

Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
Schwerpunkte: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie/Onkologie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger

Einfluss aktivierender und inhibitorischer Rezeptoren auf
die NK- und $\gamma\delta$ T-Zell vermittelte Zytotoxizität und
antikörpervermittelte Lyse von Neuroblastomzelllinien

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Alexander Haide Jöchner

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. P. Lang
2. Berichterstatter: Professorin Dr. M. Neumann

Tag der Disputation: 20.01.2021

1. Einleitung	6
1.1 Neuroblastom	6
1.1.1 Definition, Epidemiologie und Stadieneinteilung	6
1.1.2 Therapie	6
1.1.2.1 Antikörpertherapie	7
1.1.2.2 Zellbasierte Therapie	10
1.2 Natürliche Killerzellen	12
1.2.1 Maturation und Differenzierung der NK-Zellen	13
1.2.2 Regulation	15
1.2.2.1 Aktivierende und inhibierende Rezeptoren	17
1.2.3 Alloreaktivitätsmodelle	20
1.2.3.1 Ligand-Ligand (LL) Modell	20
1.2.3.2 Rezeptor-Ligand (RL) Modell	20
1.2.3.3 Rezeptor-Rezeptor Modell	21
1.2.3.4 KIR-Genotyping Modell	21
1.2.3.5 Licensing Modell	22
1.3 $\gamma\delta$T-Zellen	24
1.4 Projektskizze	26
2 Material und Methoden	27
2.1 Allgemeine Materialien und Geräte	27
2.1.1 Geräte	27
2.1.2 Plastik- und Verbrauchsmaterialien	28
2.1.3 Puffer und Lösungen	29
2.1.4 Software	32
2.2 Zellzahlbestimmung und Mikroskopie	32
2.3 Anti-GD2-Antikörper ch14.18	34
2.4 Zelllinien	34
2.4.1 Neuroblastomzelllinien	36
2.4.2 Transduzierte Neuroblastomzelllinien	36
2.4.3 Erythroleukämische Zelllinie K562	37
2.4.4 Feederzelllinie K562mb15-41BBL	37
2.5 Gesunde Spender für PBMC	37
2.6 Zellkultur	38
2.6.1 Suspensionszelllinien	38
2.6.2 Adhärenente Zelllinien	38
2.7 Kryokonservierung und Auftauen	39
2.8 Isolierung von peripheren mononukleären Zellen	40
2.9 NK-Expansion	41
2.10 Durchflusszytometrie	43
2.11 Durchflusszytometrische Zellsortierung	48

2.12	Transduktion von Neuroblastomzelllinien	49
2.13	Stimulierung der HLA-I Expression	50
2.14	CD107a-Assay	51
2.15	Luciferase-Assay	53
2.16	xCELLigence	55
3	Ergebnisse	58
3.1	NK-Zell Expansion	58
3.2	Charakterisierung der Zelllinien	61
3.3	Funktionelle Testung im xCELLigence	63
3.3.1	LAN-1	64
3.3.2	LS	65
3.4	Funktionelle Testung im CD107a-Assay	65
3.4.1	Analyse der funktionellen Testung bei Spender 1	66
3.4.1.1	Frisch isolierte PBMC	66
3.4.1.2	Expandierte NK-Zellen	70
3.4.2	Analyse der funktionellen Testung bei Spender 2	75
3.4.2.1	Frisch isolierte PBMC	76
3.4.2.2	Expandierte NK-Zellen	79
3.5	Einfluss des therapeutischen Antikörpers ch14.18	82
3.5.1	Spender 1	84
3.5.2	Spender 2	85
3.6	Meta-Analyse der funktionellen Testung	87
3.6.1	Spender 1	87
3.6.1.1	Meta-Analyse der PBMC	87
3.6.1.2	Meta-Analyse der NK-Zellen	89
3.6.2	Spender 2	90
3.6.2.1	Meta-Analyse der PBMC	91
3.6.2.2	Meta-Analyse der NK-Zellen	93
3.7	Einfluss von HLA-I	94
3.7.1	HLA-I Stimulation mit IFN γ	95
3.7.2	HLA-I Mismatch	98
3.7.3	HLA-I Blockade	102
3.7.4	Kombination von HLA-I Stimulation und HLA-I Blockade	103
3.8	Einfluss von aktivierenden Liganden	104
3.8.1	Spender 1	106
	Spender 2	108
3.9	Einfluss von spenderspezifischen Unterschieden	110
3.10	$\gamma\delta$ T-Zellaktivität	115
4	Diskussion	119
4.1	Antitumorale Aktivität von NK-Zellen	119

4.2	Expansion und Charakterisierung der NK-Zellen	120
4.3	Charakterisierung der Neuroblastom-Zelllinien	121
4.4	Funktionelle Testung	122
4.5	Einfluss von GD2, HLA-I, aktivierenden Liganden und KIR Haplotyp	123
4.5.1	HLA-I	123
4.5.2	GD2	125
4.5.3	Aktivierende Liganden	127
4.5.3.1	NKG2D Liganden	128
4.5.3.2	DNAM-1 Liganden	129
4.6	Anwendung der Alloreaktivitätsmodelle	129
4.6.1	Ligand-Ligand Modell	130
4.6.1.1	Klinische Anwendung	131
4.6.2	Rezeptor-Ligand Modell	132
4.6.2.1	Klinische Anwendung	134
4.6.3	KIR-Genotyping Modell	136
4.6.3.1	Klinische Anwendung	137
4.6.4	Licensing Modell	139
4.6.4.1	Klinische Anwendung	141
4.6.5	Zusammenfassende Beurteilung der Modelle	142
4.7	Antitumorale Aktivität von $\gamma\delta$T-Zellen	145
5	Zusammenfassung	148
6	Literaturverzeichnis	152
7	Tabellenverzeichnis	162
8	Abbildungsverzeichnis	163
9	Erklärung zum Eigenanteil	167
10	Danksagung	168

1. Einleitung

1.1 Neuroblastom

1.1.1 Definition, Epidemiologie und Stadieneinteilung

Das Neuroblastom ist ein embryonaler Tumor, der seinen Ursprung in neuroektodermalen Zellen des Neuralrohrs hat, welche später das sympathische Nervensystem bilden. Deshalb kann sich das Neuroblastom überall dort manifestieren wo auch sympathische Nervenzellen zu finden sind wie etwa die Nebennieren, die Paraganglien und die Ganglien des zervikalen/thorakalen/abdominalen Grenzstranges, nicht aber im Gehirn.

Es handelt sich beim Neuroblastom um den häufigsten soliden extrakraniellen Tumor im Kindesalter. Da es sich um einen embryonalen Tumor handelt, sinkt die Inzidenz mit steigendem Lebensalter. In den Jahren von 1995 – 2015 betrug die Inzidenz des Neuroblastoms in Deutschland 13,2 Erkrankungen pro eine Million Kinder, der Median des Alters bei Neudiagnose lag bei rund 15 Monaten [1].

Die Stadieneinteilung erfolgt anhand der INSS-Kriterien (International Neuroblastoma Staging System), dabei werden die Größe des Tumors, lokale Ausbreitung, Lymphknotenbefall und das Vorhandensein von Fernmetastasen miteinbezogen [2]. Ungefähr 50% aller Patienten weisen bei Diagnosestellung schon Fernmetastasen auf, dabei sind hauptsächlich Knochenmark und Knochen betroffen [3].

Da die INSS-Kriterien eine chirurgische Entfernung des Tumors voraussetzen wurde 2008 das Klassifikationssystem der INRG (International Neuroblastoma Risk Group) eingeführt, welches anhand der Bildgebung mittels sogenannter IDRFs (Image-defined Risk Faktoren) eine prätherapeutische Stadieneinteilung ermöglicht [4, 5].

1.1.2 Therapie

Die Therapie des Neuroblastoms ist abhängig von der Risikogruppe, diese wird durch das International Risk Grouping System (INRG) bestimmt. Dabei fließen das Alter bei Diagnose, Tumorgöße, lokale Infiltration und Fernmetastasierung

mit ein sowie histologische und genetische Komponenten wie etwa Differenzierungsgrad, Amplifikation von MYC-N [6] oder chromosomale Veränderungen [5]. Anhand dieser Variablen werden die Patienten in eine „low-risk“, „intermediate-risk“ und eine „high-risk“ Gruppe eingeteilt [7].

Aufgrund der komplexen Tumorbilogie variiert die Prognose der verschiedenen Risikogruppen stark, so haben die „low-risk“ und die „intermediat-risk“ Gruppen eine 5-Jahres-Überlebensrate von 90%, trotz multimodaler Therapiekonzepte sinkt sie in der „high-risk“ Gruppe auf 40% [8, 9]. Insbesondere die Amplifikation von MYC-N geht mit einer verschlechterten Prognose einher [6]. Eine Ausnahme bildet das Stadium 4S, dieses weist eine hohe Rate an Spontanremissionen auf und hat somit eine exzellente Prognose [10].

Das multimodale Therapiekonzept der „high-risk“ Gruppe beinhaltet neben der operativen Therapie, der Strahlentherapie sowie einer (neo-)adjuvanten Chemotherapie auch die autologe Stammzelltransplantation. Diese ermöglicht einem höheren Anteil der Patienten ein ereignisfreies Überleben [8], aber das Gesamtüberleben bleibt gleich verglichen mit der konventionellen Chemotherapie [8, 11]. Zusätzlich sollte noch die Gabe von 13-*cis*-Retinsäure (Isotretinoin) erwogen werden, diese verlängert ebenfalls das ereignisfreie Überleben [8]. Trotz dieses multimodalen Therapiekonzeptes bleibt die Langzeitprognose für Patienten mit „high-risk“ Neuroblastomen schlecht. Daher liegt das Hauptaugenmerk der wissenschaftlichen Forschung vor allem auf der Entwicklung zell- und antikörperbasierter Therapien. Dabei ist vor allem die Therapie mit GD2-Antikörpern bereits ein etablierter Teil der Therapieprotokolle von Hochrisiko-Patienten und versprechen eine deutliche Verbesserung der Prognose [12].

1.1.2.1 Antikörpertherapie

Die Standardtherapie für Hochrisiko-Neuroblastome besteht seit annähernd zwei Jahrzehnten aus operativer Therapie, gefolgt von myeloablativer Chemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation und anschließender Gabe von 13-*cis*-Retinsäure [13]. Dennoch bleibt die Prognose für diese

Patienten schlecht, die Gesamtüberlebensrate bewegt sich im Bereich von unter 40% [14, 15]. Diese Patienten profitieren erheblich von einer Immuntherapie mit einem monoklonalen Antikörper, der gegen das Disialogangliosid GD2 gerichtet ist [12]. Es handelt sich dabei um ein Glykolipid, das wohl in die Adhäsion von Neuroblastom- und Melanomzellen an Proteine der extrazellulären Matrix involviert ist [16]. GD2 wird auf der Zelloberfläche von Neuroblastomen in hoher Dichte exprimiert [17, 18], natürlicherweise kommt es nur in geringerer Menge auf der Oberfläche von Neuronen, sensiblen Nervenzellen und Melanozyten vor [19, 20].

Die Vorteile von GD2 als Zielstruktur einer antikörperbasierten Therapie sind einerseits die bereits erwähnte hohe Expressionsdichte auf Neuroblastomen und die sehr geringe Expression auf körpereigenem Gewebe und andererseits die gleichmäßige Expression von GD2 auf der Zelloberfläche im Gegensatz zu anderen Epitopen wie z.B. Oberflächenrezeptoren, die infolge von Antikörpertherapie internalisiert werden können und dadurch zu einem Immunescape der Tumorzellen führen würden [21].

Die Entwicklung der GD2-Antikörper für therapeutische Zwecke begann in den 1980er Jahren, dabei wurde zuerst an murinen Antikörpern wie m3F8 [22] oder 14.G2a [23] geforscht. Diese zeigten gute *in vitro* und *in vivo* Ergebnisse, die vor allem durch zwei Mechanismen bedingt waren: der komplement-abhängigen Zytotoxizität (CDC: complement-dependent cytotoxicity) und der antikörper-abhängigen Zytotoxizität (ADCC: antibody-dependent cellular cytotoxicity). Die CDC wird durch die Bindung des Serinproteasenkompleses C1 an die Fc-Teile von mindestens zwei GD2-gebundenen Antikörpern ausgelöst. Durch die klassische Komplementkaskade wird der Membranangriffskomplex gebildet und schließlich die Targetzelle lysiert [24]. Die ADCC wird durch die Bindung des Fc-Teils eines Antikörpers an den Fc-Rezeptor einer Immunzelle ausgelöst. Der Antikörper bindet mit seiner variablen Region an sein Antigen, z.B. ein Oberflächenprotein einer Tumorzelle, und bringt dadurch Tumorzelle und Fc-Rezeptor tragende Effektorzellen (z.B. NK-Zellen, Monozyten, neutrophile Granulozyten und Makrophagen) in räumliche Nähe. Es entsteht eine zytolytische Synapse, in diese werden

Granzyme und Perforin ausgeschüttet welche wiederum zur Lyse der Tumorzelle führen. Sind die Effektorzellen zur Phagozytose fähig werden die Tumorzellen nicht lysiert, sondern Fc-abhängig phagozytiert, man spricht dann von antikörpervermittelte Phagozytose (ADCP: antibody-dependent cellular phagocytosis) [25, 26].

Die häufigsten Nebenwirkungen dieser Antikörper sind Schmerzen, Fieber und Kreislaufbeschwerden, ein großes Problem ist die Bildung von humanen Anti-Maus-Antikörpern (HAMA: human anti-mouse antibody) durch die Applikation muriner Antikörper. HAMAs deaktivieren die therapeutischen Antikörper, indem sie Antikörper-Antikörperkomplexe bilden, wodurch es nicht mehr zur ADCC kommen kann. Aufgrund dieser beiden Probleme, die Nebenwirkungen und die Bildung von HAMAs zu reduzieren, wurde versucht die murinen Anteile der Antikörper durch humane Anteile zu ersetzen und damit weniger immunogene Antikörper zu produzieren [27]. Bei dem von uns verwendeten chimären anti-GD2-Antikörper ch14.18 wurde genau dies erreicht, indem die variable Region des murinen anti-GD2-Antikörpers 14.G2a mit der konstanten Region des humanen Immunglobulins IgG1k fusioniert wurde [28]. Die durch den Antikörper ch14.18 vermittelte ADCC ist um das 50-100fache effektiver verglichen mit dem ursprünglichen Antikörper 14.G2a [29], außerdem werden gegen den chimären Antikörper ch14.18 signifikant weniger HAMAs gebildet als gegen den murinen Antikörper. Zurzeit wird der chimäre Antikörper ch14.18 von uns in einer klinischen Studie (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02258815) getestet um dessen Wirksamkeit im Zusammenspiel mit der Applikation von IL-2 zu erforschen. Die wichtigsten Nebenwirkungen sind neuropathische Schmerzen sowie die Freisetzung von Zytokinen, die bis hin zum Zytokinfreisetzungssyndrom mit Kapillarleck führen kann. Dosislimitierend sind dabei die neuropathischen Schmerzen, da die meisten Patienten regelmäßig darunter leiden [30]. Zur Verbesserung der Lebensqualität dieser Patienten mit neuropathischen Schmerzen unter der anti-GD2-Antikörpertherapie wurde der Antikörper humanisiert (hu14.18K332A). Dabei ist durch eine Punktmutation im Fc-Teil die Bindung an Komplementfaktoren verringert, dies vermindert zwar die

CDC, die ADCC bleibt jedoch erhalten und damit die starke anti-Tumor Aktivität [30, 31].

In einer aktuellen Studie der Children's Oncology Group (ClinicalTrials.gov number: NCT00026312) zeigt sich die Überlegenheit der Anti-GD2-Antikörpertherapie in Verbindung mit der Gabe von GM-CSF, IL-2 und Isotretinoin verglichen mit der alleinigen Gabe von Isotretinoin im Anschluss an die Standardtherapie [12]. Infolgedessen erhielt 2015 der chimäre Anti-GD2-Antikörper Dinutuximab (ch14.18, Handelsnamen Unituxin) in den USA und in Europa eine Zulassung zur Therapie von Neuroblastomen [14].

Antikörperbasierte Immuntherapie ist ein vielversprechendes Themengebiet bezüglich der Therapie fortgeschrittener Neuroblastome und so sind verschiedenste Arten von Epitopen und Antikörpern Gegenstand der Forschung, z.B. der gegen B7-H3 gerichtete monoklonale Antikörper 8H9 [32] oder der bispezifische Anti-GD2/Anti-CD3 Antikörper 3F8BiAb [33].

1.1.2.2 Zellbasierte Therapie

Eine andere Möglichkeit zur Therapie von Hochrisiko-Patienten oder Patienten mit rezidivierenden Neuroblastomen besteht in der zellbasierten Therapie, diese besteht vor allem aus der allogenen (hämatopoetischen) Stammzelltransplantation (Allo-SZT/HSZT). Eine Studie der Children's Cancer Group (CCG) hat gezeigt, dass sich die autologe und die allogene Stammzelltransplantation hinsichtlich ihres Outcome nicht unterscheiden [34]. In den letzten Jahren ergaben sich viele Hinweise für die Vorteile der haploidenten Stammzelltransplantation (Haplo-SZT), so sind dies neben praktischen Vorteilen wie leichter Verfügbarkeit der Spender, höherer Bereitschaft zur Spende und einer vergleichbaren Rate an Graft-vs-Host-Disease (GvHD) durch verbesserte Transplantate und Nachsorge nach Transplantation [35, 36] vor allem der der Graft-vs-Tumor- (GvT-) Effekt, der ein besseres Langzeitüberleben verspricht [37-39]. Illhardt et al. haben erst kürzlich die Daten zweier Phase I/II Studien mit insgesamt 26 High-Risk-Neuroblastomen veröffentlicht und dabei gezeigt, dass die haploidente SZT bei gutem Engraftment und guter Verträglichkeit der autologen SZT hinsichtlich des

Langzeitüberlebens nicht überlegen ist. Eine mögliche Erklärung dafür könnte in der relativ hohen Tumorlast der eingeschlossenen Patienten liegen [40]. Zusammenfassend hat sich gezeigt, dass Patienten mit Neuroblastom-Rezidiv von einer haploidenten Stammzelltransplantation profitieren und diese sogar langfristig zur Remission führen kann [40, 41]. Insbesondere profitieren besonders diejenigen Patienten von der haploidenten SZT, deren Knochenmark durch die intensive Chemotherapie stark vorgeschädigt ist und bei denen eine autologe SZT als zu risikoreich erachtet wird.

NK-Zellen verursachen im Vergleich zu T- und B-Lymphozyten keine nennenswerte GvHD aber bewirken einen starken GvL-Effekt [42], durch die *in vitro* Expansion von NK-Zellen kann man diesen Effekt zur Verbesserung des Engraftments und zur Behandlung der MRD (Minimal Residual Disease) nutzen [43-45]. Es hat sich gezeigt, dass Neuroblastomzellen wie auch andere pädiatrische solide Tumoren gut durch *in vitro* expandierte NK- lysiert werden können [46], in Kombination mit Anti-GD2-Antikörpern wird die Lyse noch verstärkt [47]. Ebenso bewirkt die Verabreichung von expandierten NK-Zellen im Anschluss an eine haploidente Stammzelltransplantation eine Verlängerung der Überlebenszeit von pädiatrischen Patienten mit soliden Tumoren bzw. hämatologischen Erkrankungen [48, 49].

CAR T-Zellen mit genetisch modifiziertem Antigen-Rezeptor (CAR: Chimeric Antigen Receptor) stellen die neueste Entwicklung in der Krebstherapie dar. Dabei handelt es sich um genetisch modifizierte T-Zellen, die einen antigenspezifischen Rezeptor exprimieren, der ohne MHC-abhängige Antigenpräsentation die T-Zelle aktivieren kann [50-52]. Eine der am meisten untersuchten CAR T-Zellen sind CD19-spezifische CAR T-Zellen, da CD19 auf proB-, präB-, reifen B-Zellen und den meisten Lymphomen und Leukämien vorkommt, aber nicht auf anderen hämatopoetischen Zellen, und somit eine gute Zielstruktur für die CAR T-Zell Therapie darstellt [53]. Solche CD19-spezifische CAR T-Zellen wurden auch bereits am Patienten zur Therapie von rezidivierten bzw. Chemotherapie-resistenten B-Zell Leukämien angewendet [54, 55]. Für Neuroblastome und auch Melanome gibt es mit dem Disialogangliosid GD2 ein ebenso potentes, weil spezifisches Ziel (vgl. Kap.

1.1.2.1) für CAR T-Zellen. GD2-spezifische CAR T-Zellen wurden bereits erfolgreich in präklinischen Studien und im Mausmodell getestet [56, 57] und auch die ersten Versuche am Patienten scheinen vielversprechend zu sein [56], nichtsdestotrotz ist die Erforschung und Entwicklung antikörperspezifischer CAR T-Zellen erst in den Anfängen und es ist noch viel Forschungsarbeit auf diesem Gebiet zu leisten.

1.2 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind relative große, granuliert Lymphozyten und stellen beim gesunden Erwachsenen 5-15% der Lymphozyten im peripheren Blut dar [58]. Sie werden klassischerweise zum angeborenen Immunsystem gezählt, da sie im Gegensatz zu B- oder T-Lymphozyten keine antikörperspezifischen Rezeptoren exprimieren. Man findet sie vor allem in lymphatischem und extralymphatischem Gewebe von Knochen, Milz, Lymphknoten und Blut [59]. Menschliche NK-Zellen stellen sich in der Durchflusszytometrie als CD3⁻ CD56⁺ NKp46⁺ Lymphozyten dar und werden zurzeit über diese phänotypischen Marker definiert [60].

Sie erkennen virusinfizierte oder maligne entartete Zellen durch sog. „Stressliganden“ auf der Zelloberfläche und vermitteln über die Sekretion von Zytokinen, Chemokinen und direkter Zytotoxizität deren Bekämpfung. Zu den wichtigsten von NK-Zellen ausgeschütteten Zytokinen gehört vor allem IFN γ aber auch etliche andere wie TNF α , IL-10, IL-3 oder GM-CSF [59]. Die NK-vermittelte Zytotoxizität führt zur Lyse der als körperfremd oder maligne entartet erkannten Zellen. Dies kann prinzipiell auf zwei Arten geschehen: einmal über die Sekretion von Perforin und Granzymen, die dann zur Zerstörung der Zellmembran führen und durch Aktivierung von Caspasen zur Apoptose der Zielzelle. Der nicht-sekretorische Pathway induziert Apoptose indem sog. Todesrezeptoren wie FAS/CD95 auf der Oberfläche durch die entsprechenden Liganden (FASL) auf den Effektorzellen aktiviert werden [61]. Außerdem kann durch Bindung des Antikörpers einer antikörpermarkierten Zelle an den Fc γ IIIA-Rezeptor das zytotoxische Potential der NK-Zellen vervielfacht werden, dieser

Mechanismus wird ADCC (antibody dependent cellular cytotoxicity) genannt und spielt eine große Rolle in der Antikörpertherapie von Tumoren [62, 63].

Eine weitere wichtige Eigenschaft von NK-Zellen ist die Toleranz gegenüber körpereigenem Gewebe, d.h. sie können durch die Erkennung von „missing self“ und „induced self“ zwischen Selbst und Fremd unterscheiden. „Missing self“ bezeichnet dabei die verringerte bzw. fehlende Expression von HLA Klasse I durch infizierte oder entartete Zellen, unter „induced self“ versteht man die gesteigerte Expression von aktivierenden Liganden wie MIC A/B, ULBP1-6 oder DNAM-1 Liganden auf der Oberfläche gestresster Zellen. Diese Signale werden durch aktivierende NK-Oberflächenrezeptoren (bspw. NKG2D-, DNAM-1-Rezeptor) erkannt und führen zur Lyse der Targetzellen [59, 64, 65]. Im Umkehrschluss bedeutete dies, dass NK-Zellen verstärkt auf Zellen reagieren, die wenig oder kein HLA I exprimieren [58].

NK-Zellen durchlaufen während ihrer Reifung im Gegensatz zu B- und T-Lymphozyten kein HLA-restringiertes Priming und deshalb ist die NK-Aktivität nicht auf die Bindung eines spezifischen Peptidantigens angewiesen. Daraus folgt, dass NK-Zellen mit ihrem breitem Einsatzgebiet, u.a. auch die Interaktion mit APCs, Monozyten und T-Zellen, ein wichtiges Bindeglied zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem darstellen [66, 67].

Neuesten Erkenntnissen zufolge besitzen auch NK-Zellen eine Gedächtnisfunktion ähnlich wie B- und T-Lymphozyten, sodass nach Kontakt mit beispielsweise viralen Antigenen oder Haptenen eine Sensibilisierung erfolgt. Diese Sensibilisierung führt zur Bildung einer bestimmten Subpopulation von NK-Zellen, die für längere Zeit im Körper persistieren und nach Restimulation wieder expandieren kann [68]. Aufgrund dieser Tatsache muss die klassische Einordnung der NK-Zellen als Teil der angeborenen Immunabwehr neu überdacht werden.

1.2.1 Maturation und Differenzierung der NK-Zellen

Die Entwicklung der NK-Zellen folgt einem komplexen System, das erst zum Teil verstanden wird. Reife NK-Zellen stellen sich, wie bereits erwähnt, in der

Durchflusszytometrie als CD3⁻ CD56⁺ NKp46⁺ Lymphozyten dar. Weiterhin werden in der Literatur zahlreiche Untergruppen wie „helper“- NK-Zellen, regulatorische, zytotoxische sowie antigenpräsentierende NK-Zellen aufgeführt, die alle unterschiedliche immunologische Eigenschaften aufweisen [69, 70]. Die zwei wichtigsten phänotypischen Gruppen sind die CD56^{bright} CD16⁻ und die CD56^{dim} CD16⁺ Populationen. Neben diesem phänotypischen Unterschied erfüllen diese beiden Populationen auch unterschiedliche Aufgaben, daher ist die Einteilung in diese zwei Gruppen logisch. Die CD56^{bright} CD16⁻ Population erfüllt eine eher immunregulatorische Aufgabe mit hoher Zytokinproduktion aber geringer zytotoxischer Aktivität und steht im Gegensatz zur CD56^{dim} CD16⁺ Population, die eine viel stärkere zytotoxische Aktivität aufweist, aber dafür eine geringe Zytokinproduktion. Betrachtet man die Verteilung der Populationen im Gewebe, so zeigt sich ebenfalls diese Einteilung. Die CD56^{dim} CD16⁺ Population macht einen Großteil der im Blut zirkulierenden NK-Zellen aus während die CD56^{bright} CD16⁻ Population eher im lymphatischen Gewebe zu finden ist, was vom funktionellen Standpunkt gesehen eine leicht verständliche Tatsache ist [60, 71].

Die Entwicklung der NK-Zellen wirft zurzeit noch viele Fragen auf, z.B. ob die NK-Subpopulationen festgelegt sind oder ineinander übergehen können, also die Differenzierung bereits früh in der Entwicklung vorprogrammiert ist oder ob die verschiedenen Subpopulationen vielleicht sogar aus unterschiedlichen Progenitorzellen entstehen. Fest steht nur, dass sich NK-zellen aus im Knochenmark ansässigen CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen entwickeln [60, 71, 72].

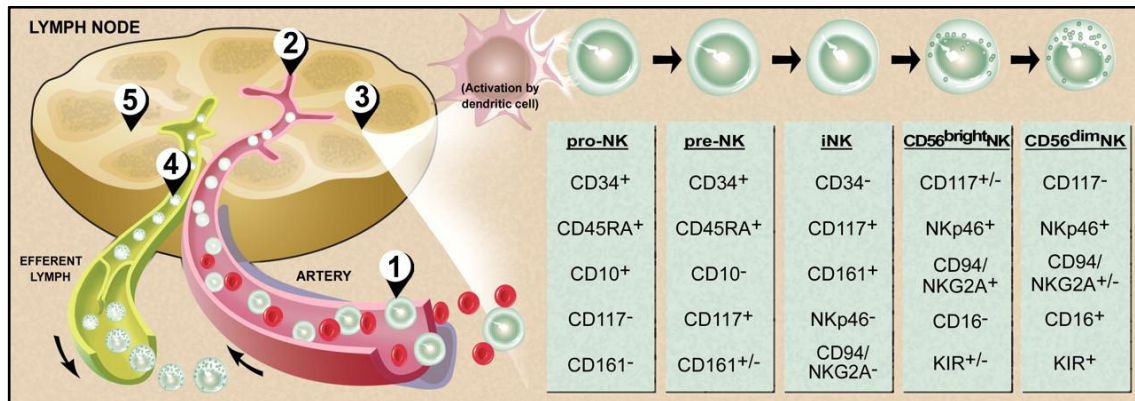


Abbildung 1.2.1 Die Entwicklung menschlicher NK-Zellen

CD34⁺CD45RA⁺ hämatopoetische Stammzellen aus dem Knochenmark wandern aus dem Blut (1) über hochendotheliale Venuele (2) in den Lymphknoten und dort in die interfollikuläre Zone (3) ein. Dort werden proNK-Zellen zur Differenzierung angeregt und durchlaufen verschiedene Stadien bis sie sich zu CD56^{bright} und CD56^{dim} NK-Zellen entwickeln. Reife NK-Zellen verlassen den Lymphknoten über die efferente Lymphbahn (4), wobei ein Teil der CD56^{bright} NK-Zellen im lymphatischen Gewebe verbleiben und z.B. mit dendritischen Zellen (5) interagieren

Aus Michael A. Caligiuri *Blood* 2008;112:461-469 [60]

1.2.2 Regulation

NK-Zellen sind im Gegensatz zu B- und T-Zellen nicht antigenspezifisch und umso wichtiger ist es in diesem Fall, dass sich ihre Aktivität nicht gegen körpereigenes Gewebe richtet. Um das richtige Maß zu finden zwischen Aktivierung und Selbsttoleranz werden NK-Zellen durch eine Vielzahl an Rezeptoren reguliert. Dabei handelt es sich um aktivierende Rezeptoren, die auf Gefahrensignale reagieren, inhibierende Rezeptoren, die eigenes Gewebe erkennen und die Aktivität dämpfen sowie costimulatorische Rezeptoren. Es besteht stets ein dynamisches Gleichgewicht zwischen aktivierenden und inhibierenden Signalen, wobei letztlich dieses Gleichgewicht den Ausschlag gibt, ob die NK-Zelle ihre Effektor-Funktion ausübt oder nicht [58, 73]. Die für das Gleichgewicht entscheidende Variable ist die Expressionsdichte der verschiedenen Rezeptoren und diese ist nicht statisch, sondern abhängig von zahlreichen Faktoren, wie z.B. das immunologische Milieu, Reifegrad der NK-Zellen und der Interaktion mit Immun- oder Targetzellen [74]. Neben den Rezeptoren und ihren Liganden spielen verschiedenste Zytokine eine entscheidende Rolle in der NK-Zell Regulation, darunter fallen proinflammatorische (IFN γ , TNF α , G-CSF, GM-CSF, IL3), antiinflammatorische

(IL5, IL10, IL13) und costimulatorische (TGF- β) Zytokine. Diese sowohl autokrin als auch parakrin wirkenden Zytokine beeinflussen nicht nur die NK-Zellen, sondern auch alle anderen Zellen des angeborenen bzw. erworbenen Immunsystems und vereinen diese in einer regulierten Immunantwort [59, 75]. Dafür spielen auch die von NK-Zellen sezernierten Chemokine (z.B. CCL2-5, XCL1, CXCL8) eine tragende Rolle, da diese die gezielte Migration der Immunzellen an ihren Bestimmungsort bewirken [75].

