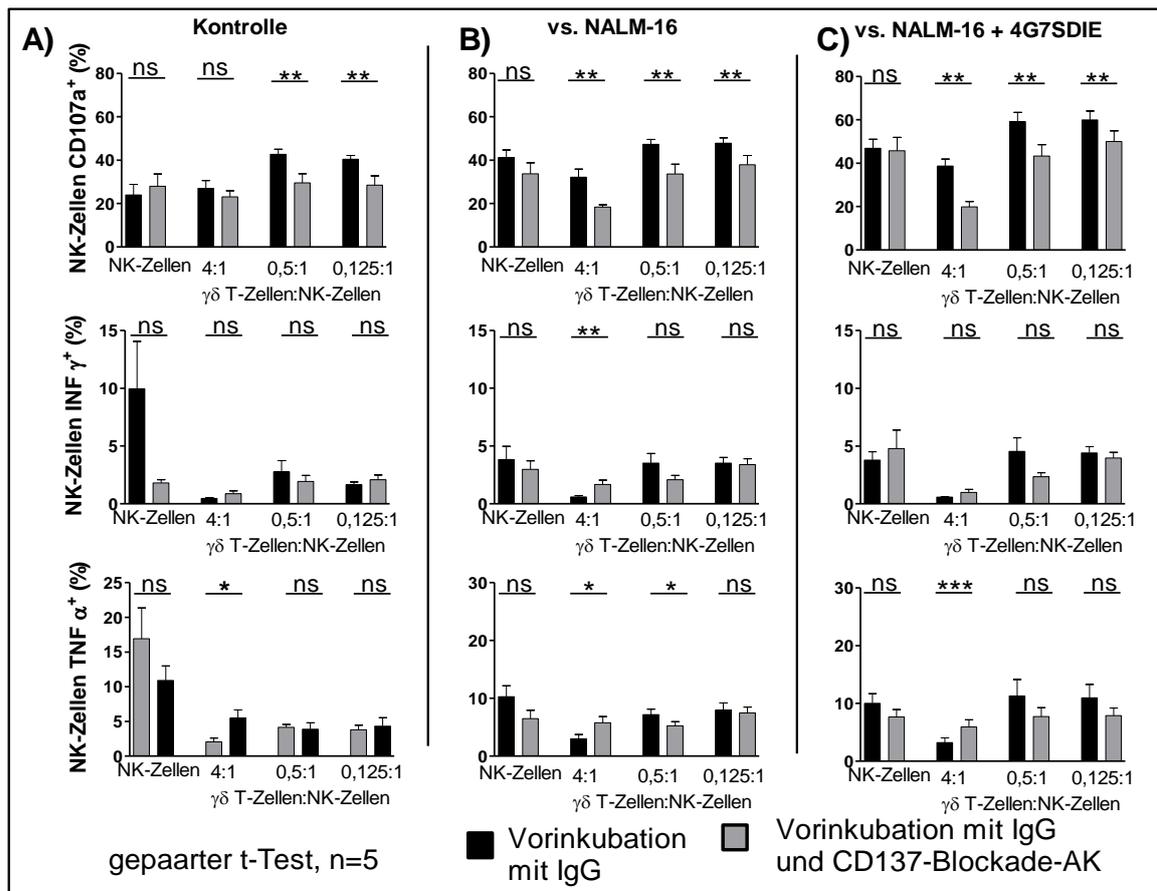


Abb. 3-28 Wirkung von CD137-Blockade auf die Interaktion von NK-Zellen mit exp. $\gamma\delta$ T-Zellen

Pure NK-Zellen und NK-Zellen in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen mit exp. $\gamma\delta$ T-Zellen wurden für 24 Stunden mit hIgG inkubiert (schwarz) und teilweise zusätzlich mit einem CD137 blockierenden Antikörper (grau). Die Zahl der NK-Zellen betrug dabei stets 250.000/Well, während die exp. $\gamma\delta$ T-Zellen in variabler Zahl in einem Verhältnis von 4:1, 0,5:1 und 0,125:1 zu den NK-Zellen hinzugegeben wurden. Im Anschluss erfolgte ein 8-stündiges CD107a-Assay mit ICS unter Verwendung von NALM-16 **B**, Nalm-16 und CD19-4G7SDIE AK **C** und einer Kontrollgruppe **A** ohne NALM-16 und CD19-4G7SDIE AK. Die Zahl der Targetzellen betrug stets 250.000/Well. Es wurde der Einfluss einer CD137-Blockade auf die NK-Aktivität untersucht.

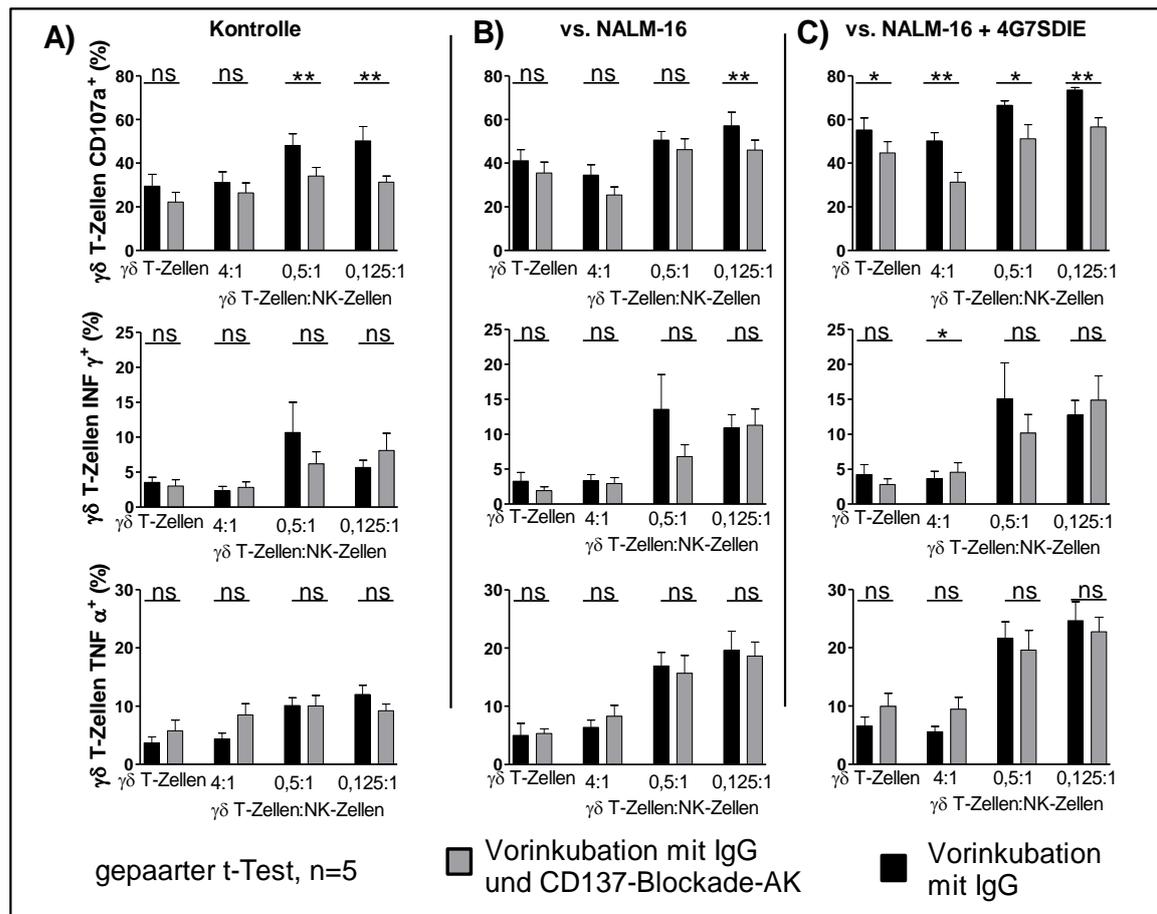


Abb. 3-29 Wirkung von CD137-Blockade auf die Interaktion von exp. $\gamma\delta$ T-Zellen mit NK-Zellen

Pure exp. $\gamma\delta$ T-Zellen und exp. $\gamma\delta$ T-Zellen in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen mit NK-Zellen wurden für 24 Stunden mit hlgG inkubiert (schwarz) und teilweise zusätzlich mit einem CD137 blockierenden Antikörper (grau). Die Zahl der NK-Zellen betrug dabei stets 250.000/Well, während die exp. $\gamma\delta$ T-Zellen in variabler Zahl in einem Verhältnis von 4:1, 0,5:1 und 0,125:1 zu den NK-Zellen hinzugegeben wurden. Die Zahl der reinen exp. $\gamma\delta$ T-Zellen belief sich je auf 250.000/Well. Im Anschluss erfolgte ein 8-stündiges CD107a-Assay mit ICS unter Verwendung von NALM-16 **B**, Nalm-16 und CD19-4G7SDIE AK **C** und einer Kontrollgruppe **A** ohne NALM-16 und CD19-4G7SDIE AK. Die Zahl der Targetzellen betrug stets 250.000/Well. Es wurde der Einfluss einer CD137-Blockade auf die Aktivität von $\gamma\delta$ T-Zellen untersucht.

3.4.8 Echtzeitanalyse der spontanen Lysefähigkeit und ADCC von NK-Zellen und exp. $\gamma\delta$ T-Zellen mittels xCELLigence

Neben dem in Abschnitt 3.3.8 beschriebenen CD107a-Assay wurde der Einfluss von $\gamma\delta$ T-Zellen auf die NK-vermittelte Lyse im xCELLigence untersucht. NK-Zellen und exp. $\gamma\delta$ T-Zellen wurden hierzu auf unbeschichteten Platten oder auf hlgG beschichteten Platten prästimuliert und der Einfluss von CD137 mittels CD137-Blockierungsexperimenten evaluiert. Als Target diente die adhärenente Neuroblastomzelllinie LS und für die Evaluation der ADCC der GD2 CH14.18 Antikörper (Dinutuximab beta). Die Lyse wurde über einen Zeitraum von 24 Stunden gemessen. Exemplarisch sind in **Abb. 3-30** die Mittelwerte der Lyseverläufe aller durchgeführten Versuche für ausgewählte Konditionen abgebildet, um einen Überblick über das Lyseverhalten im Zeitverlauf von 24 Stunden zu schaffen. Für die Mehrheit der Analysen wurde die Lyse nach 8 Stunden verwendet, in **Abb. 3-30** mit einem roten Strich gekennzeichnet, da sich zu diesem Zeitpunkt stabile Werte zeigten und auch Parallelen zu dem ebenfalls 8-stündigen CD107a-Assay mit ICS in Abschnitt 3.3.7 gezogen werden konnten. Die Lyserate durch NK- und oder exp. $\gamma\delta$ T-Zellen nahm während der ersten fünf Stunden zu und hielt sich dann stabil, bevor sie nach 20-22 Stunden wieder abfiel.

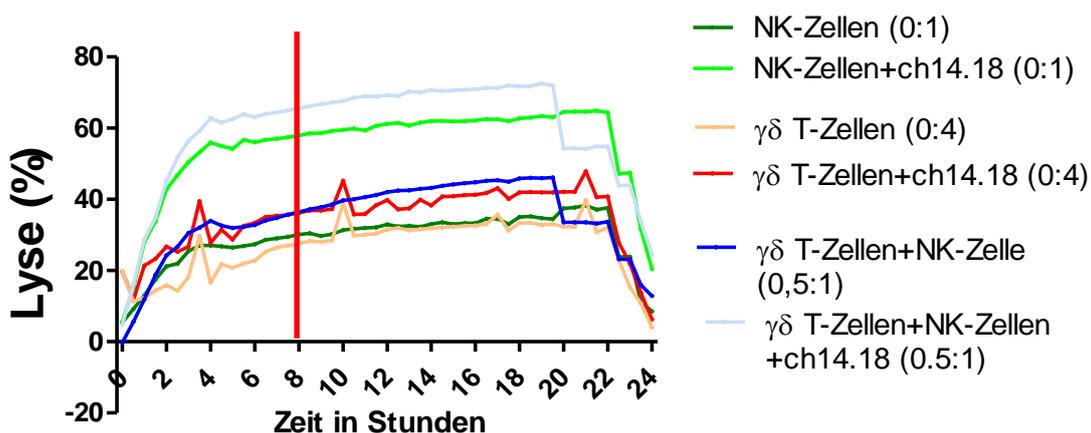


Abb. 3-30 Echtzeitanalyse der spontanen Lysefähigkeit und ADCC von NK-Zellen und exp. $\gamma\delta$ T-Zellen im xCELLigence

Frisch isolierte NK-Zellen alleine oder in Koinkubation in unterschiedlichen Verhältnissen an exp. $\gamma\delta$ T-Zellen wurden für 24 Stunden auf unbeschichteten oder auf hlgG beschichteten Platten mit und ohne einer CD137-Blockade inkubiert und anschließend gegen die Neuroblastomzelllinie LS

unter Verwendung des Antikörpers CH14.18 für 24 Stunden auf ihre Lysefähigkeit getestet. Die Zahl der NK-Zellen betrug dabei stets 15.000, während die exp. $\gamma\delta$ T-Zellen in variabler Zahl in einem Verhältnis von 4:1, 0,5:1 und 0,125:1 zu den NK-Zellen hinzugegeben wurden. Die Zahl der Targetzellen betrug zu Beginn 15.000. Die Effektoren wurden bei Erreichen des Zellindex 1 zu dem in der Grafik dargestellten Zeitpunkt 0 hinzugegeben. Um einen Eindruck des Lyseverlaufs gewinnen zu können, sind die Lyseverläufe ausgewählter Konditionen über den Zeitraum von 24 Stunden abgebildet. Die Zahlen in den Klammern geben das Verhältnis exp. $\gamma\delta$ T-Zellen zu NK-Zellen an, wobei der Wert 15.000 Zellen entspricht. Die rote Linie markiert den Zeitpunkt 8 Stunden, dessen Lysewerte vordringlich in die Auswertung einfließen.

3.4.8.1 *Vergleich der spontanen Lysefähigkeit und ADCC von NK-Zellen und exp. $\gamma\delta$ T-Zellen*

In **Abb. 3-31A** wurde analysiert, ob die Zugabe des Antikörpers CH14.18 die Lyse nach 8 Stunden erhöhen konnte. CH14.18. steigerte die Lyse in allen Konditionen. In den Konditionen NK-Zellen und NK-Zellen plus exp. $\gamma\delta$ T-Zellen im Verhältnis 0,5:1 und 0,125:1 (exp. $\gamma\delta$ T-Zellen:NK-Zellen) war die Lysesteigerung signifikant. **Abb.3-31B** vergleicht die Lyse und ADCC von NK-Zellen (weiß) und vierfach so vielen exp. $\gamma\delta$ T-Zellen (schwarz) nach 8 Stunden. Vierfach so viele exp. $\gamma\delta$ T-Zellen wie NK-Zellen lysieren LS vergleichbar effizient wie NK-Zellen. CH14.18 steigert die NK-vermittelte Lyse von LS deutlich stärker als vierfach so viele exp. $\gamma\delta$ T-Zellen mit CH14.18.

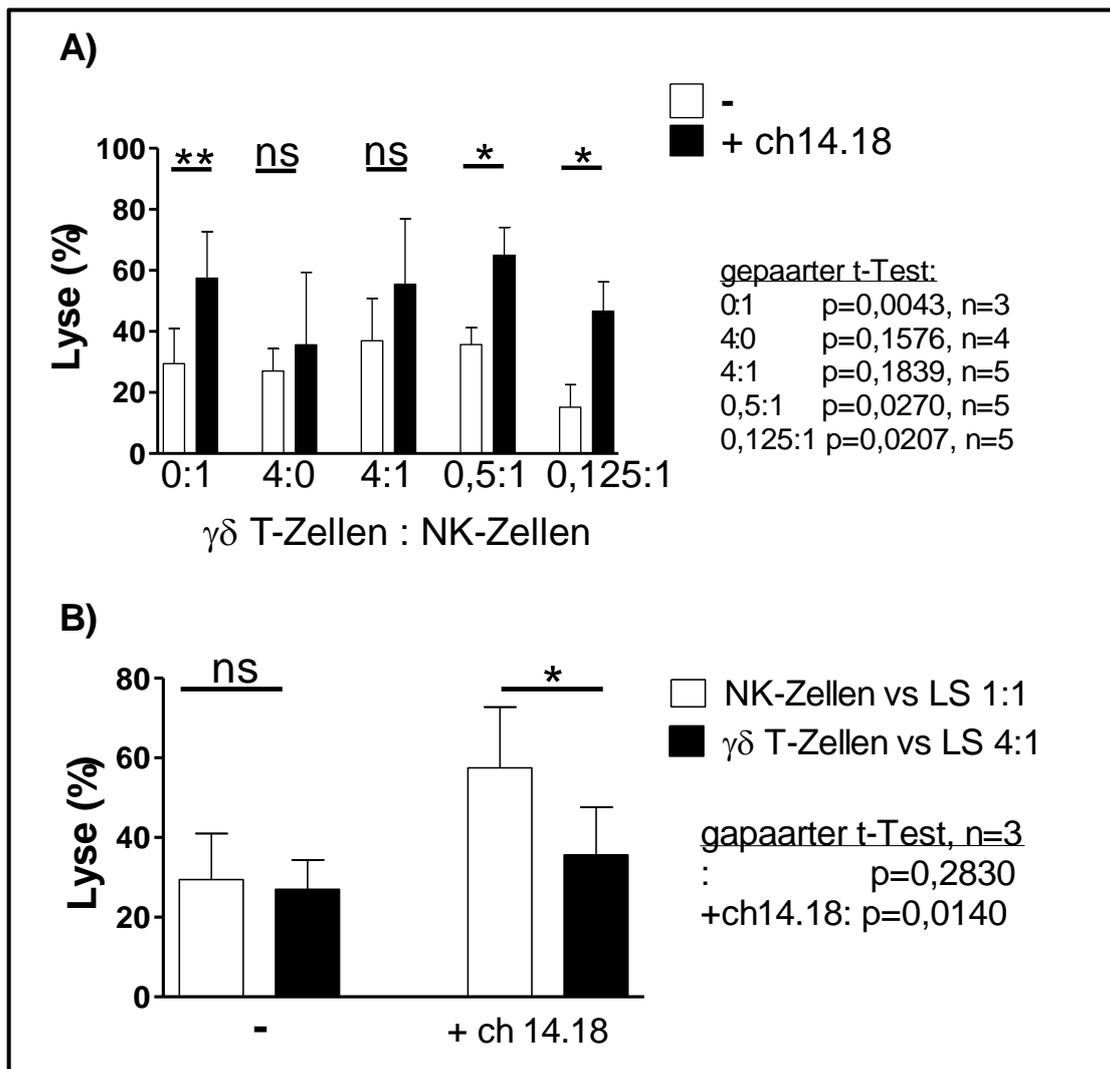


Abb. 3-31 Vergleich der spontanen Lysefähigkeit und ADCC von NK-Zellen und exp. $\gamma\delta$ T-Zellen im xCELLigence

Als Target wurden je 15.000 Targetzellen der Zelllinie LS nach Erreichen eines Zellindex von 1 zum Zeitpunkt 0 verwendet. Die dargestellten Ergebnisse beziehen sich auf die Lyse nach 8 Stunden. **A** Es wurde die Lysefähigkeit von 15.000 frisch isolierten NK-Zellen alleine oder nach 24-stündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen exp. $\gamma\delta$ T-Zellen ohne (weiß) und mit (schwarz) Zugabe von CH14.18 gemessen und verglichen. **B** Es wurde die spontane Lysefähigkeit und ADCC mittels CH14.18 von 15.000 frisch isolierten NK-Zellen (weiß) und exp. $\gamma\delta$ T-Zellen in vierfacher Dosis (schwarz) verglichen

3.4.8.2 **Wirkung einer CD137-Blockade auf die spontane Lysefähigkeit und ADCC von NK-Zellen und exp. $\gamma\delta$ T-Zellen**

Während ein Teil der Mischung aus NK-Zellen und exp. $\gamma\delta$ T-Zellen bei verschiedenen Mischungsverhältnissen auf unbeschichteten Platten inkubiert wurde,

wurde ein anderer Teil auf hlgG-beschichteten Platten mit und ohne Zugabe eines CD137 blockierenden Antiköpers für 24 Stunden inkubiert. Anhand der Höhe der erzielten Lyse im xCELLigence durch exp. $\gamma\delta$ T-Zellen und NK-Zellen nach 8 Stunden konnte der Effekt einer Vorinkubation mit IgG und einer CD137-Blockade ermittelt werden. Auch die Wirkung einer CD137-Blockade auf exp. $\gamma\delta$ T-Zellen ohne Zugabe von NK-Zellen wurde getestet. Wie in **Abb.3-32** zu sehen, führte eine Präinkubation mit hlgG teilweise zu einer signifikant reduzierten Lyse der Targetzellen. Die Blockade von CD137 nach Präinkubation mit hlgG reduzierte die Lyse, sowohl mit und ohne Zugabe des Antiköpers, erneut. Eine signifikante Reduktion der Lyse wurde durch Vorinkubation mit hlgG und CD137-Blockade nur im Vergleich zu den Zellen, die auf unbeschichteten Platten (nativ) inkubiert wurden, teilweise erzielt. Die Lyse der vierfachen Menge exp. $\gamma\delta$ T-Zellen ohne Zugabe von NK-Zellen sank durch Vorinkubation mit hlgG ebenfalls, allerdings nicht signifikant, und wurde durch CD137-Blockade nicht weiter reduziert. Es fiel zudem auf, dass ohne Zugabe von CH14.18 die Lyse der NK-Zellen, die mit exp. $\gamma\delta$ T-Zellen koinkubiert wurden, unter CD137-Blockade und hlgG-Vorstimulation keine Lyse mehr vermitteln konnten, besonders in den Mischungsverhältnissen 0,5:1 und 0,125:1 (exp. $\gamma\delta$ T-Zellen:NK-Zellen).

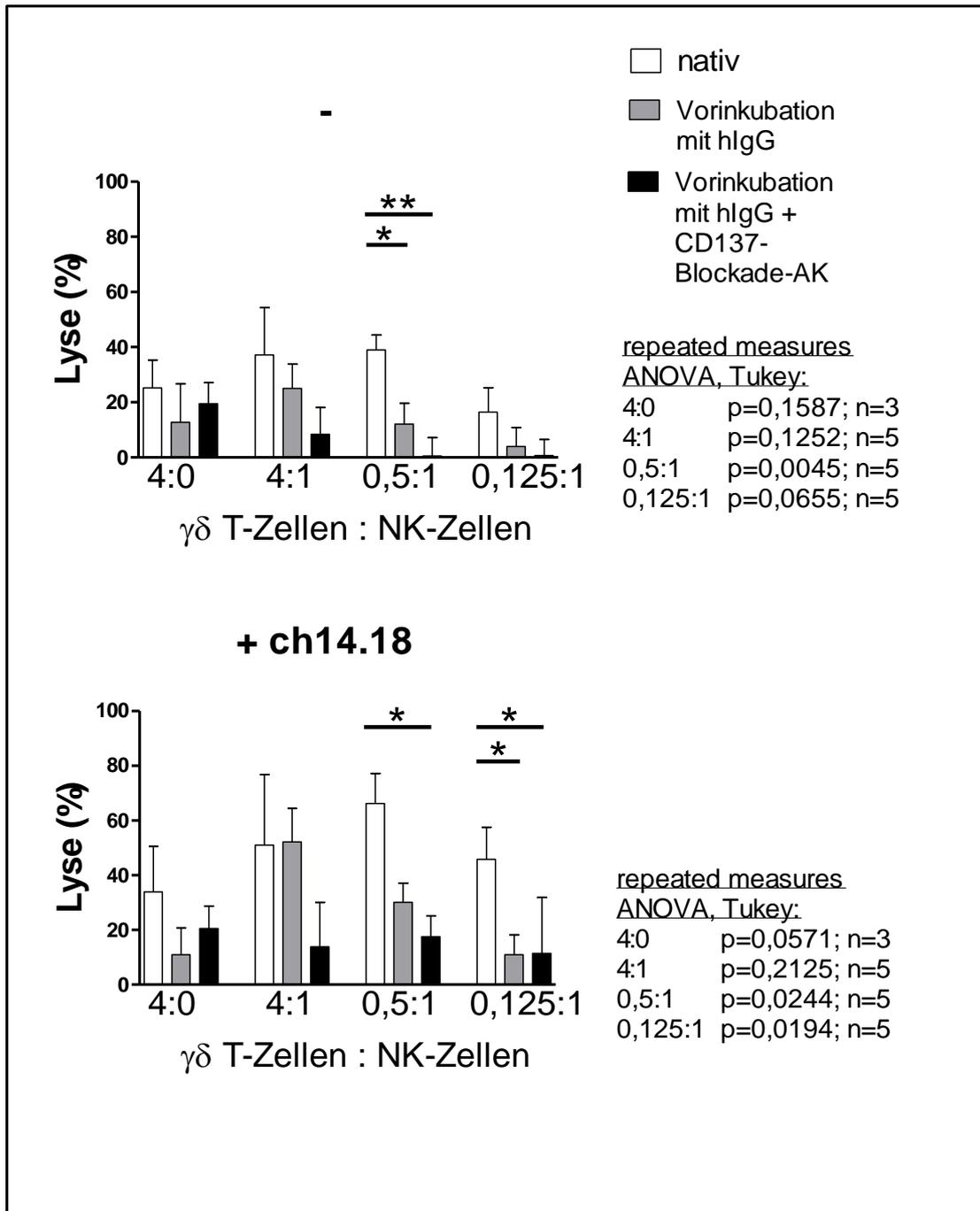


Abb. 3-32 Wirkung einer CD137-Blockade auf die spontane Lysefähigkeit und ADCC von NK- und exp. γδ T-Zellen

Frisch isolierte NK-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an exp. γδ T-Zellen wurden für 24 Stunden auf unbeschichteten oder auf hlgG-beschichteten Platten mit einer CD137-Blockade inkubiert und anschließend gegen die Neuroblastomzelllinie LS unter Verwendung des Antikörpers CH14.18 für 24 Stunden auf ihre Lysefähigkeit getestet. Die Zahl der NK-Zellen betrug dabei stets 15.000, während die exp. γδ T-Zellen in variabler Zahl in einem Verhältnis von 4:1, 0,5:1 und 0,125:1 mit den NK-Zellen koinkubiert wurden. Die Zahl der exp. γδ T-Zellen allein betrug das

Vierfache der NK-Zellen, also 60.000. Die Zahl der Targetzellen betrug zu Beginn 15.000. Die Effektoren wurden bei Erreichen des Zellindex 1 zu dem in der Grafik dargestellten Zeitpunkt 0 hinzugegeben. An dem in der Grafik dargestellten Zeitpunkt von 8 Stunden wurden die Lysewerte mit und ohne CD137-Blockade verglichen.

3.4.9 Analyse der spontane Lysefähigkeit von exp. $\gamma\delta$ T-Zellen mittels fluoreszierender Targetzellen

Wie die in den vorherigen Abschnitten beschrieben, sind exp. $\gamma\delta$ T-Zellen in der Lage Targetzellen zu lysieren. Um zu evaluieren, ob dies durch direkten Zell-Zell-Kontakt oder auf anderem Wege möglich ist, wurde ein weiterer Versuch für die genauere Untersuchung durchgeführt. Die Targetzelllinie NALM-16 wurde lentiviral stabil transduziert und exprimierte Luciferase und mCherry konstitutiv. Es zeigte sich eine gut nachweisbare Fluoreszenz, die unter anderem im TexasRed / PE oder PE-Dynamics Kanal (BD LSR II™) detektierbar war. Diese Targetzellen NALM-16-mCherry-Luc wurden mit exp. $\gamma\delta$ T-Zellen für 10 Stunden mit einer E:T von 10:1 inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch beurteilt. **Abb.3-33** zeigt exemplarische Ergebnisse der FACS-Analyse. Nachdem tote Zellen mittels Lebend/Totfärbung exkludiert wurden, wurde die verbleibende Zellpopulation in der FSC-H/FSC-A-Darstellung auf Doubletten untersucht. Diese zeigen sich als Population, die von der Diagonalen abweicht. Diese als Doubletten identifizierte Population wurde mittels der Färbung von CD3 für die Identifizierung der exp. $\gamma\delta$ T-Zellen und der Eigenfluoreszenz der Targetzellen auf ihre Zusammensetzung untersucht. Dabei zeigten sich die Doubletten CD3⁺/NALM-16 mCherry⁺ doppelt positiv. Dies legt nahe, dass die Doubletten aus an Targetzellen gebundenen exp. $\gamma\delta$ T-Zellen bestehen.

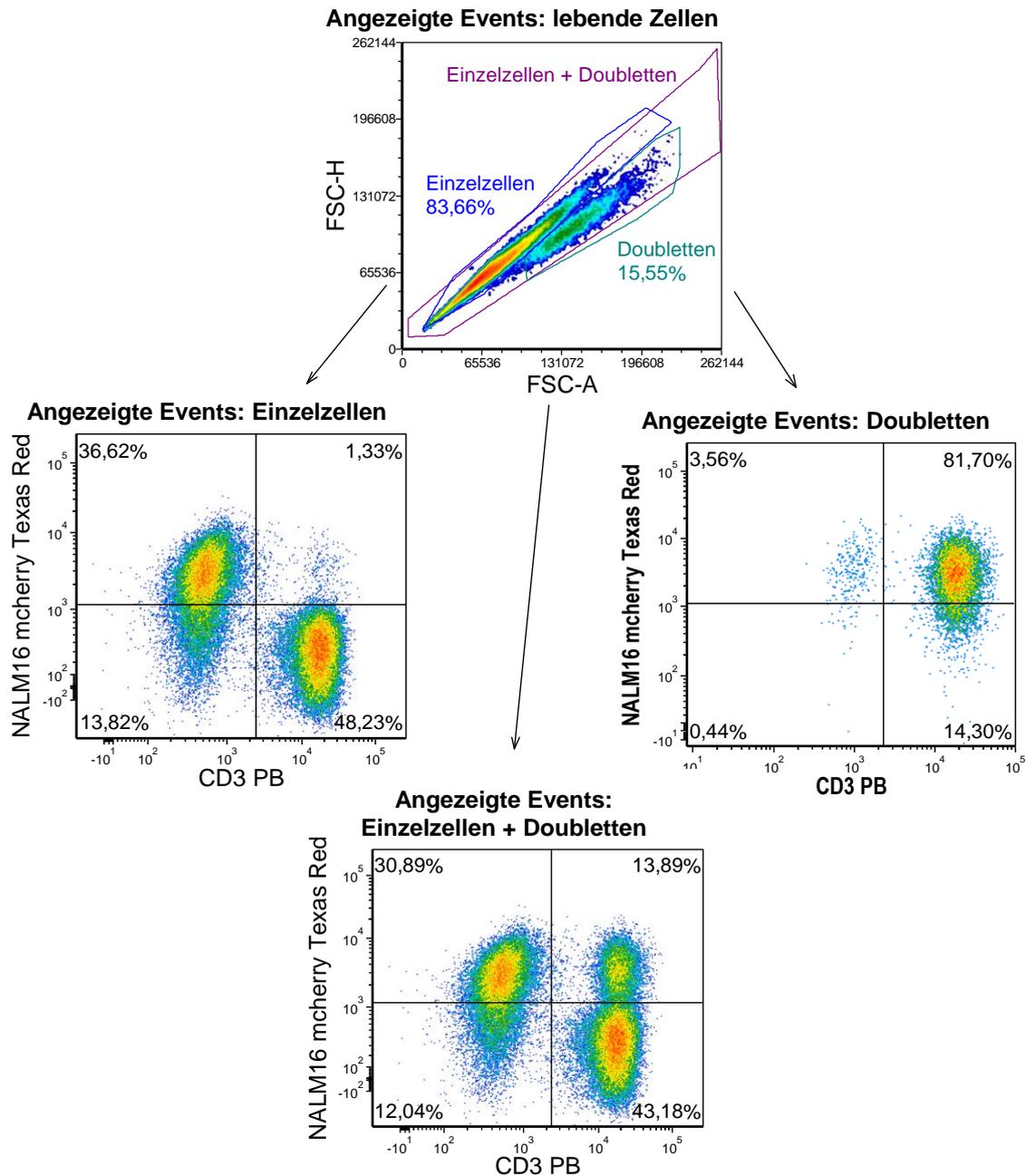


Abb. 3-33 Durchflusszytometrische Untersuchung des Lysemechanismus exp. $\gamma\delta$ T-Zellen
 Exp. $\gamma\delta$ T-Zellen wurden für 10 Stunden mit der Targetzelllinie NALM-16 mCherry, die eine Eigenfluoreszenz aufweist, bei einer E:T von 10:1 inkubiert. In der durchflusszytometrischen Analyse wurden tote Zellen mittels Lebend-/Tottfärbung exkludiert und Doubletten bzw. Einzelzellen in der FSC-H/FSC-A-Darstellung eingegrenzt. Durch Auftragen von TexasRed, in welchem die Targetzellen fluoreszieren, gegen CD3 für die Identifikation der exp. $\gamma\delta$ T-Zellen, konnten die Zellpopulationen auf ihre Zusammensetzung untersucht werden. Es zeigte sich, dass die Doubletten doppelt-positiv für CD3 und NALM-16 mCherry waren.

3.4.10 Analyse der spontanen Lysefähigkeit und ADCC von exp. $\gamma\delta$ T-Zellen und exp. NK-Zellen im Luciferase-Assay

Mithilfe des Luciferase Assays konnte die Lyse und ADCC exp. $\gamma\delta$ T-Zellen mit der Lyse exp. NK-Zellen im Zeitverlauf gegenüber verschiedener Targetzelllinien analysiert und verglichen werden. Als Targetzelllinien dienten dabei die BCP-ALL-Zelllinie NALM-6 (**Abb.3-34A**) und die Neuroblastomzelllinie LS (**Abb.3-34B**), unter Verwendung des CD19-4G7SDIE AK sowie dem GD2-Antikörper CH14.18. In der Mehrheit der Messungen lag sowohl die ADCC als auch die spontane Lysefähigkeit der exp. NK-Zellen gegenüber beider Targetzelllinien nach 12 Stunden und nach 24 Stunden im Vergleich zu den exp. $\gamma\delta$ T-Zellen signifikant höher. Der Mittelwert der spontanen Lyse und ADCC der exp. NK-Zellen war dabei in etwa doppelt so hoch wie der Mittelwert der durch die exp. $\gamma\delta$ T-Zellen vermittelte Lyse.

Im Rahmen des Versuchs wurde auch die Gesamtyse einer Mischpopulation aus exp. $\gamma\delta$ T-Zellen und NK-Zellen als Effektoren in einem Mischungsverhältnis von 4:1 bis 0,25:1 (exp. $\gamma\delta$ T-Zellen:exp. NK-Zellen) untersucht. Hierbei zeigte sich eine reduzierte Lyse im Verhältnis 4:1 (exp. $\gamma\delta$ T-Zellen:exp. NK-Zellen). Bei einem Mischungsverhältnis von 0,5:1 (exp. $\gamma\delta$ T-Zellen:exp. NK-Zellen) wurde die spontane Lyse und ADCC gegenüber NALM-6 und LS gesteigert.

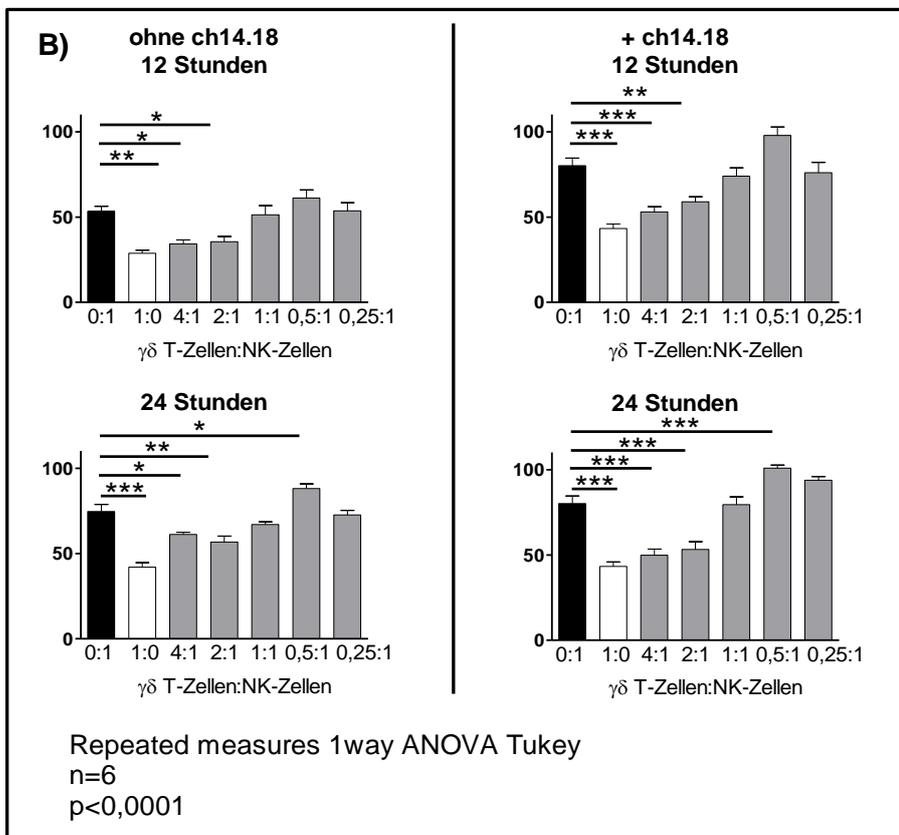
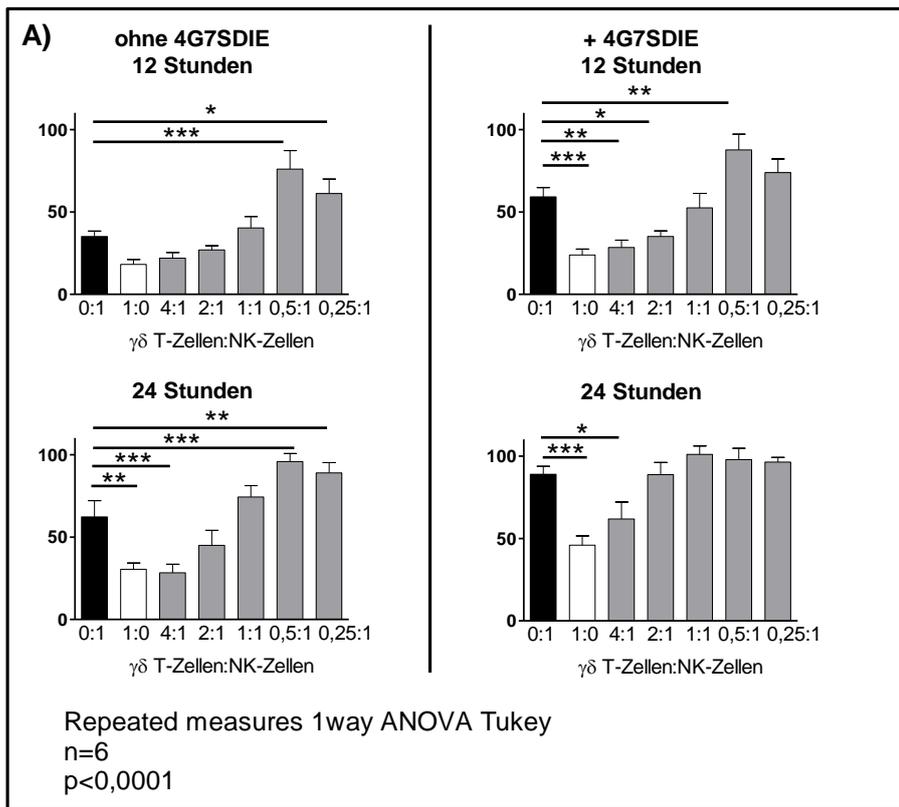


Abb. 3-34 Dosisabhängige Wirkung von exp. $\gamma\delta$ T-Zellen auf die spontane Lysefähigkeit und ADCC von exp. NK-Zellen

Expandierte NK-Zellen wurden in verschiedenen Verhältnissen mit exp. $\gamma\delta$ T-Zellen gegen **A** die BCP-ALL-Zelllinie NALM-6 oder die **B** Neuroblastomzelllinie LS mit und ohne Verwendung des Antikörpers CD19-4G7SDIE AK und bei LS mit dem GD2-AK CH14.18 im Luciferase-Assay auf ihre Lysefähigkeit getestet. Die Zahl der Effektoren betrug dabei 15.000, wobei diese entweder aus exp NK- bzw. exp. $\gamma\delta$ T-Zellen oder einer Mischung beider Zellpopulationen in einem Verhältnis von 4:1 bis 0,25:1 (exp. $\gamma\delta$ T-Zellen: NK-Zellen) bestand. Die Zahl der Targetzellen betrug zu Beginn 15.000. Die Messung der Fluoreszenz für die Berechnung der Targetzelllyse erfolgte nach 12 und 24 Stunden. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nur die Signifikanzen in Bezug auf die Lyse durch exp. NK-Zellen dargestellt.

4. DISKUSSION

Tumorerkrankungen stellen in Deutschland die häufigste natürliche Todesursache der unter 15-jährigen Kinder dar (138). Zu den häufigsten fünf Malignomen zählen Leukämien, Lymphome und Neuroblastome (136). Erleiden Patienten ein Rezidiv oder sprechen nicht auf die konventionelle Chemotherapie an, stellt besonders bei den Leukämien die allogene SZT oft die einzige kurative Therapie dar (8). Aber auch beim Neuroblastom Stadium IV Rezidiv bietet die allogene SZT bei ansonsten infauster Prognose eine kurative Therapiemöglichkeit (3, 4). Das Rezidiv nach Transplantation stellt die häufigste Todesursache nach einer allogenen SZT dar, die es unbedingt zu verhindern gilt (8). Es bedarf der steten Optimierung der allogenen Stammzelltransplantation, um transplantationsassoziierte Risiken und insbesondere Rezidive zu mindern. Die haploidente TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletierte allogene SZT ist eine in Tübingen mitentwickelte Weiterentwicklung der haploidenten Stammzelltransplantation (38).

In den Anfängen der haploidenten SZT wurden nur Stammzellen transplantiert, indem CD34-angereicherte Transplantate verwendet wurden (16). Um die Zeit der Immunrekonstitution zu überbrücken und das Engraftment zu verbessern (7, 21, 22) wurden in der Folgezeit mittels CD3/CD19-Depletion neben CD34⁺ Stammzellen auch adulte Immunzellen wie NK- und Dendritische-Zellen transplantiert. (23-25).

Bei der TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletierter allogenen SZT werden, im Gegensatz zu den früher durchgeführten CD34-Anreicherungen oder CD3/19-Depletionen, die $\gamma\delta$ T-Zellen im Stammzellpräparat belassen und mittransplantiert. Die TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletierte allogene SZT ermöglicht eine deutlich schnellere und robustere Regeneration von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen, im Verlauf auch von $\alpha\beta$ T-Zellen (37). NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen sind potente Effektorzellen. Sie sind in der Lage, Antikörper-markierte Zellen mittels ADCC zu erkennen und zu lysieren (30, 82, 83, 140, 159). Einige Studien beschrieben zudem eine Interaktion zwischen NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen (33, 35, 36).

Bei der haploidenten TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletierten allogenen SZT werden NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen mittransplantiert, womit die Interaktion dieser beiden Zellpopulationen ermöglicht wird (37). Die unmittelbar posttransplant erhöhten Effektorfunktionen von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen sowie deren Interaktion (33) könnten das Rezidivrisiko senken und hierdurch das Gesamtüberleben verbessern. Ein genaues Verständnis der Effektorfunktionen von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen sowie deren Interaktion ist essentiell, um diese therapeutisch optimal nutzen zu können und gegebenenfalls deren Antitumoraktivität durch Medikamente und/oder Antikörper noch weiter zu steigern, wie beispielsweise mit dem CD19 4G7SDIE-AK oder Zoledronat (29, 33, 82).

Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich, dass $\gamma\delta$ T-Zellen nicht nur befähigt sind NK-Zellen zu stimulieren, sondern vice versa NK-Zellen auch $\gamma\delta$ T-Zellen. Diese bidirektionale proaktivierende Interaktion resultiert in einer erhöhten Aktivität und Effektorfunktionen beider Zellpopulationen, wie Zytokinproduktion durch $\gamma\delta$ T-Zellen. Die Stärke dieses Effekts ist vom Verhältnis der $\gamma\delta$ T-Zellen zu den NK-Zellen abhängig. Bei der bidirektionalen Interaktion zwischen NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen spielt der kostimulierende Rezeptor CD137 und CD137L eine wichtige Rolle (33). Außerdem legen die durchgeführten Experimente nahe, dass es noch weitere Interaktionsmechanismen zwischen $\gamma\delta$ T-Zellen und NK-Zellen geben könnte.

Die Verwendung vorstimulierter Zellen, beispielsweise durch hIgG, führt zu einer vermehrten Expression von CD137 und lässt die gegenseitige Aktivierung der Zellen daher am besten in Erscheinung treten (33). Nach Stimulation mit Bisphosphonaten, aktivieren $\gamma\delta$ T-Zellen NK-Zellen (36) und steigern, wie unsere Versuche darüber hinaus zeigen, die Zytokinproduktion von NK-Zellen. Durch $\gamma\delta$ T-Zellen kann zudem die ADCC von NK-Zellen mittels CD19-4G7SDIE AK gesteigert werden, wie diese Arbeit darlegt, was den Einsatz dieses Antikörpers sehr interessant macht.