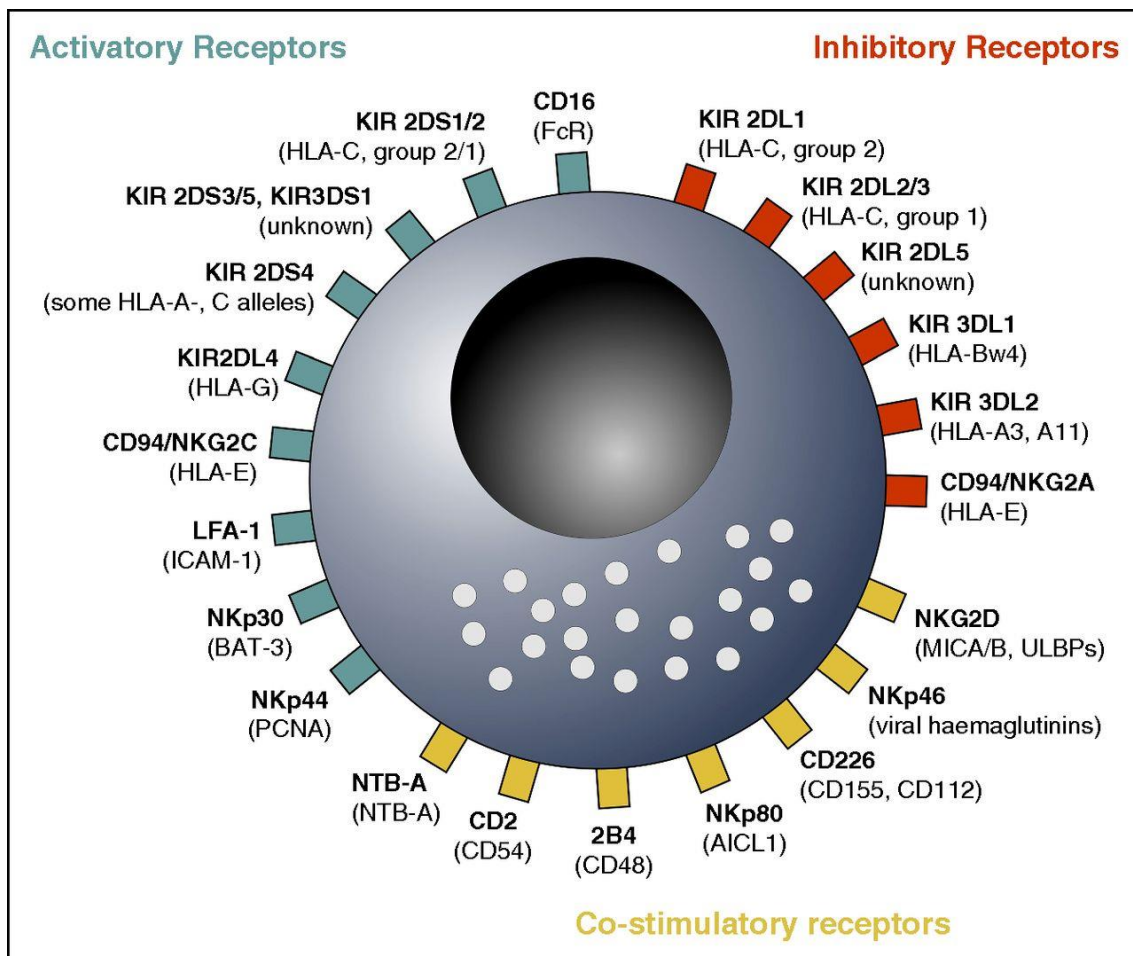


Abbildung 1.2.2 NK-Zell Rezeptoren und deren Liganden

Dargestellt sind die wichtigsten NK-Zell Oberflächenrezeptoren, deren Liganden sind in den Klammern aufgeführt. Das Gleichgewicht zwischen aktivierenden, inhibierenden und costimulatorischen Rezeptoren bestimmt die Aktivität der NK-Zellen. Viele andere Rezeptoren wie Zytokin-/ Chemokinrezeptoren oder Adhäsionsmoleküle sind nicht dargestellt. Aus Rupert Handgretinger et al. Blood 2016;127:3341-3349 [76]

1.2.2.1 Aktivierende und inhibierende Rezeptoren

Die wichtigsten aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren auf NK-Zellen sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Rezeptor	Ligand	Bemerkung
Inhibierende Rezeptoren [77]		
KIR2DL1 (CD158a)	HLA-C2	Cw2,4,5,6,15,17
KIR2DL2/3 (CD158b)	HLA-C1	Cw1,3,7,8,12,13,14
KIR3DL1 (CD158e)	HLA-Bw4	Bw4-80I: B*51, *52, *53, *57, *58,
KIR3DL2 (CD158k)	HLA-A3, A11	A*24
Aktivierende Rezeptoren [77]		
KIR2DS1	HLA-C2	Cw2,4,5,6,15,17
KIR2DS2	HLA-C1	Cw1,3,7,8,12,13,14
KIR3DS1	HLA-Bw4	Bw4-80I: B*51, *52, *53, *57, *58, A*24 Bw4-80T: B*13, *27, *37, *44
NKG2D	MICA/B, ULBP1/2/3/4	
CD226 (DNAM-1)	CD112, CD155	
CD16	Fc-Teil von IgG – AK	

Tabelle 1.1 Die wichtigsten aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren und ihre Liganden.

Die wichtigsten Oberflächenrezeptoren von NK-Zellen gehören alle zu den sog. KIR-Rezeptoren (Killer cell immunoglobuline-like receptors), einer Familie von transmembranösen Glykoproteinen die alle zur Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) gehören [78]. KIR-Rezeptoren besitzen entweder zwei oder drei Ig-ähnliche Domänen und ebenso entweder einen kurzen (S) oder einen langen (L) zytoplasmatischen Schwanz, daher die Nomenklatur (KIR $\underline{2D}$ oder KIR $\underline{3D}$ bzw. KIR $\underline{2DS}$ oder KIR $\underline{2DL}$) [79]. KIR-Rezeptoren mit langem zytoplasmatischem

Schwanz besitzen normalerweise zwei ITIMs (Immunoreceptor Tyrosine Inhibitory Motif) und vermitteln inhibitorische Signale wohingegen die KIR-Rezeptoren mit einem kurzen zytoplasmatischen Schwanz über das mit ITAMs (Immunoreceptor Tyrosine Activating Motif) assoziierte Protein DAP 12 aktivierende Signale generieren (siehe Abbildung 1.2.3) [80, 81].

Die Interaktion zwischen KIR-Rezeptor und KIR-Liganden (HLA Klasse I) ist vor allem inhibitorischer Natur, da die Signale der inhibitorischen KIRs die aktivierenden KIRs unterdrücken. Auch die Tatsache, dass es KIR Haplotypen gibt bei denen alle KIR2DS/3DS-Gene für nicht funktionelle Rezeptoren codieren spricht für eine untergeordnete Rolle der aktivierenden KIRs [82]. Die Stärke der Inhibition unterscheidet sich je nach KIR-Rezeptor und gebundenem HLA-I, so vermittelt beispielsweise HLA-C2 gebunden an KIR2DL1 (CD158a) eine sehr starke Inhibition wohingegen HLA-C1 gebunden an KIR2DL2/3 (CD158b) eine mittlere bzw. schwache Inhibition vermitteln. HLA-Bw4 bindet KIR3DL1 (CD158e) und vermittelt abhängig vom individuellen HLA-Bw4-Allel ein mittel bis schwach inhibitorisches Signal [83].

Neben den KIR-Rezeptoren gibt es noch zahlreiche andere Rezeptoren, die für das NK-Signaling eine wichtige Rolle spielen, für uns sind das insbesondere NKG2D/ DNAM-1 und CD16. Der NKG2D-Rezeptor ist einer der am besten untersuchten aktivierenden NK-Rezeptoren, er wird jedoch unter anderem auch auf NKT-Zellen, $\gamma\delta$ T- und CD8 T-Zellen exprimiert. Seine Liganden im menschlichen Körper sind zum einen die MHC class-I polypeptide-related chain (MIC) Proteine MICA/B sowie die cytomegalovirus UL16-binding proteins (ULBP) ULBP1-4. Die NKG2DL werden vor allem auf infizierten, gestressten oder entarteten Zellen hochreguliert. Zellstress bedeutet dabei oxidativer Stress, genotoxischer Stress aufgrund von DNA-Schäden oder virale Infektionen. Nach Bindung seiner Liganden führt die Aktivierung des NKG2DR zu NK-vermittelter Lyse und zu costimulatorischen Signalen für zytotoxische T-Lymphozyten [84]. DNAM-1 ist ein aktivierender Rezeptor auf fast allen NK-Zellen, T-Zellen und Monozyten. Seine Liganden sind die Adhäsionsmoleküle PVR (Poliovirus Receptor, CD112) und Nectin-2 (CD155). Die Aktivierung von DNAM-1 führt zu verstärkter Zytotoxizität und Zytokinproduktion bei NK- und T-Zellen [85].

Bemerkenswerterweise ist die Funktion von DNAM-1 an die Präsenz von LFA-1 (Lymphocytes Function-associated Antigen 1) gekoppelt, ist LFA-1 nicht vorhanden so funktioniert die DNAM-1 vermittelte NK-Zell Aktivierung nicht [86]. CD16 ist ein Oberflächenrezeptor auf NK-Zellen der seine Signale über die FCεRI γ-Kette oder über die CD3 ζ-Kette sendet, er bindet an den Fc-Teil von IgG (*hinge*-Region) [87]. CD16 wird vor allem auf ruhenden NK-Zellen exprimiert und rekrutiert diese nach Bindung seiner Liganden. Die Aktivierung von CD16 führt somit zu einer massiv verstärkten ADCC und direkten Zytotoxizität [81].

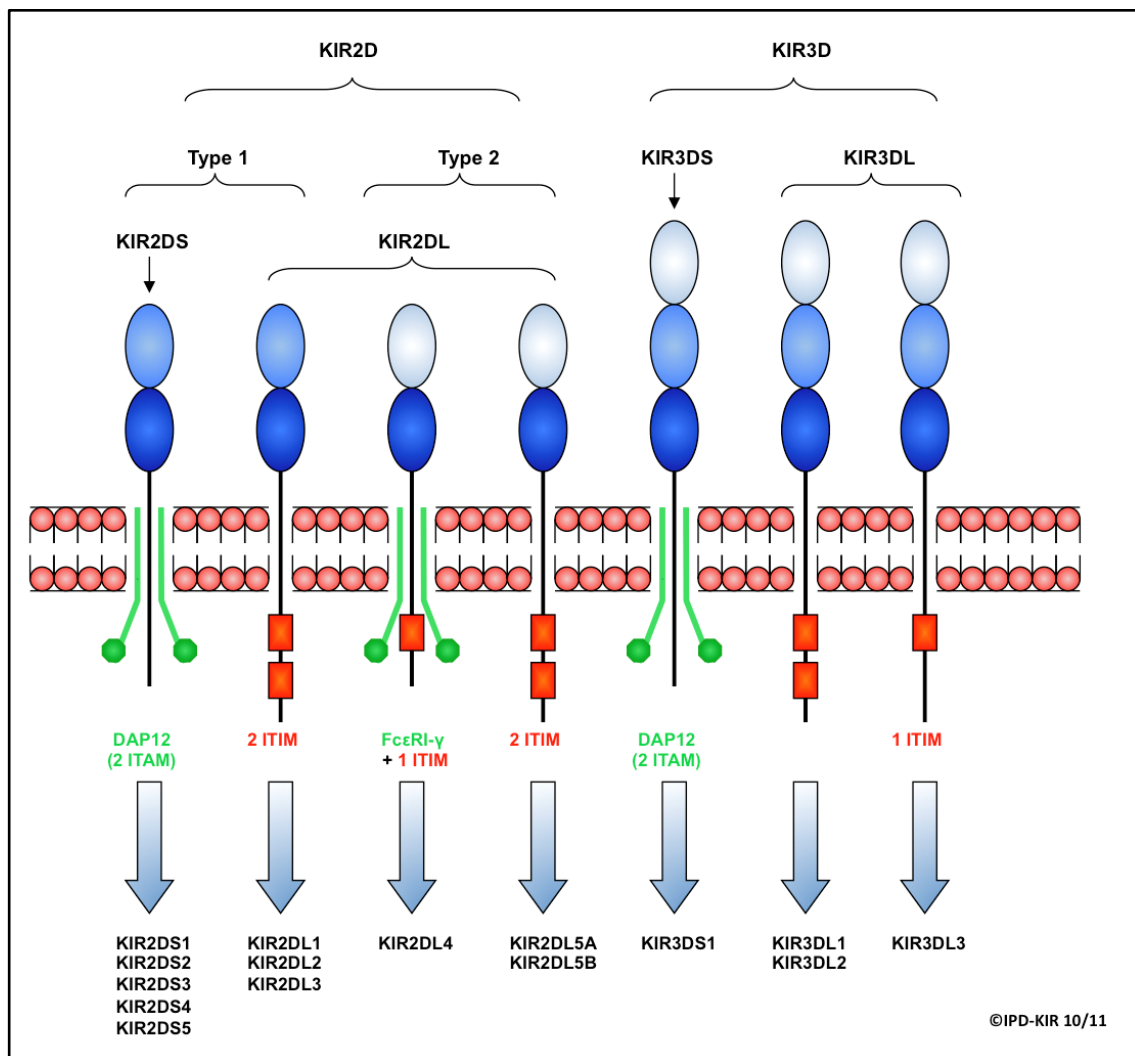


Abbildung 1.2.3 Proteinstruktur aktivierender und inhibierender KIR-Rezeptoren

Aktivierende Rezeptoren sind in Grün und inhibierende Rezeptoren in Rot dargestellt. Aus Robinson et al. 2005, *Nucleic Acids Research* [79]

1.2.3 Alloreaktivitätsmodelle

Die Grundannahme der Alloreaktivitätsmodelle ist folgende: Inhibierende KIR-Rezeptoren binden HLA Klasse I Moleküle (HLA-A/-B/-C), darüber hinaus werden die HLA-I Antigene in Gruppen eingeteilt, je nach dem welchen KIR-Rezeptor sie binden (vgl. Tabelle 1.1). Durch Haplo-SZT können alloreaktive NK-Zellen vom Spender in ein Milieu mit anderer HLA-I Expression übertragen werden [42]. In so einem Fall kann es dazu kommen, dass aufgrund fehlender HLA-I Liganden die Aktivierung des oder der dominanten KIR-Rezeptoren ausbleibt und die fehlende Inhibition zu einer Aktivierung der NK-Zelle führt.

1.2.3.1 Ligand-Ligand (LL) Modell

Die Arbeitsgruppe um Andrea Velardi in Perugia postulierte als erste das „Ligand-Ligand“ (LL) Modell im Rahmen von haploidenten Stammzelltransplantationen, um eine Aussage über die Alloreaktivität von Spender NK-Zellen treffen zu können [42]. Dabei geht man von der HLA-Typisierung der Spender aus und schließt daraus auf deren KIR-Rezeptor Repertoire. Unterscheiden sich die KIR-Liganden von Spender und Empfänger so liegt ein LL Mismatch vor. Jedoch ist dieses Modell nicht immer zuverlässig, da HLA-I und KIR-Genotyp unabhängig voneinander vererbt werden. Die Gene für die KIR-Rezeptoren liegen auf Chromosom 19 und die Gene für die HLA-I Moleküle auf Chromosom 6. Daher ist es nicht unmöglich, dass innerhalb eines Individuums ein bestimmtes Klasse I HLA exprimiert wird, der dazugehörige KIR-Rezeptor jedoch nicht bzw. umgekehrt [75].

1.2.3.2 Rezeptor-Ligand (RL) Modell

Aufgrund der ungenügenden Vorhersagen des LL Modells wurde es am St. Jude Hospital in Memphis weiterentwickelt zum „Rezeptor-Ligand“ (RL) Modell. Die Bestimmung der KIR-Rezeptor Expression vom Spender in Verbindung mit der HLA-Typisierung des Empfängers bietet die Möglichkeit, einen Mismatch zwischen Spender KIR-Rezeptoren und Empfänger KIR-Liganden zu bestimmen [88].

1.2.3.3 Rezeptor-Rezeptor Modell

Das „Rezeptor-Rezeptor“ (RR) Modell oder „Nantes“ Modell wird bei einem Mismatch zwischen Spender und Empfänger KIR-Rezeptoren angewandt [89]. Dieses Modell wurde in Stanford von McQueen et al. zum „KIR Haplotyp“ Modell weiterentwickelt. Dabei wurden die mit KIR-Mismatch assoziierten GvHD Fälle betrachtet und es fiel auf, dass in den allermeisten dieser Fälle der Spender Gene für zwei aktivierende KIR Rezeptoren (KIR Haplotyp B) besaß [75, 90]. Weiterhin konnte dieselbe Arbeitsgruppe zeigen, dass das GvHD-Risiko erhöht ist bei Patienten mit KIR Haplotyp A nach allogener SZT mit HLA-identen Geschwistern als Spendern, die den KIR Haplotyp B besitzen [90].

1.2.3.4 KIR-Genotyping Modell

Laut dem „KIR Genotyping“ Modell ist die potenzielle NK-Alloreaktivität umso stärker, je mehr aktivierende Rezeptoren die Spender NK-Zellen besitzen. KIR Haplotyp A besitzt nur KIR2DS4 als aktivierendes Gen, wohingegen KIR Haplotyp B zusätzlich noch KIR2DS1 und KIR2DS2 besitzt [91]. Bei AML-Patienten zeigte sich, dass Patienten nach HSZT nicht verwandter Spender mit Haplotyp A ein schlechteres Gesamtüberleben hatten als Patienten nach HSZT nicht verwandter Spender mit Haplotyp B [67]. Dabei scheinen die molekulargenetischen Voraussetzungen auch eine Rolle im Outcome der AML-Patienten zu spielen, insbesondere die Anlage der Zentromer- (Cen) und Telomerregion (Tel). Besitzen AML-Patienten eine homozygote Cen-B Region, so haben diese Patienten laut einer großen Studie mit 1086 Patienten eine geringere Rezidivrate als Patienten mit homozygotem Cen-A [67]. Ein Grund dafür könnte sein, dass Cen- und Tel-Region jeweils unterschiedliche KIR-Content Scores haben, so kodiert etwa Cen-B für KIR2DS2 und KIR2DL2 und Cen-A für KIR2DL3. KIR2DL2 bietet gegenüber KIR2DL3 eine höhere Affinität für HLA-C1/C2 Epitope, dadurch haben diese KIR2DL2 exprimierenden Zellen ein effektiveres Licensing und deshalb eine stärkere Antwort der NK-Zellen [92-94].

1.2.3.5 Licensing Modell

Die beschriebenen Modelle, Perugia LL Modell [42], Memphis RL Modell [88] und das Stanford KIR Haplotype Modell [90] dienen alle zur Vorhersage der NK-Alloreaktivität, dies wird für die Spenderauswahl bei einer HSZT zur Maximierung der Effektivität benutzt.

Die Alloreaktivität reifer NK-Zellen ist darüber hinaus noch von vielen anderen Umgebungsfaktoren abhängig. Dazu gehören inflammatorische Zytokine oder Stressliganden wie MICA/B, ULBP1-6, PVR oder Nectin-2 [95]. Diese Faktoren spielen auch beim sogenannten „Licensing“ eine wichtige Rolle, laut diesem Modell werden NK-Zellen, deren KIR-Rezeptoren während der Reifung mit ihrem korrespondierenden HLA-Liganden in Berührung gekommen sind als „licensed“ oder als „educated“ bezeichnet. Im Gegensatz dazu sind NK-Zellen, deren KIR-Rezeptoren keinen Kontakt zu ihrem entsprechenden Liganden hatten „unlicensed“ oder „uneducated“. Im Folgenden werde ich der Einfachheit halber von „licensed“ bzw. „unlicensed“ sprechend, da die Begriffe als gleichwertig zu verstehen sind. Die Fähigkeit zur Lyse von Targetzellen bei licensed bzw. unlicensed NK-Zellen ist maßgeblich von den Umgebungsfaktoren abhängig. Normalerweise sind die licensed NK-Zellen im Steady-State besser zur Lyse fähig, unter inflammatorischen Bedingungen jedoch kann sich das Verhältnis ins Gegenteil verkehren und dann besitzen die unlicensed NK-Zellen eine bessere Lysefähigkeit [96]. In Situationen bei denen starke aktivierende Signale vorliegen wie z.B. bei der ADCC oder im hochinflammatorischen Setting sind unlicensed NK-Zellen durch die schwächere Stimulation ihrer inhibierenden Rezeptoren besser in der Lage Infektionen zu kontrollieren als licensed NK-Zellen. Licensed NK-Zellen werden aufgrund ihres Reifeprozesses („NK-Licensing/-Education“) durch die Aktivierung ihrer inhibierenden Rezeptoren stärker gehemmt als unlicensed NK-Zellen [97].

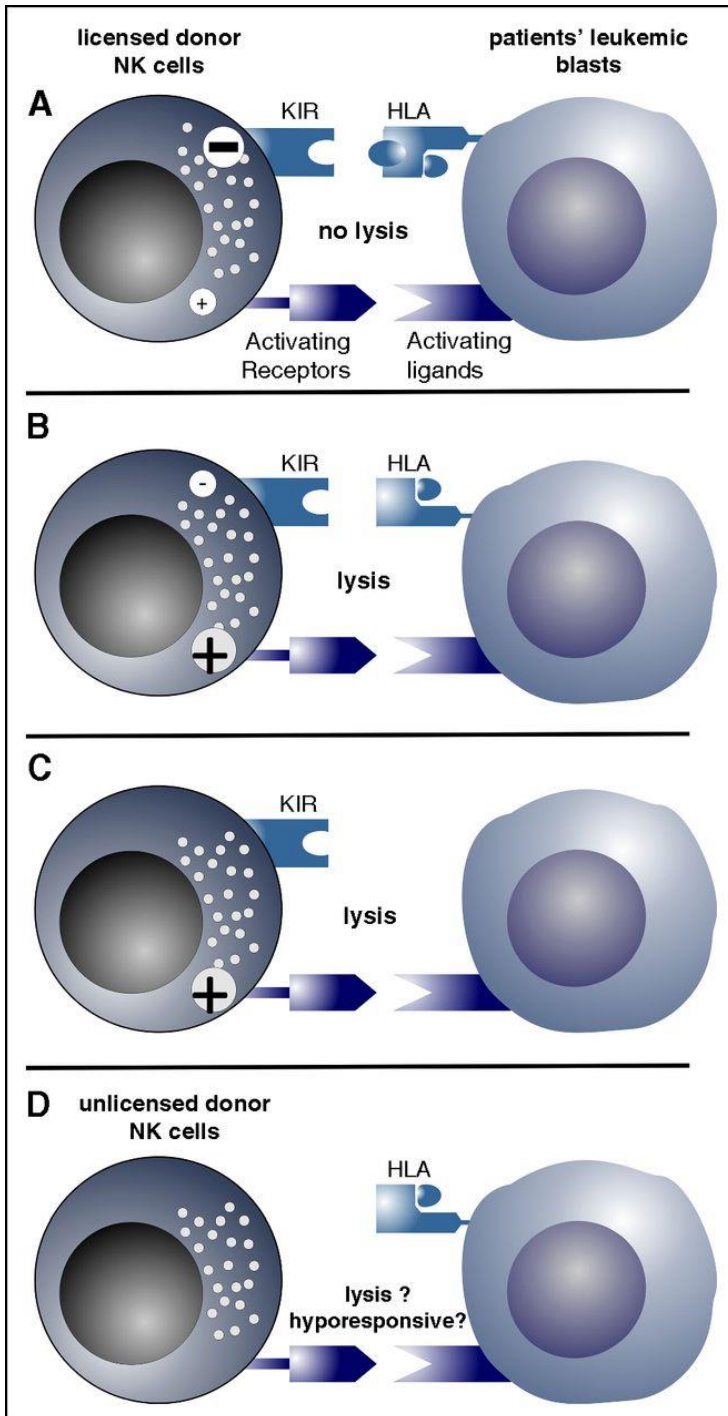


Abbildung 1.2.4 Möglichkeiten der NK-Alloreaktivität

(A) Licensed NK-Zellen werden durch Aktivierung inhibitorischer KIRs gehemmt, es findet keine Lyse der Targetzellen statt. (B) Inhibitorische KIRs binden keine Liganden, es findet keine Hemmung der NK-Zellen statt und die NK-Zelle lysiert die Targetzelle. (C) Die Empfänger-Targetzellen exprimieren kein HLA I und können aufgrund dessen die NK-Zellen nicht inhibieren, darauf folgt die Aktivierung der Spender NK-Zellen. (D) Die NK-Zelle exprimiert keine KIRs und ist deshalb unlicensed. Solche KIR negative NK-Zellen sind eine der ersten Lymphozytenpopulationen die sich nach HSZT rekonstituieren. Diese NK-Zellen gelten als hyporesponsiv, können aber nach Zytokinstimulation eine Effektorfunktion ausüben. Aus Rupert Handgretinger et al. *Blood* 2016;127:3341-3349 [76]

1.3 $\gamma\delta$ T-Zellen

$\gamma\delta$ T-Zellen sind eine Subpopulation von T-Zellen die 1985 erstmalig von Bank et al. [98] beschrieben wurden. Im Blut machen $\gamma\delta$ T-Zellen nur etwa 1-5% der gesamten T-Zellpopulation aus, wohingegen im Gewebe wie etwa Haut oder Darm 50-90% der CD3⁺ Zellen $\gamma\delta$ T-Zellen sind [99]. $\gamma\delta$ T-Zellen besitzen zahlreiche antitumoröse und antiinfektiöse Eigenschaften, darüber hinaus scheinen sie aber auch in anderen Bereichen wie beispielsweise in der Wundheilung eine Rolle zu spielen [100, 101].

Die Entwicklung von $\gamma\delta$ T-Zellen findet wie bei allen T-Zellen im Thymus statt, dort erhalten sie durch V(D)J-Rekombination ihren spezifischen T-Zellrezeptor (TCR) [102], analog zu $\alpha\beta$ T-Zellen besteht der $\gamma\delta$ TCR aus einer γ - und einer δ -Kette. Der Großteil der im Blut zirkulierenden $\gamma\delta$ T-Zellen (50-95%) sind V γ 9V δ 2T-Zellen, sie exprimieren also einen TCR bestehend aus einer V γ 9- und einer V δ 2-Kette. Die zweithäufigste Subpopulation sind die V δ 1T-Zellen mit einem TCR aus einer unspezifischen V γ - und einer V δ 1-Kette, diese kommen vor allem in immunologischen Geweben (Haut, Leber, Milz, Epithelien) und Tumoren vor [100].

V γ 9V δ 2T-Zellen sind die am besten erforschte Subpopulation der $\gamma\delta$ T-Zellen, ihre wichtigsten Funktionen sind die Tumor- und Infektabwehr. Der V γ 9V δ 2TCR erkennt verschiedenste, von Erregern produzierte oder körpereigene Pyrophosphat-Metabolite der Isoprenoid-Biosynthese wie HMBPP ((E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphat) oder IPP (Isopentenylpyrophosphat) bzw. dessen Isomer DMAPP (Dimethylallylpyrophosphat), auch als Phosphoantigene bekannt [103]. Letzteres sind Produkte des physiologischen Mevalonat-Stoffwechselwegs, die in maligne entarteten Zellen kumulieren und dadurch von V γ 9V δ 2T-Zellen identifiziert und durch Freisetzung von Perforin und Granzymen oder über den TRAIL/FasL-Signalweg zerstört werden können [104, 105]. Außerdem führt die Akkumulation von IPP zu einer Konformationsänderung der Extrazellulärdomäne des Transmembranproteins Butyrophilin A1 (BTN3A1), wodurch das Protein durch den V γ 9V δ 2TCR erkannt werden kann. Analog zu den verwandten NK-Zellen besitzen auch V γ 9V δ 2T-Zellen NKRs (Natural Killer Receptors) wie NKG2D, DNAM-1, NKp30, NKp44

und KIRs wie CD94/NKG2A oder KIR2DL1-3 [106, 107]. Nicht zuletzt können aktivierte V γ 9V δ 2T-Zellen auch durch Freisetzung von Zytokinen wie IL-17, IFN γ und TNF α auf andere Immunzellen, z.B. Makrophagen oder T-Helferzellen regulatorisch bzw. aktivierend einwirken [108-110].

Über die Funktion von V δ 1T-Zellen und ihre Liganden ist derzeit nur wenig bekannt, als gesichert gilt, dass sie auch bei der Abwehr von infizierten oder maligne entarteten Zellen eine Rolle spielen. Diese erkennen sie über die NKG2D-Liganden MIC A/B [111] oder ULBP3/4 [112-114], darüber hinaus produzieren sie Zytokine (IFN γ oder TNF α) und Chemokine (CCL3-5) mit denen wiederum andere Immunzellen wie bspw. Makrophagen rekrutiert und aktiviert werden [100, 115].

Neuere Arbeiten zeigen eine weitere interessante Eigenschaft der $\gamma\delta$ T-Zellen auf, so haben Moser et al. festgestellt, dass aktivierte $\gamma\delta$ T-Zellen ähnlich wie dendritische Zellen als Antigen-präsentierende Zellen (antigen-presenting cells, APC) fungieren und dadurch eine spezifische, $\alpha\beta$ T-Zell vermittelte Immunantwort auslösen können [116]. Somit vereinigen $\gamma\delta$ T-Zellen Eigenschaften des angeborenen und des erworbenen Immunsystems und schlagen eine Brücke zwischen diesen zwei Welten [117]. Denn auf der einen Seite erwerben $\gamma\delta$ T-Zellen ihren TCR durch V(D)J-Rekombination, einem klassischen Merkmal des erworbenen Immunsystems, auf der anderen Seite aber erkennt er HLA-unabhängig unspezifische Signale wie z.B. Pyrophosphate im Sinne eines „Pattern Recognising Receptors“. Zusätzlich besitzen $\gamma\delta$ T-Zellen weitere Merkmale des angeborenen Immunsystems wie Toll-like Rezeptoren die sog. „Pathogen associated molecular patterns“ (PAMPs) erkennen [118, 119].

Alles in allem sind $\gamma\delta$ T-Zellen potente Effektorzellen in der Bekämpfung von Infektionen und Tumoren, dabei übernehmen sie variable Funktionen aus dem Bereich der angeborenen und erworbenen Immunabwehr wie die Produktion von Zytokinen und Chemokinen, Immunregulation, Antigenpräsentation und nicht zuletzt besitzen sie auch das Potential zur direkten Zytotoxizität. Die Gesamtheit dieser immunologischen Eigenschaften machen $\gamma\delta$ T-Zellen zu

einem interessanten Forschungsobjekt mit großem Potential für die Behandlung pädiatrischer Tumoren.

1.4 Projektskizze

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren auf die Aktivität von sowohl NK- als auch $\gamma\delta$ T-Zellen gegen 8 verschiedene Neuroblastomzelllinien. Die Effektorzellen werden nach unserem Expansionsprotokoll mit bestrahlten K562-mb15-41BBL als Feederzellen inkubiert und mit IL-2 stimuliert. In der funktionellen Testung werden die Effektorzellen gegen 8 verschiedene Neuroblastomzelllinien mit und ohne Zugabe des therapeutischen Antikörpers ch14.18 getestet, die Auswahl der Targetzellen erfolgt hauptsächlich nach deren Expression von HLA-I Allelen. In Verbindung mit zwei unterschiedlichen Spendern führt dies zu unterschiedlichen KIR R/L-Match und -Mismatch Situationen wie sie etwa auch nach allogener Stammzelltransplantation vorkommen. Berücksichtigt werden die Major KIR Rezeptoren KIR2DL1, KIR2DL2/KIR2DL3 und KIR3DL1 mit ihren korrespondierenden Liganden HLA C1, C2 und Bw4. Unser Studiendesign legt das Hauptaugenmerk auf die Überprüfung der verschiedenen NK-Alloreaktivitätsmodelle, genauer gesagt des LL Modells, des RL Modells, des Licensing Modells und des KIR Genotyping Modells. Daneben wird auch der Einfluss von aktivierenden Liganden wie etwa NKG2D- oder DNAM-1-Liganden untersucht.

Die zweite wichtige Fragestellung unserer Arbeit ist die Frage nach den Unterschieden zwischen verschiedenen Spendern bezüglich der NK-vermittelten Tumorzelllyse. Gibt es eine Möglichkeit der Kategorisierung von potenziellen Spendern für eine Stammzelltransplantation in „gute“ oder „schlechte“ Spender mittels eines einfachen Testes oder muss die Spenderauswahl weiterhin durch Abwägung vielfältiger Kriterien erfolgen? Hierfür wird die NK-vermittelte Lyse der Neuroblastomzelllinien LS, LAN-1, SK-N-AS und SH-Sy5y durch die NK-Zellen von 24 gesunden Spender in einem Kill-Assay gemessen, die Spenderauswahl erfolgt unabhängig von HLA-Typisierung oder KIR-Repertoire.

2 Material und Methoden

2.1 Allgemeine Materialien und Geräte

2.1.1 Geräte

Heracell Brutschrank	Heraeus
Herasafe Sterilbank	Heraeus
Biowizard Sterilbank	Kojair
Wasserbad	GFL
Eismaschine	Scotsman
Vortexer MSA Minishaker	IKA
Kühlschrank Profi-Line	Liebherr
Gefrierschrank Premium NoFrost	Liebherr
Gefrierschrank & Kühlschrank	Sanyo
Standzentrifugen: Rotina 420 R Rotanta 46 RSC	Hettich
Pipettierhelfer: Pipetboy acu Pipetboy 2	Integra
Pipette, verstellbar: Research 2.5µl, 100µl, 1000µl Pipetman 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl	Eppendorf

	Gilson
Multikanalpipette 200µl Discovery Comfort	HTC Lab Solutions

2.1.2 Plastik- und Verbrauchsmaterialien

Pipettenspitzen 20µl 200µl, 1000µl	Ratiolab Sarstedt
Einmalpipetten, Plastik, steril	
Costar® Stripette 2ml, 5ml, 10ml, 25ml, 50ml	Corning inc.
Falconröhrchen, Polypropylen (PP), steril 15ml	Greiner Bio-One
Cellstar® Tube 50ml Falcon Tube	Corning
Kanüle Sterican 19G, 20G, steril	Braun
Reagiergefäß mit Deckel, PP, steril	
0.5ml 1.5ml, 2ml	Sarstedt Eppendorf
Spritzen, steril	
1ml, 50ml 2ml, 5ml, 10ml, 20ml	BD™ Diagnostics Braun
Zellkulturflasche Cellstar® 50ml, 250ml, 550ml	Greiner Bio-One
Platte Cellstar®, steril, U-/ F-Bottom	
6 well, 24 well, 48 well, 96 well	Greiner Bio-One
96-well-Platte Microplate, U-/F-Bottom	Greiner Bio-One
FACS-Analyseröhrchen, Rundboden, Polystyren	Corning

(PS), steril, 5ml	
Butterfly, Safety-Multifly 20G, steril	Sarstedt
Handschuhe Peta-soft nitrile	Paul Hartmann AG
Desinfektionsspray Descosept	Dr. Schumacher
Hautdesinfektionsmittel Softasept	Braun
Cryotube Cryo.S	Greiner Bio-One
Verschlussfolie Parafilm „M“	Bermis
Zellsieb, 40µl	BD™ Diagnostics
Röhrchenständer	PPT

2.1.3 Puffer und Lösungen

Dulbecco's phosphate buffered Saline (PBS)	Sigma
RPMI 1640	Biochrom
VLE Dulbecco's MEM	Biochrom
Penicillin (10.000U/ml)/ Streptomycin(10.000µg/ml)	Biochrom
L-Glutamin 200mM	Biochrom
100x NEA (non-essential Aminoacids)	Biochrom
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco
Trypsin/EDTA-Solution 0.25%	Biochrom
Natrium-Pyruvat	Biochrom

Dymethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
D-Natrium-EDTA 1.107%	AlleMan Pharma GmbH
Formaldehyd 37%	AppliChem
β -Mercaptoethanol	CarlRoth
Na-Azid (10%)	Merck
Privigen (100mg/ml)	CSL Behring GmbH
Saponin S-7900	Sigma
BSA Bovine Serum Albumin A-3059	Sigma

Stammlösung A: Standardmedium für Zellkultur

- 500ml RPMI 1640
- 50ml (10%) FCS
- 5ml Penicillin/Streptomycin
- 5ml (1%) L-Glutamin

Stammlösung B: Medium für SK-N-BE(2) und SK-N-AS

- Stammlösung A mit 500ml DMEM statt RPMI 1640
- 1x (5ml) NEA

Stammlösung C: Medium für SH-Sy5y

- Stammlösung A mit 500ml DMEM statt RPMI 1640
- 20% (100ml) FCS

Stammlösung D: Medium für NB1691 und IMR-32

- Stammlösung A
- 1x (5ml) NEA
- 20% (100ml) FCS

Stammlösung E: Medium für NK-Expansion

- Stammlösung A
- 25µl Interleukin-2 ($2 \cdot 10^6$ IE/ml)

Stammlösung F: Medium für CD107a-Assay:

- Stammlösung A
- 1% (5ml) Na-Pyruvat
- 1x (5ml) NEA
- 250µl (50µmol) β-Mercaptoethanol

FACS-Puffer:

- 500ml PBS
- 2mmol/l (2ml) EDTA
- 2% (10ml) FCS
- 0.01% (0.5ml) Na-Azid
- 0.05% (250µl) Privigen

PBSE:

- 500ml PBS
- 2mmol/l (2ml) EDTA

PermWash:

- 500ml PBS
- 0.1% (0.5g) Saponin
- 0.5% (2.5g) BSA

- 0.02% (1ml) Na-Azid

PFA-Lösung:

- FACS-Puffer
- 1% Formaldehyd

Einfriermedium:

- fetales Kälberserum (FCS)
- 10% DMSO

2.1.4 Software

Microsoft Word	Microsoft
Microsoft Excel	Microsoft
Microsoft PowerPoint	Microsoft
FCS Express 5	De Novo Software
Graphpad Prism 5	Statcon
RTCA 2.0 Software	Acea Biosciences

2.2 Zellzahlbestimmung und Mikroskopie

Mikroskop CX40	Olympus
Mikroskop LX50	Olympus
ABX Micros CRP 100	Horiba
ADVIA 120	Siemens
Neubauer Zählkammer (25mm, Tiefe 0.1 mm)	Neubauer

Deckgläser	Marienfeld
Zähluhr	Ivo
Trypanblau (0.4%)	Sigma

Die Zellzählung wurde auf verschiedene Weisen durchgeführt. Zum einen erfolgte sie vollautomatisch mittels eines Blutanalysegerätes (ADVIA 120/ABX Micros CRP 200). Zur Gewährleistung standardisierter Bedingungen wurde die vollautomatische Zellzählung der manuellen Zellzahlbestimmung überwiegend vorgezogen.

Beim ABX Micros CRP 100 (Horiba) Zählautomaten wird durch Impedanzmessung in einem Volumen von 8µl Zellsuspension die Zellzahl bestimmt und eine eingeschränkte Differenzierung der Zellen ermöglicht. Das Blutanalysegerät ADVIA 120 (Siemens) misst in einem Volumen von 175µl die Zellkonzentration mittels durchflusszytometrischer Methoden, darüber hinaus erlaubt die Bestimmung der Peroxidaseaktivität auch eine weitere Differenzierung der Zellen.

Bei eingeschränkter Nutzbarkeit der Blutanalysegeräte wurde die Zellzahl manuell bestimmt mithilfe einer Neubauer Zählkammer. Dabei wurden je 10µl Zellsuspension und Trypanblau-Lösung im Verhältnis 1:1 vermischt. Dies erlaubt außerdem die Beurteilung der Vitalität der Zellen, da zugrunde gegangene Zellen sich aufgrund des Barriereverlustes der Zellmembranen blau anfärben. Mittels eines Lichtmikroskops lassen sich die Zellen auszählen. Es werden alle vier Großquadrate ausgezählt und das Ergebnis durch zwei geteilt, um der Verdünnung Rechnung zu tragen.

Die manuelle Auszählung wurde vor allem bei adhärennten und kryokonservierten Zellen angewandt, da diese vermehrt zusammenklumpen und/oder morphologische Veränderungen aufweisen können und deshalb für die automatische Zählung eher ungeeignet sind. Die Berechnung der

Zellkonzentration erfolgte nach folgender Formel:

$$c = \frac{n}{4} \cdot k \cdot 10^4 / ml$$

wobei:

c=Zellkonzentration

n=gezählte Zellen

k = Verdünnungsfaktor (*hier: 2*)

2.3 Anti-GD2-Antikörper ch14.18

ch14.18 mAb (4.5mg/ml) Batch-No: T900310-A	Polymun
--	---------

Wir verwendeten den chimären, monoklonalen Anti-GD2- Antikörper ch14.18, der vor allem bei der Therapie von Neuroblastomen im Stadium IV zum Einsatz kommt. Der modifizierte Fc-Teil führt zu einer verbesserten Rekrutierung FcRIIIA tragenden Effektorzellen und dadurch zu einer gesteigerten antikörpervermittelten zellabhängigen Lyse (ADCC) der Tumorzellen durch NK-Zellen.

2.4 Zelllinien

Transduzierte erythroleukämische Zelllinie K562mb15-41BBL	Dario Campana, Khoo Teck Puat, National University Children's Medical Institute, Singapore
--	---

<p>Erythroleukämische Zelllinie K562</p> <p>Neuroblastomzelllinien:</p> <p>LAN-1</p> <p>LS</p> <p>SK-N-AS</p> <p>SK-N-BE(2)</p> <p>SH-Sy5y</p> <p>IMR-32 gfp/luc</p> <p>NB1691 gfp/luc</p> <p>SH-EP gfp/luc</p>	<p>Leibniz-Institut DSMZ- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig</p>
<p>Transduzierte Neuroblastomzelllinien:</p> <p>LAN-1 mcherry</p> <p>LS mcherry</p> <p>SK-N-AS gfp</p> <p>SH-Sy5y mcherry</p> <p>IMR-32 gfp</p> <p>NB1691 gfp</p> <p>SH-EP gfp</p>	<p>Eigene Herstellung</p>

Tabelle 2.1 Zelllinien

2.4.1 Neuroblastomzelllinien

Zelllinie:	HLA-I-Allele	Identifizierung ¹ [120]:
LAN-1	Cw3/Cw3/Bw4/A3	RRID: CVCL_1827
LS	Cw3/Cw4/Bw4	RRID: CVCL_2105
SK-N-AS	Cw3/Cw3	RRID: CVCL_1700
SK-N-BE(2)	Cw3/Cw4/Bw4/Bw4	RRID: CVCL_0528
SH-Sy5y	Cw3/Bw4	RRID: CVCL_0019
IMR-32	Cw3/Cw3	RRID: CVCL_0346
NB1691	Cw3/Cw3/A11	RRID: CVCL_5628
SH-EP	Cw3/Bw4	RRID: CVCL_0524

Tabelle 2.2 Neuroblastomzelllinien

Die Neuroblastomzelllinien wurden im Hinblick auf möglichst viele unterschiedliche Expression der HLA-I-Allele ausgewählt. Es wurden möglichst viele verschiedenen Zelllinien verwendet um die tumorspezifischen Unterschiede im Hinblick auf NK-Zell- und antikörpervermittelte Lyse untersuchen zu können. Außerdem wurden verschiedene HLA-I-Mismatch Situationen geschaffen, es gab Zelllinien denen das HLA-Cw4-, das HLA-Bw4- oder beide Allele fehlten. Eine Zelllinie mit HLA-Cw3-Mismatch konnte nicht beschafft werden.

Die Typisierung erfolgte durch das HLA-Labor des Universitätsklinikums Tübingen.

2.4.2 Transduzierte Neuroblastomzelllinien

Für den in Kapitel 49 beschriebenen Luciferase-Assay mussten biologisch modifizierte Zellen benutzt werden, die in der Lage sind, D-Luciferin in einer chemischen Reaktion umzusetzen.

Die Zelllinien LAN-1, LS, SH-Sy5y und SK-N-AS wurden mit einem

¹ (Quelle: <https://www.scicrunch.org/resources>)

Luciferase/Fluorochrom-tragenden Doppelvektor transduziert. Für SK-N-AS, IMR-32, NB1691 und SH-EP war das gfp/luciferase und für LAN-1, LS und SH-Sy5y mcherry/luciferase. Das Verfahren zur Transduktion wird in Kapitel 2.12 beschrieben.

2.4.3 Erythroleukämische Zelllinie K562

Die erythroleukämische Zelllinie K562² wurde aus einem Pleuraerguss einer an CML erkrankten Frau isoliert. Diese Zelllinie exprimiert weder MHC I noch GD2 und stellt daher ein gutes NK-Zelltarget dar, wird aber nicht durch den Antikörper ch14.18 erkannt. Sie diente in der Studie als Kontrollzelllinie bei der Charakterisierung der Zelllinien und bei der funktionalen Testung der expandierten NK-Zellen [121].

2.4.4 Feederzelllinie K562mb15-41BBL

Die erythroleukämische Zelllinie K562 wurde von Dr. Dario Campana (Khoo Teck Puat, National University Children's Medical Institute, Singapore) per Transduktion so modifiziert, dass diese Zellen eine membrangebundene Form von IL-15 und den stimulierenden NK-Zell-Ligand 41BBL auf ihrer Oberfläche exprimieren. Bei Zusatz dieser sog. Feederzelllinie zu frischen PBMCs führt 41BBL unterstützt durch die Wirkung von IL15 zu einer verstärkten Proliferation und Expansion der NK-Zellen [121].

2.5 Gesunde Spender für PBMC

Für die Isolierung von PBMC zur Expansion der NK-Zellen sowie als Vergleich für die funktionelle Testung wurden zwei gesunde, freiwillige Spender nach der Expression von Allelen der HLA-Bw4, HLA-C1 und der HLA-C2 Gruppen ausgewählt. Ein Spender wies alle diese Gruppen auf, beim anderen Spender fehlte die HLA-C1 Gruppe.

² RRID:CVCL_0004

2.6 Zellkultur

Die Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt im Brutschrank kultiviert. Die Zelldichte wurde mit dem Inversionsmikroskop begutachtet, die Vitalität nach anfärben mit Trypanblau mit dem Lichtmikroskop oder mit dem ADVIA Zählautomaten.

2.6.1 Suspensionszelllinien

Bei den Zelllinien K562 und K562mb15-41BBL handelt es sich um Suspensionszelllinien. Der wichtigste Indikator zur Passagierung der Zellen ist ein Farbumschlag des Mediums von Rot nach Orange/Gelb, dies weist auf einen kritischen pH-Wert hin. Ein zweites Kriterium war die Zelldichte, die $1 \cdot 10^6$ /ml nicht überschreiten sollte. Daher wurde alle 2-3 Tage ein Teil der Zellsuspension verworfen und durch frisches Medium (Stammlösung A) ersetzt, sodass die Zellkonzentration eine kritische Dichte nicht überschritt.

2.6.2 Adhärenente Zelllinien

Bei allen Neuroblastomzelllinien handelt es sich um adhärenente bzw. semiadhärenente Zelllinien. Aufgrund der unterschiedlichen Wachstumseigenschaften der verschiedenen Zelllinien wurden unterschiedliche Medien verwendet und die Passagierungsabstände angepasst.

Zelllinie	Aussaat in 5/15/35ml Medium	Passagierung
LAN-1	1.1/ 3.3/ $7.7 \cdot 10^6$ Zellen/ml	Alle 3 Tage
LS	0.15/ 0.44/ $1.0 \cdot 10^6$ Zellen/ml	Alle 3 Tage
SK-N-AS	1/ 4/ $8 \cdot 10^6$ Zellen/ml	Alle 3-5 Tage
SK-N-BE(2)	0.5/ 2/ $4 \cdot 10^6$ Zellen/ml	Alle 3-5 Tage
SH-Sy5y	-/ 1/ $3 \cdot 10^6$ Zellen/ml	1x/Woche

IMR-32	1/ 3/ 6·10 ⁶ Zellen/ml	1-2x/Woche
NB1691	1/ 3/ 6·10 ⁶ Zellen/ml	1-2x/Woche
SH-EP	-/ 0.5/ 2·10 ⁶ Zellen/ml	Alle 2-3 Tage

Tabelle 2.3 Kultur der adhärenen Zelllinien

Durchführung

1. Das verbrauchtes Medium wurde komplett entfernt und die Flasche mit 10ml PBS abgespült, um alle Rückstände zu entfernen.
2. Um die Zellen vom Flaschenboden zu lösen wurden je nach Größe der Flasche 1-3ml Trypsin/EDTA-Lösung zugegeben und die Zellen für 3-5 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert.
3. Durch leichtes Klopfen wurden die Zellen vollständig gelöst und in ein Falcon mit 10ml Medium aufgenommen.
4. Abzentrifugieren bei Raumtemperatur mit B9/R9 für 5 min, anschließend wurden die Zellen in frisches Medium aufgenommen, gezählt (s. Kapitel 2.2) und neu ausgesät (s.o.).

2.7 Kryokonservierung und Auftauen

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

Kryokonservierung

Für die Kryokonservierung wurden die entsprechenden Zellen nach dem in Kapitel 2.6 beschriebenen Verfahren kultiviert und geerntet. Nach der Zellzählung wurden sie bei Raumtemperatur mit 300g (B9 und R9) für 5 min abzentrifugiert, in Einfriermedium aufgenommen und bis zu 100·10⁶ Zellen pro Cryotube in einem für mindestens 1h bei 4°C vorgekühlten Gefrierbehälter bei -80°C eingefroren.

Auftauen

Die Zellen wurden im Cryotube durch langsames Schwenken im Wasserbad aufgetaut, in 15ml Falconröhrchen überführt und zweimal bei Raumtemperatur mit 300g für 5 min, B9 und R9 in 10ml Stammlösung A gewaschen. Anschließend wurden sie in das passende Medium aufgenommen und in entsprechend großen Zellkulturflaschen ausgesät, je nach Anzahl der aufgetauten Zellen. Nach 24h erfolgte eine optische Kontrolle unter dem Lichtmikroskop, falls die Zellen ausreichend gewachsen sind wurden sie standardisiert kultiviert.

2.8 Isolierung von peripheren mononukleären Zellen

peripheres Vollblut	Zwei gesunde Spender
Heparin-Natrium 25 000	Ratiopharm
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma
Biocoll Separating Solution	Biochrom

Prinzip

Um aus heparinisierem Vollblut gesunder, freiwilliger Spender periphere mononukleäre Zellen (PBMC) zu isolieren wird die von Böyum beschriebene Methode der Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Hypaque verwendet [122]. Dabei werden die Dichteunterschiede der zellulären Bestandteile des Blutes zur Auftrennung genutzt. Ficoll-Hypaque ist ein verzweigtes Copolymer mit einer Dichte von $\rho=1.077$ g/ml, das als Trennschicht agiert und Zellen mit höherer Dichte bei der Zentrifugation passieren lässt während Zellen mit geringerer Dichte zurückgehalten werden. So können sich Erythrozyten, Granulozyten und polymorphkernige Leukozyten unter der Ficoll-Schicht absetzen und genauso wie Thrombozyten, die sich über der Trennschicht befinden, verworfen werden. Mononukleäre Zellen (Monozyten & Leukozyten)

lagern sich als Interphase direkt auf der Ficoll-Trennschicht ab und können durch abpipettieren des Lymphozytenringes isoliert werden [121].

Durchführung

1. Heparinisiertes Vollblut von gesunden Spendern wird im Verhältnis 1:1 mit PBS gemischt. Im 50ml Falcon werden 15-20ml Biocoll Separating Solution vorgelegt und 20-30ml Blut vorsichtig aufgeschichtet, sodass zwei Phasen entstehen.
2. Zentrifugation bei Raumtemperatur mit 800g für 30 min (Beschleunigung und Bremse jeweils auf 0). Vorsichtiges abpipettieren des Lymphozytenringes, es sollte möglichst kein Ficoll-Hypaque abgenommen werden. Die PBMC werden in ein neues Falcon überführt und mit PBS auf 50mlaufgefüllt.
3. Zweimaliges Waschen der PBMC bei RT mit 300g für 10 min. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in PBS resuspendiert. Anschließend werden die Zellen in Medium oder in PBS aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

2.9 NK-Expansion

Bestrahlungsgerät Gamma Cell 1000 Elite	Nordion
BGA-Gerät ABL 800 Flex	Radiometer

Prinzip

Frisch isolierte PBMC werden mit K562mb15 inkubiert, dabei sorgt das membrangebunden IL-15 der Feederzellen sowie das in Stammlösung F vorhandene IL-2 für eine spezifische Stimulation und Expansion der NK-Zellen.

Die Expansion läuft in zwei Phasen ab: Priming-Phase und Expansions-Phase. In der Priming- Phase, die ca. 7 Tage andauert, finden viele Zell-Zell-Kontakte statt, die Genexpression für wichtige Oberflächenproteine wird induziert,

Wachstumsfaktoren werden ausgeschüttet und die Zellen werden auf Proliferation ausgerichtet. Außerdem nimmt die Zellkonzentration aufgrund des Unterganges von Monozyten, B- und T-Lymphozyten ab. In der Expansionsphase (Tag 8 - 21) findet das eigentliche Wachstum der NK-Zellen statt. Das exponentielle Wachstum ermöglicht eine Vermehrung der Ausgangspopulation um 2-3 Logstufen.

Durchführung

Tag 1:

Mit 100Gy bestrahlte K562mb15 wurden im Verhältnis 15:1 mit frisch isolierten PBMC in einer Zellkulturflasche angesetzt. Die Konzentration sollte bei ca. $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml liegen.

Ab Tag 1:

Die Zellen wurden täglich nach den folgenden Kriterien begutachtet:

Zellcluster: Die NK-Zellen sammelten sich um einzelne K562mb15 und bildeten Zellcluster, in denen die Proliferation der NK-Zellen stattfand. Das Auflösen der Zellcluster war ein Anzeichen für das Erreichen der Expansionsphase und die Versuchsfähigkeit der NK-Zellen.

Farbumschlag: Der Farbumschlag von Rot nach Gelb des Mediums lieferte einen groben Anhaltspunkt für den Zustand des Mediums

pH-Wert: wurde ein pH-Wert <7 (voraussichtlich) erreicht, wurde frisches Medium hinzugegeben. Der pH-Wert wurde im ABL 800 Flex BGA-Gerät (Radiometer) gemessen, dabei ist darauf zu achten, eine Probe möglichst ohne Lufteinschlüsse zu verwenden, da sonst das Ergebnis verfälscht sein kann.

Laktat: Das Laktat sollte 15 mmol/l nicht überschreiten

Glucose: Der Glucosegehalt war der wichtigste Anhaltspunkt für die Versorgung der Zellen, bei einer Konzentration unter 100 mg/dl wurde Medium zugegeben.

Zellzahl: Während der Priming-Phase wurde die Zellkonzentration nicht unter als $0.7 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Durch Abzentrifugieren und Abkippen eines Teils der Zellkultur konnte die Zielkonzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml erreicht

werden. Dabei wurde darauf geachtet, maximal 50% des verbrauchten Mediums zu verwerfen, um das Zytokinmilieu zu erhalten. Während der Expansionsphase spielte die Zellkonzentration nur noch eine untergeordnete Rolle, meistens wurde das Volumen einfach verdoppelt.

IL-2: Falls alle anderen Parameter noch in Ordnung sein sollten, musste trotzdem alle 2-3 Tage frisches IL-2-Medium zugegeben werden, da sonst die Konzentration zu gering war.

Tag 2-21:

Je nach Wachstum konnten ab Tag 14 die Versuche durchgeführt werden. Eine Expansionsdauer länger als 21 Tage war nicht sinnvoll, da sich mit zunehmender Expansionsdauer die Wachstumsfähigkeit der NK-Zellen und damit ihre Reaktivität erschöpft.

2.10 Durchflusszytometrie

Antikörper	Fluorochrom	Klon	Hersteller
Isotyp γ 1 Mouse	FITC	X40	BD™ Biosciences
Isotyp γ 1 Mouse	PE	X40	BD™ Biosciences
Isotyp γ 1 Mouse	APC	X40	BD™ Biosciences
Isotyp γ 2a Mouse	FITC	X39	BD™ Biosciences
Isotyp γ 2a Mouse	PE	X39	BD™ Biosciences
CD3	PerCP	SK7	Biolegend
CD16	AF700	3G8	Biolegend
CD45	APC/Cy7	HI30	Biolegend
CD56	PE/Cy7	HCD56	Biolegend
CD58j	PE		Biolegend
CD62L	FITC		Biolegend
CD69	APC	L78	Biolegend

	PerCP	FN50	
CD94	FITC	DX22	Biolegend
CD107a	APC	H4A3	Biolegend
CD112	PE		Biolegend
CD155	APC		Biolegend
CD158a	FITC	HP-3E4	BD™ Biosciences
CD158b	PE	DX27	Biolegend
CD158e	BV421	DX9	Biolegend
CD274	PE	MIH1	BD™ Biosciences
CD276	PE		Biolegend
CD279	PE	EH12.2H7	Biolegend
TcRgd	FITC	11F2	BD™ Biosciences
Mic-A/B	PE		Biolegend
ULBP1	PE		Biolegend
ULBP2/5/6	PE		Biolegend
ULBP3	PE		Biolegend
HLA-G	PE	87G	Biolegend
HLA-E	APC	3D12	Biolegend
NKG2A	PerCP		Biolegend
NKG2D	unlabelled APC	1D11	Biolegend
DNAM-1	unlabelled PE	11A8	Biolegend
HLA-A, B, C	unlabelled FITC	w6/32	Biolegend
NKp30	PE	P30-15	Biolegend

NKp44	PE	4A4.D10	Miltenyi Biotec
NKp46	APC		Miltenyi Biotec
NKp80	FITC		Miltenyi Biotec
IFN γ	BV711	4S.B3	Biologend
L/D	Aqua		Invitrogen
Wirkstoffe			Hersteller
Pembrolizumab (Keytruda)			Merck/Msd
Geräte und Software			Hersteller
BD™ LSR II Cytometer			Biologend
Angeschlossene Hardware			Hewlett-Packard
Auswerteprogramm FCS Express 5			De Novo Software
Software BD™ FACS Diva			BD™ Biosciences

Prinzip

Die Durchflusszytometrie (FACS= fluorescence activated cell sorting) ist eine Methode zur Charakterisierung von Zellen aufgrund ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften. Die Zellsuspension wird mittels einer Messkapillare in das Gerät aufgenommen, in der Messkammer werden die Zellen in der sie umgebenden Trägersubstanz durch starke Beschleunigung aufgetrennt, sodass sie als Einzelzellen sequenziell einen Laserstrahl durchwandern. Dieser Vorgang wird hydrodynamische Fokussierung genannt und dient der Messung von zellspezifischen Streueffekten und Fluoreszenzen der verwendeten Antikörper auf Einzelzellebene [121].

Die Zellen passieren den Laserstrahl und durch die Lichtbrechung entstehendes Streulicht wird entlang des einfallenden Laserstrahls als Vorwärtsstreulicht (FSC = forward light scatter) und dazu rechtwinkligem Seitwärtsstreulicht (SSC = sideward light scatter) von Photomultipliern aufgenommen und durch einen Analog-Digital-Wandler digitalisiert. Anhand des

Vorwärtsstreulicht wird die Zellgröße gemessen und das Seitwärtsstreulicht stellt eine Messgröße für die intrazelluläre Granularität dar. Bei der Analyse von Zellsuspensionen können in einem SSC (y-Achse) über FSC (x-Achse) Diagramm Monozyten, Lymphozyten und Granulozyten voneinander unterschieden werden [\[121\]](#).

Zur immunologischen Phänotypisierung von Zellen werden mit Fluorochromen markierte monoklonale Antikörper verwendet. Dadurch kann man unterschiedliche Antigene auf ein und derselben Zelle zugleich nachweisen. Die Voraussetzung dafür ist, dass sich bei Anregung durch einen Laser bestimmter Wellenlänge die Emissionsmaxima der Fluorochrome deutlich voneinander unterscheiden.

Durch Absorption der Lichtenergie des Lasers erhalten bestimmte Elektronen der Farbstoffe ein höheres Energieniveau. Bei der Rückkehr auf das Ausgangsniveau wird Energie in Form eines Photons frei, die Energie dieses Photons ist jedoch geringer als die Absorptionsenergie. Deshalb ist die Wellenlänge des emittierten Lichts größer als die des anregenden Lasers. Das abgestrahlte Licht wird durch Interferenzfilter nach Wellenlänge aufgetrennt und durch Lichtsensoren erfasst. Dabei ist die Intensität der Fluoreszenz direkt proportional zur Anzahl der mit fluoreszenzmarkierten Antikörper besetzten Bindungsstellen. Alle Zellen besitzen eine gewisse Autofluoreszenz, die durch Messung einer ungefärbten Probe ermittelt werden muss. Um die Grenze zu bestimmen, ab der eine Probe als positiv gilt, wird eine Isotyp-Kontrolle als Vergleichswert verwendet. Diese erhält man durch Färbung einer Probe mit einem Isotyp-Antikörper, der die unspezifische Bindung des Antikörpers an die Zelle messbar macht und damit die Definierung eines Nullniveaus ermöglicht.

Durchführung

Der Versuchsablauf erfolgt auf Eis. Die Zentrifugationsschritte werden bei der Verwendung von FACS-Analyseröhrchen bzw. 96-Well-Rundbodenplatten bei 4°C mit 600g für 2 min (B9 und R9) durchgeführt.

1. Die verwendeten Zellen werden mit PBSE in FACS-Tubes oder 96-Well Rundbodenplatte gewaschen und anschließend dekantiert, sodass das übrig gebliebene Zellpellet ein möglichst kleines Restvolumen aufweist.
2. Um lebende und tote Zellen unterscheiden zu können, erfolgt eine Färbung mit Life/Dead Aqua-Lösung. Der Lebend-Tot-Farbstoff wird mit PBSE im Verhältnis 1:4000 hergestellt. Die Zellen werden mit 40µl dieser Lösung gut invertiert und 20 min in Dunkeln bei 4°C inkubiert.
3. Anschließend werden die Zellen zweimal in FACS-Puffer gewaschen.
4. Zur Fluoreszenzmarkierung werden die Antikörper entsprechend ihrer Antikörpertitration eingesetzt. Erfolgte die Färbung aller Proben mit den gleichen Antikörpern, wird ein Mastermix verwendet. Hierfür wird die für alle Proben benötigte Menge der Antikörper in einem Gefäß zusammengemischt und mit FACS-Puffer verdünnt, sodass sich ein Färbvolumen von 40µl pro Probe ergibt. Die Zellen werden in der Antikörperlösung gut resuspendiert und wiederum bei 4°C im Dunkeln für 20min inkubiert.
5. Nach zweimaligem Waschen der Zellen in FACS-Puffer werden die Zellen bis zur Messung bei 4°C im Dunkeln gelagert. Erfolgt die Messung nicht gleich im Anschluss werden die Zellen mit 1% Formaldehyd-Lösung (PFA) fixiert.