Diese Ergebnisse sind besonders für Patienten nach allogener SZT von Interesse, da hier bedingt durch die minimale Tumorlast nach chemotoxischer Konditionierung ein gutes Verhältnis von Effektorzellen (NK und $\gamma\delta$ T-Zellen) zu

Tumorzellen vorliegt und restliche Tumorzellen immunologisch eradiziert werden können (90).

Für Patienten nach allogener SZT ist zudem der immuntherapeutische Ansatz mit Antikörpern von großem Interesse, da vorhandene Abwehrmechanismen gegen Tumorerkrankungen zielgerichtet gesteigert werden können (160). Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen von Patienten nach haploidenter TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletierter allogener SZT ADCC vermitteln und die antitumorale Aktivität bidirektional in beiden Effektorzellpopulationen durch die Interaktion von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen gesteigert wird (33).

4.1 Auswahl der Targetzelllinien und Messparameter

Die akute lymphatische Leukämie (ALL), insbesondere die B-phänotypische Vorläufer ALL (BCP-ALL), stellt die prädominant vorkommende Leukämieerkrankung im Kindesalter dar und ist die häufigste Indikation zu einer Stammzelltransplantation (136).

Aufgrund der Häufigkeit des ALL-Rezidivs, welches isoliert die vierthäufigste maligne Erkrankung im Kindesalter darstellt (201) wurde eine repräsentative pädiatrische BCP-ALL-Zelllinie (NALM-16) sowie eine Burkittlymphomzelllinie (Raji) für die Experimente verwendet. Des Weiteren wurde für das Neuroblastom, der häufigste solide extrakranielle Tumor im Kindesalter, die repräsentative Neuroblastomzelllinie LS verwendet (136).

Die Auswahl ermöglichte die Untersuchung zweier vollkommen unterschiedlicher Tumorentitäten, die beide im fortgeschrittenen Stadium mit einer allogenen Stammzelltransplantation kurativ behandelt werden können. Zudem kann bei beiden Tumorentitäten ein klinisch verfügbarer Fc-rekrutierender Antikörper eingesetzt werden (Fc-optimierten Antikörper CD19-4G7SDIE bzw. GD2 Antikörper CH14.18 /Dinutuximab beta) (3, 4, 37, 90, 151).

Wie bereits beschrieben, bestehen die Haupteffektorfunktionen von NK-Zellen in der direkten Targetzellyse und in der Zytokinproduktion (42, 45, 51). Auch $\gamma\delta$ T-Zellen können diese Effektorfunktionen ausüben (31, 60, 161). Um sich ein ganzheitliches Bild in der Messung einer Steigerung ihrer Antitumoraktivität bilden zu

können, wurden in dieser Arbeit beide Effektorfunktionen berücksichtigt. Die Targetzelllyse wurde sowohl direkt im FACS-basierten Kill-Assay, Luciferase-Assay und xCELLigence gemessen als auch indirekt über den Degranulationsmarker CD107a. CD107a verbleibt nach Freisetzung von Perforin- und Granzymvesikeln im Rahmen der Targetzelllyse an der Effektorzelloberfläche und bietet so ein geeignetes indirektes Maß über die Höhe der Zielzelllyse und Degranulation zytotoxischer Lymphozyten (155).

Die Zytokine TNF α und INF γ werden in NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen nach Aktivierung unter anderem durch Kontakt mit Tumorzellen gebildet. Es handelt sich um proinflammatorische Zytokine, welche die Immunreaktion gegen entartete Zellen steigern (162). Die Messung dieser beiden Zytokine bildet eine weitere wesentliche Effektorfunktion in der antitumoralen Aktivität von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen ab.

CD69 wird als kostimulatorisches Molekül auf einer Vielzahl von Immunzellen, unter anderem NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen bei Aktivierung innerhalb von Stunden exprimiert und kann daher als Frühaktivierungsmarker angesehen werden (163, 164). CD69 wurde als qualitativer und quantitativer Aktivierungsmarker von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen verwendet.

CD137 wird von stimulierten NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen exprimiert und dient während der Aktivierung als kostimulatorisches Molekül (133, 134). Da CD137 eine Rolle in der Interaktion zwischen NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen spielt, wurde die Expression dieses Oberflächenmoleküls quantifiziert (33).

4.2 Verhalten von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen unter Stimulation mit CD19-4G7SDIE AK

Antikörper sind mittlerweile in der Therapie verschiedener Malignome etabliert, beispielsweise Trastuzumab, gerichtet gegen das Zielantigen HER2, in der Behandlung des Mammakarzinoms (89). CD19 ist ein vielversprechendes Zielantigen für die Antikörpertherapie der B-phänotypischen ALL. CD19 wird exklusiv auf B-Zellen und deren Vorläuferzellen während aller Differenzierungsschritte bis hin zur Plasmazelle, die CD19 negativ sind, stabil exprimiert (91). Auch nach maligner Transformation von B-Zellen zu Leukämie- oder Lymphomzellen, ist CD19

häufig stabil exprimiert (91, 92). CD19 ist daher von großem Interesse in der Entwicklung neuer zielgerichteter Therapien wie Antikörpertherapien und CAR-T Zelltherapien (165). Mit dem FC-optimierten monoklonalen chimären CD19 IgG1 Antikörper 4G7SDIE wurde ein therapeutischer CD19-Antikörper für den breiten Einsatz bei B-phänotypischen Leukämien und Lymphomen entwickelt. CD19-4G7SDIE AK bindet hochaffin an CD19 auf Targetzellen (79). NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen erkennen opsonierte Tumorzellen, d.h. den gebundenen Antikörper auf Tumorzellen über den Fc γ IIIa Rezeptor CD16 (82, 160). Eine Antikörperbindung an CD16 löst in NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen ein Überwiegen von aktivierenden Signalen aus und somit eine gerichtete Zytolyse sowie die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie TNF α und INF γ (82, 160). Zu beachten ist, dass CD16 nicht von allen NK- und $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen in gleichem Maße exprimiert wird. CD16 ist hauptsächlich auf CD56^{dim} NK- und Vy9V δ 2 T-Zellen zu finden, die aber jeweils die Hauptpopulation der im Blut zirkulierenden Zellen darstellen (54, 62, 86, 166). Die Hauptträger der CD19-4G7SDIE AK vermittelten ADCC sind CD56^{dim} NK-Zellen und Vy9V δ 2 T-Zellen (97). Bei einer Expansion von $\gamma\delta$ T-Zellen mit Zoledronat expandieren insbesondere die Vy9V δ 2 T-Zellen (29, 107, 117). Da diese Population CD16 exprimiert, sind mit Zoledronat-expandierte $\gamma\delta$ T-Zellen für die Untersuchung der ADCC geeignet. Durch die SDIE-Modifikation weist der Fc-Teil eine höhere Affinität zu CD16 auf, die etwa um den Faktor 100 höher liegt (96) und deshalb eine wesentlich stärkere Aktivierung vermittelt als nicht Fc-optimierte Antikörper (82, 90, 97, 98). Die Firma Morphosys vermarktet eine humanisierte Version des Antikörpers CD19-4G7SDIE AK unter der Bezeichnung MOR208. Er wird in mehreren klinischen Studien in der Therapie der refraktären CLL und des refraktären diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms evaluiert (167). Im Rahmen dieser Arbeit konnte anhand frisch isolierter PBMC bei gesunden Probanden und pädiatrischen Patienten nach haploidenter TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletierter SZT gezeigt werden, dass CD19-4G7SDIE AK die Aktivität von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen gegenüber der BCP-ALL-Linie NALM-16 zuverlässig in Hinblick auf CD69-, CD137- und CD107a-Expression sowie der Sekretion von INF γ und TNF α steigert (Abb.3-2/3/19). Dies deckt sich mit den bisherigen *in vitro* Daten, die mit CD19-4G7SDIE AK gegenüber den BCP ALL-Zelllinien NALM-6 und SEM

für die Aktivität von $\gamma\delta$ T-Zellen erhoben wurden (82). Auch die Höhe der durch CD19-4G7SDIE AK erzielten Lyse von PBMC gegenüber NALM-16 in dieser Arbeit (Abb.3-4) ist vergleichbar mit der Lyse gegenüber anderen BCP ALL-Zelllinien bei Seidel et al. (90).

NK-Zellen sind potente Vermittler der ADCC. Dies ist in der Literatur vielfach belegt (83, 160). Die funktionellen Daten aus den durchgeführten Experimenten zeigen, dass NK-Zellen mit dem CD19-4G7SDIE AK effektiver ADCC vermitteln als $\gamma\delta$ T-Zellen. Dies erschließt sich durch eine deutlich höhere Expression von CD69-, CD137- und CD107a auf NK-Zellen, höhere Level an TNF α und INF γ und höhere Lysewerte (Abb.3-2/3/19) bei Koinkubation mit NALM16 und CD19-4G7SDIE AK. Wie bereits beschrieben und auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte (Abb.3-2/3), vermitteln $\gamma\delta$ T-Zellen ebenfalls eine gute ADCC (82, 168), auch wenn diese im direkten Vergleich mit NK-Zellen geringer ausfällt. Die immunologische Tumorkontrolle ergibt sich aus der Summe der antitumoralen Aktivität aller Immunzellen, so auch der NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen. Durch die spontane Lysefähigkeit und die Möglichkeit Tumorzellen durch therapeutische Antikörper für NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen sichtbar zu machen, können starke antitumorale Effekte durch NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen direkt nach haploidenter TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletierter allogener SZT erreicht werden (82, 90, 101, 145, 151). Dies ist besonders effizient möglich, da diese beiden Zellpopulationen im Stammzellpräparat in hohen Zahlen belassen werden können und sich nach Transplantation hervorragend regenerieren, ohne dabei die gefürchtetste Komplikation nach Transplantation, die GvHD, auszulösen (37). Die Zellzahlen liegen im Durchschnitt bei 75×10^6 /kgKG für NK-Zellen und bei $11,5 \times 10^6$ /kgKG für $\gamma\delta$ T-Zellen (169).

Neben der bereits erwähnten spontanen Lysefähigkeit und ADCC durch $\gamma\delta$ T-Zellen spielen $\gamma\delta$ T-Zellen auch bei der NK-Zell-vermittelten ADCC eine Rolle (33). Maniar et.al zeigte, dass sich die ADCC von PBMC gegen Lymphom- und Kopf-/Halstumor-Zelllinien unter Verwendung der Antikörper Rituximab bzw. Cetuximab nach Depletion von $\gamma\delta$ T-Zellen verschlechterte. Um diesen Effekt zu erzielen, wurden die PBMC zusätzlich mit Zoledronat stimuliert (33). In dieser Arbeit konnte der Einfluss von $\gamma\delta$ T-Zellen auf die NK-Zell vermittelte ADCC ebenfalls beobachtet werden. So wurde nach Depletion von $\gamma\delta$ T-Zellen aus

PBMC, unter Stimulation mit CD19-4G7SDIE AK, eine verminderte INF γ -Sekretion und eine signifikant verringerte CD107a Expression der NK-Zellen gegenüber NALM-16 und eine geminderte Lyseaktivität von Raji durch PBMC gemessen (Abb.3-10/11). Anders als bei Maniar et al. war für diesen Effekt allerdings keine Stimulation der PBMC mit Zoledronat notwendig. Eine Erklärung für diese Beobachtung könnte das kostimulatorische Oberflächenmolekül CD137 sein. Die Expression von CD137 auf NK-Zellen wird unter Stimulation mit CD19-4G7SDIE AK signifikant gesteigert (Abb.3-19). Wie in den kommenden Abschnitten noch thematisiert wird, bildet die Interaktion zwischen CD137 auf NK-Zellen und CD137L auf $\gamma\delta$ T-Zellen die Basis für eine Stimulation von NK-Zellen durch $\gamma\delta$ T-Zellen (33). Der CD19-4G7SDIE AK erhöht die CD137-Expression ausreichend, sodass eine Interaktion zwischen NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen auch ohne Vorstimulation mit Zoledronat erfolgt (Abb3-10/11/19).

Der CD19-4G7SDIE AK wird auch bei Patienten nach haploidenter TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletierter allogener SZT eingesetzt (90). Wichtig für eine erfolgreiche Antikörpertherapie ist, dass NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen ihre Funktion zu ADCC auch nach Transplantation behalten. In der Untersuchung von PBMC aus 28 Blutproben pädiatrischer Patienten nach haploidenter TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletierter SZT konnte gezeigt werden, dass durch CD19-4G7SDIE AK eine zuverlässige Steigerung der Effektorfunktionen erfolgt. Sowohl die Lyse der Targetzelllinie NALM-16 konnte unter Zusatz von CD19-4G7SDIE AK signifikant erhöht werden als auch die Expression von Aktivierungsmarkern auf NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen sowie die Zytokinsekretion durch NK-Zellen (Abb.3-5/6). Auch Seidel et al. konnten bei Patienten nach haploidenter TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletierter SZT ein Ansprechen von $\gamma\delta$ T-Zellen auf den CD19-4G7SDIE beobachten (82).

Eine offene Frage war, ob die NK- und $\gamma\delta$ T-Zellfunktion nach SZT mit der gesunder Probanden vergleichbar ist. Dieser Vergleich ist Teil der vorliegenden Dissertationsarbeit. Leider erzielten Patienten nach haploidenter TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletierter SZT im Vergleich zu gesunden Probanden bei der Expression von Aktivierungsmarkern und der Zytokinproduktion sowohl von NK-Zellen als auch $\gamma\delta$ T-Zellen teils signifikant geringere Werte als gesunde Probanden (Abb.3-7/8). Eine verminderte Aktivierbarkeit von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen der Patienten könnte

daran liegen, dass Patienten nach SZT oftmals eine Vielzahl verschiedener Medikamente benötigen und dabei nicht ausgeschlossen werden kann, dass hierdurch die Immunfunktion als unbeabsichtigter Nebeneffekt beeinflusst wird. Die Beobachtung einer geminderten NK-Zellfunktion nach SZT im Vergleich zu gesunden Probanden deckt sich mit der Literatur, in der eine geminderte NK-Zellfunktion nach SZT mit CD3-depletierten Transplantaten in Bezug auf CD107a-Expression und INF γ -Sekretion beschrieben wurde (170, 171). Ein Erklärungsversuch wird anhand einer verminderten Expression des Transkriptionsfaktors T-box in NK-Zellen nach Transplantation vorgenommen, was in einer verringerten Freisetzung des Zytokins INF γ resultiert (172). Die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse beziehen sich allerdings nicht auf Patienten, die haploident TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletiert transplantiert wurden. Daher kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob dieser Mechanismus auch hier zutrifft. Zudem beschränkt sich der bisherige Vergleich der Effektorfunktion von NK-Zellen zwischen gesunden Probanden und Patienten nach SZT auf die Messung von Degranulationsmarkern und Zytokinen von NK-Zellen, während über die Funktion der $\gamma\delta$ T-Zellen und die effektive Targetzelllyse keine Aussage getroffen wurde (170, 171). Die für die Tumorkontrolle entscheidende Effektorfunktion von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen ist jedoch die Targetzelllyse. Diese wurde hier weiterführend zwischen Patienten nach SZT und gesunden Probanden verglichen. In der Targetzelllyse durch PBMC wurden keine Unterschiede zwischen gesunden Probanden und den TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletiert transplantierten Patienten beobachtet (Abb.3-9). Es scheint, dass eine ausreichende Aktivierung von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen relevant ist, jedoch für die am Ende erzielte Targetzelllyse in den durchgeführten Experimenten nicht entscheidend gewesen zu sein scheint. Es ist davon auszugehen, dass Patienten nach haploidenter TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletierter SZT eine klinisch relevante NK- und $\gamma\delta$ T-Zell-Effektorfunktion aufweisen. Die Zytokinproduktion scheint im Vergleich zu gesunden Probanden reduziert zu sein, bei allerdings vergleichbarer erhaltener Zytotoxizität. Ein weiterer wichtiger Punkt dabei ist, dass auch bei Patienten nach haploidenter TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletierter SZT $\gamma\delta$ T-Zellen die durch NK-Zellen vermittelte ADCC steigern können (Abb.3-10). Für gesunde Probanden wurde diese Interaktion zwischen NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen in

Bezug auf die ADCC in der Literatur bereits beschrieben (33), nicht aber für Patienten nach SZT. Wie diese Arbeit darlegt, resultiert eine Depletion von $\gamma\delta$ T-Zellen aus PBMC auch bei Patienten nach haploidenter TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletierter SZT in einer verminderten NK-Zell vermittelten ADCC (Abb.3-10).

Für den Patienten könnte dies bedeuten, dass durch das Vorhandensein der zusätzlichen Effektorzellpopulation der $\gamma\delta$ T-Zellen zum einen die antitumorale Aktivität grundsätzlich, aber vor allem in der Frühphase nach haploidenter TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletierter SZT deutlich gesteigert werden kann. Überdies kann hierbei durch die Interaktion von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen eine verbesserte Leukämiekontrolle, im Sinne eines zielgerichteten Graft versus Leukemia Effekts erzielt werden (205).

In der klinischen Anwendung konnte CD19-4G7SDIE bei Patienten mit Restleukämie auf MRD-Niveau (MRD = minimale Resterkrankung) im Kontext der allogenen SZT bei 10 von 14 Patienten die MRD um mindestens ≥ 1 Logstufe, d.h. Faktor 10 senken. Das Nebenwirkungsprofil war überschaubar und konnte meist nicht direkt mit der AK-Applikation in Verbindung gebracht werden. Entsprechend CTCAE 5.0 Version, der Klassifikation unerwünschter Nebenwirkungen, traten Grad I und II Nebenwirkungen, wie vorübergehende Übelkeit, Fieber und Kopfschmerzen auf. Lebensbedrohliche Komplikationen hingegen traten bei keinem Patienten auf (90, 205). Der prophylaktische Einsatz bei 15 weiteren Patienten ergab erfreulicherweise ebenfalls nur geringgradige Nebenwirkungen und ein, im behandelten Hochrisikokollektiv nach ≥ 2 haploidenten SZT, ereignisfreies Überleben $> 50\%$. In einer historischen Kontrollgruppe lag das Gesamtüberleben im Vergleich bei 20% (205).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass antitumorale Effekte nach allogener Knochenmark- oder Stammzelltransplantation durch therapeutische Antikörper klinisch relevant gesteigert werden können (90, 145). Dieser Effekt kann auch bei Patienten nach haploidenter TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletierter SZT erreicht werden, wie hier gezeigt wurde. CD19-4G7SDIE AK steigert sowohl bei gesunden Probanden als auch bei pädiatrischen Patienten nach haploidenter TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletierter SZT zuverlässig die Effektorfunktionen von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen durch ADCC. Darüber hinaus erhöhen $\gamma\delta$ T-Zellen die NK-Zell-vermittelte ADCC. Insbesondere

die TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletierte haploidente SZT eignet sich für den frühen Einsatz therapeutischer Antikörper, da eine große Anzahl an Effektorzellen wie NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen im Transplantat belassen werden und mit der Transplantation eine antitumorale Immunität auf den Patienten übertragen werden kann (169). Die schnelle und robuste Immunrekonstitution von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen ermöglicht in Kombination mit Antikörpern frühzeitig und anhaltend, die antitumorale Aktivität aufrechtzuerhalten und zielgerichtet zu steigern (37).

4.3 Verhalten von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen unter Stimulation mit IL2 und Zoledronat

Das synthetisch hergestellte Bisphosphonat Zoledronat wird in der Tumorthera- pie klassischerweise bei osteolytischen Knochenmetastasen z.B. bei Mammakarzinom oder Prostatakarzinomen, für die Behandlung von Knochen- schmerzen und zur Abwendung möglicher Instabilitäten durch Osteoklastenakti- vität eingesetzt. Zoledronat übt dabei seine Wirkung über eine Hemmung der Osteoklasten aus (103, 105, 106). Seitdem in den 90-iger Jahren zufällig entdeckt wurde, dass Zoledronat zusätzlich zu einer Aktivierung und Expansion von $\gamma\delta$ T- Zellen führt, ist auch dieser Aspekt Gegenstand der Forschung und wird gezielt in der Tumorthera- pie eingesetzt (107, 114). Wie bereits in der Einleitung be- schrieben, führt Zoledronat zur Inhibition des Enzyms FppS im Mevalonatweg. Neben Osteoklasten kann Zoledronat auch in Tumorzellen und Monozyten wir- ken, wenn es durch Endozytose aufgenommen wird (67, 107, 119). Die daraus resultierende Akkumulation von IPP in diesen beiden Zellgruppen wird von Vy9V δ 2 T-Zellen über den TcR erkannt und kann auf diese Weise eine Aktivitäts- steigerung und Expansion dieser Zellen anregen (29, 107, 114, 115, 117, 119). Neue Erkenntnisse lassen vermuten, dass intrazellulär akkumuliertes IPP vom TcR der Vy9V δ 2 T-Zellen über BTN3A1, einem Protein aus der Familie der Ig- Rezeptoren, erkannt wird (112, 113). Eine intrazelluläre Akkumulation von IPP führt zu einer Konformationsänderung des extrazellulären Anteils von BTN3A1, das transmural von diesen Zellen exprimiert wird (72). Durch diese Konformati- onsänderung wird eine Bindung von BTN1A3 an den Vy9V δ 2 TcR möglich, die in einer Aktivierung der Vy9V δ 2 resultiert (72, 112, 113).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass $\gamma\delta$ T-Zellen bei Koinkubation mit Zoledronat und verschiedenen Tumorentitäten, wie BCP-ALL und BZ-Lymphom, rasch eine Expression von CD69 und CD137 induzieren (Abb.3-15/16). Die Expression des Degranulationsmarkers CD107a sowie die Ausschüttung von TNF α und INF γ erreicht erst verzögert die höchste Expression (Abb.3-17). Die Aktivierung der $\gamma\delta$ T-Zellen wird durch Bisphosphonate induziert und ist bereits vielfach beschrieben (110, 114, 117). Eine spezifische Aktivierung der $\gamma\delta$ T-Zellen durch Zugabe der Targetzellen NALM-16 konnte bei hoher Grundaktivität im Beisein von Zoledronat nicht festgestellt werden. Eine Aktivitätserhöhung von $\gamma\delta$ T-Zellen durch maligne Zellen unter Stimulation mit Zoledronat ist abhängig davon, ob Tumorzellen Zoledronat durch Endozytose aufnehmen können. Die Endozytose von Bisphosphonaten ist Voraussetzung für die Inhibition des intrazellulären Mevalonatweges, die zur Akkumulation von IPP führt und in einer spezifischen Stimulation von $\gamma\delta$ T-Zellen resultiert. Für Tumorzellen, wie die Burkittlymphomzelllinie Daudi, wurde dies gezeigt (67). In den durchgeführten Versuchen war die Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen durch Zoledronat so hoch, dass NALM-16 das Aktivitätsniveau der $\gamma\delta$ T-Zellen nicht mehr wesentlich steigerte, da bereits die Prästimulation zu einer massiven Aktivitätserhöhung führte (Abb.3-16/17). Wie stark Zoledronat $\gamma\delta$ T-Zellen aktiviert, zeigt sich beispielsweise daran, dass $\gamma\delta$ T-Zellen unter Stimulation mit Zoledronat signifikant mehr CD69 exprimieren als unter Stimulation mit dem CD19-4G7SDIE AK (Abb.3-16). Auch Nussbaumer et al. konnten ohne Zugabe von Targetzellen eine erhöhte Zytokinproduktion von $\gamma\delta$ T-Zellen feststellen (173).