Messung und Auswertung

Die Messung erfolgte mit dem BD™ LSR II Flow Cytometer und die Auswertung mit der Software FCS Express 5.0. Vor der Messung findet die Einstellung der Verstärkerspannungen des FSC (x-Achse) und SSC (y-Achse) statt, damit die übliche Zellverteilung im Auswerteprogramm dargestellt werden kann und die Anpassung der Autofluoreszenzlevel der ungefärbten Probe. Anschließend erfolgt die Messung der Proben. Zur genaueren Auswertung werden Ausschnitte des Diagramms in welchen sich bestimmte Populationen befinden als Gates definiert. Eine Population in einem Gate (z.B. Lymphozyten) kann gesondert in einem neuen Schaubild dargestellt werden. Werden zwei Kanäle z.B. FITC und PE in einem x-y-Diagramm gegeneinander dargestellt, kann das Schaubild in vier Quadranten eingeteilt werden und die darin befindlichen

Populationen als doppelt positiv, einfach positiv und doppelt negativ für die dargestellten Fluorochrome definiert werden. Die absolute und relative Anzahl erfasster Zellen in den jeweiligen Quadranten wird automatisch berechnet. Das Subtraktionsverfahren erlaubt die Berechnung, wie viele Zellen einen bestimmten Marker tragen (%-Anteil Antigen-positiver Zellen nach Overton) [123].

Zur Bestimmung der MFI-Ratio wird der Quotient zwischen MFI (median fluorescence intensity) der Probe und MFI der Isotypkontrolle gebildet und als Ratio, d.h. einheitenlos berechnet.

Bei allen Versuchen wurden 3 technische Replikate pro Versuch erstellt, unter Angabe der biologischen Variabilität, d.h. unterschiedlicher Spender. Bei der statistischen Auswertung wurden diese als einzelne Werte miteinander berechnet, jedoch nicht als einzelnes Experiment bewertet. Die Anzahl der durchgeführten Experimente ergibt die Angabe n=x.

2.11 Durchflusszytometrische Zellsortierung

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

Prinzip

Die durchflusszytometrische Zellsortierung gleicht im Prinzip der klassischen Durchflusszytometrie (Kap.2.10). Neben der Charakterisierung der Zellen ermöglicht sie darüber hinaus auch noch die gezielte Isolierung bestimmter Zellpopulationen. Die Differenzierung verschiedener Zellpopulationen erfolgt wie bereits beschrieben mithilfe fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern. Im BD™ FACS Diva können durch das Setzen von Gates eine oder mehrere Zielpopulationen definiert werden. Die Zellen gelangen nach der Messung zu einem Abrisspunkt, dort wird der Flüssigkeitsstrahl durch einen piezoelektrischen Schwingungsgeber (Nozzle) stabilisiert und dann in Einzeltropfen aufgetrennt, dabei enthält jeder Tropfen eine Zelle. Entsprechend

der vorher definierten Gates werden die Einzelzellen vor Auftrennen des Strahls elektrisch aufgeladen. Anschließend werden sie in einem elektrischen Feld entsprechend ihrer Ladung in Richtung des jeweiligen Auffangbehälters abgelenkt. Der BD™ FACS Aria Cellsorter kann Zellen anhand von bis zu 8 Farben vier verschiedene Zielpopulationen sortieren [121].

Durchführung

Es sollen transduzierte Neuroblastomzelllinien (Kap.2.4.2) anhand der Expression des gfp/luciferase bzw. mcherry/luciferase Doppelvektors sortiert werden. Dabei wurden nur die erfolgreich transduzierten Zellen behalten und der Rest verworfen. Es erfolgte lediglich eine lebend/tot-Färbung mit L/D-Aqua, da gfp bzw. mcherry in den Kanälen FITC bzw. PE-Dyomics590 fluoreszieren. Die sortierten Zellen wurden in Falcon-Tubes mit 1ml der passenden Stammlösung aufgefangen.

2.12 Transduktion von Neuroblastomzelllinien

Prinzip

Um biologisch markierte Zielzellen für den Luciferase Assay (Kapitel 2.15) zu erhalten müssen diese erst hergestellt werden. Hierfür werden die Zielzellen mittels eines lentiviralen Doppelvektors³ transduziert. Das gfp/luciferase bzw. mcherry/luciferase Gen wird in das Genom der Zielzellen integriert, sodass diese in der Lage sind gfp/mcherry auf der Oberfläche zu exprimieren und D-Luciferin abzubauen.

Durchführung

Es wurden die Neuroblastomzelllinien LAN-1, LS, SK-N-AS und SH-Sy5y transduziert.

1. Die zu transduzierenden Zellen werden auf $0.125 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt

³ mcherry: pCDH-EF1a-eFFly-mcherry
GFP: pCDH-EF1a-eFFly-eGFP

2. In eine 24- oder 48-well-Platte werden 200µl der Zellsuspension pro well pipettiert
3. 45µl/ 5µl/ 0µl Virusüberstand hinzugeben und für 30 min mit 800g bei 32°C (B9/R0) zentrifugieren
4. Für 24h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubieren, anschließend Medium zugeben
5. Das Medium wird anhand des Farbumschlages beurteilt und ggf. gewechselt, sobald die Zellen dicht genug gewachsen sind, werden sie in eine größere Platte/Flasche umgesetzt.
6. Kontroll-FACS zur Bestimmung der Transduktionsrate nach ca. 14 Tagen

2.13 Stimulierung der HLA-I Expression

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

Prinzip

Neuroblastomzelllinien exprimieren wenig bis gar kein HLA I, weshalb sie nur schlecht durch T-Lymphozyten erkannt werden, jedoch aber ein gutes Ziel für NK-Zellen darstellen. Durch Inkubation der Zellen mit kann deren HLA I Expression hochreguliert werden [124]. Dadurch können die Effekte von HLA Klasse I Molekülen auf die Aktivierung von expandierten NK-Zellen oder frisch isolierten PBMC besser untersucht werden.

Durchführung

Die Vorbereitung der Zellen erfolgte nach dem in Kapitel 2.6.2 beschriebenen Protokoll. Die endgültige Konzentration von IFN γ im Medium sollte bei 1000 IE/ml liegen. Dies entsprach bei einer Ausgangskonzentration von $4 \cdot 10^6$ IE/ml einer Verdünnung von 1:4000. Für 15ml Medium in einer 75cm² Flasche wurden 3.75µl IFN γ -Imukin hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen für 72h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Die Überprüfung der Hochregulierung von HLA I erfolgte mittels eines in FITC fluoreszenzmarkierten

Anti-HLA-A, B, C-Antikörpers im Durchflusszytometer und unstimulierten Zellen als Kontrolle.

2.14 CD107a-Assay

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

Prinzip

Der CD107a Assay untersucht mittels durchflusszytometrischer Methoden die Aktivierung von NK-Zellen bei Kontakt mit Zielzellen. Aktivierte NK-Zellen setzen zytoplasmatische Vesikel mit Granzymen und Perforin frei, wodurch ihre Zielzellen lysiert werden. Die Membran dieser Granula enthält CD107a (LAMP-1), welches nach Fusion der Vesikel mit der Zellmembran mithilfe eines entsprechenden fluoreszenzmarkierten Antikörpers nachweisbar ist. Durch zusätzliche Färbung anderer Oberflächenmoleküle ist eine gesonderte Betrachtung der Aktivierung einzelner NK-Populationen möglich. In unserer Studie wurde die CD107a-Expression expandierter NK-Zellen bei Kontakt mit den in Kapitel 2.4.1 genannten Neuroblastomzelllinien mit und ohne Zugabe des therapeutischen Antikörpers ch14.18 untersucht. Außerdem wurde durch eine Intrazellulärfärbung die IFN γ – Produktion der NK-Zellen gemessen [[121](#)].

Durchführung

Der Versuchsansatz wurde in 96-Well Rundbodenplatten auf Eis durchgeführt. Die Platten wurden mit 600g für 2 min bei 4°C (B9 und R9) zentrifugiert. Effektor- und Targetzellen wurden jeweils auf $10 \cdot 10^6$ Zellen/ml mit Stammlösung F eingestellt, sodass ein Pipettivolumen von 50 μ l einer Zellzahl von $0.5 \cdot 10^6$ Zellen/well entspricht.

Die verwendeten Lösungen wurden wie folgt eingesetzt:

	Konzentration	Pipettiervolumen
Brefeldin A/GolgiStop (Monensin)	40µg/ml	50µl
PMA/Ionomycin	200ng/ml; 4 µM	50µl
ch15.18	4µg/ml	50µl
Anti-NKG2D/-DNAM-1/-HLA-A, B, C	s. Hersteller	2µl

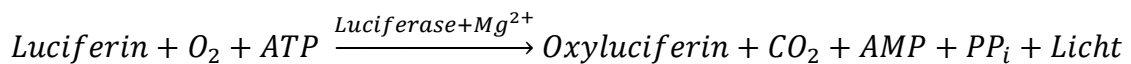
1. In alle Wells mit Ausnahme der ungefärbten, der Isotyp- und der PMA-Kontrolle wurden je 50µl Effektorzellen, Targetzellen, BrefeldinA/GolgiStop und Stammlösung F bzw. ch14.18 gegeben.
2. Die PMA-Kontrolle bestand aus je 50µl Effektorzellen, BrefeldinA/GolgiStop, PMA/Ionomycin und Stammlösung A bzw. ch14.18. Für die ungefärbte bzw. die Isotyp-Kontrolle wurden nur je 50µl Effektorzellen, BrefeldinA/GolgiStop, 100µl Stammlösung F in die wells pipettiert.
3. Es wurden 2µl CD107a-APC-AK pro well zugegeben. Anschließend wurden die Platten für 6h bei 37°C/5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.
4. Die Platten wurden bei 4°C abzentrifugiert und zweimal mit FACS-Puffer gewaschen
5. Es folgte eine Oberflächenfärbung nach dem in Kapitel 2.10 beschriebenen Verfahren.
6. Erneut zweimaliges Waschen der Platten. Dann wurden die Zellen in 100µl Cytofix/Cytoperm aufgenommen, 20 min im Dunkeln bei 4°C inkubiert und anschließend zweimal mit Permwash gewaschen.
7. Intrazellulärfärbung mit IFN γ -BV711-AK in einem Färbevolumen von 40µl. Anschließend erneute Inkubation für 20min bei 4°C im Dunkeln.
8. Zweimaliges Waschen der Zellen mit Permwash. Fixieren der Zellen mit 100µl PFA.
9. Messen und Auswerten wie in Kapitel 2.10

2.15 Luciferase-Assay

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

Prinzip

Luciferasen sind strukturell unterschiedliche Enzyme die ihre Substrate (Luciferine) in einer chemischen Reaktion umsetzen, bei der Photonen emittiert werden. Das am besten untersuchte Luciferin-Luciferase-System ist das firefly-Luciferin (Luc) der nordamerikanischen Leuchtkäferart *Photinus pyralis*, welches D-Luciferin als Substrat nutzt [125]. Die Reaktion benötigt Sauerstoff und ATP sowie Magnesium als Cofaktor [126]:



Das abgestrahlte Licht hat sein Emissionsmaximum bei einer Wellenlänge von $\lambda=537$ nm.

Die oben genannte Reaktion kann sich zunutze gemacht werden, indem Neuroblastomzelllinien mit dem in Kapitel 2.4.2 beschriebenen Verfahren transduziert werden, sodass sie das Luciferase-Gen exprimieren und nach Zugabe von D-Luciferin Licht emittieren, das im Photometer gemessen werden kann. D-Luciferin überwindet die Zellmembran passiv bzw. mittels eines ABC-Transporters [127]. Da für die Oxidationsreaktion ATP vorhanden sein muss, findet die Reaktion nur in lebendigen Zellen statt. Somit kann man durch Messung der Lichtintensität Rückschlüsse auf die Luciferase-Aktivität und damit auf die Anzahl der lebendigen Zellen ziehen.

Durchführung

Durch NK-Zell-vermittelte Lyse der Zielzellen nimmt die Aktivität der Luciferase ab, diese wird durch Einsatz des therapeutischen Antikörpers ch14.18 noch verstärkt. Die Lichtintensität wurde im Photometer Victor 1420 Multilabel Counter gemessen. Wir verwendeten in unserem Assay E/T-Ratios von 1:1 und 0.5:1.

1. Vorbereitung der Effektor- und Zielzellen. Diese wurden auf eine Konzentration von $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Ein Pipettiervolumen von 50µl resultierte in $0.1 \cdot 10^6$ Zellen pro well.
2. Es wurde eine Titrationsreihe der Targetzellen mit 1/ 0.75/ 0.5/ 0.25/ $0.1 \cdot 10^5$ Zellen erstellt, diese wird für die Auswertung benötigt. Die Effektorzellen wurden auf die korrekte E/T-Ratio eingestellt.
3. Pipettieren der Effektor-/ Zielzellen, des therapeutischen Antikörpers ch14.18 und zuletzt des Luciferins, dabei wurde darauf geachtet, dass das Licht ausgeschaltet war.
4. Inkubation der Zellen bei 37°C und 5% CO₂. Die Messung erfolgte nach 6h/ 12h/ 24h und evtl. 48h im Victor 1420 Multilabel Counter.

Auswertung

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Target only								1 *10 ⁵			Target only
B	Target only								0.75*10 ⁵			Target only
C	Target only								0.5*10 ⁵			Target only
D	Target only								0.25 *10 ⁵			Target only
E	Target only								0.1*10 ⁵			Target only
F	Target only								Medium only			Target only
G	Target only											Target only
H	Target only											Target only

Abbildung 2.15.1 Pipettierschema für Luciferase-Assay

In den grau hinterlegten Feldern werden die Kontrollproben zur Bestimmung der Abnahme der Leuchtkraft pipettiert, in den gelb hinterlegten Feldern eine genau festgelegte Zellzahl zur

Erstellung einer Titrationsreihe, um die Leuchtkraft mit der Zellzahl korrelieren zu können. Die weißen Felder werden für die Versuchsdurchführung benutzt.

Alle Versuchsplatten wurden nach dem oben gezeigten Schema angesetzt. Dadurch wurde eine vergleichbare Auswertung ermöglicht. Die Daten wurden per Hand in ein Excel-Auswerteschema eingetragen.

Der Messvorgang erfolgte reihenweise von A1 nach H12, währenddessen nahm die Biolumineszenz (BL) aufgrund von Temperaturabnahme und pH-Schwankungen ab. Über die beiden äußeren Spalten 1 und 12 wurde in Microsoft Excel eine Ausgleichsgerade erstellt, anhand der die prozentuale Abnahme der Leuchtkraft pro well berechnet werden konnte. Mit diesem Korrekturfaktor KF_{BL} und dem Zeitintervall t wurde dann die korrigierte Biolumineszenz BL_{korr} in jedem well mit folgender Formel berechnet:

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

Um Biolumineszenzwerte einordnen zu können wurde auf jeder Platte eine Titrationsreihe mit genau definierten Zellzahlen erstellt. Anhand dieser wurde wieder eine Ausgleichsgerade erstellt deren Steigung den Lysefaktor LF darstellte und der y-Achsenabschnitt die Biolumineszenz BL_0 ohne Zellen. Mit diesen Parametern konnte die Anzahl der lebenden Zellen n bestimmt werden.

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

Die maximale Zellzahl in einem well betrug 100.000 Zellen, daraus folgte:

$$Vitalität = \frac{n}{100000}$$

$$Lyse = 1 - Vitalität$$

2.16 xCELLigence

Analyseplatte E-Plate VIEW 96 PET	ACEA Biosciences
xCELLigence RTCA SP Messgerät	ACEA Biosciences
Angeschlossene Hardware, PC	Hewlett-Packard
Heracell Brutschrank	Heraeus

Prinzip

Das xCELLigence bietet eine weitere Möglichkeit, um NK-Zellen funktional zu testen. Dazu werden adhärenente Zelllinien verwendet, die im Boden der Analyseplatte anwachsen. Durch im Boden eingelassene Mikroelektroden kann die Impedanz der Zellen gemessen werden, die Änderung der Impedanz wird als Cell Index (CI) wiedergegeben. Der CI stellt eine dimensionslose Einheit dar und korreliert positiv mit der Anzahl der angewachsenen, lebenden Zellen [128]. Aus dem CI lassen sich Rückschlüsse ziehen über Wachstum, Viabilität, Stärke der Adhärenz und Morphologie der Zellen. Die Echtzeitmessung des xCELLigence-Systems ermöglicht eine Untersuchung der NK-vermittelten Lyse über den gesamten Versuchszeitraum hinweg (48h-72h). Dafür werden adhärenente Tumorzellen auf der E-Platte ausgesät und bis zum Versuchszeitpunkt in der RTCA SP Station im Brutschrank inkubiert, um ein Anwachsen der Zellen zu ermöglichen. Zu einem definierten Zeitpunkt werden die Effektorzellen hinzugegeben. Lysierte und abgestorbene Tumorzellen lösen sich vom Boden der Platte, wodurch der CI abnimmt.

Durchführung

Es wurde jeweils eine Fünffachbestimmung der spezifischen Lyse der expandierten NK-Zellen jedes Spenders mit und ohne Zugabe des therapeutischen Anit-GD2-Antikörpers ch14.18 gegen die Neuroblastomzelllinien LAN-1 und LS durchgeführt.

1. Zum Kalibrieren der 96-Well E-Platte wurde 50µl Stammlösung A in jedes Well pipettiert und die Platte in die RTCA SP Station im Brutschrank gestellt. Es erfolgte nach Start der Messung eine automatische Kalibrierung der Platte.
2. LAN-1 wurden auf $0.25 \cdot 10^6$ /ml in Stammlösung A eingestellt und LS auf $0.15 \cdot 10^6$ /ml. Nach Aussaat von 100µl Zellsuspension/well wurde die Platte wieder zurück in die RTCA SP Station im Brutschrank gestellt und die Messung mit einem Messintervall von 30 min gestartet. Da LS

schneller wachsen als LAN-1 erfolgte deren Zugabe 24h nach der Aussaat von LAN-1.

3. Nach 24h erfolgte die Zugabe der Effektorzellen zu den ausgesäten LS/LAN-1. Für eine E/T-Ratio von 2:1 wurden die expandierten NK-Zellen bei wells gegen LAN-1 auf $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml, gegen LS auf $1.2 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt und 25 μ l dieser Zellsuspension in die entsprechenden wells zugegeben.
4. Die Testung der ADCC erfolgte durch Zugabe von 25 μ l therapeutischen AK ch14.18 mit der Konzentration 1 μ g/ml, sodass die Antikörpermenge pro well 0.2 μ g betrug. Bei der Testung ohne AK wurden 25 μ l Stammlösung A hinzugegeben.
5. Zu den Kontrollwells wurden keine Effektorzellen zugefügt, sondern 50 μ l Stammlösung A bzw. 25 μ l Stammlösung A und 25 μ l ch14.18.
6. Die Platte wurde wieder in die RTCA SP Station im Brutschrank gestellt und die Messung mit einem Messintervall von 30 min für 24 h weitergeführt.

Auswertung

Aus den Rohdaten wurden mit Hilfe der RTCA Software jeweils der Mittelwert der Fünffachmessungen gebildet und die Werte auf den Zeitpunkt der Zugabe der Effektorzellen normalisiert. Anschließend konnte man die Daten in Excel exportieren. Der Anteil noch lebender Zellen in jedem well wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{lebende Zellen} = \frac{CI_{\text{Probe}}}{CI_{\text{Kontrolle}}} \cdot 100\%$$

Die spezifische Lyse konnte dann nach Folgender Formel berechnet werden:

$$\text{spezifische Lyse} = \left(1 - \frac{CI_{\text{Probe}}}{CI_{\text{Kontrolle}}}\right) \cdot 100\%$$

3 Ergebnisse

3.1 NK-Zell Expansion

Als Grundlage für die folgenden Experimente war das erste Ziel NK-Zellen in ausreichender Menge und Qualität zu expandieren. Dabei wurden das Proliferationsverhalten und die CD107a-Aktivität vor und nach Expansion untersucht.

Die Zellzahl der Expansionen stieg von durchschnittlich $43,2 \cdot 10^6$ auf $710,3 \cdot 10^6$ Zellen an Tag 11 an, dies entspricht einer Vermehrung der Zellzahl um den Faktor 16.

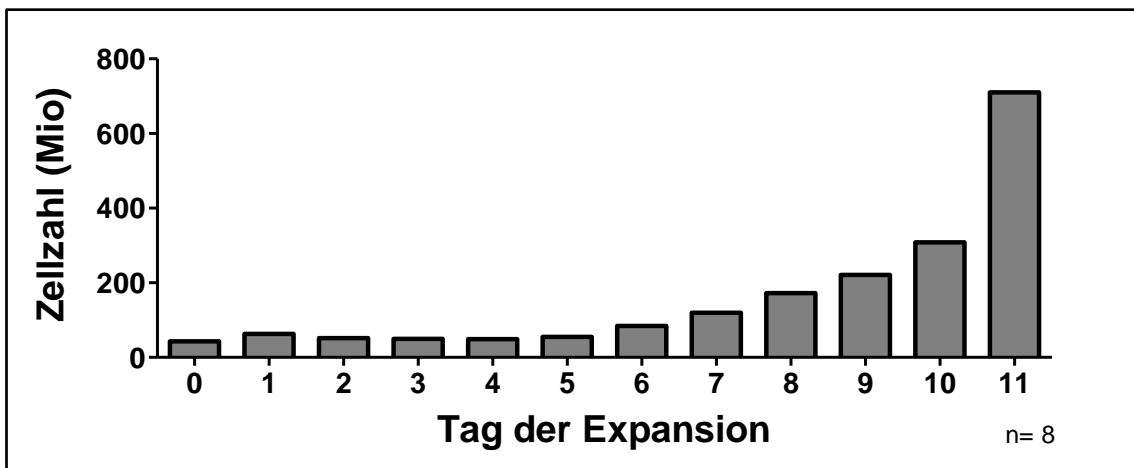


Abbildung 3.1.1 Die durchschnittliche Zellzahl der NK-Expansionen

Dargestellt ist die Gesamtzellzahl während einer der NK-Expansion aus PBMCs über durchschnittlich 11 Tage. Zellzählung mittels ADVIA (200 μ l/Probe). Es wurden 8 Expansionen von 2 Spendern zusammengefasst.

Von Tag 0 bis Tag 6-7 bleibt die Zellzahl ziemlich konstant, danach kommt es zu einem exponentiellen Wachstum der Leukozyten. An Tag 12/13 wurden die Zellen für die Assays entnommen, deshalb scheint die Zellzahl abzunehmen, die Proliferationsrate bleibt jedoch auf ihrem hohen Niveau bis ca. Tag 20. Zudem konnte man beobachten, wie der prozentuale Anteil an Lymphozyten von durchschnittlich 14,6% an Tag 1 auf 98,6% an Tag 20 anstieg, gleichzeitig nahm der Anteil von unklassifizierbaren Leukozyten von 32,3% an Tag 1 auf 0,40% an Tag 10 ab. Die maximale Expansionsdauer lag bei ca. 20 Tagen,

danach nahm die Proliferationsrate stark ab und die Zellzahl veränderte sich nur noch wenig.

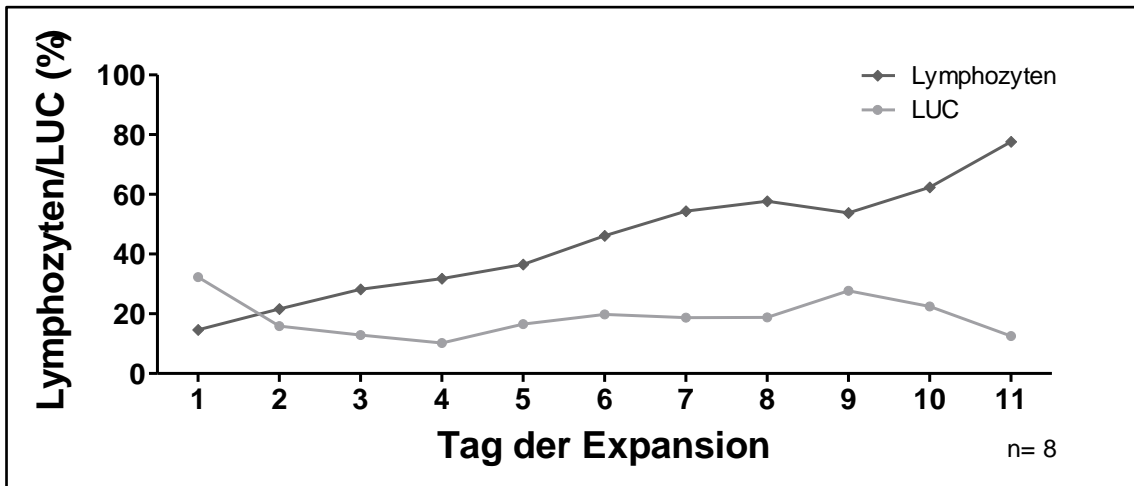


Abbildung 3.1.2 Der durchschnittliche prozentuale Anteil von Lymphozyten und LUC an allen gemessenen Zellen

Darstellung der prozentualen Zunahme von Lymphozyten (dunkelgrau) und Abnahme von unklassifizierten Leukozyten (LUC, hellgrau) während einer der NK-Expansion aus PBMCs über durchschnittlich 11 Tage. Zelldifferenzierung mittels ADVIA (200 µl/Probe). Es wurden 8 Expansionen von 2 Spendern zusammengefasst.

Der prozentuale Anteil von Lymphozyten an der Gesamtzellzahl steigt kontinuierlich von 14,36% auf nahezu 100% an, während der prozentuale Anteil von LUC von 32,3% auf fast 0% abfällt.

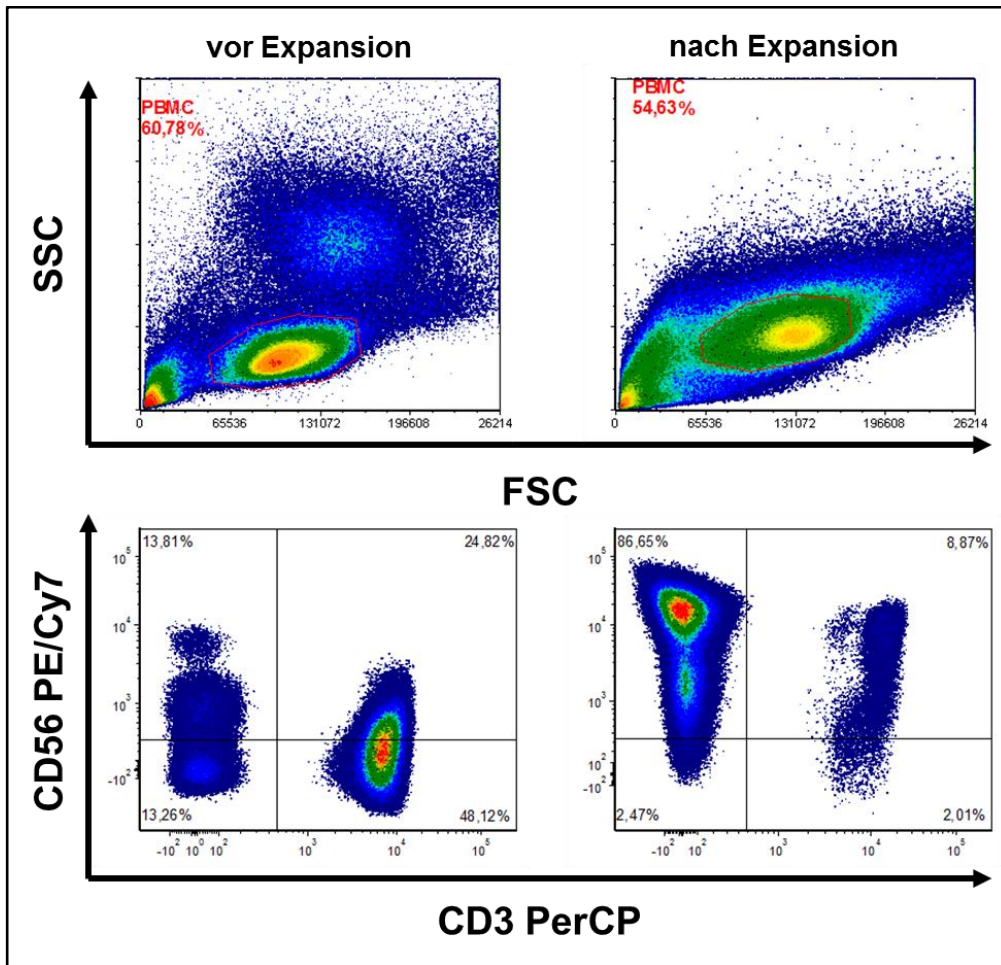


Abbildung 3.1.3 Veränderung der CD56⁺/CD3⁻ Population vor und nach Expansion

Im FACS-Plots sind exemplarisch dargestellt, FSC gegen SSC aufgetragen und unten CD3 gegen CD56. Links sind frisch isolierte PBMC vor Expansion dargestellt und rechts die gleichen Zellen nach 12-14 Tagen Expansion.

Im Vergleich vor und nach Expansion sieht man, dass die Zellen während der Expansion an Größe und Dichte zunehmen (v.a. der Granula). Außerdem erkennt man in den FACS-Plots vor und nach Expansion eine deutliche Zunahme der NK-Zell Population (CD56⁺/CD3⁻) sowie eine Hochregulierung der CD56-Expression. Nach Expansion lassen sich die CD56⁺CD3⁻ Zellen klar in eine CD56^{dim} – und eine CD56^{bright} -Population unterscheiden.

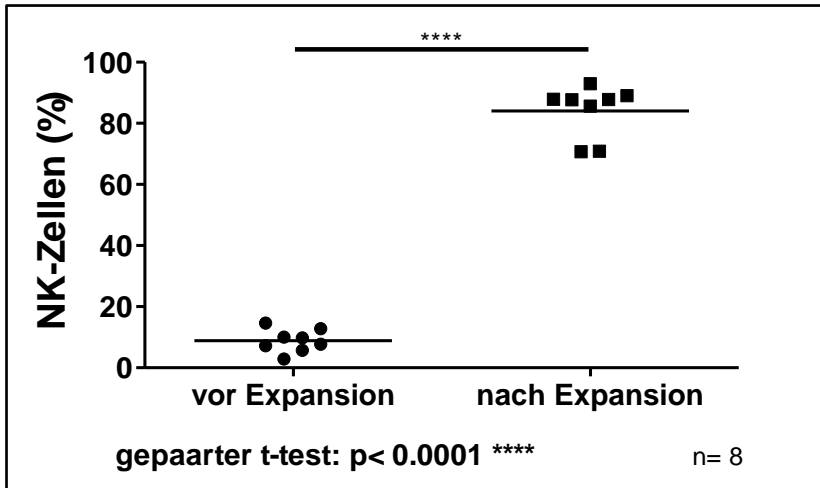


Abbildung 3.1.4 Prozentualer Anteil der NK-Zellen vor und nach Expansion

Prozentualer Anteil der NK-Zellen an der gesamten Leukozytenpopulation vor (Kreis) und nach (Rechteck) Expansion. Ausgewertet wurden 8 Expansionen von 2 unterschiedlichen Spendern.

Der prozentuale Anteil der NK-Zellen in der gesamten Leukozytenpopulation steigt von durchschnittlich 8,85% vor Expansion auf 84,07% nach Expansion an.