Die meisten Autoren sind sich einig, dass in Abwesenheit von Tumorzellen, Monozyten notwendig sind, um den stimulierenden Effekt von Zoledronat auf $\gamma\delta$ T-Zellen zu vermitteln (110, 112, 113, 119, 178). Wurden Monozyten-depletierte PBMC mit Zoledronat inkubiert, blieb eine Steigerung der Zytokinproduktion aus und auch eine Expansion von $\gamma\delta$ T-Zellen war nur in geringem Ausmaß und verzögert nachweisbar (173). Mittels Massenspektrometrie konnte zudem gezeigt werden, dass innerhalb der PBMC nur Monozyten nach Aufnahme von Zoledronat genügend IPP anreichern, um $\gamma\delta$ T-Zellen zu stimulieren (119). Nussbaumer

et al. spekulieren, dass Zoledronat $\gamma\delta$ T-Zellen potenziell auch ohne das Mitwirken von Monozyten stimulieren könnten, da $\gamma\delta$ T-Zellen die Fähigkeit zu APC besitzen. Somit müsste es möglich sein, dass auch $\gamma\delta$ T-Zellen Zoledronat mittels Endozytose aufnehmen können, woraus eine Akkumulation von IPP in $\gamma\delta$ T-Zellen resultieren würde, welches sich die $\gamma\delta$ T-Zellen dann gegenseitig präsentieren könnten, um sich gegenseitig zu stimulieren (173). Auch wenn noch Fragen offen sind, wie der aktivierende Effekt von Zoledronat an $\gamma\delta$ T-Zellen genau vermittelt wird, so besteht Einigkeit darüber, dass Zoledronat die Aktivität, Zytokinsekretion und Zytotoxizität von $\gamma\delta$ T-Zellen steigert, was durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt wird (71, 110, 117, 173).

Ein weiteres wichtiges Phänomen, das beschrieben wurde, ist, dass durch Zoledronat aktivierte $\gamma\delta$ T-Zellen NK-Zellen stimulieren können (36). Diese Interaktion resultiert in einer gesteigerten INF γ -Sekretion und erhöhten Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber verschiedenen Tumorzelllinien (33, 175). In dieser Arbeit konnte ebenfalls eine gesteigerte INF γ Produktion und CD107a-Expression als indirekter Marker für Zytotoxizität auf NK-Zellen durch Interaktion mit Zoledronat-stimulierten $\gamma\delta$ T-Zellen beobachtet werden (Abb.3-13/14). Darüber hinaus wurde nach einer ausreichend langen Inkubation von PBMC mit Zoledronat auch eine erhöhte CD69- und CD137-Expression sowie eine TNF α -Sekretion von NK-Zellen beobachtet (Abb.3-13/14). Wie in der Literatur beschrieben, ließ sich der Effekt von Zoledronat auf NK-Zellen auf die vorherige Stimulation von $\gamma\delta$ T-Zellen durch Zoledronat zurückführen, und nicht auf eine direkte Wirkung von Zoledronat auf NK-Zellen (33, 175). Diese Schlussfolgerung begründet sich durch die Beobachtung, dass Zoledronat keine vermehrte Expression der gemessenen Parameter auf NK-Zellen auslöst, sobald $\gamma\delta$ T-Zellen aus den PBMC depletiert wurden (Abb.3-18). Ein weiteres Indiz für einen indirekten Mechanismus (Stimulation von NK Zellen durch $\gamma\delta$ T-Zellen) ist die zeitverzögerte Reaktion von NK-Zellen auf Zoledronat. $\gamma\delta$ T-Zellen zeigen schon nach 14 Stunden einen Aktivitätsanstieg durch Zoledronat, während NK-Zellen diese erst nach weiteren 24 Stunden zeigen (Abb.3-13/14/15/16). Diese Verzögerung der Aktivitätssteigerung der NK-Zellen könnte daher kommen, dass $\gamma\delta$ T-Zellen zunächst selbst durch Zoledronat

aktiviert werden müssen, bevor sie ihrerseits NK-Zellen direkt über Zell-Zell-Interaktion oder indirekt parakrin über Zytokinfreisetzung stimulieren (33, 36). Für eine durch Zoledronat-stimulierte $\gamma\delta$ T-Zellen vermittelte Steigerung der INF γ -Sekretion von NK-Zellen ist keine Zugabe eines Targets notwendig (175). In dieser Arbeit konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass für die Expression anderer Aktivierungsmarker und Zytokine ebenfalls keine Targetzellen erforderlich sind (Abb.3-13/14). Das Signal aktivierter $\gamma\delta$ T-Zellen reicht aus, um NK-Zellen zu präaktivieren. Alexander et al. konnten als Erste beobachten, dass mit Zoledronat stimulierte $\gamma\delta$ T-Zellen die Zytotoxizität von NK-Zellen erhöhen können. Ihre Beobachtungen im Rahmen einer 14-tägigen Stimulation von PBMC mit IL2 und Zoledronat führten sie auf eine Aktivierung der NK-Zellen durch $\gamma\delta$ T-Zellen durch lösliche Faktoren wie INF γ und TNF α zurück (36). In neueren Studien wurde die Interaktion zwischen NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen im Rahmen der Betrachtung eines kürzeren Zeitraums durch eine Zell-Zell-Interaktion über CD137 und CD137-Ligand (CD137L) erklärt (33). Unterstützt wird dies durch die hier gemachte Beobachtung, dass Zoledronat die CD137-Expression auf NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen erhöht (Abb.3-13/16). Auf die Interaktion von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen über CD137/CD137L wird an anderer Stelle noch einmal genauer eingegangen (Abschnitt 4.4).

Nussbaumer et al. wiesen darauf hin, dass für eine Anregung von NK-Zellen zu INF γ -Ausschüttung unter Stimulation mit Zoledronat neben dem Signal von $\gamma\delta$ T-Zellen auch IL18 aus Zoledronat-stimulierten Dendritischen Zellen notwendig ist (173). Dendritische Zellen und Monozyten können Zoledronat über Endozytose aufnehmen, was in Blockade des Mevalonatweges und einer Akkumulation von IPP in den Zellen resultiert. Aufgrund des dadurch bedingten Zellstress kommt es zu einer Ausschüttung des inflammatorischen Zytokins IL18 (173, 175). Wurden in dieser Arbeit PBMC mit Zoledronat stimuliert, kam es zu einer gesteigerten INF γ -Sekretion der NK-Zellen (Abb.3-14). Diese gesteigerte INF γ -Sekretion war nach Depletion von $\gamma\delta$ T-Zellen aufgehoben, obwohl Dendritische Zellen noch vorhanden waren (Abb.3-18). Der Einfluss von Dendritischen Zellen unter Stimulation mit Zoledronat scheint ohne das Vorhandensein von $\gamma\delta$ T-Zellen keine Aktivitätssteigerung der NK-Zellen bewirken zu können. Es lässt sich daraus

schließen, dass der Effekt von Zoledronat auf NK-Zellen im Wesentlichen von $\gamma\delta$ T-Zellen vermittelt wird.

Das inflammatorische Zytokin IL2 wird hauptsächlich von T-Zellen und Dendritischen Zellen im Rahmen einer Immunantwort produziert und kann die Aktivität und Expansion zahlreicher Immunzellen, unter anderem von NK-Zellen, fördern (120, 126, 176, 177). Rekombinantes IL2 wird als Immunstimulans in der Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms und Melanoms eingesetzt. Der Einsatz bei anderen Malignomen wird untersucht (120). Im Rahmen von *in vitro* Analysen kann IL2 die Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber verschiedenen Tumorzelllinien, sowie die Expression von Aktivierungsmarkern wie CD69 und CD137 steigern (177, 178). In dieser Arbeit konnte dementsprechend durch Stimulation mit IL2 auch eine signifikante Steigerung dieser Aktivierungsmarker und der Zytokinproduktion von NK-Zellen gegenüber NALM-16 (Abb.3-13/14) sowie eine Steigerung der Targetzelllyse von PBMC gegenüber verschiedener hämatologischer Tumorzelllinien (Abb.3-12) beobachtet werden. IL2 kann auch von aktivierten $\gamma\delta$ T-Zellen sezerniert werden und diese auto- und parakrin zu Expansion und Zytokinproduktion anregen (60). In dieser Arbeit reagierten $\gamma\delta$ T-Zellen unter Stimulation mit IL2 lediglich mit einer leicht gesteigerten CD69-Expression (Abb.3-15). Alle anderen Parameter wie die Expression der Aktivierungsmarker CD137, CD69, CD107a und der Zytokine INF γ und TNF α zeigten keine Veränderung (Abb.3-16/17). Auch Cairo et al. beobachteten keine gesteigerte CD137-Expression auf $\gamma\delta$ T-Zellen unter Stimulation mit IL2 (178).

Während IL2 die NK-Zellen direkt über IL2-Rezeptoren auf der NK-Zelloberfläche aktiviert, wird der Effekt von Zoledronat indirekt über Zoledronat-aktivierte $\gamma\delta$ T-Zellen an NK-Zellen übermittelt (33, 178). Beide Stoffe führen somit auf unterschiedlichen Wegen zu einer Aktivitätssteigerung der NK-Zellen. Eine Stimulation von PBMC mit der Kombination aus beiden Stoffen könnte daher die Aktivierung der NK-Zellen potenzieren. Nussbaumer et al. konnten nach der Stimulation von PBMC mit IL2 und Zoledronat eine verstärkte Produktion von INF γ durch NK-Zellen beobachten (175). Wie bei Nussbaumer et al. wurde auch in dieser Arbeit

durch Inkubation von PBMC mit IL2 und Zometa eine erhöhte INF γ -Sekretion gemessen. Darüber hinaus zeigte sich nach der Inkubation von PBMC mit beiden Stoffen eine höhere Sekretion des Zytokins TNF α und höhere CD137-Expression der NK-Zellen (Abb.3-14/15) im Vergleich zu den Konditionen, in denen PBMC nur mit IL2 oder nur mit Zoledronat inkubiert wurden. Des Weiteren steigerte sich die Lyse der PBMC gegenüber NALM-16 (Abb.3-13) nach Inkubation mit IL2 und Zoledronat signifikant. In Hinblick auf die Erhöhung der Lysefähigkeit und Zytokinproduktion von NK-Zellen scheinen IL2 und Zoledronat synergistisch zu wirken. Nussbaumer et al. erklären die additive Wirkung beider Stoffe in Bezug auf eine gesteigerte INF γ -Sekretion von NK-Zellen über eine Interaktion von NK-Zellen mit Dendritischen Zellen (175). Wie bereits beschrieben, produzieren Dendritische Zellen unter Stimulation mit Zoledronat vermehrt IL18 (175). IL18 kann synergetisch mit IL2 die INF γ -Produktion von NK-Zellen steigern. Nach 48 Stunden wurde eine Terminierung der INF γ -Produktion durch NK-Zellen beschrieben, was mit dem Absterben der koinkubierten Dendritischen Zellen erklärt wird (175). In der vorliegenden Arbeit lag die INF γ -Produktion der NK-Zellen nach einer Inkubationszeit von PBMC mit Zoledronat und IL2 nach 38 Stunden allerdings bei einem höheren Wert als nach 14 Stunden. Dieser Unterschied mag eventuell darin begründet sein, dass bei Nussbaumer et al. die Inkubation ohne Targetzellen erfolgte, im Gegensatz zu dieser Arbeit, in der mit NALM-16 koinkubiert wurde. Ein alternatives Erklärungsmodell für den additiven Effekt von IL2 und Zometa auf die Zytokinproduktion von NK-Zellen könnte sein, dass die Kombination beider Stoffe die Stimulation von NK-Zellen durch $\gamma\delta$ T-Zellen verstärkt. Sowohl IL2 als auch indirekt Zoledronat führen zu einer gesteigerten CD137-Expression auf NK-Zellen, wie diese Arbeit zeigt und in der Literatur beschrieben wird (178). Mit IL2 und Zoledronat stimulierte $\gamma\delta$ T-Zellen exprimieren verstärkt CD137L (33). Die gesteigerte Expression von CD137 auf NK-Zellen und CD137L auf $\gamma\delta$ T-Zellen durch die Kombination von IL2 und Zoledronat könnte eine verstärkte Stimulation von NK-Zellen durch $\gamma\delta$ T-Zellen ermöglichen, da diese Oberflächenmoleküle maßgeblich an der Interaktion der beiden Zellgruppen beteiligt sind (33). Die verstärkte Interaktion von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen unter Einfluss

von IL2 und Zometa erklärt hinreichend die erhöhte Zytokinproduktion von NK-Zellen.

Die Kombination aus IL2 und Zoledronat konnte die Expression von Aktivierungsmarkern auf $\gamma\delta$ T-Zellen in der vorliegenden Arbeit zwar nicht stärker erhöhen als Zoledronat alleine, allerdings bietet die Kombination beider Stoffe die Möglichkeit Vy9V δ 2 T-Zellen zu expandieren (117). Durch eine Expansion von $\gamma\delta$ T-Zellen mit IL2 und Zometa (117) können $\gamma\delta$ T-Zellen in großer Zahl gewonnen werden und isoliert für Versuche verwendet werden. Eine Expansion von $\gamma\delta$ T-Zellen ermöglicht auch die Anwendung von $\gamma\delta$ T-Zellen zu therapeutischen Zwecken bei Tumorpatienten im Rahmen eines Transfers autologer exp. $\gamma\delta$ T-Zellen (29).

Zoledronat hat, verglichen mit anderen synthetischen Bisphosphonaten, den potentesten Effekt auf die Expansion von Vy9V δ 2 T-Zellen (110). Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Etablierung eines modifizierten Expansionsprotokolls, mit dem eine Reinheit von 86-96% an $\gamma\delta$ T-Zellen spenderunabhängig und zuverlässig erreicht wurde, sodass keine anschließende Anreicherung der $\gamma\delta$ T-Zellen für die Durchführung der Experimente erfolgte (33). Durch die Modifikation des Protokolls konnten höhere Reinheitsgrade an $\gamma\delta$ T-Zellen als mit anderen Expansionsprotokollen, z.B. von Cairo et al. oder Seidel et al. (82, 178), erreicht werden. Der Unterschied zu anderen Protokollen besteht darin, dass ab Tag neun eine tägliche, statt dreitägige Zellpflege unter Zugabe frischen, IL2-haltigen Mediums erfolgte und nur zu Beginn der Kultur einmalig 1 μ M Zoledronat zugegeben wurde. Bei Cairo et al. erfolgte im Gegensatz zu unserem Protokoll initial eine Zugabe von 0,5 μ M Zoledronat und die Zellpflege durchgehend dreitägig mit IL2-haltigem Medium, wobei ein geringerer Reinheitsgrad von 70-85% an $\gamma\delta$ T-Zellen erreicht wurde (178). Seidel et al. führte die Zellpflege zwei- bis dreitägig mit IL2- und zusätzlich zoledronathaltigem Medium (400nM Zoledronat) durch, wobei ein Reinheitsgrad von lediglich 32-60% an $\gamma\delta$ T-Zellen erzielt werden konnte (82). Unserer Erfahrung nach ist für ein optimales Expansionsergebnis eine tägliche Zellpflege ab der zweiten Expansionswoche mit IL2-haltigem Medium wichtig. Zudem ist eine initiale einmalige Zoledronatzugabe mit einer gesteigerten Dosis von 1 μ M Zoledronat vorteilhaft, um einen hohen Reinheitsgrad an $\gamma\delta$ T-Zellen zu

erreichen, anstatt einer täglichen Restimulation mit Zoledronat über den Expansionszeitraum.

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass Zoledronat $\gamma\delta$ T-Zellen aktiviert, wodurch diese wiederum über CD137 NK-Zellen stimulieren. Somit bewirkt Zoledronat eine Steigerung der Aktivität, Zytotoxizität und Zytokinproduktion beider Zellgruppen (33, 110). Zoledronat bietet daher das Potenzial in der Therapie von Patienten nach TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletierter allogener SZT die Effektorfunktionen von NK-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen gegen Malignomzellen, insbesondere in der Kombination mit IL2, zu steigern. Der Einfluss von IL2 auf andere Immunzellen, z.B. regulatorische T-Zellen, muss jedoch balanciert werden (181, 182).

4.4 Einfluss von $\gamma\delta$ T-Zellen auf NK-Zellen

Mehrere Autoren beschreiben eine Interaktion zwischen $\gamma\delta$ T-Zellen und NK-Zellen (33, 36). Auch in dieser Arbeit steigerten $\gamma\delta$ T-Zellen die NK-Zell-vermittelte ADCC. Insbesondere die Prästimulation von $\gamma\delta$ T-Zellen mit Zoledronat führte zu einer erhöhten Zytotoxizität und Zytokinproduktion von NK-Zellen. Durch Verwendung exp. $\gamma\delta$ T-Zellen und aus Vollblut isolierter NK-Zellen, war eine isolierte Betrachtung der Interaktion zwischen NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen möglich, da etwaige Einflüsse und Störfaktoren anderer in der PBMC-Fraktion enthaltener Immunzellen auf die Interaktion dieser Zellen verhindert wurde. Bisherigen Erkenntnissen zufolge, interagieren NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen über CD137-CD137L, wie bereits mehrfach erwähnt wurde (33). Eine Inkubation mit auf Plastik immobilisiertem hlgG erhöht die CD137 Expression auf NK-Zellen (33). Dies wurde in den Messungen der vorliegenden Arbeit bestätigt. Darüber hinaus kam es durch hlgG zu einer vermehrten CD137-Expression auf $\gamma\delta$ T-Zellen (Abb.3-23). Somit könnte eine Interaktion zwischen NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen nach Inkubation mit hlgG durch erhöhte CD137-Expression forciert werden. Eine Inkubation mit immobilisiertem hlgG erhöht allerdings auch die unspezifische Aktivität von NK-Zellen, was berücksichtigt werden muss (33). Das auf Plastik immobilisierte hlgG wird von CD16 auf NK- bzw. $\gamma\delta$ T-Zellen gebunden und löst so eine unspezifische Aktivierung dieser Zellen aus (166, 183), was zu einer Erhöhung der Aktivierungsmarker, wie

beispielsweise CD69 und CD54, auf NK-Zellen führt. Die unspezifische Aktivierung durch immobilisiertes hlgG führte in den durchgeführten Experimenten zu einer gesteigerten CD107a-Expression auf NK-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen (Abb.3-25). Therapeutische Antikörper, wie beispielsweise der CD19-4G7SDIE AK und der GD2-CHCH14.18 AK, aktivieren NK-Zellen antigenspezifisch (160). Vergleicht man die Expression des Aktivierungsmarkers CD107a und die Zytokinproduktion von NK-Zellen, die mit hlgG und dem CD19 4G7SDIE AK inkubiert wurden mit der von NK-Zellen, die nur mit 4G7SDIE inkubiert wurden, so zeigt sich kein Unterschied zwischen den Gruppen (Abb.3-25). Der CD19 4G7SDIE Antikörper aktiviert die NK-Zellen somit so stark, dass die Aktivierung durch hlgG nicht mehr zum Tragen kommt. Dies zeigt einmal mehr, wie potent der Fc-optimierte CD19-4G7SDIE AK NK-Zellen aktivieren kann.

Maniar et al. zeigten, dass exp. $\gamma\delta$ T-Zellen nach Inkubation auf hlgG-beschichteten Platten die Aktivität und Zytotoxizität von frischen NK-Zellen erhöhen (33). Auch in unseren Experimenten steigerten exp. $\gamma\delta$ T-Zellen die CD107a-Expression auf NK-Zellen als indirektes Maß für Zytotoxizität nach Inkubation mit hlgG (Abb.3-26). Ohne Präinkubation auf hlgG-beschichteten Platten zeigte sich diese Tendenz ebenfalls, allerdings aufgrund der geringeren CD137-Expression erwartet (33), weniger ausgeprägt. Wie bereits bei der Interaktion von Zoledronat-stimulierten $\gamma\delta$ T-Zellen scheint der Einfluss exp. $\gamma\delta$ T-Zellen auf NK-Zellen nach Inkubation mit hlgG so stark zu sein, dass exp. $\gamma\delta$ T-Zellen NK-Zellen auch ohne Zugabe eines Targets aktivieren können. So resultiert die Inkubation exp. $\gamma\delta$ T-Zellen mit NK-Zellen nach Stimulation mit hlgG auch ohne Target in einer verstärkten Expression der Aktivierungsmarker CD69 und CD54 auf NK-Zellen (33) oder wie in unseren Versuchen mit einer erhöhten CD107a-Expression (Abb.3-26).