3.2 Charakterisierung der Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien unterscheiden sich z.T. sehr deutlich in ihrer genetischen Ausstattung, hier sind vor allem HLA-I, GD2 und andere aktivierende/inhibierende Liganden von Bedeutung. Die HLA-I Allele wurden wie in Kapitel 2.4.1 beschrieben bestimmt.

Zelllinie:	HLA-I-Allele	Fehlendes Allel:
LAN-1	Cw3/Cw3/Bw4/A3	Cw4
LS	Cw3/Cw4/Bw4	Alle vorhanden
SK-N-AS	Cw3/Cw3	Cw4 und Bw4
SK-N-BE(2)	Cw3/Cw4/Bw4/Bw4	Alle vorhanden
SH-Sy5y	Cw3/Bw4	Cw4
IMR-32	Cw3/Cw3	Cw4 und Bw4
NB1691	Cw3/C43/A11	Bw4

SH-EP	Cw3/Bw4	Cw4
-------	---------	-----

Tabelle 3.1 HLA-I Allele der verwendeten Tumorzelllinien

Aufgeführt sind jeweils die vorhandenen und die fehlenden HLA-I-Allele der getesteten Zelllinien.

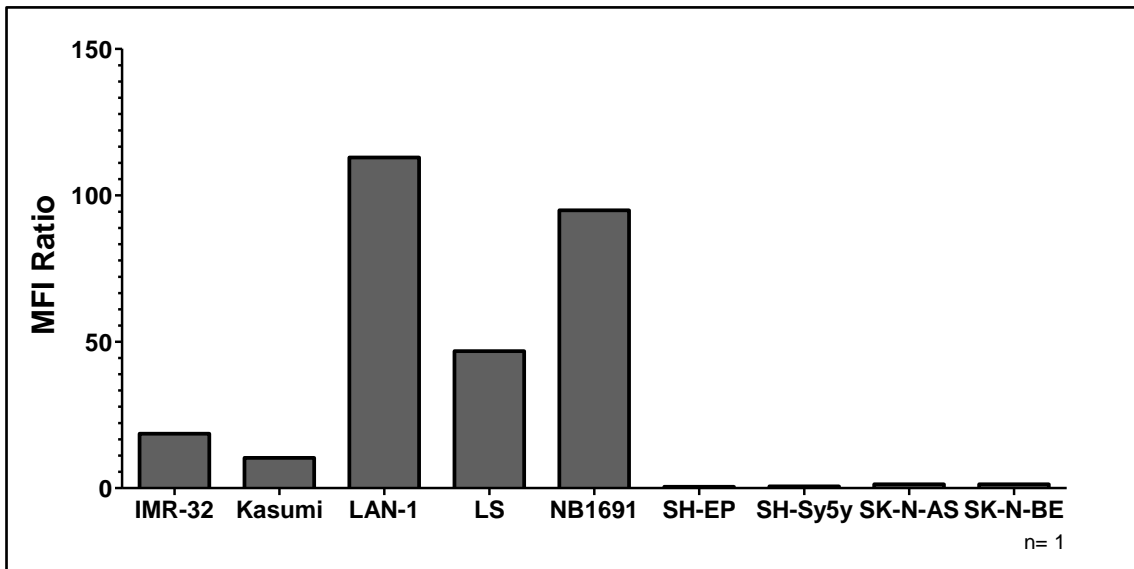


Abbildung 3.2.1 Semiquantitative Bestimmung der GD2-Expression der Tumorzellen

Bestimmung der semiquantitativen GD2-Expression durch spezifische Antikörperfärbung als MFI-Ratio (Quotient aus MFI von Probe und Isotypkontrolle, einheitenlos). IMR-32: 18,6 Kasumi: 10,4 LAN-1: 112,9 LS: 46,8 NB1691: 94,9 SH-EP: 0,46 SH-Sy5y: 0,61 SK-N-AS: 1,3 SK-N-BE: 1,3.

Die getesteten Tumorzellen variieren stark in ihrer GD2-Expression, manche Zelllinien wie SH-Sy5y, SK-N-AS oder SK-N-BE exprimieren kein GD2 und andere wiederum wie LAN-1 oder NB1691 zeigen eine starke GD2-Expression. Zum Vergleich ist die AML-Zelllinie Kasumi als formal GD2-negative Kontrolle untersucht worden.

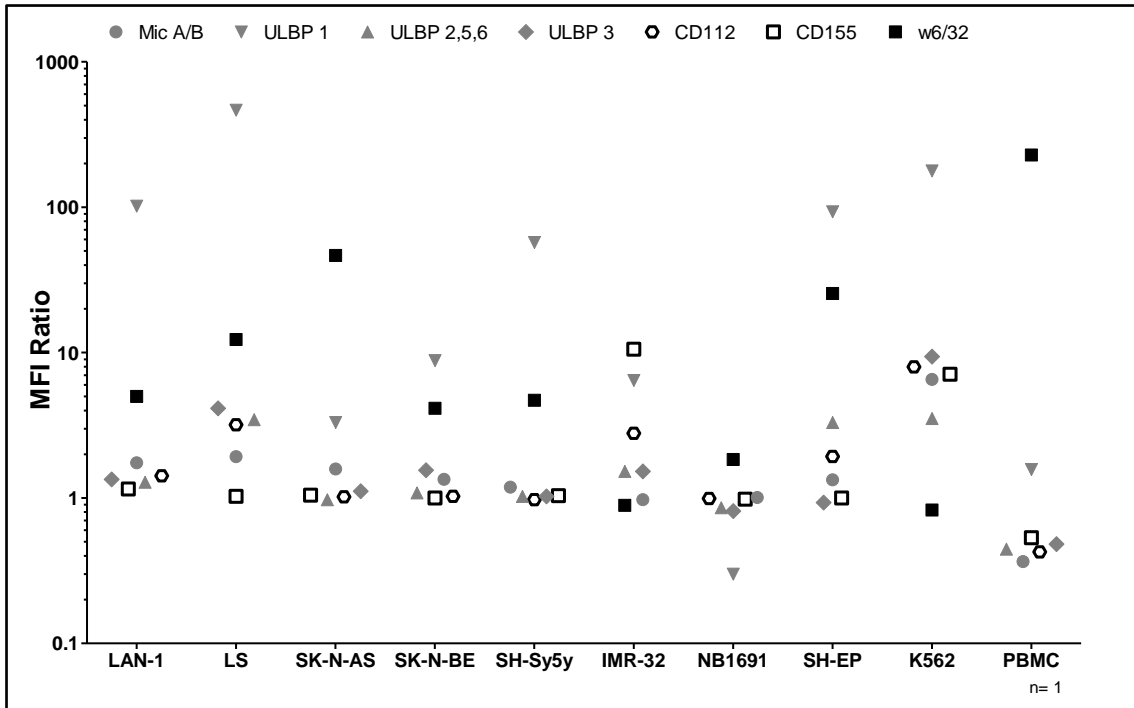


Abbildung 3.2.2 Semiquantitative Darstellung der aktivierenden/inhibierenden Liganden

Bestimmung der semiquantitativen Expression der aktivierenden/inhibierenden Liganden auf NK-Zellen durch spezifische Antikörperfärbung als MFI-Ratio (Quotient aus MFI von Probe und Isotypkontrolle, einheitenlos). Grau: NKG2D-Liganden; Weiß: DNAM-1-Liganden; Schwarz: HLA-I

Die Expression der aktivierenden/inhibierenden Liganden wurde semiquantitativ mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die getesteten Zelllinien unterscheiden sich z.T. deutlich in der Expression ihrer Liganden, vor allem der Unterschied in der HLA-I Expression ist von entscheidender Bedeutung für unsere Studie.

3.3 Funktionelle Testung im xCELLigence

Wir testeten die funktionelle Aktivität expandierter NK-Zellen vier verschiedener Spender gegen die Zelllinien LAN-1 und LS im xCELLigence.

3.3.1 LAN-1

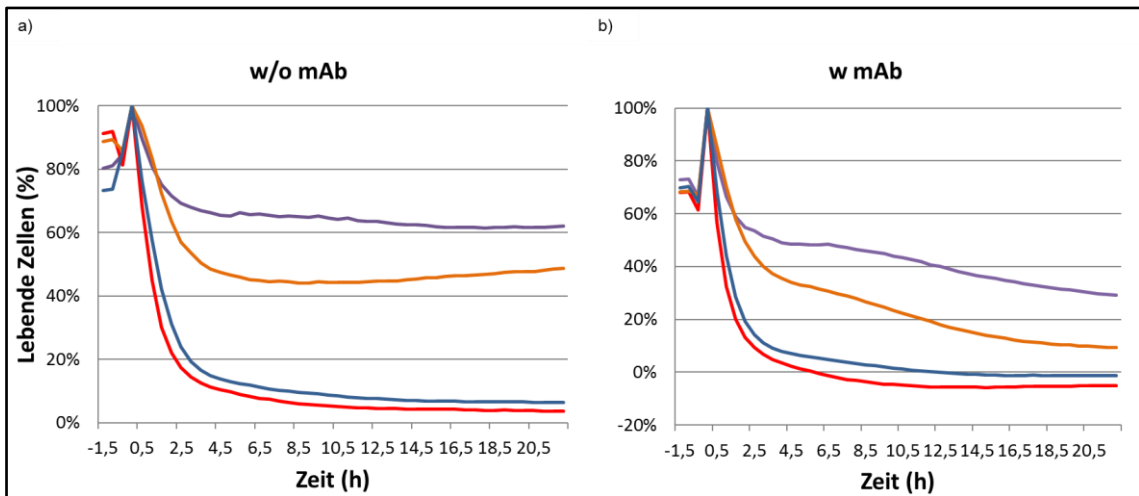


Abbildung 3.3.1 NK-vermittelte Lyse von 4 Spendern vs LAN-1 ohne/mit ch14.18 im xCELLigence

Lyse von LAN-1 durch expandierte NK Zellen ohne (Abb. a) und mit (Abb. b) ch14.18. Dargestellt ist der Mittelwert aus fünf technischen Replikaten eines Versuchs mit 4 Spendern, Messintervall 30min, E/T Ratio 2:1, Endkonzentration ch14.18 1µg/ml, n=4. Lila: Spender 1; Orange: Spender 2; Blau: Spender 3; Rot: Spender 4

Man sieht deutliche Unterschiede was die Lyse von LAN-1 bei Inkubation mit expandierten NK-Zellen von vier verschiedenen Spendern. Spender 1 (lila Kurve) lysiert deutlich schlechter als Spender 2 (blaue Kurve) und Spender 3 (rote Kurve). Bei Spender 1 und Spender 2 nähert sich die Lyse einem Plateau bei ca. 70% bzw. 50% an, während bei Spender 3 und Spender 4 100% der Zellen lysiert werden. Gibt man den therapeutischen Antikörper ch14.18 hinzu verändert sich die Kurve von Spender 3 bzw. Spender 4 nahezu gar nicht, wohingegen bei Spender 1 und Spender 2 die Kurve kein Plateau erreicht, sondern die Lyse auch noch nach ca. 21 h anhält.

3.3.2 LS

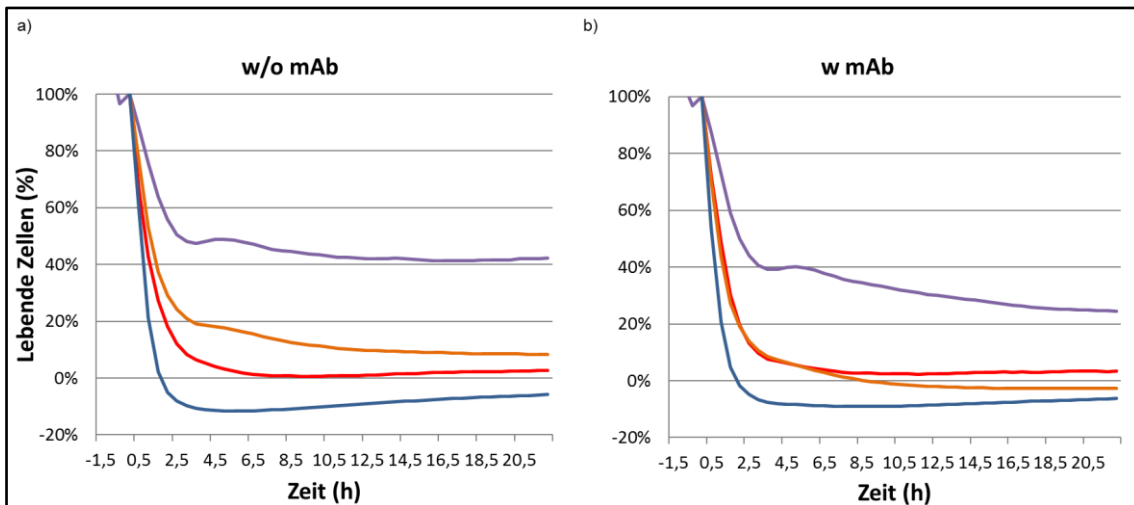


Abbildung 3.3.2 NK-vermittelte Lyse von 4 Spendern vs LS ohne/mit ch14.18 im xCELLigence

Lyse von LS durch expandierte NK Zellen ohne (Abb. a) und mit (Abb. b) ch14.18. Dargestellt ist der Mittelwert aus fünf technischen Replikaten eines Versuchs mit 4 Spendern, Messintervall 30min, E/T Ratio 2:1, Endkonzentration ch14.18 1µg/ml, n=4. Lila: Spender 1; Orange: Spender 2; Blau: Spender 3; Rot: Spender 4

Inkubiert man LS mit expandierten NK-Zellen von denselben Spendern ergibt sich ein ähnliches Bild. Spender 1 lysiert deutlich schlechter als Spender 2, Spender 3 oder Spender 4. Bei Spender 1 nähert sich die Lyse wieder einem Plateau bei 50% an, während bei den anderen Spendern 90-100% der Zellen lysiert werden. Gibt man den therapeutischen Antikörper ch14.18 hinzu, erreicht die Lysekurve von Spender 1 kein Plateau mehr, sondern hält nach ca. 21 h noch an und die restlichen Spender erreichen 100% Lyse.

3.4 Funktionelle Testung im CD107a-Assay

Im CD107a-Assay testeten wir die funktionelle Aktivität der expandierten NK-Zellen gegen die Neuroblastomzelllinien jeweils ohne und mit Zugabe von ch14.18. Dabei bestimmten wir bei jedem Assay auch die Aktivität frisch isolierter PBMC als Vergleich. Wir verwendeten expandierte NK-Zellen bzw. frisch isolierte PBMC von zwei Spendern (s. Kap. 2.5).

3.4.1 Analyse der funktionellen Testung bei Spender 1

Wir testeten die Aktivität von frisch isolierten PBMC und expandierte NK-Zellen gegen die Neuroblastomzelllinien jeweils ohne und mit Zugabe des therapeutischen Antikörpers ch14.18.

3.4.1.1 Frisch isolierte PBMC

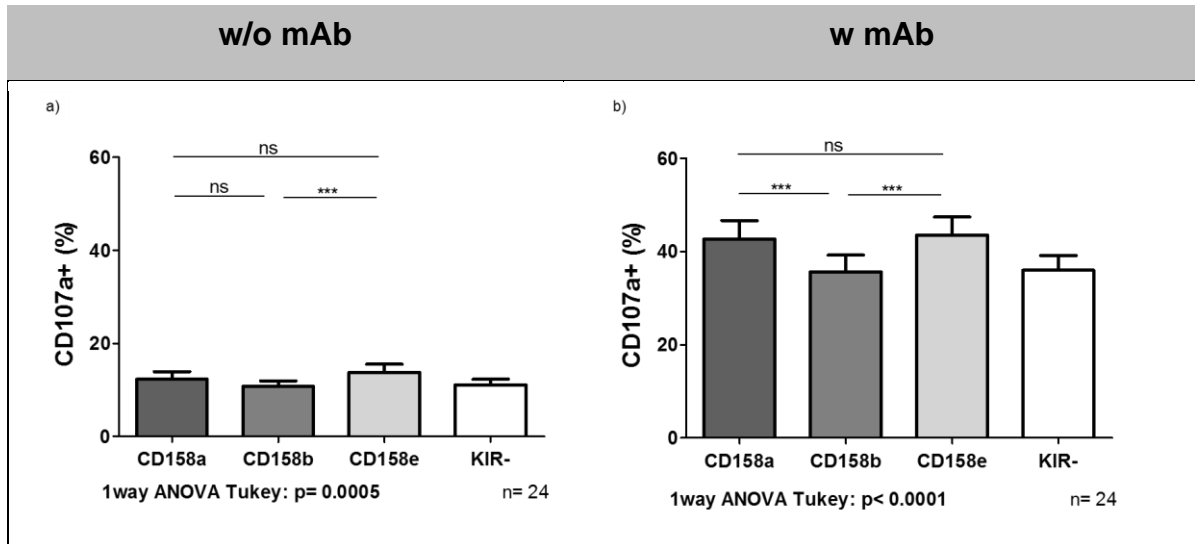
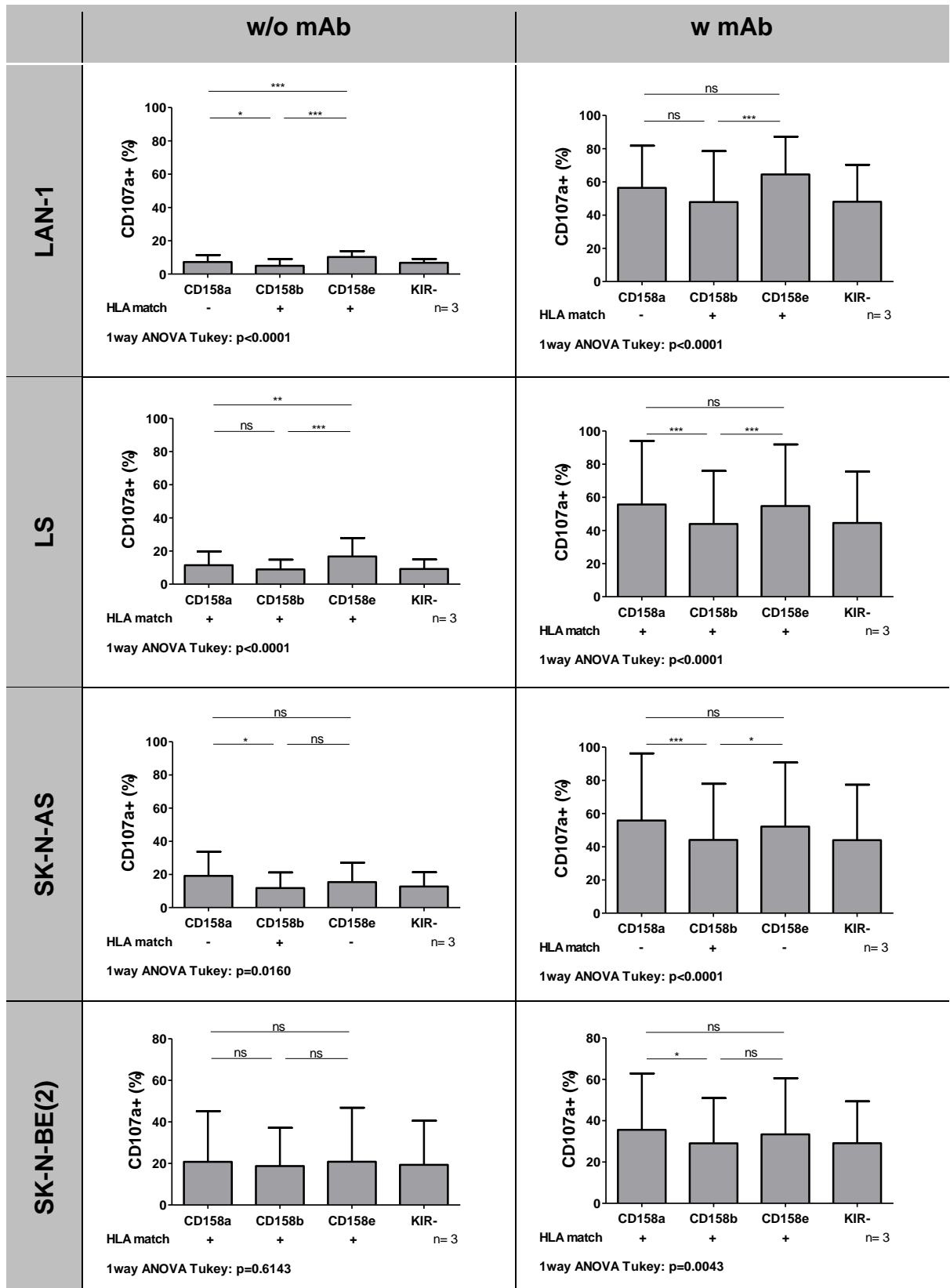


Abbildung 3.4.1 CD107a-Aktivität frisch isolierter PBMC von Spender 1 gegen alle Targets mit und ohne ch14.18

Bestimmung der Aktivität frisch isolierter PBMC im CD107a-Assay ohne (Abb. a) und mit (Abb. b)) Zugabe von ch14.18. Dargestellt sind n=24 Versuche mit den Effektorzellen von Spender 1 gegen 8 Targets mit jeweils 3 technischen Replikaten. E/T Ratio 1:1, Inkubationszeit 6h, Endkonzentration ch14.18 1µg/ml.

In der Grafik sieht man die CD107a-Aktivität der KIR-Populationen frisch isolierter PBMC ohne und mit Zugabe von ch14.18, dabei wurden die Ergebnisse aller Targetzelllinien zusammengefasst. Ohne Antikörper zeigt nur die CD158b-Population eine signifikant niedrigere Aktivität als die CD158e-Population. Bei Zugabe von ch14.18 steigt insgesamt die Aktivität stark an, jedoch zeigt die CD158b-Population eine signifikant niedrigere Aktivität sowohl als die CD158a-Population als auch die CD158e-Population. Nachfolgend werden die Ergebnisse der einzelnen Zelllinien präsentiert.



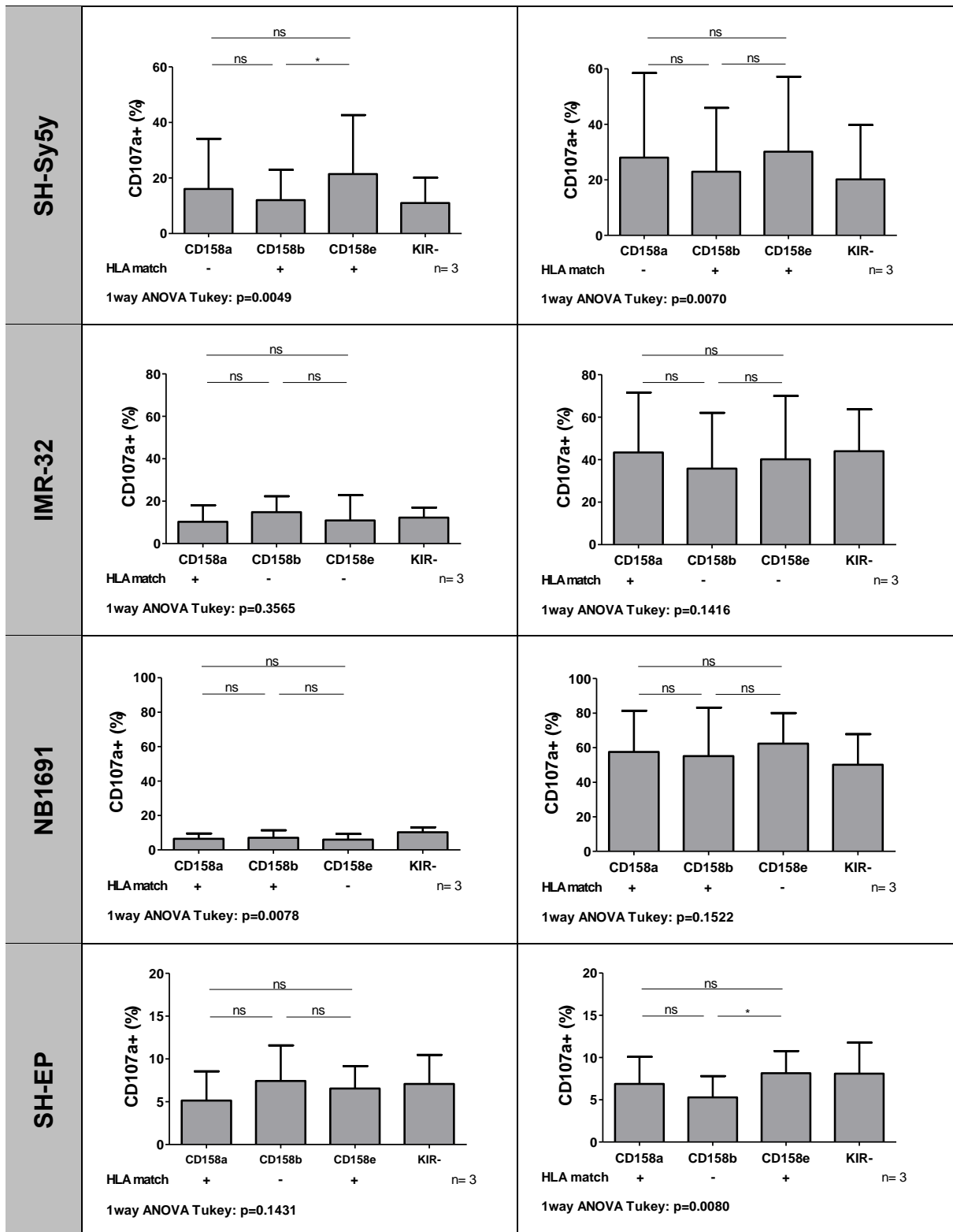


Abbildung 3.4.2 Aktivität der frisch isolierten PBMC von Spender 1 gegen alle getesteten Zelllinien mit und ohne ch14.18

Zusammenfassung der Ergebnisse der CD107a-Assays mit frisch isolierten PBMC von Spender 1 gegen die indizierten Neuroblastozelllinien. Dargestellt sind jeweils n=3 Versuche mit je 3 technischen Replikaten. E/T Ratio 1:1, Inkubationszeit 6h, Endkonzentration ch14.18 1µg/ml.

Ebenfalls ist die jeweilige HLA Match/Mismatch Situation und das Ergebnis der statistischen Auswertung aufgeführt.

LAN-1

Alle Populationen unterscheiden sich signifikant voneinander, dabei hat die CD158b-Population die niedrigste Aktivität. Bei Zugabe von ch14.18 erhöht sich die Aktivität aller Populationen insgesamt deutlich, jedoch verringern sich die Unterschiede zwischen den Populationen. Die CD158b-Population zeigt eine signifikant niedrigere Aktivität als die CD158e-Population.

LS

Sowohl die CD158a-Population als auch die CD158b-Population zeigen eine signifikant niedrigere Aktivität als die CD158e-Population. Nach Zugabe von ch14.18 erhöht sich die gesamte Aktivität, nun zeigt die CD158b-Population eine signifikant niedrigere Aktivität als sowohl die CD158a- als auch die CD158e-Population.

SK-N-AS

Die CD158b-Population zeigt eine signifikant niedrigere Aktivität als die CD158a-Population. Bei Zugabe des therapeutischen Antikörpers ch14.18 steigt die Aktivität insgesamt stark an, hier zeigt die CD158b-Population eine signifikant niedrigere Aktivität als sowohl die CD158a- als auch die CD158e-Population.

SK-N-BE(2)

Ohne ch14.18 unterscheiden sich die Populationen nicht signifikant. Bei Zugabe von ch14.18 steigt die Aktivität nur leicht an, die CD158b-Population zeigt eine signifikant niedrigere Aktivität als die CD158a-Population.

SH-Sy5y

Die CD158b-Population zeigt eine signifikant niedrigere Aktivität als die CD158e-Population. Bei Zugabe des therapeutischen Antikörpers ch14.18

verändert sich die Aktivität der KIR-positiven Populationen kaum, untereinander unterscheiden sie sich nicht signifikant in ihrer Aktivität.

IMR-32

Die KIR-positiven Populationen unterscheiden sich weder ohne noch mit Zugabe des therapeutischen Antikörpers ch14.18 signifikant voneinander. Nach Zugabe steigt insgesamt die Aktivität stark an.

NB1691

Die KIR-positiven Populationen unterscheiden sich weder ohne noch mit Zugabe des therapeutischen Antikörpers ch14.18 signifikant voneinander. Nach Zugabe steigt insgesamt die Aktivität stark an.

SH-EP

Ohne ch14.18 unterscheiden sich die KIR-positiven Populationen nicht signifikant voneinander. Bei Zugabe des therapeutischen Antikörpers ch14.18 zeigt die CD158b-Population eine signifikant niedrigere Aktivität als die CD158e-Population. Die Aktivität verändert sich insgesamt jedoch fast nicht.