Wichtig ist dabei festzuhalten, dass die Wirkung von exp. $\gamma\delta$ T-Zellen auf NK-Zellen vom Verhältnis der beiden Zellpopulationen zueinander abhängig ist (33). In unseren Untersuchungen führte die Zugabe von exp. $\gamma\delta$ T-Zellen im Verhältnis 0,5:1 und 0,125:1 ($\gamma\delta$ T-Zellen:NK-Zellen) zu einer signifikant höheren CD107a-

Expression der NK-Zellen als ohne Zugabe von $\gamma\delta$ T-Zellen (Abb.3-26), insbesondere unter Verwendung des CD19-4G7SDIE AK. Ein Verhältnis von 4:1 ($\gamma\delta$ T-Zellen:NK-Zellen) hingegen verschlechterte die CD107a-Expression der NK-Zellen und auch die Zytokinsekretion (Abb.3-26). Maniar et al. definieren ein Verhältnis von 0,5:1 ($\gamma\delta$ T-Zellen:NK-Zellen) als optimal (33). Allerdings wurde diese Aussage anhand der CD69- und CD45-Expression auf NK-Zellen getroffen und nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden statt wie hier nach 32 Stunden. Maniar et. al kamen überdies zu dem Schluss, dass eine zu geringe Konzentration an exp. $\gamma\delta$ T-Zellen, genauer gesagt ein Verhältnis von 0,005:1 ($\gamma\delta$ T-Zellen:NK-Zellen), die $\gamma\delta$ T-Zellen keinen stimulierenden Effekt mehr auf die NK-Zellen ausüben können. Diese geringe Konzentration an exp. $\gamma\delta$ T-Zellen wurde hier nicht untersucht, allerdings konnte in dieser Arbeit festgestellt werden, dass bei einem Verhältnis von 0,125:1 $\gamma\delta$ T-Zellen noch einen stimulierenden Einfluss auf NK-Zellen in Hinblick auf die CD107a-Expression haben (Abb.3-26). Der Einfluss eines Verhältnisses von exp. $\gamma\delta$ T-Zellen auf NK-Zellen größer als 1 wurde bei Maniar et al. nicht untersucht. Cairo et al. konnten allerdings eine durch exp. $\gamma\delta$ T-Zellen erhöhte CD69-Expression auf NK-Zellen noch bei einem Verhältnis von 1:1 der beiden Zellgruppen zueinander feststellen (178). In einem in dem Rahmen dieser Arbeit durchgeführten exemplarischen Versuch für die Titration des optimalen Verhältnisses von $\gamma\delta$ T-Zellen zu NK-Zellen entsprach die CD107a-Expression von NK-Zellen bei einem Verhältnis von 1:1 der Höhe der CD107a-Expression ohne Zugabe von exp. $\gamma\delta$ T-Zellen (Abb.3-21). Die obere Grenze des Verhältnisses von $\gamma\delta$ T-Zellen zu NK-Zellen, bei dem NK-Zellen noch von $\gamma\delta$ T-Zellen stimuliert werden, ist demnach von dem gemessenen Parameter abhängig und liegt in etwa bei einem Verhältnis von 1:1. Der Grund dafür, dass die Zugabe eines hohen Anteils an exp. $\gamma\delta$ T-Zellen keinen stimulierenden Effekt bzw. sogar hemmenden Effekt auf die NK-Zellaktivität haben könnte, könnten räumlich-sterische Effekte sein (184, 185). Es kann vermutet werden, dass bei $\gamma\delta$ T-Zellen im Überschuss NK-Zellen schlechter mit den Targetzellen interagieren und so nur einen geringeren zytotoxischen Effekt ausüben. Reduziert man das Verhältnis von $\gamma\delta$ T-Zellen zu NK-Zellen von 4:1 um den Faktor 8 auf 0,5:1, können die exp. $\gamma\delta$ T-Zellen die NK-Zellen stimulieren, ohne den Kontakt von NK- zu Targetzellen

zu behindern. Wird das Verhältnis an $\gamma\delta$ T-Zellen zu NK-Zellen zu weit reduziert, kann der Effekt von $\gamma\delta$ T-Zellen auf NK-Zellen nicht mehr objektiviert werden, wie von Maniar et al. (33) beschrieben. Dies ist wahrscheinlich dadurch bedingt, dass die geringe Anzahl an $\gamma\delta$ T-Zellen nicht in der Lage sind mit den NK-Zellen ausreichend zu interagieren, um eine messbare Aktivitätssteigerung der NK-Zellen hervorzurufen (33).

Die Beobachtung, dass NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen bei Koinkubation Zellkluster bilden (Abb. 3-24), wie sie von anderen Arbeitsgruppen ebenfalls beschrieben wurden, lassen eine Interaktion zwischen NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen über Zell-Zell-Interaktion vermuten (33, 178). Maniar et al. zeigten eine Interaktion von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen über CD137 und CD137L. Eine Stimulation der NK-Zellen durch $\gamma\delta$ T-Zellen über lösliche Faktoren konnten sie hingegen bei einer kurzzeitigen Inkubation ausschließen (33). In dieser Arbeit führte eine Blockade von CD137 zu einem signifikanten Rückgang der CD107a-Expression von NK-Zellen bei Koinkubation mit exp. $\gamma\delta$ T-Zellen (Abb.3-29). Dieser Aktivitätsrückgang zeigte sich sowohl bei Inkubation mit und ohne Targetzellen als auch bei Inkubation mit CD19-4G7SDIE AK. Nach CD137-Blockade wurde im Rahmen desselben Versuchsaufbaus bereits ein Rückgang der unspezifischen Aktivierung (CD54- und CD25-Expression) und eine reduzierte Lyse von Kopf/Halsmalignomzellen beschrieben (33). Die Versuche dieser Arbeit legen nahe, dass die Interaktion zwischen $\gamma\delta$ T-Zellen und NK-Zellen über CD137 bei der NK-Zell-vermittelten direkten Zytotoxizität und ADCC gegenüber der BCP-ALL-Zelllinie NALM-16 eine Rolle spielt. Die CD107a Expression von NK-Zellen alleine, ohne Zugabe von exp. $\gamma\delta$ T-Zellen, verminderte sich unter CD137-Blockade nicht (Abb. 3-29). Die verminderte CD107a-Expression von NK-Zellen unter CD137-Blockade entsteht somit nicht durch eine verminderte Aktivität der NK-Zellen unter CD137-Blockade generell, beispielsweise weil die Interaktion von NK-Zellen untereinander über CD137 inhibiert würde. Die Aktivitätsminderung der NK-Zellen entsteht vielmehr durch die verminderte Interaktion mit $\gamma\delta$ T-Zellen (33).

Der Grund für eine vermehrte Aktivität, Zytotoxizität und ADCC von NK-Zellen nach Interaktion mit $\gamma\delta$ T-Zellen könnte sein, dass die Interaktion zwischen CD137L auf $\gamma\delta$ T-Zellen mit CD137 auf NK-Zellen die NKG2D-Expression auf

NK-Zellen steigert (33). NKG2D gehört zu den potentesten proaktivierenden Rezeptoren auf NK-Zellen, dessen Liganden, beispielsweise MICA/B oder ULBP, auf virusinfizierten und/oder malignen Zellen exprimiert werden (186). Eine gesteigerte NKG2D-Expression erhöht somit das zytotoxische Potential von NK-Zellen. Cairo et al. beschrieben, dass exp. $\gamma\delta$ T-Zellen die Fähigkeit von NK-Zellen für die Lyse unreifer Dendritischer Zellen stimulieren können (178). Sie identifizierten die Oberflächenmoleküle „inducible T-cell costimulator“ (ICOS) auf exp. $\gamma\delta$ T-Zellen und ICOS-Ligand (ICOSL) auf NK-Zellen, als die für die Interaktion zwischen NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen verantwortlichen Moleküle in Bezug auf die Lyse Dendritischer Zellen. Eine Beteiligung von CD137/CD137L schlossen sie hingegen in diesem Kontext aus. Maniar et al. konnten allerdings keine vermehrte Expression von ICOS beobachten, weshalb sie diesen Mechanismus in der Interaktion zwischen exp. $\gamma\delta$ T-Zellen und NK-Zellen in der Tumorzellerkennung für unwesentlich einschätzten (33). Je nach Art des Targets scheinen unterschiedliche Interaktionsmechanismen zwischen NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen verantwortlich zu sein. Da in dieser Arbeit die Aktivitätssteigerung der NK-Zellen durch $\gamma\delta$ T-Zellen nach CD137-Blockade nahezu komplett aufgehoben war, kann vermutet werden, dass die Interaktion von CD137-CD137L direkt oder indirekt den Hauptmechanismus in der Erhöhung der CD107a-Expression gegenüber NALM16 darstellt (Abb.3-26).

Neben der Targetzelllyse ist die Zytokinproduktion eine weitere wesentliche Effektorfunktion von NK-Zellen (42, 45, 51). Fokussierten sich Maniar et al. auf das Zusammenspiel von exp. $\gamma\delta$ T-Zellen mit NK-Zellen in Bezug auf die NK-Zell vermittelte Zytotoxizität (33), so wurde in dieser Arbeit auch der Aspekt der Zytokinproduktion berücksichtigt. Die Zytokinproduktion durch NK-Zellen wurde bei Koinkubation von exp. $\gamma\delta$ T-Zellen und NK nicht gesteigert und wurde durch die Blockade von CD137 nicht beeinflusst (Abb.3-26). Dass $\gamma\delta$ T-Zellen NK-Zellen prinzipiell zu einer erhöhten Zytokinproduktion anregen können, ist im Zusammenhang mit einer Stimulation durch Zoledronat bekannt (187). So konnten auch in dieser Arbeit bei Stimulation von PBMC mit Zoledronat $\gamma\delta$ T-Zellen die NK-Zellen zu einer erhöhten Produktion von $\text{INF}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ anregen, besonders in

Zusammenspiel mit IL2 (Abb.3-14/18). Nussbaumer et al. beschreiben, dass $\gamma\delta$ T-Zellen NK-Zellen unter Einfluss von Zoledronat nur zu erhöhter INF γ Produktion stimulieren können, wenn sie durch IL18, sezerniert von Dendritischen Zellen, kostimuliert werden (173, 175). Werden ausschließlich NK-Zellen mit exp. $\gamma\delta$ T-Zellen inkubiert, können Dendritische Zellen keinen Einfluss auf die Interaktion nehmen. Der fehlende Einfluss Dendritischer Zellen über IL18 erklärt, dass $\gamma\delta$ T-Zellen die Zytokinproduktion durch NK-Zellen in dem Versuchsaufbau in dieser Arbeit nicht steigerte, obwohl sie dazu indirekt über Dendritische Zellen fähig sind.

Unter Stimulation mit CD19-4G7SDIE AK konnten $\gamma\delta$ T-Zellen die ADCC von NK-Zellen steigern (Abb.3-10/11). Darüber hinaus führte die Stimulation und Expansion von $\gamma\delta$ T-Zellen mit Zoledronat zu einer Aktivierungssteigerung von NK-Zellen (Abb.3-18). Dies entspricht dem bisherigen Kenntnisstand (33, 173, 175, 187), während die Interaktion zwischen $\gamma\delta$ T-Zellen und NK-Zellen im Hinblick auf die spontane Lysefähigkeit von NK-Zellen ohne vorherige Stimulation der $\gamma\delta$ T-Zellen durch Zoledronat nicht bekannt ist. Wie diese Arbeit zeigt, beeinflussen native $\gamma\delta$ T-Zellen aus dem Peripherblut ohne Präaktivierung durch Bisphosphonate und/oder präaktivierende Zytokine (IL2) nicht die spontane Lysefähigkeit von NK-Zellen (178). Dies erschließt sich aus der Beobachtung, dass die NK-vermittelte Lyse nach Depletion von $\gamma\delta$ T-Zellen gegenüber der Targetzelllinien NALM-16, Raji und K562 ohne vorherige Stimulation nicht verringert war (Abb.3-11). Es scheint, als müssten $\gamma\delta$ T-Zellen für eine relevante Interaktion mit NK-Zellen im durchgeführten Messzeitraum (< 48 Stunden) z.B. durch Zoledronat und/oder therapeutische Antikörper CD19-4G7SDIE AK präaktiviert werden. Beide Substanzen führen zu einer gesteigerten Expression von CD137 auf NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen (Abb.3-16/19) (33). Die Interaktion von CD137-CD137L ist ein nachgewiesener kostimulierender Mechanismus zwischen NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen (33). Es ist davon auszugehen, dass die erhöhte CD137-Expression auf NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen durch vorherige Stimulation mit Zoledronat indirekt zur Aktivierungssteigerung von NK Zellen geführt hat. Auch in der Literatur wurde eine gesteigerte

Zytotoxizität und ADCC durch Stimulation von NK-Zellen mit $\gamma\delta$ T-Zellen nur unter vorheriger Inkubation mit Bisphosphonaten oder unter Verwendung exp- $\gamma\delta$ T-Zellen beobachtet (33, 36, 178). Da $\gamma\delta$ T-Zellen mit IL2 und Bisphosphonaten bzw. IPP expandiert werden, können sie ebenfalls als voraktiviert betrachtet werden (33, 36). Eine gesteigerte antitumorale Aktivität könnte durch die Kombination von therapeutischen Antikörpern und Bisphosphonaten im Patienten erreicht werden, da hier neben den nachgewiesenen Effekten durch Antikörper alleine mit NK und $\gamma\delta$ T- Zellen überdies die robuste Aktivierung von von NK-Zellen durch $\gamma\delta$ T- Zellen gesteigert werden könnte.

4.5 Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen durch NK-Zellen

In den bisherigen Abschnitten wurde die Aktivierung von NK-Zellen durch $\gamma\delta$ T-Zellen dargelegt. Die Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen durch NK-Zellen wurde hingegen bislang wenig untersucht (35).

In den durchgeführten Experimenten zeigte sich eine Aktivierung von exp. $\gamma\delta$ T-Zellen durch NK-Zellen. NK-Zellen steigern neben der CD107a-Expression auf $\gamma\delta$ T-Zellen auch die Sekretion von INF γ und TNF α signifikant (Abb.3-27).

Die Aktivierung von NK-Zellen durch exp. $\gamma\delta$ T-Zellen ist vom Verhältnis der beiden Zellgruppen zueinander abhängig (33). Auch andersherum ist die Aktivitätssteigerung und Zytokinproduktion abhängig von dem Verhältnis der NK- zu $\gamma\delta$ T-Zellen (Abb.3-27). Ähnlich wie bei der Stimulation der NK-Zellen durch $\gamma\delta$ T-Zellen, ist die Stimulation von $\gamma\delta$ T-Zellen durch NK-Zellen bei einem Verhältnis von 0,5:1 und 0,125:1 ($\gamma\delta$ T-Zellen:NK-Zellen) am effektivsten. Ein Verhältnis von 4:1 ($\gamma\delta$ T-Zellen:NK-Zellen) hat keinen relevanten Einfluss auf die Aktivität der $\gamma\delta$ T-Zellen und führt lediglich zu einer geringen Aktivitätssteigerung, im Sinne einer erhöhten CD107a-Expression bzw. INF γ - /TNF α -Sekretion. Als Erklärung hierfür kann wieder über räumlich-sterische Effekte spekuliert werden (184, 185). Sind zu viele $\gamma\delta$ T-Zellen im Vergleich zu NK-Zellen vorhanden, ist es vermutlich nicht für alle $\gamma\delta$ T-Zellen möglich, mit einer NK-Zelle zu interagieren, was dazu führt, dass ein geringerer Prozentsatz an $\gamma\delta$ T-Zellen durch NK-Zellen aktiviert wird als bei einem höheren NK-Zell-Anteil. Für den Patienten könnte die bidirektionale Aktivitätssteigerung von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen einen Therapievorteil bringen, da

$\gamma\delta$ T-Zellen neben direkter zytotoxischer und regulatorischer Effekte ebenfalls zu einer ADCC von Targetzellen befähigt sind (62, 73, 82). NK-Zellen können in Anbetracht der CD107a-Expression als indirekter Messparameter für die Targetzelllyse sowohl die spontane Lysefähigkeit der $\gamma\delta$ T-Zellen gegenüber NALM-16 als auch die ADCC mittels CD19-4G7SDIE AK massiv steigern (Abb.3-27). Bei der Interaktion mit $\gamma\delta$ T-Zellen kommt es, wie bereits erwähnt, auch ohne Zugabe eines Targets zu einer Aktivitätssteigerung der NK-Zellen (33). Auch bei $\gamma\delta$ T-Zellen kommt es durch die Interaktion mit NK-Zellen ohne die Zugabe eines Targets zu einer gesteigerten CD107a-Expression und Zytokinsekretion. Das von NK-Zellen ausgeübte Signal auf exp. $\gamma\delta$ T-Zellen scheint starken Einfluss auf die $\gamma\delta$ T-Zellen zu haben, da für eine Aktivitätssteigerung kein zusätzlicher Stimulus wie z.B. durch ein Target benötigt wird. Auch Cairo et al. konnten einen Anstieg der INF γ - und TNF α - Sekretion nach Koinkubation von NK- und exp $\gamma\delta$ T-Zellen gegenüber autologen unreifen Dendritischen Zellen beobachten (178). Da der Zytokingehalt allerdings im Überstand der Kultur gemessen wurde, konnte die Zytokinproduktion nicht eindeutig den NK- oder $\gamma\delta$ T-Zellen zugeordnet werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass die erhöhte Zytokinproduktion unter Koinkubation von NK- und exp. $\gamma\delta$ T-Zellen auf die $\gamma\delta$ T-Zellen zurückzuführen ist und durch eine Stimulation der $\gamma\delta$ T-Zellen durch NK-Zellen bedingt war. Maniar et al. beschrieben hingegen, dass nach der Koinkubation von NK- und exp. $\gamma\delta$ T-Zellen unter Stimulation mit hlgG keine Steigerung der Aktivität der $\gamma\delta$ T-Zellen durch NK-Zellen zu beobachten ist (33). Als Messparameter diente CD69. Diese Beobachtung deckt sich nicht mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Auch die Inkubation mit hlgG erhöhte die CD69-Expression der $\gamma\delta$ T-Zellen bei Maniar et al nicht im Vergleich zur Kontrolle (nur Medium). Eine erhöhte CD69 Expression auf exp. $\gamma\delta$ T-Zellen durch hlgG wäre allerdings zu erwarten, da das immobilisierte hlgG nicht nur NK-Zellen, sondern auch $\gamma\delta$ T-Zellen über CD16 stimulieren kann (166).

Während es zu einer erhöhten Aktivität der NK-Zellen durch exp. $\gamma\delta$ T-Zellen nur nach Inkubation mit hlgG kam, ist die Stimulation von $\gamma\delta$ T-Zellen durch NK-Zellen auch ohne vorherige Stimulation mit hlgG möglich (Abb.3-27). HlgG erhöht

die CD137-Expression auf $\gamma\delta$ T-Zellen und auch die CD107a-Expression (Abb.3-23/25) (33). Allerdings erhöht sich die CD137-Expression auf den $\gamma\delta$ T-Zellen auch durch eine Inkubation mit NK-Zellen, unabhängig davon, ob eine Vorinkubation mit hlgG stattgefunden hat oder nicht (Abb.2-23). Auch hier induzierte das Verhältnis von 0,5:1 ($\gamma\delta$ T-Zellen:NK-Zellen) die höchste Aktivierungszunahme und das Verhältnis 4:1 die geringste Aktivierungssteigerung. Dies könnte erneut durch räumlich-sterischen Effekte, die auch die Höhe der CD107a-Expression beeinflussen, erklärt werden (184, 185). Auch andere Autoren beschreiben, dass NK-Zellen die CD137-Expression von $\gamma\delta$ T-Zellen steigern (33, 178). Allerdings wurde die erhöhte CD137-Expression auf exp. $\gamma\delta$ T-Zellen durch NK-Zellen nur nach Vorinkubation mit hlgG untersucht (33, 178). Wie diese Arbeit zeigt, ist diese nicht obligat, um $\gamma\delta$ T-Zellen durch NK-Zellen zu stimulieren (Abb.3-27). Bei der Interaktion von NK-Zellen mit $\gamma\delta$ T-Zellen werden NK-Zellen über eine Interaktion von CD137 mit CD137L aktiviert (33). Die Frage ist nun, in wieweit eine Interaktion über CD137/CD137L für die Stimulation von exp. $\gamma\delta$ T-Zellen durch NK-Zellen wichtig ist.

Durch die CD137-Blockade zeigte sich eine signifikante, allerdings nicht vollständige Reduktion der CD107a-Expression von exp. $\gamma\delta$ T-Zellen (Abb.3-29). CD137 spielt in Hinblick auf die CD107a-Expression somit eine wichtige Rolle. Es könnten jedoch auch weitere Interaktionsmechanismen, auch indirekte parakrine Mechanismen geben die einen relevanten Einfluss auf die Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen haben (137). Wichtig ist in diesem Zusammenhangebenfalls, dass CD137 auch in der Interaktion der $\gamma\delta$ T-Zellen untereinander eine Rolle zu spielen scheint. Die CD107a-Expression der $\gamma\delta$ T-Zellen verschlechterte sich teils signifikant durch eine CD137-Blockade ohne Zugabe von NK-Zellen (Abb.3-29). Exp. $\gamma\delta$ T-Zellen exprimieren CD137L (33), sodass eine Interaktion von exp. $\gamma\delta$ T-Zellen untereinander über CD137/CD137L gut vorstellbar ist. CD137 übermittelt ein kostimulatorisches aktivierendes Signal sowie ein Überlebenssignal an T-Zellen (188-190). Es ist also fraglich, ob der Rückgang der CD107a-Expression nach CD137-Blockade durch eine verminderte Interaktion der $\gamma\delta$ T-Zellen untereinander oder durch verminderte Interaktion der $\gamma\delta$ T-Zellen mit den NK-Zellen bedingt ist. NK-Zellen exprimieren kein CD137L, sodass eine CD137-Rezeptor-Ligand

Interaktion von $\gamma\delta$ T-Zellen durch NK Zellen nicht möglich ist (203) Wahrscheinlicher ist, dass durch die Blockade von CD137 NK-Zellen nicht mehr über CD137 von CD137L auf $\gamma\delta$ T-Zellen aktiviert werden können (33) und somit weniger Zytokine wie beispielsweise IL2 sezernieren, welche wiederum $\gamma\delta$ T-Zellen stimulieren.

Zusammengefasst lässt sich schließen, dass $\gamma\delta$ T-Zellen wahrscheinlich sowohl durch eine Interaktion untereinander über CD137-CD137L als auch indirekt durch NK-Zellen, die über CD137-CD137L Interaktion stimuliert wurden, über sekretierte Zytokine (IL2) aktiviert werden. Abbildung 4.1 stellt dies grafisch dar.

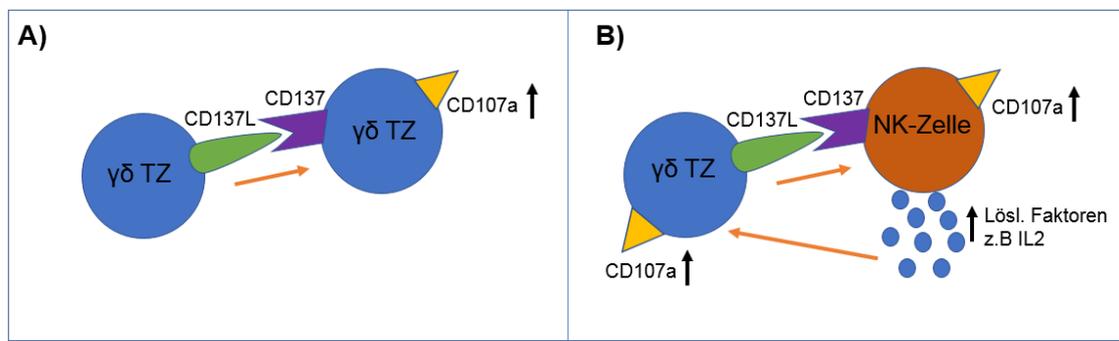


Abb. 4.1 Theorien zur Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen über Interaktion von CD137 und CD137L
A Durch Interaktion von CD137 (4-1BB) und CD137L (CD137-Ligand) zwischen $\gamma\delta$ T-Zellen ($\gamma\delta$ TZ) können $\gamma\delta$ T-Zellen sich gegenseitig aktivieren, was mit einer erhöhten CD107a-Expression einhergeht. **B** CD137L auf $\gamma\delta$ T-Zellen kann an CD137 auf NK-Zellen binden, was zu einer Aktivierung der NK-Zellen führt. Es kommt zu einem Anstieg der CD107a-Expression. Zudem ist zu anzunehmen, dass durch die Ausschüttung löslicher Faktoren wie IL2, $\gamma\delta$ T-Zellen parakrin stimulieren.

Die durch die NK-Zellen gesteigerte Zytokinproduktion der $\gamma\delta$ T-Zellen zeigte durch CD137-Blockade keine Veränderung (Abb.3-29). Die Anregung von exp. $\gamma\delta$ T-Zellen durch NK-Zellen zu erhöhter Zytokinproduktion scheint über einen anderen Mechanismus als CD137/CD137L vermittelt zu werden. Denkbar sind andere Zell-Zell-Interaktionen oder eine Interaktion über lösliche Faktoren. Mikroskopisch zeigte sich, dass durch CD137-Blockade die Bildung von Zellclustern deutlich reduziert wird (Abb.3-24). Diese Beobachtung spricht bei erhaltener Aktivierungssteigerung der $\gamma\delta$ T-Zellen für eine Interaktion über lösliche Faktoren. INF γ und TNF α kommen hierbei nicht in Frage, da sie bei einer Koinkubation von

NK-Zellen mit exp. $\gamma\delta$ T-Zellen nicht verstärkt von NK-Zellen ausgeschüttet wurden (Abb.3-26). Eine übersichtliche Anzahl an Arbeiten, wie von Zhang et al., zeigte bislang eine Stimulation von $\gamma\delta$ T-Zellen durch NK-Zellen, allerdings im Kontext der Tuberkulose und nicht bei Malignomen (35). Nach Inkubation von PBMC mit hitzeinaktiviertem Mycobacterium tuberculosis und IL2 verstärkte die Anwesenheit von NK-Zellen die Proliferation von $\gamma\delta$ T-Zellen. Für diesen Effekt machten Zhang et al. eine Kombination aus Zell-Zell-Interaktion über CD45 und lösliche Faktoren wie IL12, GM-CSF und TNF α verantwortlich. Fraglich ist jedoch, ob sich diese Beobachtungen auch ohne den Zusammenhang mit Tuberkulose zeigen lässt und ob diese Interaktion neben der Wachstumsstimulation auch eine Wirkung auf die Zytotoxizität und Zytokinproduktion von $\gamma\delta$ T-Zellen hat. Die Höhe der Stimulation und Zytokinproduktion implizieren, dass der Antitumoreffekt induziert von NK und $\gamma\delta$ T-Zellen relevant gesteigert und therapeutisch genutzt werden könnte. An dieser Stelle bleibt ungeklärt, über welche Interaktionswege neben CD137-CD137L die Interaktion zwischen NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen vermittelt wird und ob die erhöhte Zytotoxizität durch die Steigerung der NKG2D-Expression vermittelt wird bzw. welche kostimulatorischen Moleküle relevant sind.

4.6 Targetzelllyse und ADCC durch NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen

Im Rahmen eines CD107a-Assays wird die Targetzelllyse indirekt über die Höhe des Degranulationsmarkers CD107a einmalig zu einem prädefinierten Zeitpunkt gemessen. Es handelt sich um eine Momentaufnahme und nicht um eine dynamische Messmethode des Lyseverlaufs über die Zeit. Das xCELLigence (RTCA, real time cytotoxicity assessment) und der Luciferase-Assay bieten hingegen den Vorteil die Lyse von Targetzellen, die Endstrecke der Effektorfunktion von zytotoxischen Prozessen, zu messen. Zudem ist eine dynamische Beobachtung des Lyseverlaufs über einen gewissen Zeitraum möglich. Der Nachteil dieser Methode ist, dass bei Zugabe zweier verschiedener Effektoren anders als bei dem CD107a Assay nicht berücksichtigt werden kann, auf welchen Effektor die Targetzelllyse zu welchem Anteil zurückzuführen ist bzw. welche Zellpopulation entscheidend aktiviert wird und Zytokine produziert.

Vergleicht man die Lysefähigkeit von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen gegenüber der Neuroblastomzelllinie LS, so lysiert eine NK-Zelle ungefähr so effektiv wie vier exp. $\gamma\delta$ T-Zellen (Abb.3-31) bzw. im Luciferase-Assay erzielten NK-Zellen eine doppelt so hohe Lyse und ADCC von LS und NALM-6 wie exp. $\gamma\delta$ T-Zellen (Abb.3-34). Wie in dieser Arbeit dargestellt werden konnte, lysieren $\gamma\delta$ T-Zellen Targetzellen durch Zell-Zell-Interaktion (Abb.3-33). Dies entspricht dem bereits beschriebenen Mechanismus, dass $\gamma\delta$ T-Zellen Targetzellen über NKG2D oder mit ihrem TcR anhand der Expression von BNT3A1 oder MICA/B bzw. ULBP3 erkennen und dann über die Freisetzung von Granzym und Perforin lysieren (64, 65, 71, 73, 74). Dieser Mechanismus entspricht dem „Induced-self-Mechanismus“ von NK-Zellen, der eine gezielte Lyse von Targetzellen mit aberranter Antigenexpression bzw. NKG2D-Liganden ermöglicht (49). In Anbetracht der ADCC sind NK-Zellen deutlich potenter als exp. $\gamma\delta$ T-Zellen, was in den durchgeführten Experimenten mit CD19-4G7SDIE AK bestätigt wurde. Entscheidend für die ADCC ist die CD16-Expression auf den Effektorzellen, da CD16 den FC-Teil der Antikörper bindet, welcher auf NK Zellen höher exprimiert wird als auf $\gamma\delta$ T-Zellen (166, 183). Etwa 70-90%, der im Blut zirkulierenden NK-Zellen sind CD56^{dim}CD16⁺ NK-Zellen, während $\gamma\delta$ T-Zellen nach Expansion nur zu etwa 27% CD16 exprimieren (82). Die Höhe der ADCC der exp. $\gamma\delta$ T-Zellen korreliert mit der CD16-Expression (82). Es ist somit plausibel, dass die ADCC von NK-Zellen effektiver ist als die der exp. $\gamma\delta$ T-Zellen, obgleich diese ebenfalls zu ADCC befähigt sind (Abb.3-2/3/31) (82).

Exp. $\gamma\delta$ T-Zellen können Targetzellen lysieren (82) und werden bei einer Interaktion mit NK-Zellen, wie gezeigt werden konnte, stimuliert. *In vivo* resultiert die effektive Targetzelllyse aus der Summe der Effektorfunktion und bidirektionalen Interaktion von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen. Daher wurde in dieser Arbeit weiterführend das Lyseverhalten von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen gemeinsam gegenüber Targetzellen evaluiert.

Es wurde bewusst ein niedriges E:T-Verhältnis gewählt, sodass unter Addition von $\gamma\delta$ T-Zellen und NK-Zellen als Effektoren die E:T bei 1:1 bis 5:1 lag. Bei Verwendung einer hohen E:T exp. $\gamma\delta$ T-Zellen bzw. NK-Zellen können die Targetzellen gänzlich lysiert werden (82). Bei einem niedrigeren E:T-Verhältnis werden die Targetzellen nicht vollständig lysiert, sodass es wie auch in unserem Versuchsaufbau nach etwa 20-22 Stunden zu einer Erschöpfung der Effektoren kam und diese von den überlebenden Targetzellen im längeren Verlauf überwachsen werden. Im Zeitraum vor Ablauf von 20 Stunden lassen sich aufgrund des niedrigen E:T-Verhältnis allerdings feine Unterschiede bei der Veränderung der Zahl der $\gamma\delta$ T-Zellen erkennen, wie es bei hohen E:T aufgrund der vollständigen Targetzelllyse durch NK-Zellen nicht möglich gewesen wäre.

Wie bereits beschrieben, scheint eine Interaktion zwischen CD137 und CD137L für die Interaktion zwischen NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen bzw. der aus dieser Interaktion resultierenden gesteigerten Zytotoxizität der NK-Zellen verantwortlich zu sein (33). So führte bei Maniar et al. eine CD137-Blockade zu einem Rückgang der NK-Zell-vermittelten Targetzelllyse, nachdem sie mit $\gamma\delta$ T-Zellen inkubiert worden waren (33). Die weiterführende Frage ist nun, inwiefern CD137 einen Einfluss auf die von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen gemeinsam vermittelte Lyse nimmt. Nach Vorinkubation mit immobilisiertem hIgG und einem CD137-blockierenden Antikörper zeigte sich die Lyse im Vergleich zu unmanipulierten (nicht prästimulierten) NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen teilweise signifikant reduziert bis hin zu fehlender Lyseaktivität (Abb.3-32). Der Rückgang der Lyse unter CD137-Blockade erscheint gemäß den Beobachtungen von Maniar et al. für NK-Zellen alleine plausibel, allerdings wurde keine vollständige Aufhebung der Lyseaktivität beobachtet (33). Ein Unterschied könnte darin begründet liegen, dass im Vergleich zu den dargestellten Versuchen höhere E:T-Verhältnisse gewählt wurden. Unter Zugabe von CH14.18 verminderte sich die Lyse unter CD137-Blockade auch, allerdings fiel sie nicht unter 10%, was für die hohe Potenz von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen zu ADCC spricht (82, 160). CD137 scheint also nicht nur die NK-Zell-vermittelte Lyse und ADCC bei Interaktion von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen zu beeinflussen (33), sondern darüberhinausgehend auch die Targetzelllyse beider Zellpopulationen

gemeinsam. Allerdings ist die Verschlechterung der Lyse im Vergleich zu unbehandelten NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen nicht nur durch CD137 Blockade bedingt, sondern auch durch Vorinkubation mit hlgG.

NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen werden durch Inkubation mit immobilisiertem hlgG, wie bereits beschrieben, aktiviert (33). Im Rahmen der Messung der tatsächlichen Lyse und ADCC durch NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen verschlechterte eine Vorinkubation mit hlgG jedoch die Lyse teilweise signifikant. Daraus lassen sich zwei Schlüsse ziehen. Zum einen scheint eine Aktivitätssteigerung nicht automatisch eine Aussage über die tatsächliche Höhe der resultierenden Lyse zu ermöglichen. Des Weiteren scheint sich die Lysefähigkeit von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen nach Bindung von immobilisiertem hlgG an CD16 durch daraus resultierende unspezifische Degranulation zu erschöpfen, während eine Aktivitätssteigerung dennoch erhalten bleibt. Auch in der Literatur führte eine Vorinkubation mit hlgG teilweise zu einer verminderten Lysefähigkeit von NK-Zellen, allerdings nicht zwingend und in geringerem Ausmaß als in unseren Versuchen (33).

Wie bei Maniar et al. (33) und passend zu den dargestellten Ergebnissen des CD107a-Assays (Abb.3-26) ist die Gesamtzytotoxizität und ADCC von $\gamma\delta$ T-Zellen und NK-Zellen gemeinsam im Luciferase-Assay bei einem Mischungsverhältnis von 0,5:1 und teilweise auch 0,25:1 (Abb.3-34) gegenüber NALM-6 und LS erhöht. Währenddessen verschlechtert sich die Lyse bei Zugabe von vielen $\gamma\delta$ T-Zellen im Sinne eines Mischungsverhältnisses von 4:1 bzw. 2:1. NK-Zellen sind die potenteren Effektoren, wie vorab beschrieben. Daher steigert ein Überschuss an $\gamma\delta$ T-Zellen nicht unmittelbar die Gesamtlyse, da vermutlich die NK-Zellen in ihrem Kontakt mit den Targetzellen durch räumlich-sterische Effekte gestört werden (184, 185). Als weniger potente Effektoren scheinen $\gamma\delta$ T-Zellen die Lysereduktion mit ihrer Eigenlysefähigkeit nicht kompensieren zu können. Die Steigerung der Gesamtlyse und ADCC bei einem Mischungsverhältnis von 0,5:1 weist auf eine Steigerung der NK- oder $\gamma\delta$ T-Zell vermittelten Lyse durch Interaktion der beiden Zellen miteinander hin (33). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass anders als bei der Verwendung frischer NK-Zellen wie bei Maniar et al. bei der Verwendung exp. NK-Zellen keine Vorstimulation mit hlgG für eine

Interaktion von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen notwendig zu sein scheint (33). Gibt die Literatur bereits Anhalt auf eine Interaktion zwischen NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen (33), so konnte hier gezeigt werden, dass die bidirektionale Interaktion beider Zellgruppen in einer signifikanten Steigerung der Gesamttargetzelllyse und ADCC gegenüber verschiedenen Targetzelllinien resultiert. Diese Interaktion bietet das Potential therapeutisch in der Tumortherapie genutzt zu werden. Gerade Patienten nach TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletierter SZT sind hierfür prädestiniert, besonders in der sensiblen Phase direkt nach Transplantation den synergistischen Effekt zu nutzen, im Vergleich zu anderen T-Zell-depletierten Strategien, da beide Zellpopulationen in verhältnismäßig hoher Anzahl mit der Transplantation übertragen werden und zügig expandieren (27,28,37,38). Auf die sich bietenden Möglichkeiten der therapeutischen Nutzung wird im nächsten Abschnitt genauer eingegangen.

4.7 Klinischer Bezug und Ausblick

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, lysieren $\gamma\delta$ T-Zellen BCP-ALL und Neuroblastomzellen, sind des Weiteren befähigt zu ADCC und können die Zytokine INF γ und TNF α sezernieren. Zudem interagieren $\gamma\delta$ T-Zellen und NK-Zellen miteinander (33), was in einer erhöhten Zytotoxizität und ADCC beider Zellpopulationen resultiert. Die genannten Effektorfunktionen sind wichtig in der Ausübung eines Antitumoreffekts. Gerade nach Transplantation ist ein früher, potenter Antitumoreffekt zur Prävention eines Rezidivs wichtig. $\gamma\delta$ T-Zellen sollten aus diesem Grund unbedingt im Transplantat belassen werden und mit der Transplantation in den Patienten transferiert werden, zumal $\gamma\delta$ T-Zellen überdies einen Schutz vor Infektionen bieten können, welche für Patienten nach Transplantation lebensbedrohlich sind (32, 60, 191). $\gamma\delta$ T-Zellen induzieren selbst keine GvHD, im Gegensatz zu $\alpha\beta$ T-Zellen (32). Es überrascht daher nicht, dass pädiatrischen Patienten mit ALL, die nach SZT einen hohen Anteil an $\gamma\delta$ T-Zellen aufwiesen, ein besseres Überleben und niedrigere Infektionsraten zeigten, innerhalb einer Beobachtungszeit von 2,7 Jahren (191). Die haploidente TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletierte SZT ermöglicht neben der Transplantation von NK-Zellen die Transplantation der wichtigen Effektorzellpopulation $\gamma\delta$ T-Zellen. Diese

regenerieren zügiger und führen überdies zu einer schnelleren Immunregeneration von $\alpha\beta$ T-Zellen, was einen großen Vorteil gegenüber anderen $\alpha\beta$ T-Zell reduktiven Graftmanipulationen bietet. Auch 3 Monate nach SZT weisen Patienten, die eine TcR $\alpha\beta$ /CD19- depletierte SZT erhalten haben, einen signifikant höheren Prozentsatz an $\gamma\delta$ T-Zellen auf als Patienten nach Erhalt CD34-angereicherter Stammzelltransplantate (39).

Durch die Option $\gamma\delta$ T-Zellen zu stimulieren, wie beispielsweise durch Zoledronat oder Antikörper (82, 110), besteht die Möglichkeit das Potential der $\gamma\delta$ T-Zellen besser auszuschöpfen, wobei hierzu bislang nur beschränkte klinische Erfahrungen vorliegen. Zumal durch Stimulation von $\gamma\delta$ T-Zellen, wie hier gezeigt wurde, die Interaktion mit NK-Zellen intensiviert wird und es zu einer Expansion *in vivo* kommen kann (107). Allerdings reagieren nicht alle Malignompatienten unter Therapie mit Zoledronat mit einer Expansion von $\gamma\delta$ T-Zellen, wobei ein Nicht-Ansprechen bereits als prognostisch ungünstiger Marker identifiziert wurde (173, 192). Bertaina et al. haben bei der Therapie mit Zoledronat bei pädiatrischen Patienten nach TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletierte SZT eine gesteigerte Zytotoxizität von $\gamma\delta$ T-Zellen gegenüber Leukämiezellen beobachtet, ohne das Auftreten gravierender Nebenwirkungen festzustellen (193). In einer anderen klinischen Pilotstudie von Lang et al. zeigten sich allerdings keine relevanten Vorteile durch die Stimulation von $\gamma\delta$ T-Zellen mit Zoledronat (194). So konnte in einer klinischen Pilotstudie bei Patienten mit refraktärem Nierenzellkarzinom durch Applikation von Zoledronat und IL2 nur bei 2 von 14 Patienten ein Progress verzögert werden, während kein Regress beobachtet wurde (194).

Neben der Möglichkeit $\gamma\delta$ T-Zellen durch Applikation von Medikamenten zu stimulieren, besteht die Möglichkeit V γ 9V δ 2 T-Zellen *ex vivo* zu expandieren und autolog zu retransplantieren. Ein adoptiver Transfer autologer *ex vivo* exp. $\gamma\delta$ T-Zellen wurde bisher in klinischen Phase I-Studien bei Patienten mit fortgeschrittenem nichtkleinzelligem Lungenkarzinom bzw. metastasiertem Nierenzellkarzinom durchgeführt. Die Therapie mit *ex vivo* exp. $\gamma\delta$ T-Zellen wurde dabei bis zu einer maximalen Zelldosis von 8×10^9 Zellen gut toleriert und konnte einen Progress bei 50-60% der Patienten um im Mittel 26 bzw. 18 Wochen verzögern. Ein Regress des Tumors wurde nicht beobachtet (195, 196). Neben $\gamma\delta$ T-Zellen sind

NK-Zellen Immunzellen des angeborenen Immunsystems mit hoher Antitumoraktivität, welche autolog und allogene *ex vivo* expandiert und transferiert wurden, bei pädiatrischen Patienten mit Leukämien bzw. Lymphomen mit erkennbarer Reduktion an Tumorlast (174).

Wie diese Arbeit zeigen konnten, stimulieren sich $\gamma\delta$ T-Zellen durch NK-Zellen gegenseitig (33). Der autologe und allogene Transfer von exp. NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen gemeinsam könnte den therapeutischen bzw. antitumoralen Effekt der beiden Zellen durch ihre bidirektionale Stimulation verstärken. So konnte bei einem pädiatrischen Patienten mit refraktärer, rezidivierender AML in unserer Klinik im Zusammenhang mit einem autologen Transfer an NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen ein MRD-negativer Befund erzielt werden. Die Therapie wurde gut vertagen. Der Patient ist 5 Jahre nach Zelltransfer weiterhin in Remission (204).

Zusammengefasst konnte ein klinisch messbarer Einfluss von Therapien mit $\gamma\delta$ T-Zellen oder Zoledronat auf das Überleben von Patienten mit Malignomerkrankungen beobachtet werden, wobei der Stellenwert der Therapie unklar ist (193-196). Besonders die Wirkung von NK-Zellen auf $\gamma\delta$ T-Zellen ist noch ungenügend verstanden. Ein weiteres Verständnis in der Interaktion dieser beiden interessanten Immunzellpopulationen könnte insbesondere im Zeitalter der synthetischen Biologie genutzt werden, um neue effektivere, zielgerichtete und robustere Therapien mit anhaltendem Verbleib der Zellen im Patienten zu etablieren (197,198).

5. ZUSAMMENFASSUNG

Krebserkrankungen stellen die häufigste natürliche Todesursache im Kindesalter in Deutschland dar. Mithilfe multimodaler Therapiekonzepte können heutzutage circa 70% der Kinder von ihrer Grunderkrankung geheilt werden. Bei refraktären Leukämien und leukämischen Rezidiven stellt die SZT häufig die einzige kurative Therapie dar. Die SZT kann auch erfolgreich bei anderen Malignomen als Ultima Ratio eingesetzt werden. Ziel der SZT ist die immunologische Kontrolle einer möglichen Tumorersterkrankung. Die haploidente SZT ermöglicht die SZT von einem Elternteil. Da eine HLA-Disparität vorliegt, muss eine T-Zell-Depletion oder Inaktivierung alloreaktiver $\alpha\beta$ T-Zellen erfolgen, um eine tödliche GvHD zu vermeiden. Bei der TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletierte SZT werden neben NK-Zellen, $\gamma\delta$ T-Zellen im Transplantat belassen und transplantiert. Mit dem Transfer dieser beiden Effektorzellpopulationen kann das immunologische Repertoire erhöht und der antitumorale Effekt gesteigert werden, um nach Transplantation eine Tumorersterkrankung zu eliminieren und ein Rezidiv zu verhindern. In der Forschungsarbeit wurde der Einfluss von $\gamma\delta$ T-Zellen auf die spontane Lysefähigkeit und ADCC von NK-Zellen mit dem CD19 4G7SDIE AK untersucht. Der Fc-optimierte CD19-4G7SDIE AK steigert die ADCC von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen bei gesunden Probanden und Patienten nach TcR $\alpha\beta$ /CD19-depletierter SZT. CD19-4G7SDIE AK führte zu einer gesteigerten Aktivierung, gemessen an der Expression der Aktivierungsmarker CD107a, CD69, CD137 auf NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen, sowie zu einer gesteigerten Sekretion an TNF α und INF γ durch NK-Zellen und einer gesteigerten Lyse durch NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen. Ein weiterer wesentlicher Aspekt dabei ist, dass $\gamma\delta$ T-Zellen die ADCC von NK-Zellen mittels CD19-4G7SDIE AK signifikant erhöhen. Auch unter Stimulation mit Zoledronat können $\gamma\delta$ T-Zellen die Zytotoxizität von NK-Zellen (CD107a-Expression) signifikant steigern. Wie bereits vorbeschrieben, basiert die Interaktion der beiden Zellpopulationen vorrangig auf CD137-CD137L. Durch eine Blockade von CD137 ist dieser Effekt aufgehoben. Eine Steigerung der Effektorfunktion von NK-Zellen durch $\gamma\delta$ T-Zellen wurde neben CD19-4G7SDIE AK für NALM-16 (BCP-ALL) für GD2-CH14.18 AK für LS (Neuroblastom) gezeigt. Es stellte sich dabei heraus, dass die Interaktion zwischen NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen bidirektional ist. So resultierte die Interaktion

von expandierten $\gamma\delta$ T-Zellen mit NK-Zellen nicht nur in einer gesteigerten ADCC und Zytotoxizität der NK-Zellen, sondern auch in einer gesteigerten Zytotoxizität und Zytokinproduktion der $\gamma\delta$ T-Zellen. Die Interaktion dieser beiden Zellpopulationen wurde anhand der CD107a-Expression bzw. der Sekretion von $\text{INF}\gamma/\text{TNF}\alpha$, sowie der direkten Messung der Targetzelllyse im Luciferaseassay und dem xCELLigence evaluiert. Der Mechanismus, wie NK-Zellen $\gamma\delta$ T-Zellen stimulieren, ist weniger bekannt als der Einfluss von $\gamma\delta$ T-Zellen auf NK-Zellen und scheint nur partiell von CD137 abhängig. Insbesondere die Steigerung der Zytokinproduktion von $\text{INF}\gamma/\text{TNF}\alpha$ ist unabhängig von einer CD137-Blockade. Wie hoch die Steigerung der Zytotoxizität und ADCC durch Interaktion von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen ist, hängt vom Verhältnis der beiden Zellpopulationen zueinander ab. NK-Zellen sind die stärkeren Effektorzellen (Zytolyse), so zeigten expandierte NK-Zellen im Durchschnitt eine doppelt so hohe Lyse wie expandierte $\gamma\delta$ T-Zellen. Das Verhältnis von $\gamma\delta$ T-Zellen zu NK-Zellen spielt eine wesentliche Rolle auf die gegenseitige Aktivierbarkeit. Im optimalen Verhältnis von 0,5:1 $\gamma\delta$ T-Zellen zu NK-Zellen wird die Aktivität in Hinblick auf CD107a-Expression, direkte Targetzelllyse und teilweise auch die Sekretion von $\text{INF}\gamma/\text{TNF}\alpha$ gegenüber den Targetzelllinien NALM-16 und LS verstärkt. Auch bei Patienten nach haploidenter $\text{TcR}\alpha\beta/\text{CD19}$ -depletierter SZT konnte die Interaktion von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen mit daraus resultierender gesteigerter NK-Zell-vermittelter ADCC nachgewiesen werden.