3.4.1.2 Expandierte NK-Zellen

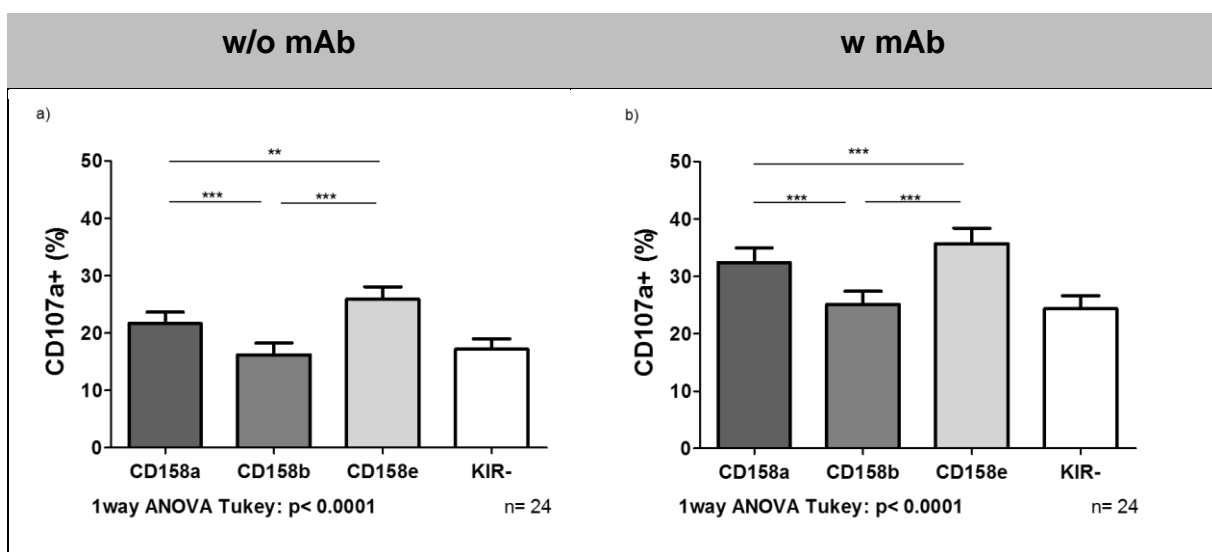
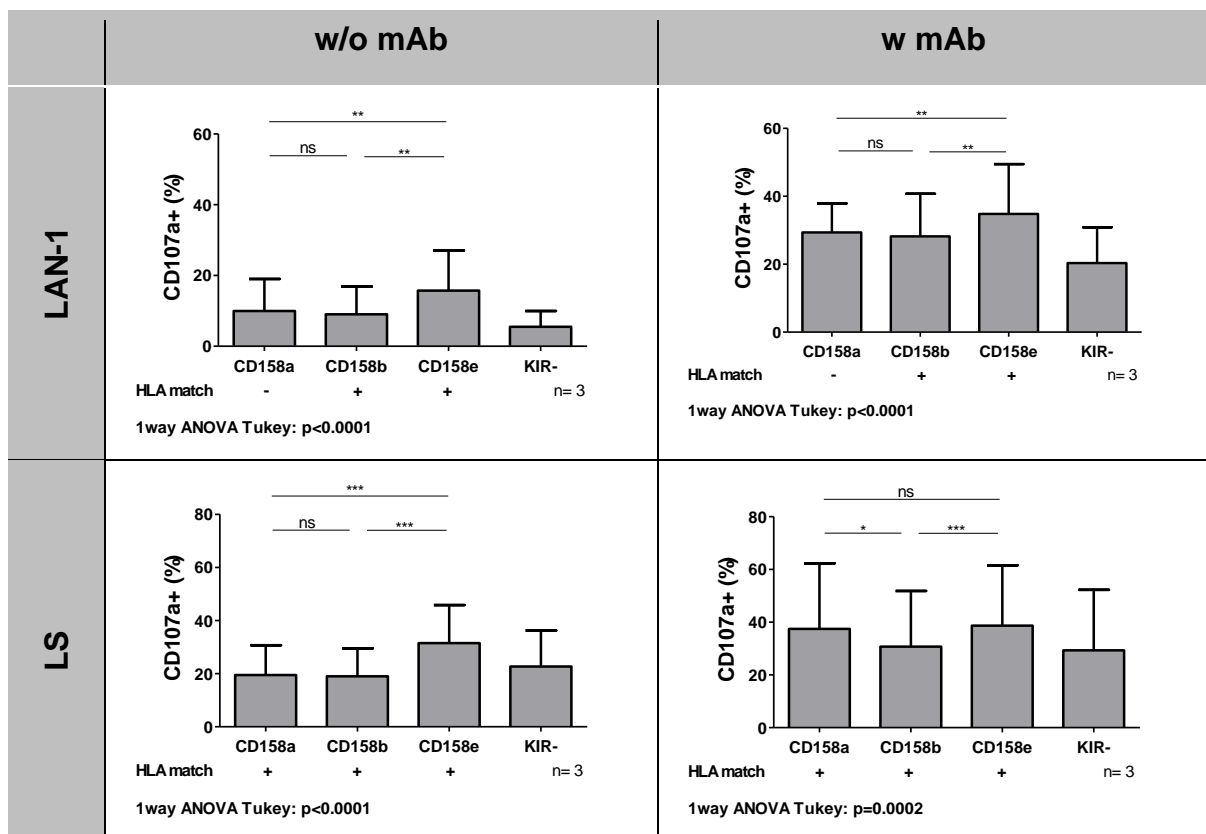
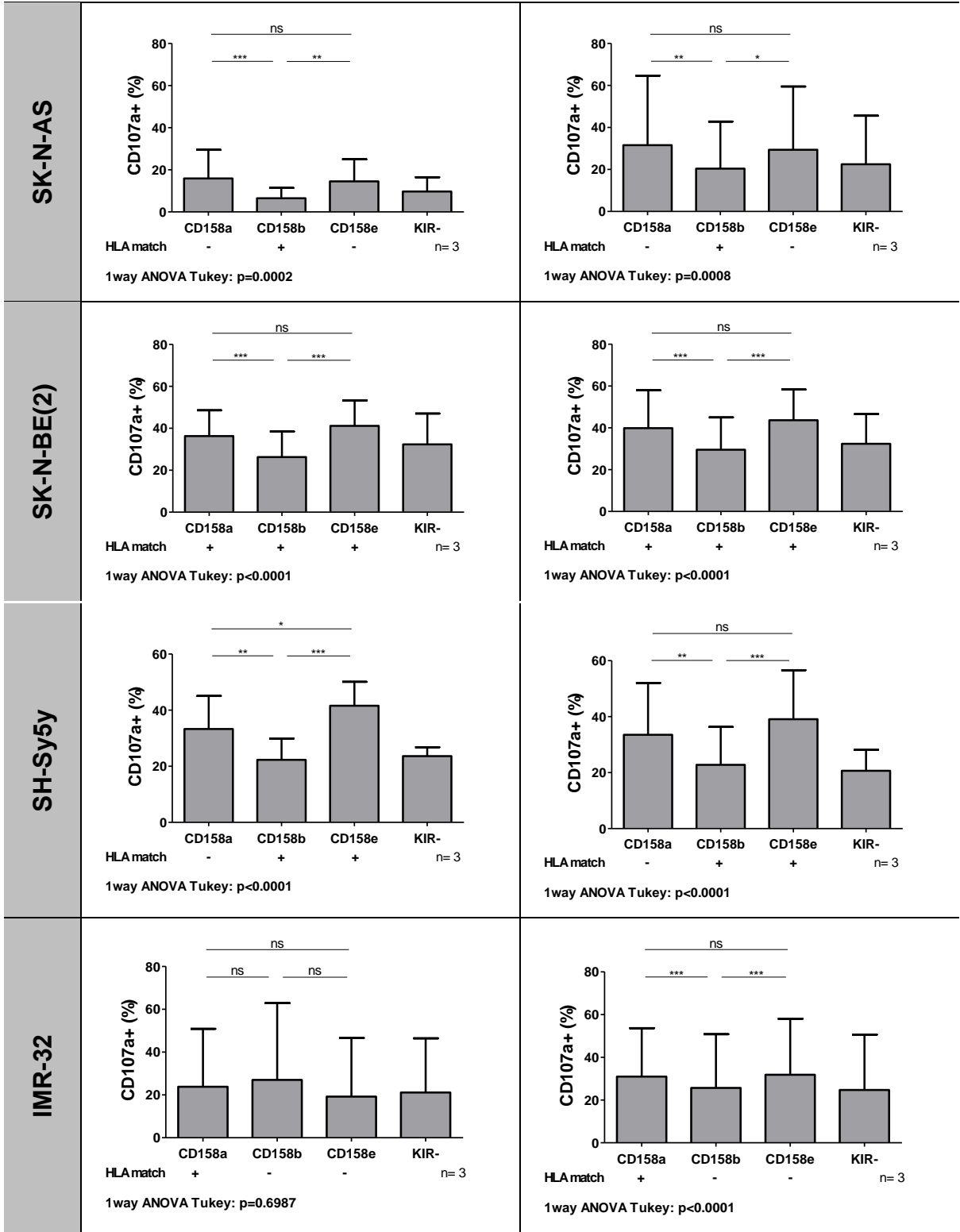


Abbildung 3.4.3 CD107a-Aktivität expandierter NK-Zellen von Spender 1 gegen alle Targets mit und ohne ch14.18

Bestimmung der Aktivität expandierter NK-Zellen im CD107a-Assay ohne (Abb. a) und mit (Abb. b) Zugabe von ch14.18. Dargestellt sind n=24 Versuche mit den Effektorzellen von Spender 1 gegen 8 Targets mit jeweils 3 technischen Replikaten. E/T Ratio 1:1, Inkubationszeit 6h, Endkonzentration ch14.18 1µg/ml.

In der Grafik sieht man die CD107a-Aktivität der KIR-Populationen expandierter NK-Zellen ohne und mit Zugabe von ch14.18, dabei wurden die Ergebnisse aller Targetzelllinien zusammengefasst. Sowohl ohne als auch mit Antikörper unterscheiden sich alle KIR-Populationen signifikant voneinander, beides Mal zeigt die CD158b-Population die geringste und die CD158e-Population die höchste Aktivität. Bei Zugabe des therapeutischen Antikörpers ch14.18 steigt die Aktivität aller Subpopulationen deutlich an. Nachfolgend werden die Ergebnisse der einzelnen Zelllinien präsentiert.





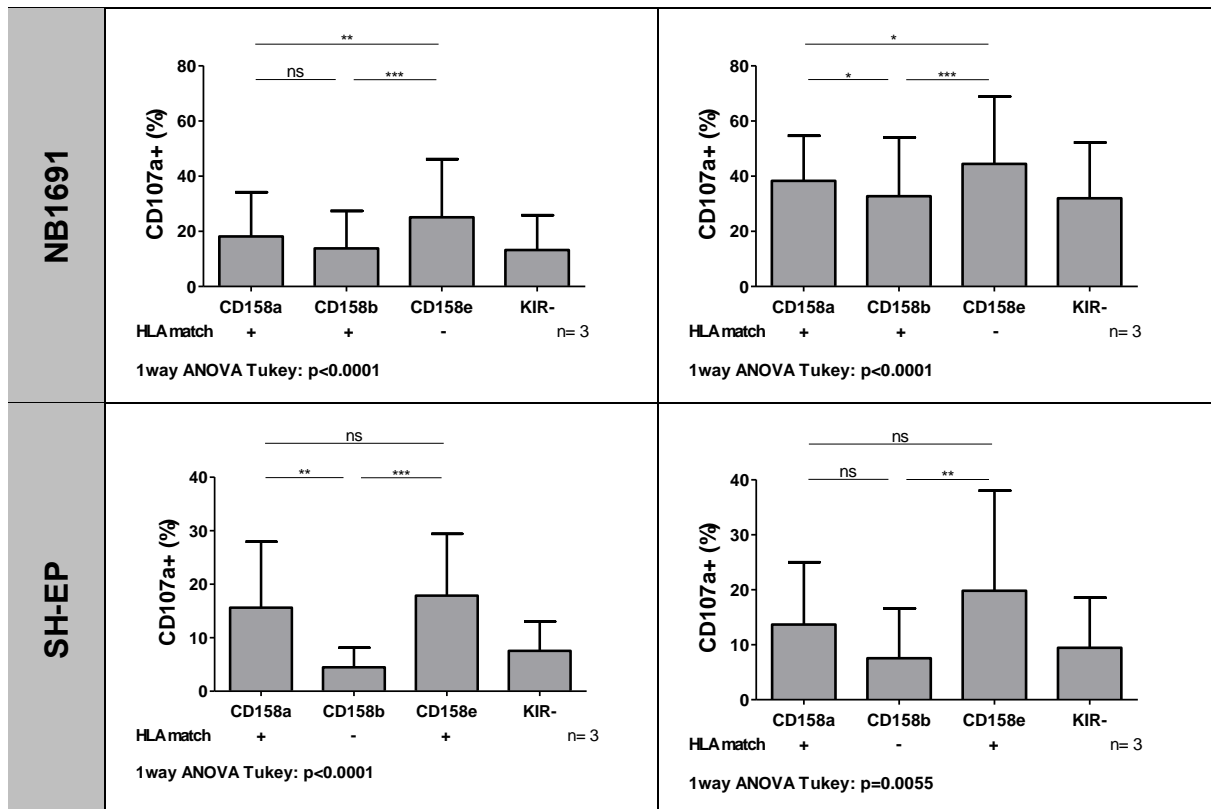


Abbildung 3.4.4 Aktivität der expandierten NK-Zellen von Spender 1 gegen alle getesteten Zelllinien mit und ohne ch14.18

Zusammenfassung der Ergebnisse der CD107a-Assays mit expandierten NK-Zellen von Spender 1 gegen die indizierten Neuroblastomzelllinien. Dargestellt sind jeweils n=3 Versuche mit je 3 technischen Replikaten. E/T Ratio 1:1, Inkubationszeit 6h, Endkonzentration ch14.18 1µg/ml. Ebenfalls ist die jeweilige HLA Match/Mismatch Situation und das Ergebnis der statistischen Auswertung aufgeführt.

LAN-1

Die CD158b-Population zeigt eine signifikant niedrigere Aktivität als die CD158e-Population, diese zeigt eine signifikant höhere Aktivität als die CD158a-Population. CD158a- und CD158b-Population unterschieden sich nicht signifikant. Bei Zugabe von ch14.18 bleiben die Unterschiede zwischen den Subpopulationen gleich, insgesamt steigt die Aktivität der NK-Zellen stark an.

LS

Die CD158b-Population zeigt eine signifikant niedrigere Aktivität als die CD158e-Population, diese zeigt eine signifikant höhere Aktivität als die CD158a-Population, CD158a- und CD158b-Population unterschieden sich nicht signifikant. Bei Zugabe von ch14.18 steigt die Aktivität stark an, die CD158b-

Population zeigt eine signifikant niedrigere Aktivität sowohl als die CD158a-Population als auch die CD158e-Population.

SK-N-AS

Die CD158b-Population zeigt eine signifikant niedrigere Aktivität sowohl als die CD158a-Population als auch die CD158e-Population. Bei Zugabe des therapeutischen Antikörpers ch14.18 erhöht sich die Aktivität aller Subpopulationen ein wenig, die Unterschiede zwischen den KIR-Populationen bleiben jedoch erhalten.

SK-N-BE(2)

Die CD158b-Population zeigt eine signifikant niedrigere Aktivität sowohl als die CD158a-Population als auch die CD158e-Population. Durch Zugabe von ch14.18 verändern sich weder die Gesamtaktivität noch die Unterschiede zwischen den Subpopulationen.

SH-Sy5y

Ohne ch14.18 zeigt die CD158b-Population eine signifikant niedrigere Aktivität sowohl als die CD158a-Population als auch die CD158e-Population, die CD158e-Population zeigt eine signifikant höhere Aktivität als die CD158a-Population. Mit Zugabe von ch14.18 zeigt die CD158b-Population eine signifikant niedrigere Aktivität sowohl als die CD158a-Population als auch die CD158e-Population, letztere unterscheiden sich nicht signifikant.

NB1691

Die CD158b-Population zeigt eine signifikant niedrigere Aktivität als die CD158e-Population, diese zeigt eine signifikant höhere Aktivität als die CD158a-Population. Bei Zugabe des therapeutischen Antikörpers ch14.18 erhöht sich insgesamt die Aktivität, außerdem ist die Aktivität der CD158b-Population nun auch noch signifikant niedriger als die der CD158a-Population.

IMR-32

Ohne ch14.18 unterscheiden sich die KIR-Populationen nicht signifikant voneinander. Die Gesamtaktivität verändert sich nach Zugabe von ch14.18 kaum, jedoch ist die Aktivität der CD158b-Population signifikant niedriger als die der CD158a- und CD158e-Population.

SH-EP

Die CD158b-Population zeigt eine signifikant niedrigere Aktivität sowohl als die CD158a-Population als auch die CD158e-Population.

Bei Zugabe des therapeutischen Antikörpers ch14.18 verändert sich die Gesamtaktivität der KIR-Populationen kaum, die CD158b-Population zeigt nun nur noch eine signifikant niedrigere Aktivität als die CD158e-Population, zwischen der CD158a- und der CD158b-Population besteht kein signifikanter Unterschied mehr.

3.4.2 Analyse der funktionellen Testung bei Spender 2

Wir testeten die Aktivität von frisch isolierten PBMC und expandierte NK-Zellen gegen fünf Neuroblastomzelllinien jeweils ohne und mit Zugabe des therapeutischen Antikörpers ch14.18.

3.4.2.1 Frisch isolierte PBMC

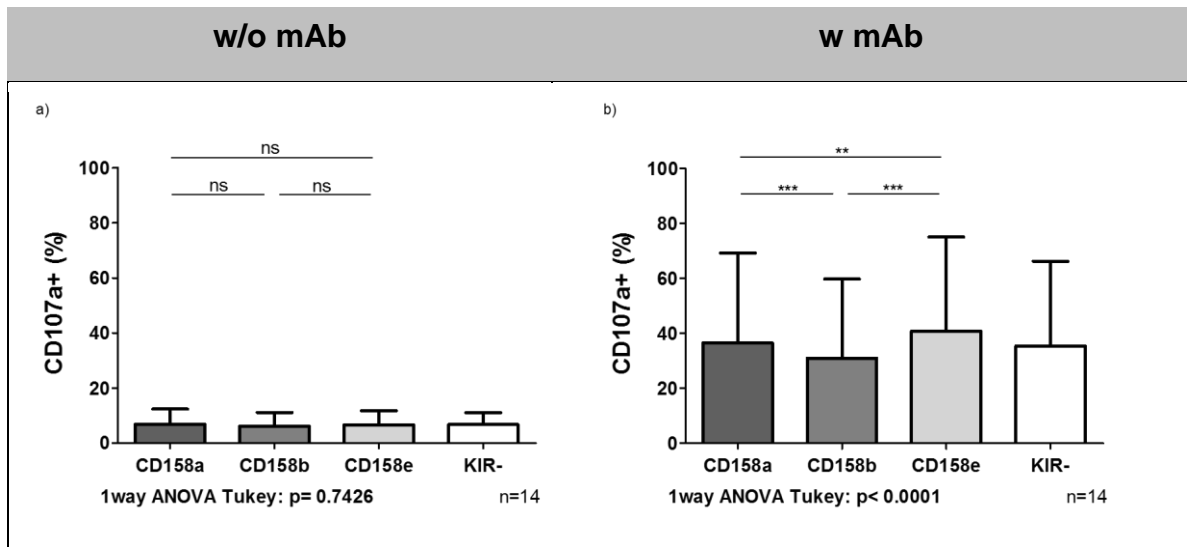
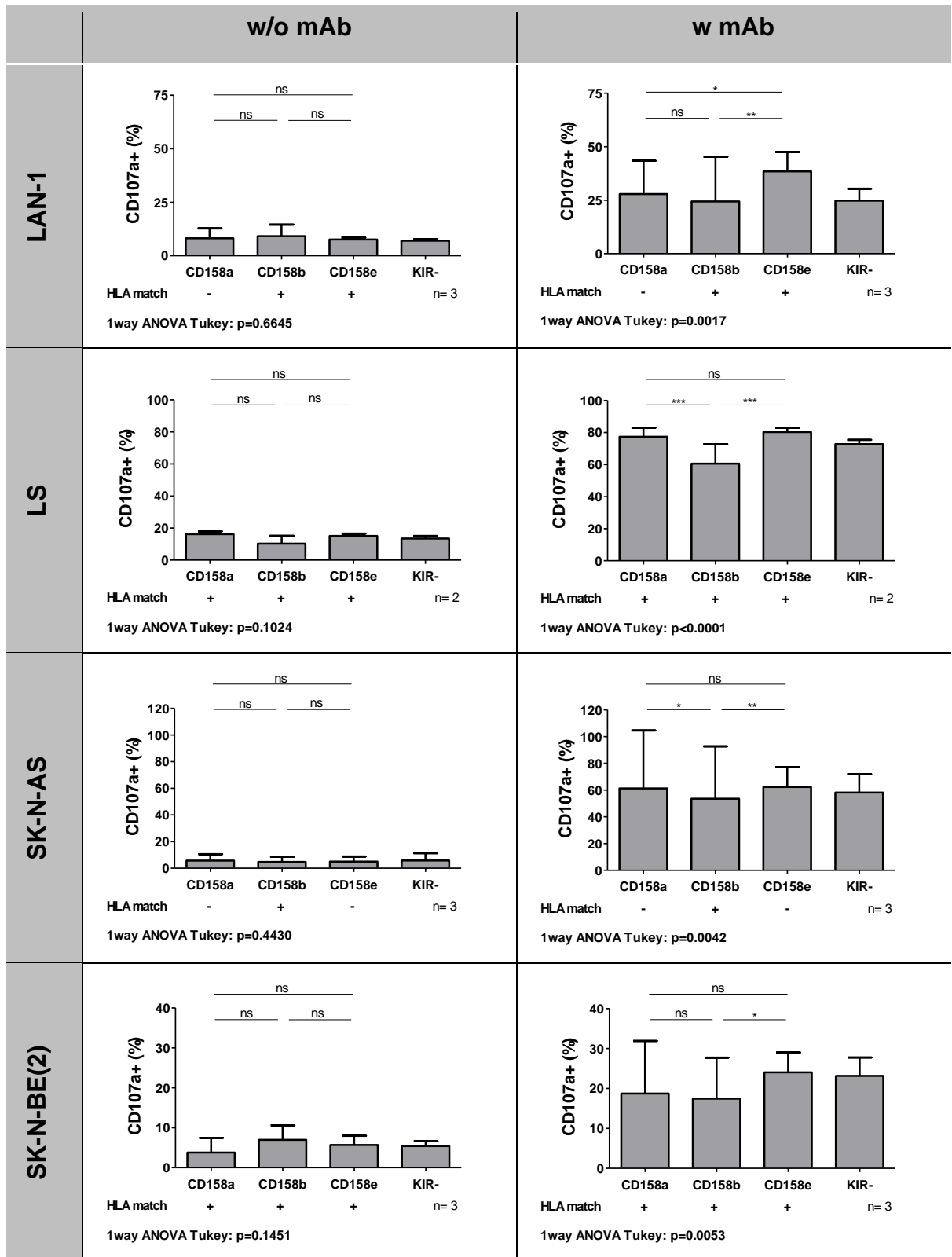


Abbildung 3.4.5 CD107a-Aktivität frisch isolierter PBMC von Spender 2 gegen alle Targets mit und ohne ch14.18

Bestimmung der Aktivität frisch isolierter PBMC im CD107a-Assay ohne (Abb. a) und mit (Abb. b) Zugabe von ch14.18. Dargestellt sind n=14 Versuche mit den Effektorzellen von Spender 2 gegen 5 Targets mit jeweils 3 technischen Replikaten. E/T Ratio 1:1, Inkubationszeit 6h, Endkonzentration ch14.18 1µg/ml.

In der Grafik sieht man die CD107a-Aktivität der KIR-Populationen frisch isolierter PBMC ohne und mit Zugabe von ch14.18, dabei wurden die Ergebnisse aller Targetzelllinien zusammengefasst. Ohne Antikörper unterscheiden sich die KIR positiven Populationen nicht signifikant. Bei Zugabe von ch14.18 steigt insgesamt die Aktivität stark an, jedoch zeigt die CD158b-Population eine signifikant niedrigere Aktivität sowohl als die CD158a-Population als auch die CD158e-Population. Letztere zeigt die höchste Aktivität der Subpopulationen. Nachfolgend werden die Ergebnisse der einzelnen Zelllinien präsentiert.



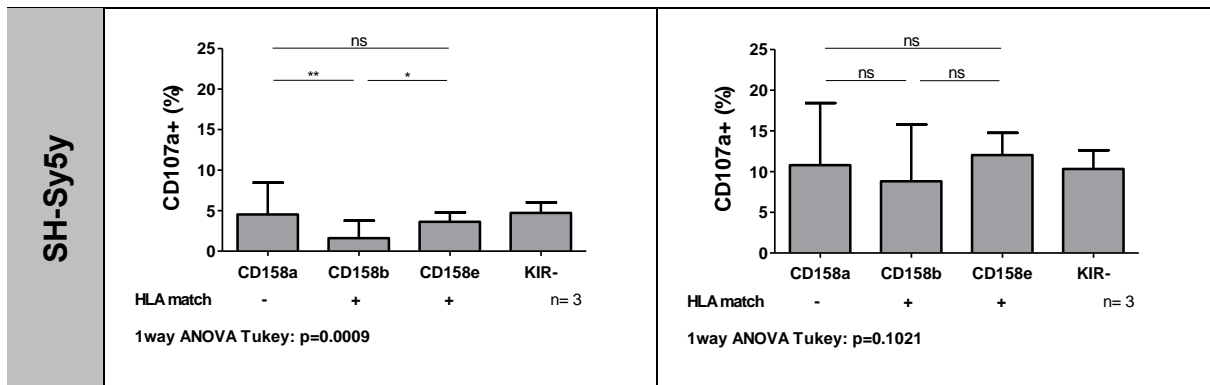


Abbildung 3.4.6 Aktivität der frisch isolierten PBMC von Spender 2 gegen alle getesteten Zelllinien mit und ohne ch14.18

Zusammenfassung der Ergebnisse der CD107a-Assays mit frisch isolierten PBMC von Spender 2 gegen die indizierten Neuroblastozelllinien. Dargestellt sind jeweils n=3 Versuche mit je 3 technischen Replikaten. E/T Ratio 1:1, Inkubationszeit 6h, Endkonzentration ch14.18 1µg/ml. Ebenfalls ist die jeweilige HLA Match/Mismatch Situation und das Ergebnis der statistischen Auswertung aufgeführt.

LAN-1

Ohne Antikörper unterscheiden sich die KIR positiven Populationen nicht signifikant. Bei Zugabe von ch14.18 steigt insgesamt die Aktivität stark an, jedoch zeigt die CD158b-Population eine signifikant niedrigere Aktivität als die CD158e-Population. Diese zeigt eine signifikant höhere Aktivität als die CD158a- und CD158b- Population.

LS

Ohne Antikörper unterscheiden sich die KIR positiven Populationen nicht signifikant. Bei Zugabe von ch14.18 steigt insgesamt die Aktivität stark an, die CD158b-Population zeigt eine signifikant niedrigere Aktivität als sowohl die CD158a-Population als auch die CD158e-Population.

SK-N-AS

Ohne Antikörper unterscheiden sich die KIR positiven Populationen nicht signifikant. Bei Zugabe von ch14.18 steigt insgesamt die Aktivität stark an, die CD158b-Population zeigt eine signifikant niedrigere Aktivität als sowohl die CD158a-Population als auch die CD158e-Population.

SK-N-BE(2)

Ohne Antikörper unterscheiden sich die KIR positiven Populationen nicht signifikant. Bei Zugabe von ch14.18 steigt insgesamt die Aktivität stark an, die CD158b-Population zeigt eine signifikant niedrigere Aktivität als die CD158e-Population.

SH-Sy5y

Die CD158b-Population zeigt eine signifikant niedrigere Aktivität als sowohl die CD158a-Population als auch die CD158e-Population. Bei Zugabe von ch14.18 steigt die Aktivität insgesamt leicht an, jedoch unterscheiden sich die KIR-positiven Populationen nicht mehr signifikant voneinander.

3.4.2.2 Expandierte NK-Zellen

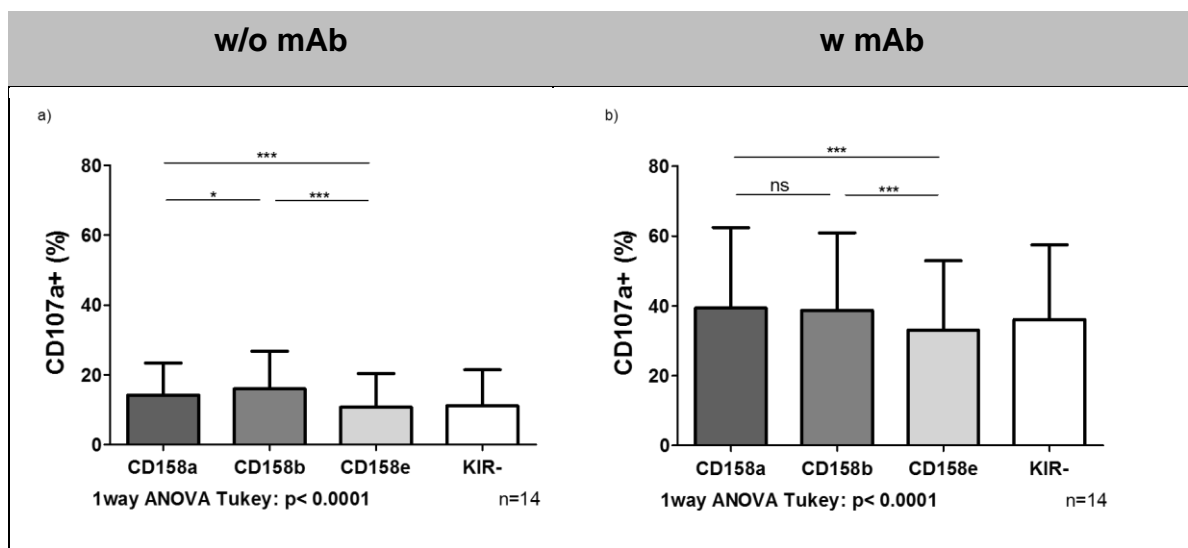
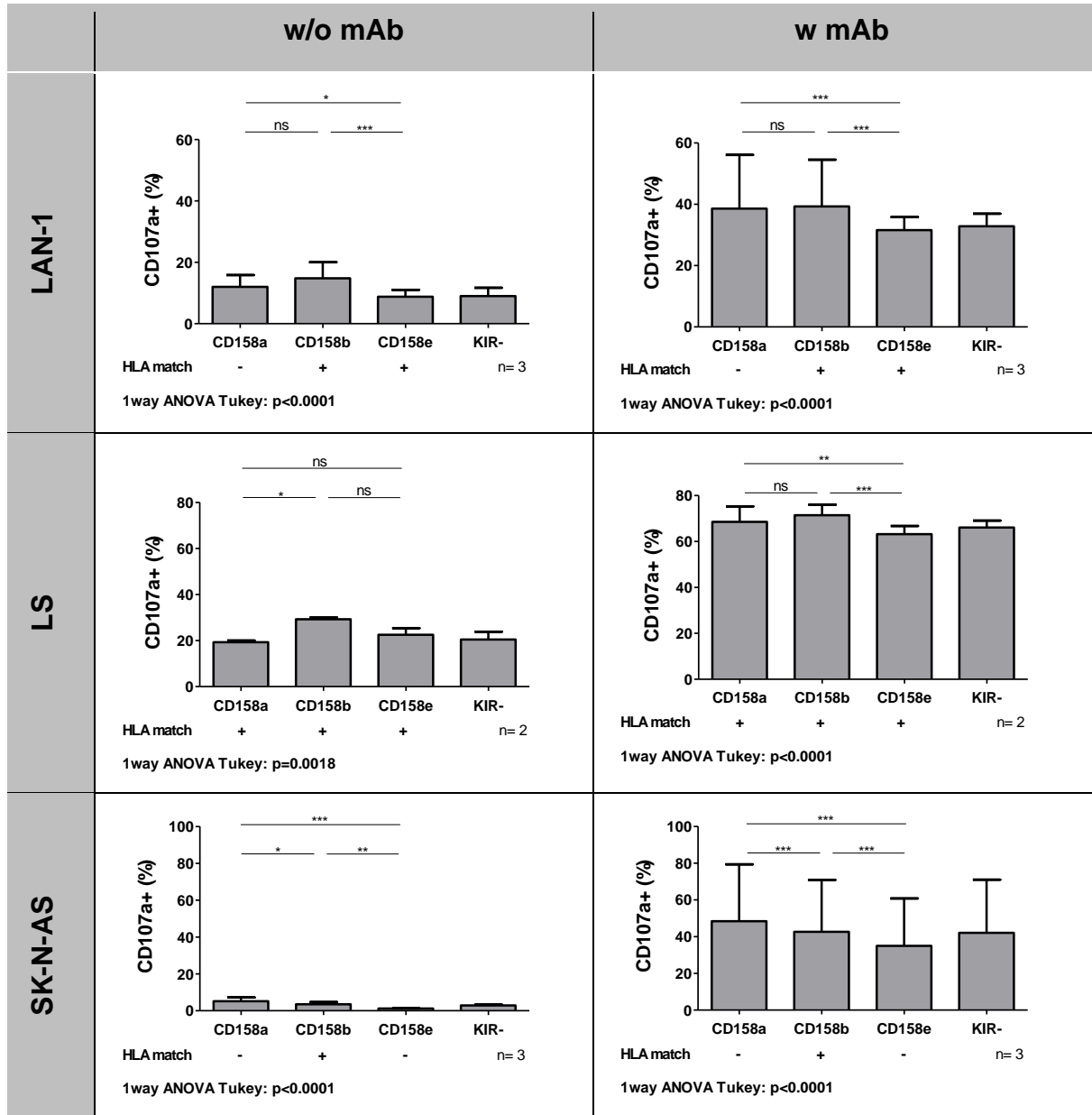


Abbildung 3.4.7 CD107a-Aktivität expandierter NK-Zellen gegen alle Targets

Bestimmung der Aktivität expandierter NK-Zellen im CD107a-Assay ohne (Abb. a) und mit (Abb. b) Zugabe von ch14.18. Dargestellt sind n=14 Versuche mit den Effektorzellen von Spender 2 gegen 5 Targets mit jeweils 3 technischen Replikaten. E/T Ratio 1:1, Inkubationszeit 6h, Endkonzentration ch14.18 1µg/ml.

In der Grafik sieht man die CD107a-Aktivität der KIR-Populationen expandierter NK-Zellen ohne und mit Zugabe von ch14.18, dabei wurden die Ergebnisse aller Targetzelllinien zusammengefasst. Ohne Antikörper unterscheiden sich alle KIR-Populationen signifikant voneinander, die CD158b-Population hat die höchste und die CD158e-Population die geringste Aktivität. Bei Zugabe des

therapeutischen Antikörpers ch14.18 steigt die Aktivität aller Subpopulationen deutlich an, die CD158e-Population ist immer noch am wenigsten aktiv, zwischen der CD158a- und CD158b-Population gibt es aber keinen signifikanten Unterschied mehr. Nachfolgend werden die Ergebnisse der einzelnen Zelllinien präsentiert.



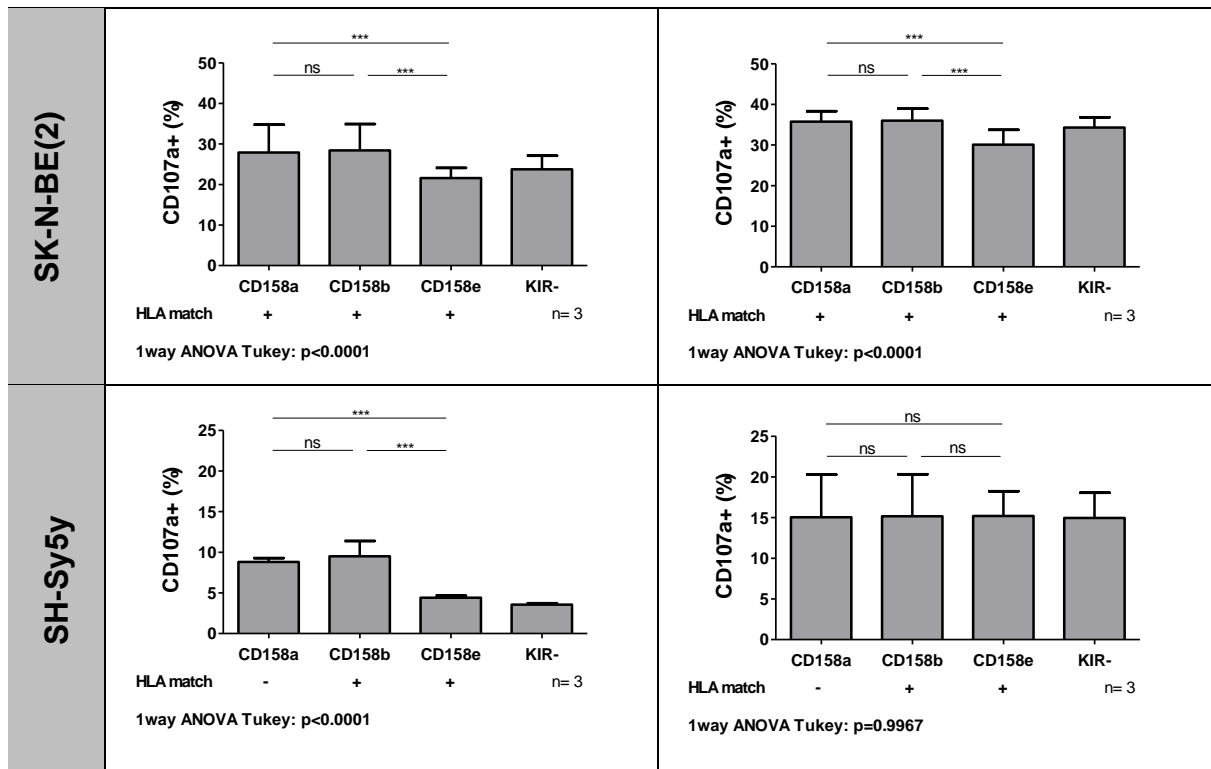


Abbildung 3.4.8 Aktivität der expandierten NK-Zellen von Spender 2 gegen alle getesteten Zelllinien mit und ohne ch14.18

Zusammenfassung der Ergebnisse der CD107a-Assays mit expandierten NK-Zellen von Spender 2 gegen die indizierten Neuroblastomzelllinien. Dargestellt sind jeweils n=3 Versuche mit je 3 technischen Replikaten. E/T Ratio 1:1, Inkubationszeit 6h, Endkonzentration ch14.18 1µg/ml. Ebenfalls ist die jeweilige HLA Match/Mismatch Situation und das Ergebnis der statistischen Auswertung aufgeführt.

LAN-1

Ohne Antikörper zeigt die CD158e-Population eine signifikant niedrigere Aktivität als sowohl die CD158a- als auch die CD158b-Population. Bei Zugabe von ch14.18 steigt insgesamt die Aktivität stark an, die Unterschiede zwischen den Subpopulationen bleiben gleich.

LS

Ohne Antikörpergabe zeigt die CD158a-Population eine signifikant niedrigere Aktivität als die CD158b-Population. Bei Zugabe von ch14.18 steigt die Gesamtaktivität stark an, die CD158e-Population zeigt eine signifikant niedrigere Aktivität als sowohl die CD158a- als auch die CD158b-Population. Letztere unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

SK-N-AS

Ohne Antikörper unterscheiden sich alle KIR-Populationen signifikant voneinander, die CD158b-Population hat die höchste und die CD158e-Population die geringste Aktivität. Bei Zugabe von ch14.18 steigt die Gesamtaktivität stark an, die Unterschiede zwischen den Subpopulationen bleiben jedoch gleich.

SK-N-BE(2)

Ohne Antikörpergabe zeigt die CD158e-Population eine signifikant niedrigere Aktivität als sowohl die CD158a- als auch die CD158b-Population. Letztere unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Bei Zugabe von ch14.18 steigt die Gesamtaktivität kaum an, auch die Unterschiede zwischen den KIR-Populationen bleiben gleich.

SH-Sy5y

Ohne Antikörper zeigt die CD158e-Population eine signifikant niedrigere Aktivität als sowohl die CD158a- als auch die CD158b-Population. Letztere unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Bei Zugabe von ch14.18 steigt die Gesamtaktivität etwas an, aber KIR-Populationen unterscheiden sich nicht mehr signifikant.

3.5 Einfluss des therapeutischen Antikörpers ch14.18

Der therapeutische Antikörper ch14.18 bewirkt eine Steigerung der NK-Zellvermittelten Lyse, dabei spielt die Expression des GD2-Oberflächenmoleküls auf den Targetzelllinien eine entscheidende Rolle. In Abbildung 3.2.1 ist die unterschiedliche GD2-Expression der Tumorzellen dargestellt. Um die Aktivitätssteigerung zu quantifizieren testeten wir die Aktivität frisch isolierter PBMC und expandierter NK-Zellen von zwei Spendern jeweils ohne und mit Zugabe von ch14.18.

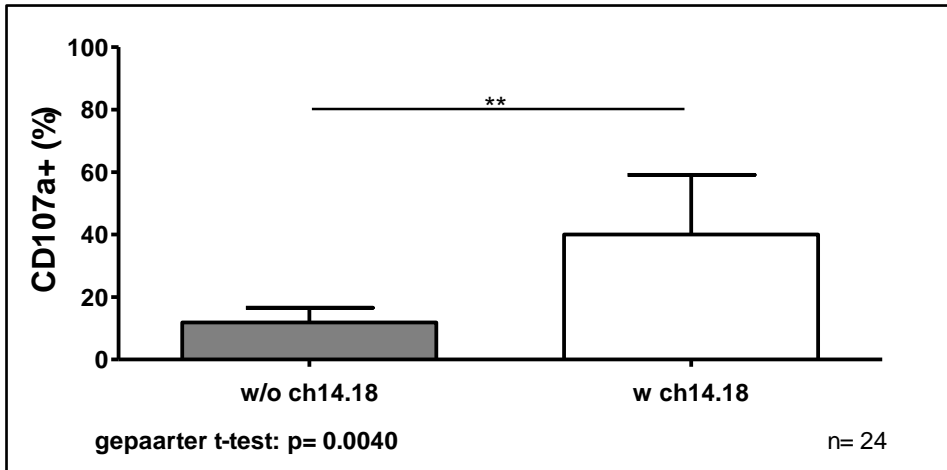


Abbildung 3.5.1 Einfluss von ch14.18 auf die CD107a-Aktivität frisch isolierter PBMC

CD107a-Aktivität frisch isolierter PBMC gegen 8 Targets ohne (grau) und mit (weiß) Zugabe von ch14.18. Signifikante Aktivitätssteigerung ($p=0,040$) nach Zugabe des Antikörpers. Dargestellt sind $n=24$ Versuche mit je 3 technischen Replikaten. E/T Ratio 1:1, Inkubationszeit 6h, Endkonzentration ch14.18 $1\mu\text{g/ml}$.

Die Abbildung zeigt die kumulative Aktivität frisch isolierter PBMC gegen alle Targets. Es gibt einen deutlichen Zuwachs an Aktivität bei Zugabe von ch14.18, der Unterschied der Mittelwerte beträgt 28,15% und ist mit $p=0,040$ signifikant.

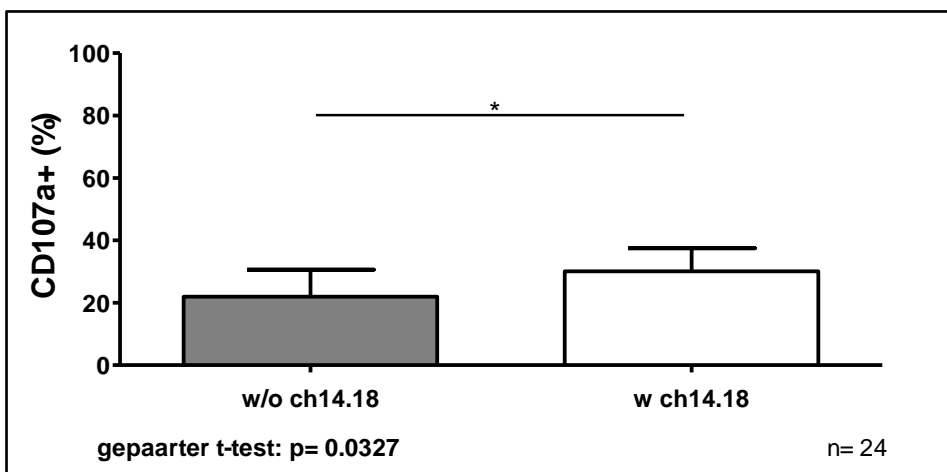


Abbildung 3.5.2 Einfluss von ch14.18 auf die CD107a-Aktivität expandierter NK-Zellen

CD107a-Aktivität expandierter NK-Zellen gegen 8 Targets ohne (grau) und mit (weiß) Zugabe von ch14.18. Signifikante Aktivitätssteigerung ($p=0,0327$) nach Zugabe des Antikörpers. Dargestellt sind $n=24$ Versuche mit je 3 technischen Replikaten. E/T Ratio 1:1, Inkubationszeit 6h, Endkonzentration ch14.18 $1\mu\text{g/ml}$.

Die Abbildung zeigt die kumulative Aktivität expandierter NK-Zellen gegen alle Targets. Die Aktivität steigt bei Zugabe von ch14.18 an, der Unterschied der Mittelwerte beträgt 8,169% und ist mit $p=0,0327$ auch hier signifikant.

3.5.1 Spender 1

Die PBMC bzw. NK-Zellen von Spender 1 wurde gegen alle verfügbaren Neuroblastomzelllinien getestet.

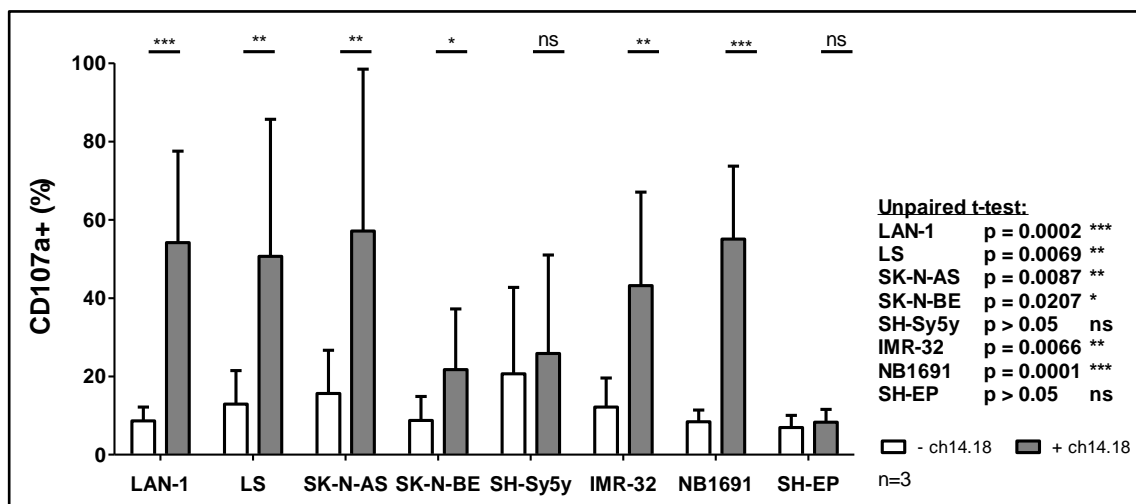


Abbildung 3.5.3 Einfluss von ch14.18 auf die CD107a-Aktivität frisch isolierter PBMC (Spender 1)

Darstellung der CD107a-Aktivität frisch isolierter PBMC von Spender 1 gegen die einzelnen Zelllinien. Es wurden 8 Targets jeweils ohne und mit Zugabe von ch14.18 getestet, n=3 Versuche mit je 3 technischen Replikaten. E/T Ratio 1:1, Inkubationszeit 6h, Endkonzentration ch14.18 1µg/ml.

In der Abbildung ist die CD107a-Aktivität frisch isolierter PBMC gegen die Tumorzellen dargestellt. Passend zur GD2-Expression ist bei LAN-1, LS, SK-N-BE, IMR-32 und NB1691 die Aktivität mit ch14.18 signifikant erhöht. Bei SH-Sy5y und SH-EP, die kein GD2 exprimieren, gibt es zwar eine Aktivitätssteigerung, der Unterschied ist jedoch nicht signifikant. SK-N-AS und SK-N-BE exprimieren nach unseren Messungen zwar kein bzw. sehr wenig GD2, trotzdem ist eine signifikant erhöhte Aktivität bei Zugabe von ch14.18 zu sehen.

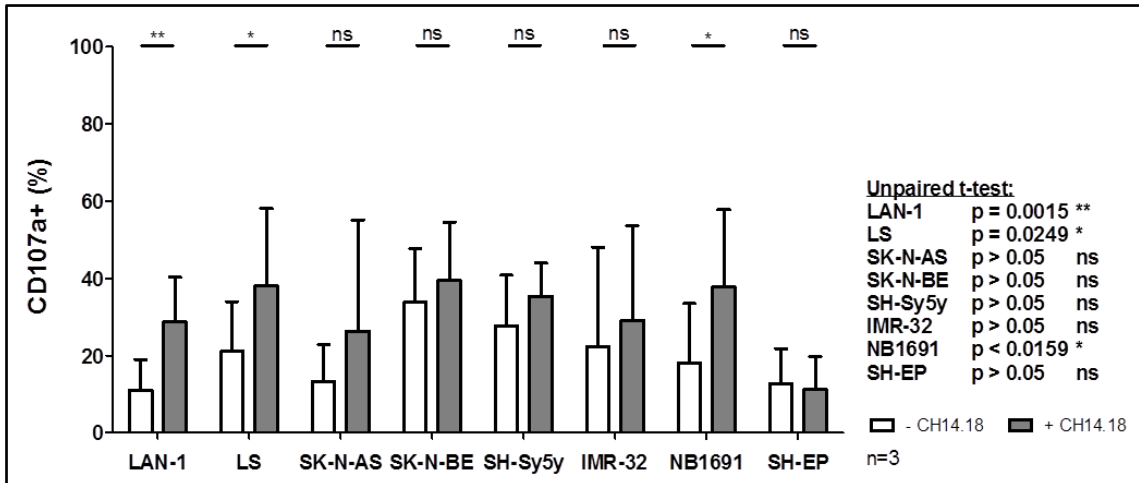


Abbildung 3.5.4 Einfluss von ch14.18 auf die CD107a-Aktivität expandierter NK-Zellen (Spender 1)

Darstellung der CD107a-Aktivität expandierter NK-Zellen von Spender 1 gegen die einzelnen Zelllinien. Es wurden 8 Targets jeweils ohne und mit Zugabe von ch14.18 getestet, n=3 Versuche mit je 3 technischen Replikaten. E/T Ratio 1:1, Inkubationszeit 6h, Endkonzentration ch14.18 1µg/ml.

In der Abbildung ist die CD107a-Aktivität expandierter NK-zellen gegen die Tumorzellen dargestellt. Passend zur GD2-Expression ist bei LAN-1 und NB1691 die Aktivität mit ch14.18 signifikant erhöht. Bei SK-N-AS, SK-N-BE, SH-Sy5y und SH-EP, die alle kein GD2 exprimieren, gibt es zwar eine Aktivitätssteigerung, der Unterschied ist jedoch nicht signifikant. LS und IMR-32 zeigen hier ebenfalls eine Aktivitätszunahme, die jedoch statistisch nicht signifikant ist.

3.5.2 Spender 2

Die PBMC bzw. NK-Zellen von Spender 2 wurde gegen LAN-1, LS, SK-N-AS, SK-N-BE und SH-Sy5y getestet.

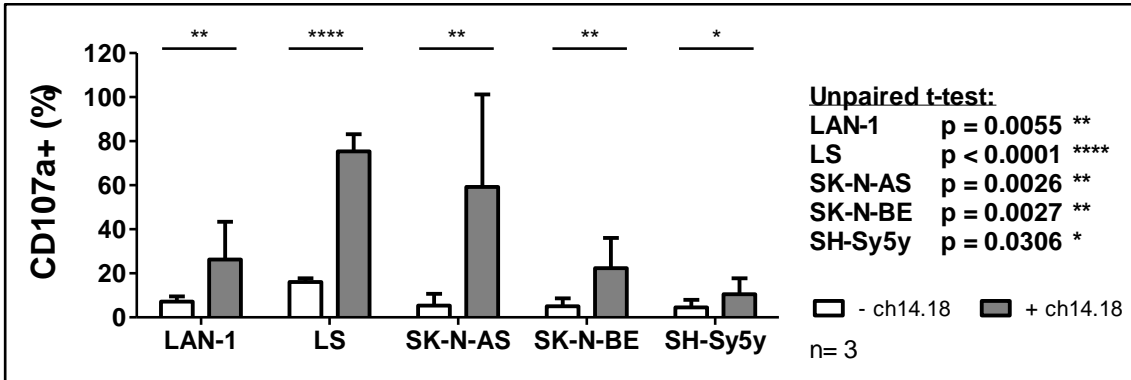


Abbildung 3.5.5 Einfluss von ch14.18 auf die CD107a-Aktivität frisch isolierter PBMC (Spender 2)

Darstellung der CD107a-Aktivität frisch isolierter PBMC von Spender 2 gegen die einzelnen Zelllinien. Es wurden 5 Targets jeweils ohne und mit Zugabe von ch14.18 getestet, n=3 Versuche mit je 3 technischen Replikaten. E/T Ratio 1:1, Inkubationszeit 6h, Endkonzentration ch14.18 1µg/ml.

In der Abbildung ist die CD107a-Aktivität frisch isolierter PBMC gegen die Tumorzellen dargestellt. Alle getesteten Zelllinien zeigen eine signifikante Steigerung der Aktivität bei Zugabe von ch14.18.

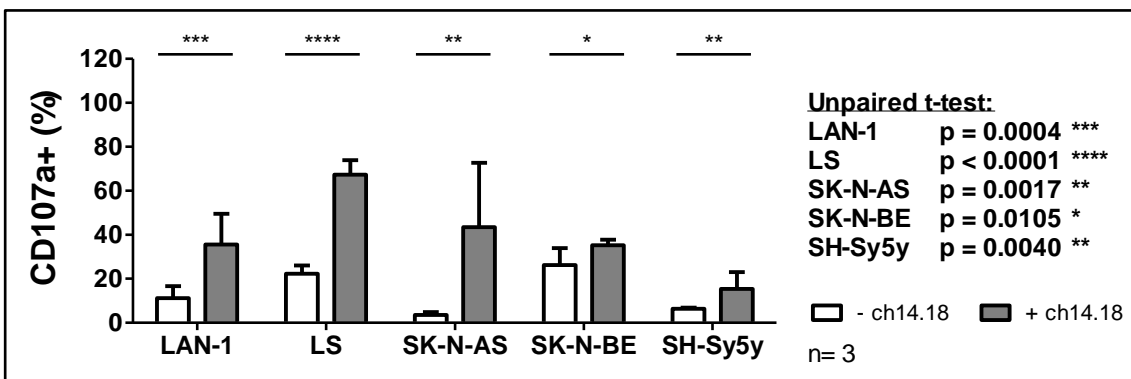


Abbildung 3.5.6 Einfluss von ch14.18 auf die CD107a-Aktivität expandierter NK-Zellen (Spender 2)

Darstellung der CD107a-Aktivität expandierter NK-Zellen von Spender 2 gegen die einzelnen Zelllinien. Es wurden 5 Targets jeweils ohne und mit Zugabe von ch14.18 getestet, n=3 Versuche mit je 3 technischen Replikaten. E/T Ratio 1:1, Inkubationszeit 6h, Endkonzentration ch14.18 1µg/ml.

In der Abbildung ist die CD107a-Aktivität expandierter NK-zellen gegen die Tumorzellen dargestellt. Auch hier signifikante Erhöhung der CD107a-Aktivität nach Zugabe von ch14.18.

3.6 Meta-Analyse der funktionellen Testung

Um die bei der funktionellen Testung erhaltenen Ergebnisse in einen größeren Zusammenhang zu stellen führten wir eine Meta-Analyse der Ergebnisse durch. Dabei fassten wir die Ergebnisse der expandierten NK-Zellen bzw. frisch isolierten PBMC zusammen und betrachteten diese jeweils ohne und mit Zugabe des therapeutischen Antikörpers ch14.18.

3.6.1 Spender 1

Spender 1 besitzt Allele der HLA-C2 und -Bw4 Gruppen, die HLA-C1 Gruppe wird nicht exprimiert.

3.6.1.1 Meta-Analyse der PBMC

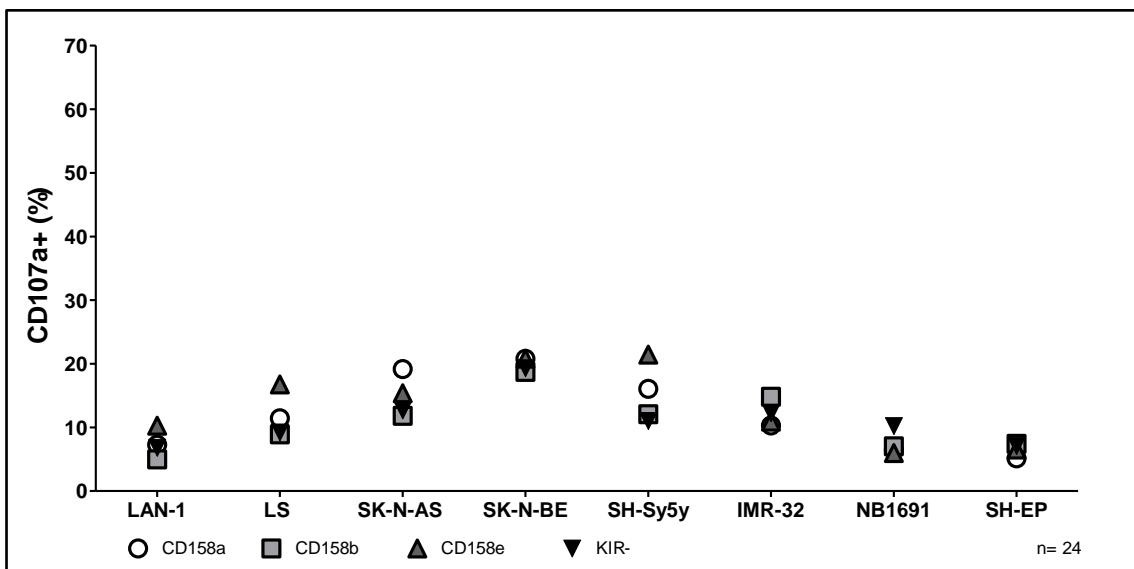


Abbildung 3.6.1 CD107a-Aktivität verschiedener PBMC-Populationen ohne ch14.18

Darstellung der CD107a-Aktivität der einzelnen KIR-Subpopulationen frisch isolierter PBMC von Spender 1 gegen 8 Neuroblastomzelllinien ohne Zugabe von ch14.18, n=24 Versuche mit jeweils 3 technischen Replikaten. E/T Ratio 1:1, Inkubationszeit 6h. Weißer Kreis: CD158a single-positive Population; Graues Quadrat: CD158b single-positive Population; Graues Dreieck: CD158e single-positive Population; Schwarzes Dreieck: KIR negative Population

Die Abbildung zeigt die CD107a-Aktivität verschiedener KIR-Populationen von frisch isolierten PBMC bei Inkubation mit den getesteten Zelllinien. Erkennbar sind auch hier Unterschiede in der Aktivität der PBMC gegen verschiedene

Targets. Bei frisch isolierten PBMC scheinen sich die verschiedenen Subpopulationen nicht deutlich zu unterscheiden.

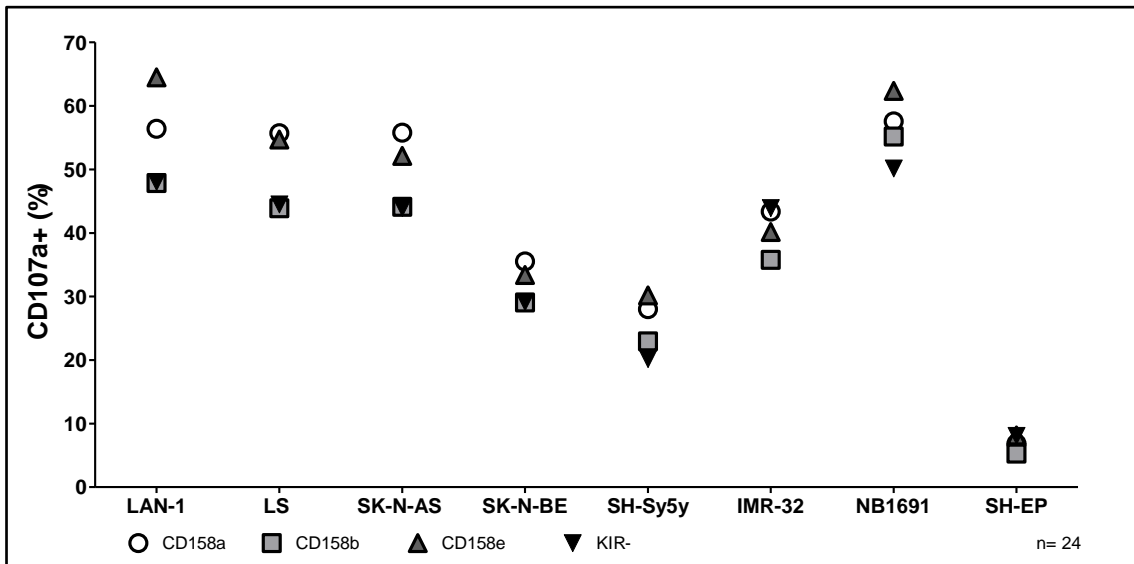


Abbildung 3.6.2 CD107a-Aktivität verschiedener PBMC-Populationen mit ch14.18

Darstellung der CD107a-Aktivität der einzelnen KIR-Subpopulationen frisch isolierter PBMC von Spender 1 gegen 8 Neuroblastomzelllinien mit Zugabe von ch14.18, n=24 Versuche jeweils 3 technischen Replikaten. E/T Ratio 1:1, Inkubationszeit 6h, Endkonzentration ch14.18 1µg/ml. Weißer Kreis: CD158a single-positive Population; Graues Quadrat: CD158b single-positive Population; Graues Dreieck: CD158e single-positive Population; Schwarzes Dreieck: KIR negative Population

Die Abbildung zeigt die CD107a-Aktivität verschiedener KIR-Populationen von frisch isolierten PBMC bei Inkubation mit den getesteten Zelllinien und Zugabe des therapeutischen Antikörpers ch14.18. Die Unterschiede in der Aktivität der PBMC gegen verschiedene Targets nehmen deutlich zu und auch die KIR-Subpopulationen zeigen stärkere Unterschiede untereinander. Jedoch scheint die Verteilung bezüglich der Aktivität zwischen den Targets konserviert zu sein. Die CD158b-Population zeigt am wenigsten Aktivität und die CD158e-Population am meisten.

3.6.1.2 Meta-Analyse der NK-Zellen

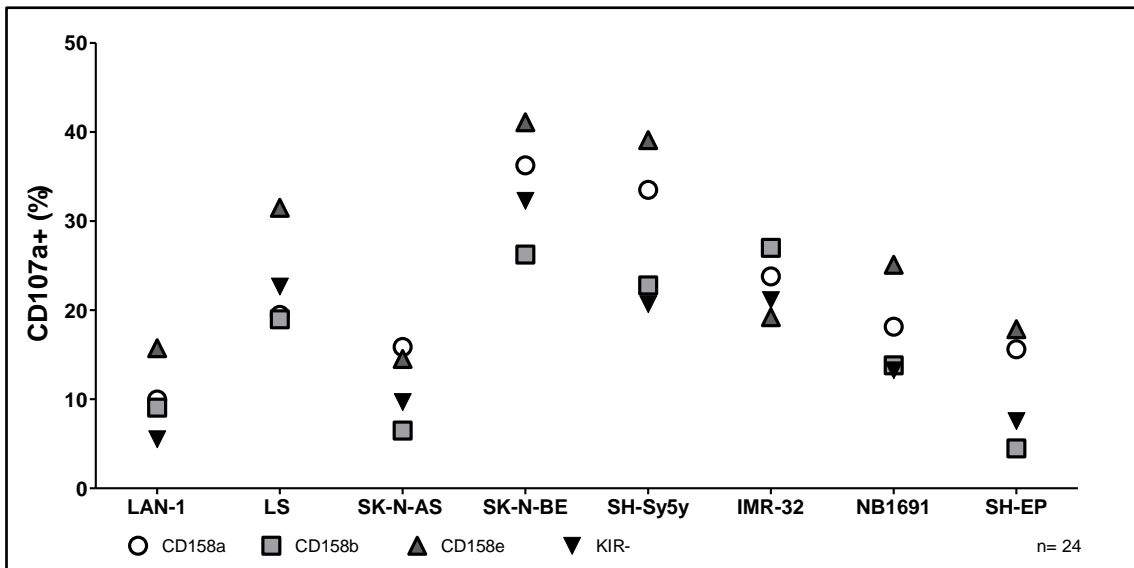


Abbildung 3.6.3 CD107a-Aktivität verschiedener NK-Zellpopulationen ohne ch14.18

Darstellung der CD107a-Aktivität der einzelnen KIR-Subpopulationen expandierter NK-Zellen von Spender 1 gegen 8 Neuroblastomzelllinien ohne Zugabe von ch14.18, n=24 Versuche jeweils 3 technischen Replikaten. E/T Ratio 1:1, Inkubationszeit 6h. Weißer Kreis: CD158a single-positive Population; Graues Quadrat: CD158b single-positive Population; Graues Dreieck: CD158e single-positive Population; Schwarzes Dreieck: KIR negative Population

Die Abbildung zeigt die CD107a-Aktivität verschiedener KIR-Populationen von expandierten NK-Zellen bei Inkubation mit den getesteten Zelllinien. Erkennbar sind deutliche Unterschiede in der Aktivität der NK-Zellen gegen verschiedene Targets. Auffällig ist auch hier die relativ konservierte Verteilung der KIR-Subpopulationen bei den unterschiedlichen Targets, so scheint die CD158b-Population bei allen Targets am schlechtesten aktivierbar zu sein und die CD158e-Population am besten aktivierbar, nur bei IMR-32 als Target ist die Verteilung anders.