Die bidirektionale Interaktion von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen nach haploidenter $\text{TcR}\alpha\beta/\text{CD19}$ -depletierter SZT und der daraus resultierende antitumorale Effekt könnte durch Stimulation von $\gamma\delta$ T-Zellen mit Zoledronat und therapeutischem Antikörper z.B. CD19-4G7SDIE AK oder GD2-CH14.18 gesteigert werden und zu einer besseren immunologischen Kontrolle restlicher Tumorzellen nach haploidenter SZT führen.

6. ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

6.1 **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1-1 Die Induced- self- und Missing-self-Hypothese von NK-Zellen.....	5
Abb. 1-2 Interaktion von Vy9Vδ2-T-Zellen mit Leukämiezellen	9
Abb. 1-3 Chimärisierung und SDIE-Modifikation von Antikörpern	12
Abb. 1-4 Wirkung von Zoledronat im Mevalonatweg	13
Abb. 1-5 Übermittlung der intrazellulären Akkumulation von IPP an Vy9Vδ2-Zellen.....	15
Abb. 2-1 Alter der Patienten und Tage posttransplant.....	30
Abb. 2-2 FACS-Analyse des Kill-Assay	35
Abb. 2-3 Anteil der $\gamma\delta$ T-Zellen nach Depletion	41
Abb. 3-1 CD19 Expression der Targetzelllinien	54
Abb. 3-2 CD69-Expression auf NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen durch CD19-4G7SDIE AK.....	55
Abb. 3-3 Messung der Aktivierbarkeit von NK- und $\gamma\delta$ T-Zelle durch CD19- 4G7SDIE AK.....	56
Abb. 3-4 Direkte Messung der ADCC im Kill-Assay	57
Abb. 3-5 Aktivierbarkeit von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen pädiatrischer Patienten nach SZT durch CD19-4G7SDIE AK.....	59
Abb. 3-6 Messung der ADCC durch PBMC pädiatrischer Patienten nach SZT im Kill-Assay	60
Abb. 3-7 Vergleich der Aktivierbarkeit von NK-Zellen gesunder Probanden und Patienten nach SZT durch NALM-16 und CD19-4G7SDIE AK.....	62
Abb. 3-8 Vergleich der Aktivierbarkeit von $\gamma\delta$ T-Zellen gesunder Probanden und Patienten nach SZT durch NALM-16 und CD19- 4G7SDIE AK.....	63
Abb. 3-9 Vergleich der spontanen Lysefähigkeit und ADCC zwischen PBMC gesunder Probanden und Patienten nach SZT	64
Abb. 3-10 Vergleich zwischen TcR$\gamma\delta$- und mock-depletierten PBMC im CD107a-Assay mit ICS	66

Abb.3-11 Vergleich der spontanen Lyse und ADCC zwischen TcR$\gamma\delta$- und mock-depletierten PBMC	67
Abb. 3-12 Einfluss von IL2 und Zoledronat auf die CD69-Expression von NK-Zellen.....	68
Abb. 3-13 Einfluss von Prestimulation mit IL2 und Zoledronat auf NK-Zellen in Kill- und Aktivierungs-Assay	70
Abb. 3-14 Aktivierung von NK-Zellen durch IL2 und Zoledronat im CD107a-assay mit ICS	71
Abb. 3-15 Einfluss von IL2 und Zoledronat auf die CD69-Expression von $\gamma\delta$ T-Zellen	72
Abb. 3-16 Einfluss einer Prestimulation mit IL2 und Zoledronat auf $\gamma\delta$ T-Zellen im Kill-Assay	74
Abb. 3-17 Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen durch IL2 und Zoledronat im CD107a-Assay mit ICS	75
Abb. 3-18 Einfluss von $\gamma\delta$ T-Zellen auf die Aktivierung von NK-Zellen unter Einfluss von Zoledronat.....	77
Abb. 3-19 Einfluss von NALM-16 und CD19-4G7SDIE AK auf Expression von CD137.....	78
Abb. 3-20 Durchflusszytometrische Kontrolle der Expansion von $\gamma\delta$ T Zellen.....	79
Abb. 3-21 Vorversuch: Abhängigkeit der CD107a-Expression von dem Verhältnis von NK-Zellen zu exp. $\gamma\delta$ T-Zellen	80
Abb. 3-22 Durchflusszytometrische Kontrolle der CD137-Blokade mittels Antikörper	80
Abb. 3-23 Wirkung von humanem IgG auf die CD137-Expression.....	83
Abb. 3-24 Mikroskopische Analyse der Wirkung von IgG und CD137-Blockade auf die Inkubation von NK-Zellen mit exp. $\gamma\delta$ T-Zellen	83
Abb. 3-25 Wirkung von IgG auf NK- und exp. $\gamma\delta$ T-Zellen im CD107a-Assay mit ICS	85
Abb. 3-26 Wirkung verschiedener Konzentrationen exp. $\gamma\delta$ T-Zellen auf NK-Zellen.....	87

Abb. 3-27 Wirkung verschiedener Konzentrationen von NK-Zellen auf exp. $\gamma\delta$ T-Zellen	88
Abb. 3-28 Wirkung von CD137-Blockade auf die Interaktion von NK-Zellen mit exp. $\gamma\delta$ T-Zellen	90
Abb. 3-29 Wirkung von CD137-Blockade auf die Interaktion von exp. $\gamma\delta$ T-Zellen mit NK-Zellen	91
Abb. 3-30 Echtzeitanalyse der spontanen Lysefähigkeit und ADCC von NK-Zellen und exp. $\gamma\delta$ T-Zellen im xCELLigence	92
Abb. 3-31 Vergleich der spontanen Lysefähigkeit und ADCC von NK-Zellen und exp. $\gamma\delta$ T-Zellen im xCELLigence	94
ABB. 6-32 WIRKUNG EINER CD137-Blockade auf die spontane Lysefähigkeit und ADCC von NK- und exp. $\gamma\delta$ T-Zellen	96
Abb. 6-33 Durchflusszytometrische Untersuchung des Lysemechanismus exp. $\gamma\delta$ T-Zellen.....	98
Abb. 6-34 Dosisabhängige Wirkung von exp. $\gamma\delta$ T-Zellen auf die spontane Lysefähigkeit und ADCC von exp. NK-Zellen.....	100
ABB. 4-1 THEORIEN ZUR AKTIVIERUNG VON $\gamma\delta$ T-ZELLEN ÜBER INTERAKTION VON CD137 UND CD137L.....	126
Abb. 9-1 CD137-Expression auf frisch isolierten NK-Zellen.....	154

6.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1 Diagnosen der Patienten	30
Tab. 2-2 Ansatzschema des Luciferase- Assay	50

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Jacobson LH. X rays and childhood cancer. *Lancet* (London, England). 1968;1(7549):980.
2. Willasch A, et al. Outcome of allogeneic stem cell transplantation in children with non-malignant diseases. *Haematologica*. 2006;91(6):788-94.
3. Lang P, et al. Allogene Stammzelltransplantation bei pädiatrischen soliden Tumoren 2011. 1024-31 p.
4. Fischer M, et al. Das Neuroblastom 2005. 1054-64 p.
5. Trigg ME, et al. Milestones in the development of pediatric hematopoietic stem cell transplantation—50 years of progress. *Pediatric Transplantation*. 2002;6(6):465-74.
6. Balduzzi A, et al. Chemotherapy versus allogeneic transplantation for very-high-risk childhood acute lymphoblastic leukaemia in first complete remission: comparison by genetic randomisation in an international prospective study. *Lancet* (London, England). 2005;366(9486):635-42.
7. Peters C. SZT-BFM ALL 2003: Allogene Stammzell-Transplantation bei Kindern und Jugendlichen mit Akuter-Lymphoblastischer Leukämie (ALL). 2011.
8. Yanir AD, et al. Current Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Pediatric Acute Lymphocytic Leukemia: Success, Failure and Future Perspectives-A Single-Center Experience, 2008 to 2016. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2018;24(7):1424-31.
9. Locatelli F, et al. How I Treat Relapsed Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia 2012. 2807-16 p.
10. Leung W, et al. High success rate of hematopoietic cell transplantation regardless of donor source in children with very high-risk leukemia. *Blood*. 2011;118(2):223-30.
11. Sayer HG, Beelen DW. Hämatopoetische Stammzelltransplantation. *Der Onkologe*. 2009;15(6):564-74.
12. Anasetti C, et al. to the Future: Mismatched Unrelated Donor, Haploidentical Related Donor, or Unrelated Umbilical Cord Blood Transplantation? 2012. S161-5 p.
13. Ferrara JLM, et al. Graft-versus-host disease. *The Lancet*. 2009;373(9674):1550-61.
14. Choo SY. The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei medical journal*. 2007;48(1):11-23.
15. Seggewiss R, Einsele H. Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update. *Blood*. 2010;115(19):3861-8.
16. Handgretinger R, Lang P. The history and future prospective of haplo-identical stem cell transplantation. *Cytotherapy*. 2008;10(5):443-51.
17. Marmont AM, et al. T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia. *Blood*. 1991;78(8):2120-30.

18. Schumm M, et al. Isolation of highly purified autologous and allogeneic peripheral CD34+ cells using the CliniMACS device. *Journal of hematology*. 1999;8(2):209-18.
19. Handgretinger R, et al. Megadose transplantation of purified peripheral blood CD34(+) progenitor cells from HLA-mismatched parental donors in children. *Bone marrow transplantation*. 2001;27(8):777-83.
20. Lang P, et al. Transplantation of highly purified CD34+ progenitor cells from unrelated donors in pediatric leukemia. *Blood*. 2003;101(4):1630-6.
21. Klingebiel T, et al. Results and factors influencing outcome after fully haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in children with very high-risk acute lymphoblastic leukemia: impact of center size: an analysis on behalf of the Acute Leukemia and Pediatric Disease Working Parties of the European Blood and Marrow Transplant group. *Blood*. 2010;115(17):3437-46.
22. Ciceri F, et al. A survey of fully haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in adults with high-risk acute leukemia: a risk factor analysis of outcomes for patients in remission at transplantation. *Blood*. 2008;112(9):3574-81.
23. Handgretinger R, et al. Cellular immune reconstitution after haploidentical transplantation in children. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2008;14(1 Suppl 1):59-65.
24. Barfield RC, et al. A one-step large-scale method for T- and B-cell depletion of mobilized PBSC for allogeneic transplantation. *Cytotherapy*. 2004;6(1):1-6.
25. Bader P, et al. Rapid immune recovery and low TRM in haploidentical stem cell transplantation in children and adolescence using CD3/CD19-depleted stem cells. *Best practice & research Clinical haematology*. 2011;24(3):331-7.
26. Schumm M, et al. Determination of residual T- and B-cell content after immunomagnetic depletion: proposal for flow cytometric analysis and results from 103 separations. *Cytotherapy*. 2006;8(5):465-72.
27. Locatelli F, et al. Negative depletion of alpha/beta+ T cells and of CD19+ B lymphocytes: a novel frontier to optimize the effect of innate immunity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Immunology letters*. 2013;155(1-2):21-3.
28. Handgretinger R. Negative depletion of CD3(+) and TcRalphabeta(+) T cells. *Current opinion in hematology*. 2012;19(6):434-9.
29. Wilhelm M, et al. Gammadelta T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. *Blood*. 2003;102(1):200-6.
30. Chiplunkar S, et al. gammadelta T cells in cancer immunotherapy: current status and future prospects. *Immunotherapy*. 2009;1(4):663-78.
31. Bonneville M, et al. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nature reviews Immunology*. 2010;10(7):467-78.
32. Minculescu L, Sengelov H. The role of gamma delta T cells in haematopoietic stem cell transplantation. *Scandinavian journal of immunology*. 2015;81(6):459-68.

33. Maniar A, et al. Human gammadelta T lymphocytes induce robust NK cell-mediated antitumor cytotoxicity through CD137 engagement. *Blood*. 2010;116(10):1726-33.
34. Chen ZW, Letvin NL. Adaptive immune response of Vgamma2Vdelta2 T cells: a new paradigm. *Trends in immunology*. 2003;24(4):213-9.
35. Zhang R, et al. Human NK cells positively regulate gammadelta T cells in response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2006;176(4):2610-6.
36. Alexander AA, et al. Isopentenyl pyrophosphate-activated CD56+{gamma}{delta} T lymphocytes display potent antitumor activity toward human squamous cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(13):4232-40.
37. Oevermann L, Handgretinger R. New strategies for haploidentical transplantation. *Pediatric research*. 2012;71(4 Pt 2):418-26.
38. Handgretinger R, P L, F F. Transplantation of TcR $\alpha\beta$ /CD19 depleted stem cells from haploidentical donors: robust engraftment and rapid immune reconstitution in children with high risk acute leukemia. *ASH Annual Meeting Abstracts 2011*;118:1005
39. Airoidi I, et al. $\gamma\delta$ T-cell reconstitution after HLA-haploidentical hematopoietic transplantation depleted of TCR- $\alpha\beta$ + /CD19+ lymphocytes. *Blood*. 2015;125(15):2349-58.
40. Lanier LL, et al. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1986;136(12):4480-6.
41. Huntington ND, et al. Developmental pathways that generate natural-killer-cell diversity in mice and humans. *Nature reviews Immunology*. 2007;7(9):703-14.
42. Whiteside TL, Herberman RB. Role of human natural killer cells in health and disease. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 1994;1(2):125-33.
43. Maghazachi AA. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *Current topics in microbiology and immunology*. 2010;341:37-58.
44. Sun JC, Lanier LL. Natural killer cells remember: an evolutionary bridge between innate and adaptive immunity? *European journal of immunology*. 2009;39(8):2059-64.
45. Cooper MA, et al. Talents of natural killers: NK cells in innate and adaptive immunity. *EMBO reports*. 2009;10(10):1103-10.
46. Farag SS, Caligiuri MA. Human natural killer cell development and biology. *Blood reviews*. 2006;20(3):123-37.
47. Kumar V, McNerney ME. A new self: MHC-class-I-independent natural-killer-cell self-tolerance. *Nature reviews Immunology*. 2005;5(5):363-74.
48. Ljunggren HG, Karre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunology today*. 1990;11(7):237-44.
49. Raulet DH, Vance RE. Self-tolerance of natural killer cells. *Nature reviews Immunology*. 2006;6(7):520-31.

50. Lee RK, et al. Perforin, Fas ligand, and tumor necrosis factor are the major cytotoxic molecules used by lymphokine-activated killer cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1996;157(5):1919-25.
51. Fauriat C, et al. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood*. 2010;115(11):2167-76.
52. Vivier E, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science (New York, NY)*. 2011;331(6013):44-9.
53. Leung W. Use of NK cell activity in cure by transplant. *British journal of haematology*. 2011;155(1):14-29.
54. Penack O, et al. CD56dimCD16neg cells are responsible for natural cytotoxicity against tumor targets. *Leukemia*. 2005;19(5):835-40.
55. Moretta L. Dissecting CD56^{dim} human NK cells. *Blood*. 2010;116(19):3689-91.
56. Fehniger TA, et al. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood*. 2003;101(8):3052-7.
57. Knorr DA, et al. Clinical utility of natural killer cells in cancer therapy and transplantation. *Seminars in immunology*. 2014;26(2):161-72.
58. Ruggeri L, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science (New York, NY)*. 2002;295(5562):2097-100.
59. Bank I, et al. A functional T3 molecule associated with a novel heterodimer on the surface of immature human thymocytes. *Nature*. 1986;322(6075):179-81.
60. Vantourout P, Hayday A. Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(2):88-100.
61. Toulon A, Breton L, et al. A role for human skin-resident T cells in wound healing. *The Journal of experimental medicine*. 2009;206(4):743-50.
62. Silva-Santos B, et al. $\gamma\delta$ T cells in cancer. *Nature Reviews Immunology*. 2015;15:683.
63. Kazen AR, Adams EJ. Evolution of the V, D, and J gene segments used in the primate gammadelta T-cell receptor reveals a dichotomy of conservation and diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(29):E332-40.
64. Groh V, et al. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science (New York, NY)*. 1998;279(5357):1737-40.
65. Kong Y, et al. The NKG2D ligand ULBP4 binds to TCR γ 9/delta2 and induces cytotoxicity to tumor cells through both TCRgammadelta and NKG2D. *Blood*. 2009;114(2):310-7.
66. Hudspeth K, et al. Engagement of NKp30 on Vdelta1 T cells induces the production of CCL3, CCL4, and CCL5 and suppresses HIV-1 replication. *Blood*. 2012;119(17):4013-6.
67. Gober HJ, et al. Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *The Journal of experimental medicine*. 2003;197(2):163-8.

68. Shen Y, et al. Adaptive immune response of Vgamma2Vdelta2+ T cells during mycobacterial infections. *Science (New York, NY)*. 2002;295(5563):2255-8.
69. Yamachika E, et al. The influence of zoledronate and teriparatide on gamma delta T cells in mice. *Journal of Dental Sciences*. 2017;12(4):333-9.
70. Morita CT, et al. Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human Vgamma2Vdelta2 T cells: discriminating friend from foe through the recognition of prenyl pyrophosphate antigens. *Immunological reviews*. 2007;215:59-76.
71. D'Asaro M, et al. V gamma 9V delta 2 T lymphocytes efficiently recognize and kill zoledronate-sensitized, imatinib-sensitive, and imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2010;184(6):3260-8.
72. Sebestyen Z, et al. RhoB Mediates Phosphoantigen Recognition by Vγ9Vδ2 T Cell Receptor. *Cell reports*. 2016;15(9):1973-85.
73. Correia DV, et al. Tumor cell recognition by gammadelta T lymphocytes: T-cell receptor vs. NK-cell receptors. *Oncoimmunology*. 2013;2(1):e22892.
74. Rincon-Orozco B, et al. Activation of V gamma 9V delta 2 T cells by NKG2D. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2005;175(4):2144-51.
75. Moser B, Brandes M. Gammadelta T cells: an alternative type of professional APC. *Trends in immunology*. 2006;27(3):112-8.
76. Brandes M, et al. Cross-presenting human gammadelta T cells induce robust CD8+ alphabeta T cell responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(7):2307-12.
77. Skeen MJ, Ziegler HK. Activation of gamma delta T cells for production of IFN-gamma is mediated by bacteria via macrophage-derived cytokines IL-1 and IL-12. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1995;154(11):5832-41.
78. Martin B, et al. Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals. *Immunity*. 2009;31(2):321-30.
79. Lafont V, et al. Production of TNF-alpha by human V gamma 9V delta 2 T cells via engagement of Fc gamma RIIIA, the low affinity type 3 receptor for the Fc portion of IgG, expressed upon TCR activation by nonpeptidic antigen. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2001;166(12):7190-9.
80. Deetz CO, et al. Gamma interferon secretion by human Vgamma2Vdelta2 T cells after stimulation with antibody against the T-cell receptor plus the Toll-Like receptor 2 agonist Pam3Cys. *Infection and immunity*. 2006;74(8):4505-11.
81. Wesch D, et al. Direct costimulatory effect of TLR3 ligand poly(I:C) on human gamma delta T lymphocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2006;176(3):1348-54.

82. Seidel UJ, et al. gammadelta T Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity with CD19 Antibodies Assessed by an Impedance-Based Label-Free Real-Time Cytotoxicity Assay. *Frontiers in immunology*. 2014;5:618.
83. Wang W, et al. NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy. *Frontiers in immunology*. 2015;6:368.
84. Dairon M. Fc receptor biology. *Annual review of immunology*. 1997;15:203-34.
85. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nature reviews Immunology*. 2008;8(1):34-47.
86. Pang DJ, et al. Understanding the complexity of gammadelta T-cell subsets in mouse and human. *Immunology*. 2012;136(3):283-90.
87. May C, et al. Advances in bispecific biotherapeutics for the treatment of cancer. *Biochemical pharmacology*. 2012;84(9):1105-12.
88. Sliwkowski MX, et al. Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). *Seminars in oncology*. 1999;26(4 Suppl 12):60-70.
89. Shak S. Overview of the trastuzumab (Herceptin) anti-HER2 monoclonal antibody clinical program in HER2-overexpressing metastatic breast cancer. Herceptin Multinational Investigator Study Group. *Seminars in oncology*. 1999;26(4 Suppl 12):71-7.
90. Seidel UJ, et al. Reduction of Minimal Residual Disease in Pediatric B-lineage Acute Lymphoblastic Leukemia by an Fc-optimized CD19 Antibody. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2016;24(9):1634-43.
91. Scheuermann RH, Racila E. CD19 antigen in leukemia and lymphoma diagnosis and immunotherapy. *Leukemia & lymphoma*. 1995;18(5-6):385-97.
92. Uckun F, et al. Detailed studies on expression and function of CD19 surface determinant by using B43 monoclonal antibody and the clinical potential of anti- CD19 immunotoxins. *Blood*. 1988;71(1):13-29.
93. Redpath S, et al. The influence of the hinge region length in binding of human IgG to human Fcγ receptors. *Human immunology*. 1998;59(11):720-7.
94. Sarmay G, et al. Mapping and comparison of the interaction sites on the Fc region of IgG responsible for triggering antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) through different types of human Fc γ receptor. *Molecular immunology*. 1992;29(5):633-9.
95. Morrison SL, et al.. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1984;81(21):6851-5.
96. Lazar GA, et al. Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(11):4005-10.

97. Kellner C, et al. The Fc-engineered CD19 antibody MOR208 (XmAb5574) induces natural killer cell-mediated lysis of acute lymphoblastic leukemia cells from pediatric and adult patients. *Leukemia*. 2013;27(7):1595-8.
98. Horton HM, et al. Potent in vitro and in vivo activity of an Fc-engineered anti-CD19 monoclonal antibody against lymphoma and leukemia. *Cancer research*. 2008;68(19):8049-57.
99. Chames P, et al. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *British journal of pharmacology*. 2009;157(2):220-33.
100. Soman G, et al. Analytical characterization of CH14.18: a mouse-human chimeric disialoganglioside-specific therapeutic antibody. *mAbs*. 2012;4(1):84-100.
101. Navid F, et al. Anti-GD2 antibody therapy for GD2-expressing tumors. *Current cancer drug targets*. 2010;10(2):200-9.
102. Hoy SM. Dinutuximab: A Review in High-Risk Neuroblastoma. *Targeted oncology*. 2016;11(2):247-53.
103. Rodan GA, Fleisch HA. Bisphosphonates: mechanisms of action. *The Journal of clinical investigation*. 1996;97(12):2692-6.
104. Fleisch H. Bisphosphonates in osteoporosis. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society*. 2003;12 Suppl 2:S142-6.
105. Michaelson MD, Smith MR. Bisphosphonates for treatment and prevention of bone metastases. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(32):8219-24.
106. Pavlakis N, Stockler M. Bisphosphonates for breast cancer. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2002(1):Cd003474.
107. Kunzmann V, et al. Gamma/delta T-cell stimulation by pamidronate. *The New England journal of medicine*. 1999;340(9):737-8.
108. Freed-Pastor WA, et al. Mutant p53 disrupts mammary tissue architecture via the mevalonate pathway. *Cell*. 2012;148(1-2):244-58.
109. Luckman SP, et al. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1998;13(4):581-9.
110. Thompson K, et al. Activation of gammadelta T cells by bisphosphonates. *Advances in experimental medicine and biology*. 2010;658:11-20.
111. Wang H, et al. Indirect Stimulation of Human V γ 2V δ 2 T Cells through Alterations in Isoprenoid Metabolism. *The Journal of Immunology*. 2011;187(10):5099-113.
112. Harly C, et al. Molecules and Mechanisms Implicated in the Peculiar Antigenic Activation Process of Human V γ 9V δ 2 T Cells. *Frontiers in immunology*. 2015;5(657).
113. De Libero G, Lau S-Y, Mori L. Phosphoantigen Presentation to TCR $\gamma\delta$ Cells, a Conundrum Getting Less Gray Zones. *Frontiers in immunology*. 2015;5:679-.

114. Kunzmann V, et al. Stimulation of gammadelta T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma. *Blood*. 2000;96(2):384-92.
115. Thiebaud D, et al. An in vitro and in vivo study of cytokines in the acute-phase response associated with bisphosphonates. *Calcified tissue international*. 1997;61(5):386-92.
116. Sauty A, et al. Interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha levels after bisphosphonates treatment in vitro and in patients with malignancy. *Bone*. 1996;18(2):133-9.
117. Ferlazzo V, et al. In vitro effects of aminobisphosphonates on Vgamma9Vdelta2 T cell activation and differentiation. *International journal of immunopathology and pharmacology*. 2006;19(2):309-17.
118. Thompson K, et al. Cytosolic entry of bisphosphonate drugs requires acidification of vesicles after fluid-phase endocytosis. *Molecular pharmacology*. 2006;69(5):1624-32.
119. Roelofs AJ, et al. Peripheral blood monocytes are responsible for gammadelta T cell activation induced by zoledronic acid through accumulation of IPP/DMAPP. *British journal of haematology*. 2009;144(2):245-50.
120. Gaffen SL, Liu KD. Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine*. 2004;28(3):109-23.
121. Morgan DA, et al. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science (New York, NY)*. 1976;193(4257):1007-8.
122. Mingari MC, et al. Human interleukin-2 promotes proliferation of activated B cells via surface receptors similar to those of activated T cells. *Nature*. 1984;312(5995):641-3.
123. Lenardo M, et al. Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annual review of immunology*. 1999;17:221-53.
124. Miyazaki T, et al. Three distinct IL-2 signaling pathways mediated by bcl-2, c-myc, and lck cooperate in hematopoietic cell proliferation. *Cell*. 1995;81(2):223-31.
125. Malek TR, Bayer AL. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nature reviews Immunology*. 2004;4(9):665-74.
126. Petrolini Capobianco M, et al. Human Interleukin 2 (IL-2) Promotion of Immune Regulation and Clinical Outcomes: A Review 2016.
127. Blackman MA, et al. A model system for peptide hormone action in differentiation: Interleukin 2 induces a B lymphoma to transcribe the J chain gene. *Cell*. 1986;47(4):609-17.
128. Carson WE, et al. A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival. *The Journal of clinical investigation*. 1997;99(5):937-43.
129. Khatri VP, et al. Ultra low dose interleukin-2 therapy promotes a type 1 cytokine profile in vivo in patients with AIDS and AIDS-associated malignancies. *The Journal of clinical investigation*. 1998;101(6):1373-8.
130. Glaspy JA. Therapeutic options in the management of renal cell carcinoma. *Seminars in oncology*. 2002;29(3, Supplement 7):41-6.

131. Rosenberg SA, et al. Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin 2. *JAMA*. 1994;271(12):907-13.
132. Atkins MB, et al. High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1999;17(7):2105-16.
133. Wang C, et al. Immune regulation by 4-1BB and 4-1BBL: complexities and challenges. *Immunological reviews*. 2009;229(1):192-215.
134. Wilcox RA, et al. Signaling through NK cell-associated CD137 promotes both helper function for CD8+ cytolytic T cells and responsiveness to IL-2 but not cytolytic activity. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2002;169(8):4230-6.
135. Goodwin RG, et al. Molecular cloning of a ligand for the inducible T cell gene 4-1BB: a member of an emerging family of cytokines with homology to tumor necrosis factor. *European journal of immunology*. 1993;23(10):2631-41.
136. <Jahresbericht 2017, Deutsches Kinderkrebsregister.pdf>.
137. Li HC, et al. The impact of cancer on children's physical, emotional, and psychosocial well-being. *Cancer nursing*. 2010;33(1):47-54.
138. Hillienhof A. Todesursachen: Jeder Vierte stirbt an Krebs. *Deutsches ÄrzteblattInternational*. 2012;109(6):234.
139. Kaatsch P, et al. Childhood Cancer Registry - Report 2017 (1980-2016). Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz 2018.
140. Pui CH, et al. A 50-year journey to cure childhood acute lymphoblastic leukemia. *Seminars in hematology*. 2013;50(3):185-96.
141. Smith MA, et al. Outcomes for children and adolescents with cancer: challenges for the twenty-first century. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(15):2625-34.
142. S1-Leitlinie 025/014: Akute lymphoblastische- (ALL) Leukämie im Kindesalter. AWMF online. 2016.
143. Bailey LC, et al. Bone-marrow relapse in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet Oncology*. 2008;9(9):873-83.
144. Grupp SA, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *The New England journal of medicine*. 2013;368(16):1509-18.
145. Lang P, et al. Chimeric CD19 antibody mediates cytotoxic activity against leukemic blasts with effector cells from pediatric patients who received T-cell-depleted allografts. *Blood*. 2004;103(10):3982-5.
146. Walter S, et al. Multipetide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival. *Nature medicine*. 2012;18(8):1254-61.
147. Herold G und Mitarbeiter. *Innere Medizin*. Köln: Gerd Herold; 2015. S.74

148. Gross TG, et al. Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Refractory or Recurrent Non-Hodgkin Lymphoma in Children and Adolescents. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2010;16(2):223-30.
149. Claviez A, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children and adolescents with recurrent and refractory Hodgkin lymphoma: an analysis of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood*. 2009;114(10):2060-7.
150. Meadows AT, et al. Second malignant neoplasms following childhood Hodgkin's disease: Treatment and splenectomy as risk factors. *Medical and Pediatric Oncology*. 1989;17(5-6):477-84.
151. Mora J. Dinutuximab for the treatment of pediatric patients with high-risk neuroblastoma. *Expert review of clinical pharmacology*. 2016;9(5):647-53.
152. Meeker TC, et al. A Unique Human B Lymphocyte Antigen Defined by a Monoclonal Antibody. *Hybridoma*. 1984;3(4):305-20.
153. Hofmann M, et al. Generation, selection and preclinical characterization of an Fc-optimized FLT3 antibody for the treatment of myeloid leukemia. *Leukemia*. 2012;26(6):1228-37.
154. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation Supplementum*. 1968;97:77-89.
155. Alter G, et al. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *Journal of immunological methods*. 2004;294(1-2):15-22.
156. Tomchuck SL, et al. Zoledronic Acid-Mediated Ex Vivo Expansion and Function of Human Umbilical Cord Blood Gamma Delta T Cells Is Distinct from Human Peripheral Blood Gamma Delta T Cells. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2015;21(2):S241-S2.
157. Gates BJ, DeLuca M. The production of oxyluciferin during the firefly luciferase light reaction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1975;169(2):616-21.
158. Kaskova ZM, et al. 1001 lights: luciferins, luciferases, their mechanisms of action and applications in chemical analysis, biology and medicine. *Chemical Society Reviews*. 2016;45(21):6048-77.
159. Smyth MJ, et al. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nature reviews Cancer*. 2002;2(11):850-61.
160. Seidel UJ, et al. Natural killer cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in tumor immunotherapy with therapeutic antibodies. *Frontiers in immunology*. 2013;4:76.
161. Corvaisier M, et al. V gamma 9V delta 2 T cell response to colon carcinoma cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2005;175(8):5481-8.
162. Wang R, et al. Natural killer cell-produced IFN- γ and TNF- α induce target cell cytolysis through up-regulation of ICAM-1. *Journal of leukocyte biology*. 2012;91(2):299-309.
163. Britton C, Alexander T. Flow cytometric assay for monitoring the activity of natural killer cells. *Clinical and Applied Immunology Reviews*. 2002;3(1):14-5.

164. Ziegler SF, et al. The activation antigen CD69. *Stem cells* (Dayton, Ohio). 1994;12(5):456-65.
165. Park JH, et al. CD19-targeted CAR T-cell therapeutics for hematologic malignancies: interpreting clinical outcomes to date. *Blood*. 2016;127(26):3312-20.
166. Braakman E, et al. CD16 on human gamma delta T lymphocytes: expression, function, and specificity for mouse IgG isotypes. *Cellular immunology*. 1992;143(1):97-107.
167. ClinicalTrials.gov NCT02399085, A Study to Evaluate the Safety and Efficacy of Lenalidomide With MOR00208 in Patients With R-R DLBCL (L-MIND). U.S. National Institutes of Health (2017). [
168. Tokuyama H, et al. V γ 9V δ 2 T cell cytotoxicity against tumor cells is enhanced by monoclonal antibody drugs—Rituximab and trastuzumab. *International Journal of Cancer*. 2008;122(11):2526-34.
169. Maschan M, et al. TCR-alpha/beta and CD19 depletion and treosulfan-based conditioning regimen in unrelated and haploidentical transplantation in children with acute myeloid leukemia. *Bone marrow transplantation*. 2016;51(5):668-74.
170. Foley B, et al. NK cell education after allogeneic transplantation: dissociation between recovery of cytokine-producing and cytotoxic functions. *Blood*. 2011;118(10):2784-92.
171. Gleason MK, et al. Tim-3 is an inducible human natural killer cell receptor that enhances interferon gamma production in response to galectin-9. *Blood*. 2012;119(13):3064-72.
172. Simonetta F, et al. NK Cell Functional Impairment after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Is Associated with Reduced Levels of T-bet and Eomesodermin. *The Journal of Immunology*. 2015;195(10):4712-20.
173. Nussbaumer O, et al. Essential requirements of zoledronate-induced cytokine and gammadelta T cell proliferative responses. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2013;191(3):1346-55.
174. Mavers M, et al. High-Risk Leukemia: Past, Present, and Future Role of NK Cells. *Journal of immunology research*. 2018;2018:1586905-.
175. Nussbaumer O, et al. DC-like cell-dependent activation of human natural killer cells by the bisphosphonate zoledronic acid is regulated by $\gamma\delta$ T lymphocytes. *Blood*. 2011;118(10):2743-51.
176. Whittington R, Faulds D. Interleukin-2. *Drugs*. 1993;46(3):446-514.
177. Henney CS, et al. Interleukin-2 augments natural killer cell activity. *Nature*. 1981;291:335.
178. Cairo C, et al. V γ 2V δ 2 T cell Costimulation Increases NK cell Killing of Monocyte-derived Dendritic Cells. *Immunology*. 144(3):422-30.
179. ClinicalTrials.gov NCT02639910, Phase II Study to Evaluate Safety and Preliminary Efficacy of MOR208 With Idelalisib or Venetoclax in R/R CLL/SLL Patients Pretreated With BTKi (COSMOS). U.S. National Institutes of Health (2018).
180. Handgretinger R, et al. The potential role of $\gamma\delta$ T cells after allogeneic HCT for leukemia. *Blood*. 2018;131(10):1063-72.

181. Ribot JC, et al. B7-CD28 costimulatory signals control the survival and proliferation of murine and human gammadelta T cells via IL-2 production. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2012;189(3):1202-8.
182. Voss SD, et al. Characterization of the interleukin 2 receptors (IL-2R) expressed on human natural killer cells activated in vivo by IL-2: association of the p64 IL-2R gamma chain with the IL-2R beta chain in functional intermediate-affinity IL-2R. *The Journal of experimental medicine*. 1992;176(2):531-41.
183. Lanier LL, et al. Functional and biochemical analysis of CD16 antigen on natural killer cells and granulocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1988;141(10):3478-85.
184. Alipour M, Safari Z. From information theory to quantitative description of steric effects. *Physical chemistry chemical physics : PCCP*. 2016;18(27):17917-29.
185. Hlavacek WS, et al. Steric Effects on Multivalent Ligand-Receptor Binding: Exclusion of Ligand Sites by Bound Cell Surface Receptors. *Biophysical Journal*. 1999;76(6):3031-43.
186. Molfetta R, et al. Regulation of NKG2D-Dependent NK Cell Functions: The Yin and the Yang of Receptor Endocytosis. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(8):1677.
187. Yu J. Zoledronate activates NK cells. *Blood*. 2011;118(10):2642-3.
188. Lee SJ, et al. 4-1BB signal stimulates the activation, expansion, and effector functions of $\gamma\delta$ T cells in mice and humans. *European journal of immunology*. 2013;43(7):1839-48.
189. Takahashi C, et al. Cutting edge: 4-1BB is a bona fide CD8 T cell survival signal. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1999;162(9):5037-40.
190. Hurtado JC, et al. Signals through 4-1BB are costimulatory to previously activated splenic T cells and inhibit activation-induced cell death. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1997;158(6):2600-9.
191. Perko R, et al. Gamma delta T cell reconstitution is associated with fewer infections and improved event-free survival after hematopoietic stem cell transplantation for pediatric leukemia. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2015;21(1):130-6.
192. Meraviglia S, et al. In vivo manipulation of Vgamma9Vdelta2 T cells with zoledronate and low-dose interleukin-2 for immunotherapy of advanced breast cancer patients. *Clinical and experimental immunology*. 2010;161(2):290-7.
193. Bertaina A, et al. Zoledronic acid boosts gammadelta T-cell activity in children receiving alphabeta(+) T and CD19(+) cell-depleted grafts from an HLA-haplo-identical donor. *Oncoimmunology*. 2017;6(2):e1216291.
194. Lang JM, et al. Pilot trial of interleukin-2 and zoledronic acid to augment $\gamma\delta$ T cells as treatment for patients with refractory renal cell carcinoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2011;60(10):1447-60.
195. Sakamoto M, et al. Adoptive Immunotherapy for Advanced Non-small Cell Lung Cancer Using Zoledronate-expanded $\gamma\delta$ T Cells: A Phase I Clinical Study. *Journal of Immunotherapy*. 2011;34(2):202-11.

196. Bennouna J, et al. Phase-I study of Innacell gammadelta, an autologous cell-therapy product highly enriched in gamma9delta2 T lymphocytes, in combination with IL-2, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII. 2008;57(11):1599-609.
197. Siegler EL, et al. Off-the-Shelf CAR-NK Cells for Cancer Immunotherapy. *Cell stem cell*. 2018;23(2):160-1.
198. Capsomidis A, et al. Chimeric Antigen Receptor-Engineered Human Gamma Delta T Cells: Enhanced Cytotoxicity with Retention of Cross Presentation. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2018;26(2):354-65.
199. Fujisaki, H., et al., Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy. *Cancer Res*, 2009. 69(9): p. 4010-7.
200. Anderson, D.M., et al., Functional characterization of the human interleukin-15 receptor alpha chain and close linkage of IL15RA and IL2RA genes. *J Biol Chem*, 1995. 270(50): p. 29862-9.
201. Handgretinger, R et al. Akute lymphatische Leukämie im Kindesalter: Klinische Erfolge optimierter risikoadaptierter Therapien. *Dtsch Arztebl International*. 2015; 112(20): p24
202. Horrer A (2016) *In vitro* Untersuchung antileukämischer NK-Zell Subpopulationen auf ihre Lysefähigkeit gegenüber primären pädiatrischen BCP-ALL Blasten. Medizinische Dissertationsschrift, Universität Tübingen
203. Shao, Z., et al., CD137 ligand, a member of the tumor necrosis factor family, regulates immune responses via reverse signal transduction. *Journal of Leukocyte Biology*. 2011; 89(1): p21-29
204. Schlegel, P., et al., Ex vivo Expansion of autologous, donor-derived NK-, gd T- and Cytokine Induced Killer (CIK) cells post haploidentical hematopoietic stem cell transplantation results in increased antitumor activity. *Bone Marrow Transplant*, 2019 (accepted)
205. Schlegel, P., et al., Ex vivo Expansion of autologous, donor-derived NK-, gd T- and Cytokine Induced Killer (CIK) cells post haploidentical hematopoietic stem cell transplantation results in increased antitumor activity. *Bone Marrow Transplant*, 2019(accepted)

8. ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL

Die wissenschaftliche Studie wurde von Dr. med. P. Schlegel und Prof. Dr. med. P. Lang an der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen konzipiert und betreut.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Dr. med. P. Schlegel und Dr. rer. nat. C. Klohse von mir eigenständig durchgeführt und statistisch ausgewertet.

Die Zelllinien NALM-16 mCherry-Luc, LS mCherry-Luc, NALM-6 mCherry-Luc wurde von Dr. med. Patrick Schlegel, die Zelllinie K562-mb15-41BBL von Dr. D. Campana MD, National University Cancer Institute, Singapore, und der Fc-optimierte monoklonale CD19 Antikörper 4G7SDIE von Dr. rer. nat. L. Grosse-Hovest und Prof. Dr. med. G. Jung, Universität Tübingen, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 22.05.2019

9. ANHANG

9.1 Abbildungen

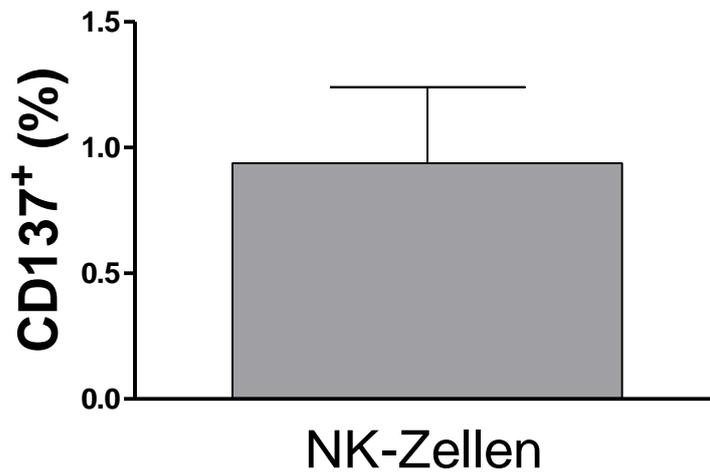


Abb. 9-1 CD137-Expression auf frisch isolierten NK-Zellen

Durchflusszytometrisch wurde die CD137-Expression auf frisch isolierten NK-Zellen aus Vollblut bestimmt. n=5

10. VERÖFFENTLICHUNGEN

10.1 Publikation

Zur Veröffentlichung angenommen:

Schlegel P, Lang AM, Matela M, Horrer A, Schilling A, Jöchner A, Wiedenmann M, Seitz CM, Döring M, Feuchtinger T, Heubach F, Rabsteyn F, Handgretinger R and Lang P (2019) Ex vivo Expansion of autologous, donor-derived NK-, gd T- and Cytokine Induced Killer (CIK) cells post haploidentical hematopoietic stem cell transplantation results in increased antitumor activity, Bone Marrow Transplant

10.2 Kongress

European Bone Marrow Transplantation (EBMT) 2015, Istanbul: Complementary activity of NK and $\gamma\delta$ T cells post depleted haploidentical hematopoietic stem cell transplantation (Poster)

11. DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich während des Entstehungsprozesses dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben:

- Herrn Prof. Dr. med. Rupert Handgretinger für die freundliche Aufnahme an der Universitätskinderklinik Tübingen und das Interesse an meiner Arbeit.
- Herrn Prof. Dr. med. Peter Lang für die Bereitstellung des interessanten Themas und die stets offene Tür.
- Herrn Dr. med. Patrick Schlegel für die überaus engagierte Betreuung und alles, was ich von ihm lernen durfte. Er hat mich mit seiner Begeisterung für die Klinische Forschung und seinem unermüdlichen Einsatz angesteckt und mich stets an seinem umfangreichen Wissen teilhaben lassen. Daraus entstanden viele spannende Diskussionen oft bis zu später Stunde, die entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Vielen Dank auch für die schöne Zeit außerhalb des Labors, die ihn mir zu einem geschätzten Freund haben werden lassen.
- Dem Sonderforschungsbund 685 für die Aufnahme in das Graduiertenkolleg und die Möglichkeit zur Teilnahme an internationalen Kongressen. Beides hat mir die wunderbare Gelegenheit eröffnet mein Wissen in Immunologie zu vertiefen.
- Den Kollegen der Arbeitsgruppe Lang für die Diskussionen, die unkomplizierte Zusammenarbeit und Anregungen zur vorliegenden Arbeit. Insbesondere Chihab Klohse der mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Außerdem Annika Horrer, Marie Matela, Anne-Marie Lang, Max Wiedenmann, Alexander Jöchner und Jana Hau für die schöne Zeit in und außerhalb des Labors.
- Kathrin Gonsior für den Austausch während des Schreibprozess.
- Meinen Freunden für die vielseitige Unterstützung und Ermutigung.
- Meinen Eltern, meiner Schwester Marie und Christian Lellmann für Alles.