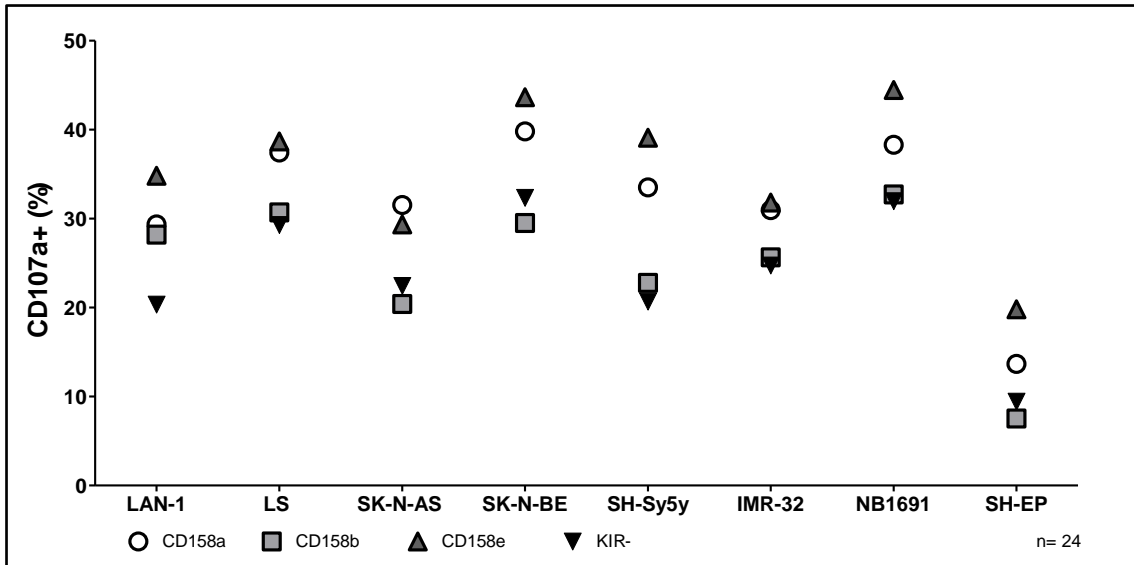


Abbildung 3.6.4 CD107a-Aktivität verschiedener NK-Zellpopulationen mit ch14.18

Darstellung der CD107a-Aktivität der einzelnen KIR-Subpopulationen expandierter NK-Zellen von Spender 1 gegen 8 Neuroblastomzelllinien mit Zugabe von ch14.18, n=24 Versuche mit jeweils 3 technischen Replikaten. E/T Ratio 1:1, Inkubationszeit 6h, Endkonzentration ch14.18 1µg/ml. Weißer Kreis: CD158a single-positive Population; Graues Quadrat: CD158b single-positive Population; Graues Dreieck: CD158e single-positive Population; Schwarzes Dreieck: KIR negative Population

Die Abbildung zeigt die CD107a-Aktivität verschiedener KIR-Populationen von expandierten NK-Zellen bei Inkubation mit den getesteten Zelllinien und Zugabe des therapeutischen Antikörpers ch14.18. Hier erkennt man einerseits die allgemein höhere Aktivität bei allen Targets, außerdem nehmen die Unterschiede zwischen den verschiedenen Targets ab. Andererseits bleibt die Verteilung der KIR-Subpopulationen bei den unterschiedlichen Targets erhalten. Auch hier ist die CD158b-Population bei allen Targets am schlechtesten und die CD158e-Population am besten aktivierbar.

3.6.2 Spender 2

Spender 2 besitzt Allele aller HLA-I Gruppen, es wurden nur 5 der insgesamt 8 Targetzelllinien getestet.

3.6.2.1 Meta-Analyse der PBMC

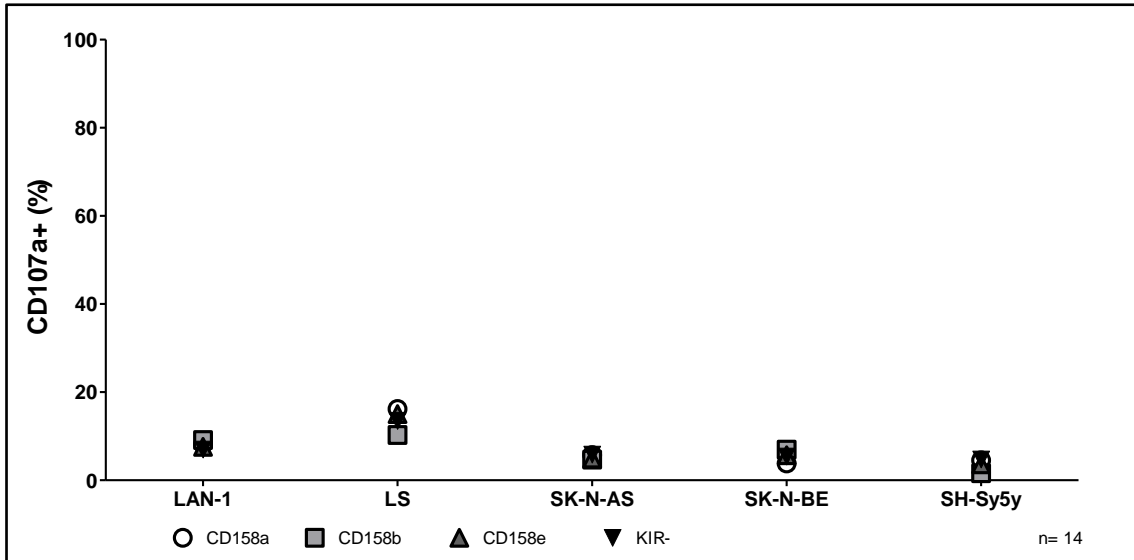


Abbildung 3.6.5 CD107a-Aktivität verschiedener PBMC-Populationen ohne ch14.18

Darstellung der CD107a-Aktivität der einzelnen KIR-Subpopulationen frisch isolierter PBMC von Spender 2 gegen 5 Neuroblastomzelllinien ohne Zugabe von ch14.18, n=14 Versuche mit jeweils 3 technischen Replikaten. E/T Ratio 1:1, Inkubationszeit 6h. Weißer Kreis: CD158a single-positive Population; Graues Quadrat: CD158b single-positive Population; Graues Dreieck: CD158e single-positive Population; Schwarzes Dreieck: KIR negative Population

Die Abbildung zeigt die CD107a-Aktivität verschiedener KIR-Populationen von frisch isolierten PBMC bei Inkubation mit den getesteten Zelllinien. Es sind so gut wie keine Unterschiede zwischen den Targets erkennbar, weder in der Gesamtaktivität als auch zwischen den KIR-Populationen.

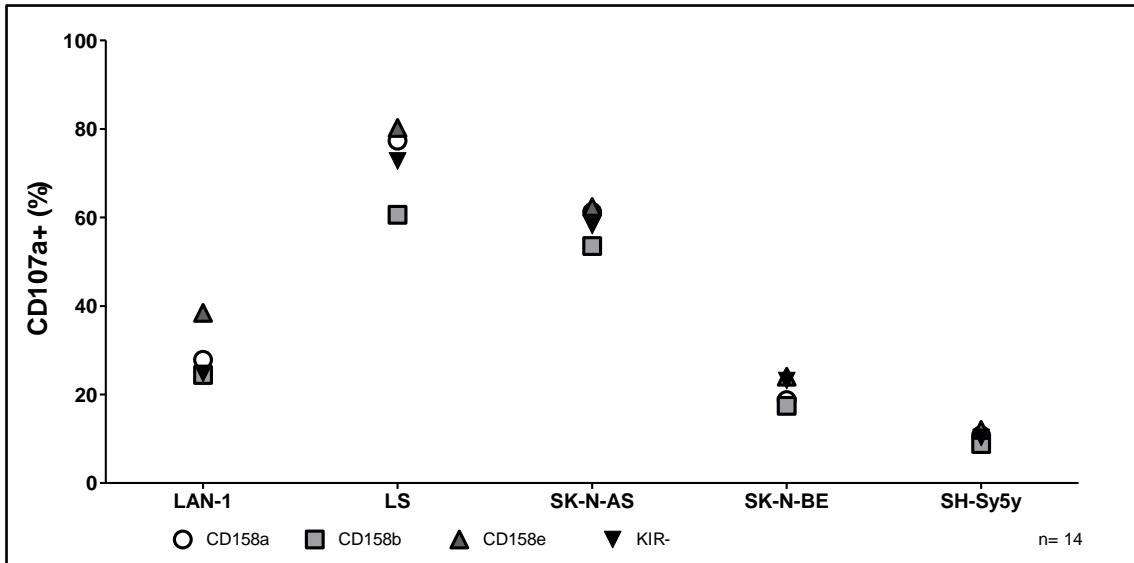


Abbildung 3.6.6 CD107a-Aktivität verschiedener PBMC-Populationen mit ch14.18

Darstellung der CD107a-Aktivität der einzelnen KIR-Subpopulationen frisch isolierter PBMC von Spender 2 gegen 5 Neuroblastomzelllinien mit Zugabe von ch14.18, n=14 Versuche mit jeweils 3 technischen Replikaten. E/T Ratio 1:1, Inkubationszeit 6h, Endkonzentration ch14.18 1µg/ml. Weißer Kreis: CD158a single-positive Population; Graues Quadrat: CD158b single-positive Population; Graues Dreieck: CD158e single-positive Population; Schwarzes Dreieck: KIR- negative Population

Die Abbildung zeigt die CD107a-Aktivität verschiedener KIR-Populationen von frisch isolierten PBMC bei Inkubation mit den getesteten Zelllinien und Zugabe des therapeutischen Antikörpers ch14.18. Hier zeigt sich analog zu Spender 1 eine deutliche Zunahme an CD107a-Aktivität verglichen mit PBMC ohne ch14.8 und auch die Unterschiede zwischen den KIR-Populationen nehmen etwas zu. Die CD158b-Population zeigt bei allen Targets die geringste Aktivität und die CD158e-Population bei allen außer SK-N-BE und SH-Sy5y (keine Unterschiede erkennbar) die stärkste Aktivität.

3.6.2.2 Meta-Analyse der NK-Zellen

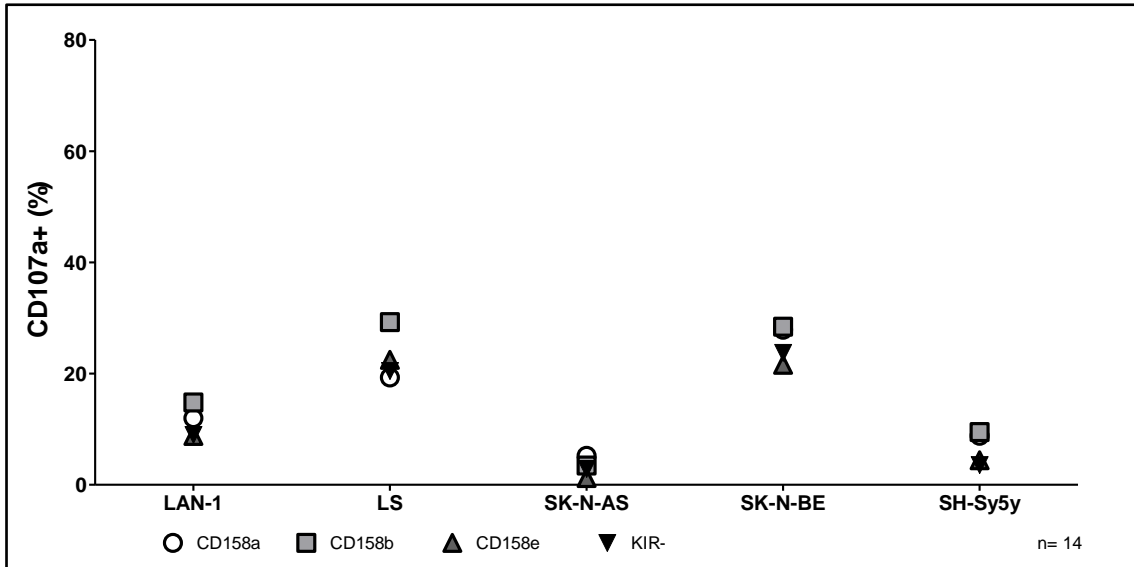


Abbildung 3.6.7 CD107a-Aktivität verschiedener NK-Zellpopulationen ohne ch14.18

Darstellung der CD107a-Aktivität der einzelnen KIR-Subpopulationen expandierter NK-Zellen von Spender 2 gegen 5 Neuroblastomzelllinien ohne Zugabe von ch14.18, n=14 Versuche mit jeweils 3 technischen Replikaten. E/T Ratio 1:1, Inkubationszeit 6h. Weißer Kreis: CD158a single-positive Population; Graues Quadrat: CD158b single-positive Population; Graues Dreieck: CD158e single-positive Population; Schwarzes Dreieck: KIR negative Population

Die Abbildung zeigt die CD107a-Aktivität verschiedener KIR-Subpopulationen von expandierten NK-Zellen bei Inkubation mit den getesteten Zelllinien. Auch bei Spender 2 gibt es Unterschiede in der Aktivität der NK-Zellen gegen verschiedene Targets. Dabei unterscheidet sich die Verteilung der KIR-Subpopulationen innerhalb der Targets nicht so stark wie bei Spender 1, jedoch scheint hier die CD158b-Population die stärkste Aktivierung zu zeigen. Die anderen KIR-Subpopulationen lassen sich schwer voneinander abgrenzen.

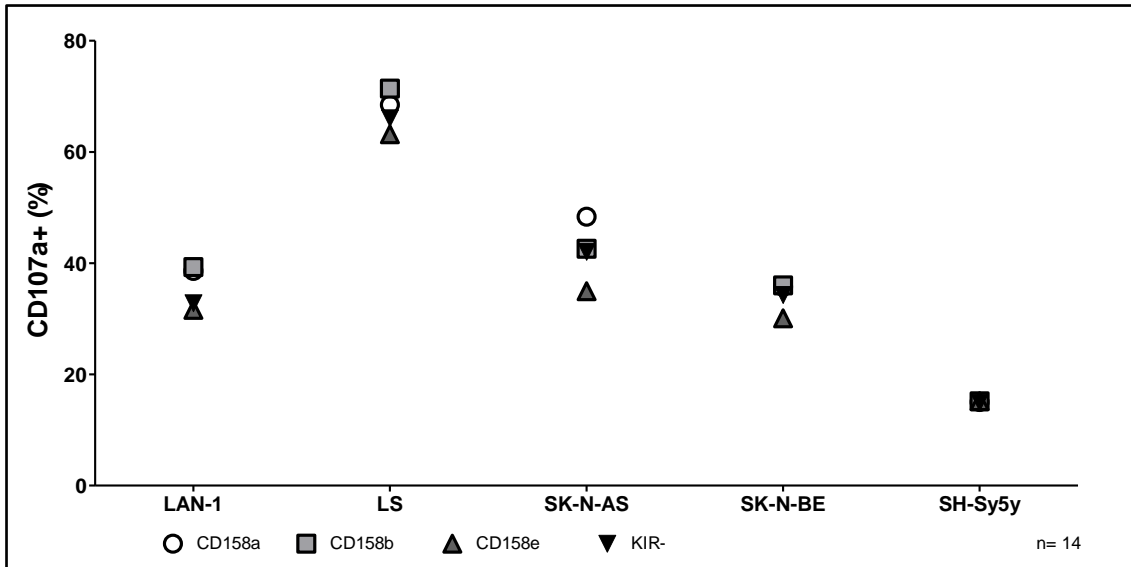


Abbildung 3.6.8 CD107a-Aktivität verschiedener NK-Zellpopulationen mit ch14.18

Darstellung der CD107a-Aktivität der einzelnen KIR-Subpopulationen expandierter NK-Zellen von Spender 2 gegen 5 Neuroblastomzelllinien mit Zugabe von ch14.18, n=14 Versuche mit jeweils 3 technischen Replikaten. E/T Ratio 1:1, Inkubationszeit 6h, Endkonzentration ch14.18 1µg/ml. Weißer Kreis: CD158a single-positive Population; Graues Quadrat: CD158b single-positive Population; Graues Dreieck: CD158e single-positive Population; Schwarzes Dreieck: KIR negative Population

Die Abbildung zeigt die CD107a-Aktivität verschiedener KIR-Populationen von expandierten NK-Zellen bei Inkubation mit den getesteten Zelllinien und Zugabe des therapeutischen Antikörpers ch14.18. Es ergibt sich wiederum eine höhere Aktivität bei allen Targets. Die Unterschiede der KIR-Subpopulationen innerhalb der Targets verändern sich nicht, die CD158e-Population zeigt weiterhin bei den meisten Zelllinien außer SK-N-AS und SH-Sy5y (bei dieser ist kein Unterschied erkennbar) die höchste Aktivität.

3.7 Einfluss von HLA-I

HLA-I hat einen großen Einfluss auf die Aktivierung von NK-Zellen (s. Kapitel 1.2) und somit auch auf die NK-Zellvermittelte Zytotoxizität. Um diesen Mechanismus näher zu untersuchen war es zunächst notwendig die Höhe der HLA-I Expression der verschiedenen Tumorzelllinien zu bestimmen, dies geschah semiquantitativ mittels FACS-Analyse (s. Abbildung 3.2.2).

3.7.1 HLA-I Stimulation mit IFN γ

Zunächst untersuchten wir, ob die Höhe der HLA-I Expression einen Einfluss auf die Aktivierung der NK-Zellen haben könnte. Dazu stimulierten wir Targetzellen nach der in Kapitel 2.13 beschriebenen Methode mit IFN γ .

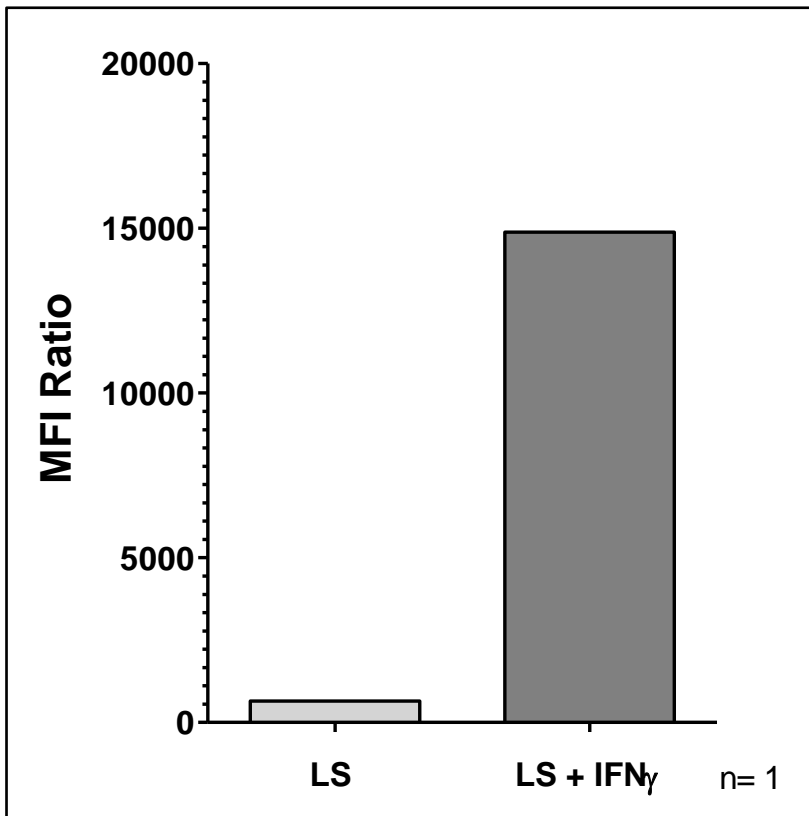


Abbildung 3.7.1 HLA-I Expression vor und nach IFN γ -Stimulation von LS

Semiquantitative Darstellung der HLA-I Expression von LS vor und nach Stimulation mit IFN γ mittels MFI-Ratio (einheitenlos). Durchflusszytometrische Messung der MFI-Ratio durch Färbung mit FITC-markiertem HLA-I Antikörper, n=1 Experiment mit 3 technischen Replikaten, Inkubationszeit 72h mit IFN γ 1000 IE/ml Zellmedium vor Testung.

Die Abbildung zeigt exemplarisch die Höhe der HLA-I Expression von LS vor (linker Balken) und nach (rechter Balken) Stimulation mit IFN γ . Die Messung erfolge semiquantitativ mittels FACS-Analyse und einem FITC-markierten HLA-I Antikörper. Durch die Stimulation steigt die MFI-Ratio von 648 auf 14888 ungefähr um den Faktor 23 an, dies lässt auf eine deutliche Hochregulierung der HLA-I Expression auf den Tumorzellen schließen.

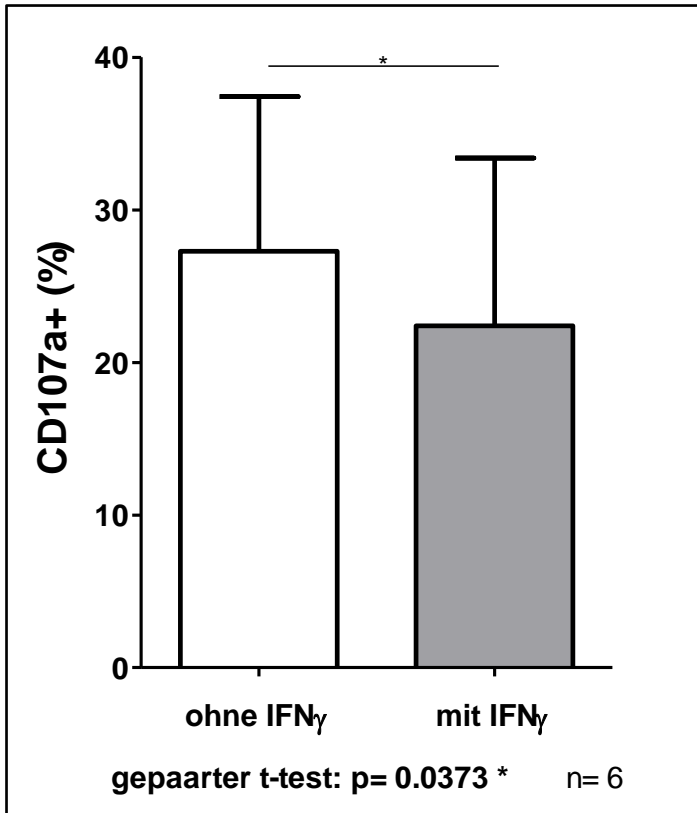


Abbildung 3.7.2 Einfluss von IFN γ -Stimulation auf NK-Aktivität

CD107a-Aktivität expandierter NK-Zellen von Spender 1 gegen 6 Zelllinien vor (weiß) und nach (grau) Stimulation mit IFN γ , n=6 Versuche mit jeweils 3 technischen Replikaten, E/T Ratio 1:1, Inkubationszeit 6h. Inkubation der Targetzellen mit IFN γ 1000 IE/ml Zellmedium für 72h vor Applikation.

Die Abbildung zeigt die CD107a-Aktivität expandierter NK-Zellen ohne und mit IFN γ -Stimulation, dabei wurden die Ergebnisse von allen getesteten Zelllinien zusammengefasst. Durch die IFN γ -Stimulation wird die Aktivität verringert von durchschnittlich 27,3% auf 22,4%. Im gepaarten t-test ergibt sich ein p-Wert von 0,0373, damit unterscheiden sich die beiden Gruppen signifikant.

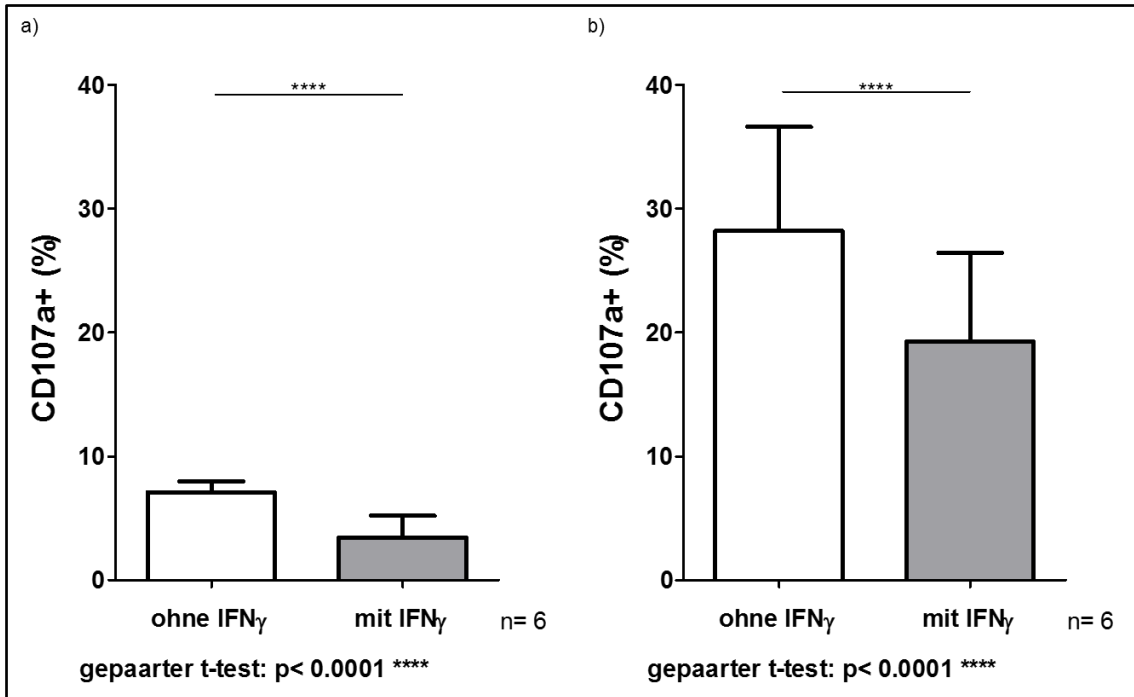


Abbildung 3.7.3 Vergleich der PBMC-Aktivität ohne und mit IFN γ -Stimulation

CD107a-Aktivität frisch isolierter PBMC ohne (a) Zugabe von ch14.18 und mit (b) Zugabe von ch14.18. Getestet wurden 4 verschiedene Neuroblastomzelllinien gegen fünf Spender, n=6 Versuche mit jeweils 3 technischen Replikaten, E/T Ratio 1:1, Inkubationszeit 6h, Endkonzentration ch14.18 1 μ g/ml.

Die Abbildung zeigt den Einfluss von IFN γ -Stimulation auf die CD107a-Aktivität frisch isolierter PBMC ohne und mit Zugabe von ch14.18, dabei wurden die Ergebnisse von zwei Zelllinien zusammengefasst. Durch die IFN γ -Stimulation wird die Aktivität signifikant verringert sowohl ohne als auch mit ch14.18. Ohne Antikörper verringert sich die Aktivität von durchschnittlich 7,08% auf 3,45% (gepaarter t-test p=0,0002) und mit ch14.18 von durchschnittlich 28,2% auf 19,3% (gepaarter t-test p<0,0001).

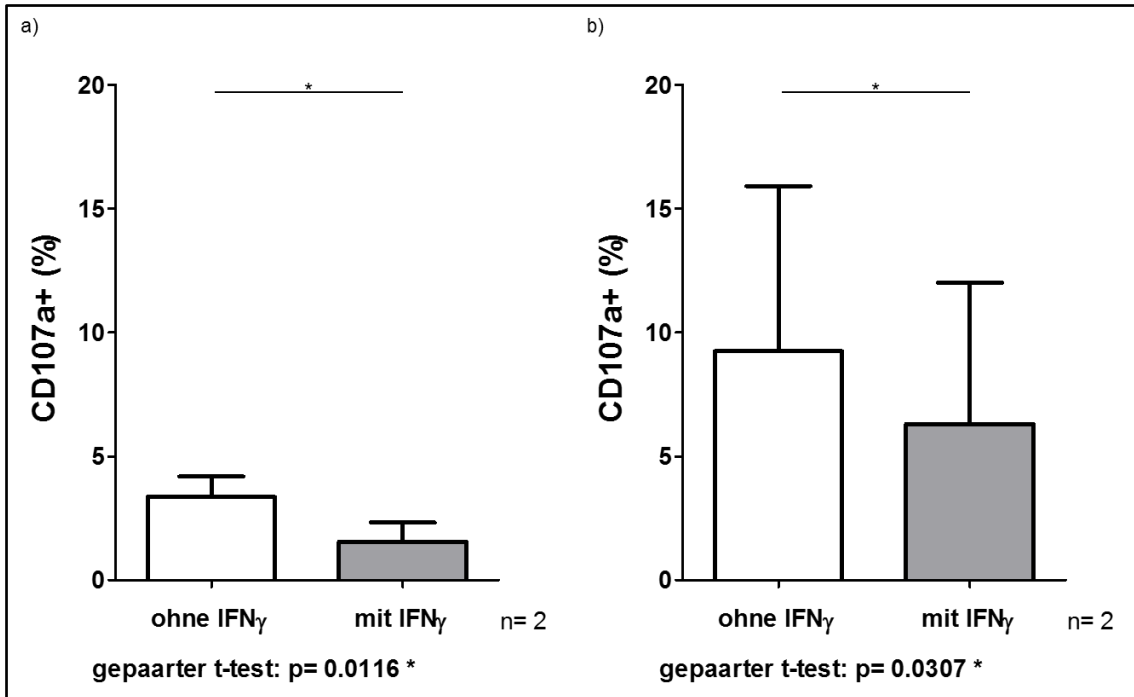


Abbildung 3.7.4 Vergleich der NK-Aktivität ohne und mit IFN γ -Stimulation

CD107a-Aktivität expandierter NK-Zellen ohne (a) Zugabe von ch14.18 und mit (b) Zugabe von ch14.18. Getestet wurden 2 verschiedene Neuroblastomzelllinien gegen einen Spender, n=2 Versuche mit jeweils 3 technischen Replikaten, E/T Ratio 1:1, Inkubationszeit 6h, Endkonzentration ch14.18 1 μ g/ml.

Die Abbildung zeigt den Einfluss von IFN γ -Stimulation auf die CD107a-Aktivität expandierter NK-Zellen ohne und mit Zugabe von ch14.18, dabei wurden die Ergebnisse von zwei Zelllinien zusammengefasst. Durch die IFN γ -Stimulation wird die Aktivität signifikant verringert sowohl ohne als auch mit ch14.18. Ohne Antikörper verringert sich die Aktivität von durchschnittlich 3,35% auf 1,55% (gepaarter t-test p=0,0116) und mit ch14.18 von durchschnittlich 9,24% auf 6,29% (gepaarter t-test p= 0,0307).

3.7.2 HLA-I Mismatch

Die Ausstattung der Tumorzellen mit den Genen für die verschiedenen HLA-I Moleküle ist in Tabelle 3.1 dargestellt. Für uns ist vor allem die tatsächliche Expression von Bw4 als einflussreichstem Vertreter der HLA-I Moleküle von Interesse.

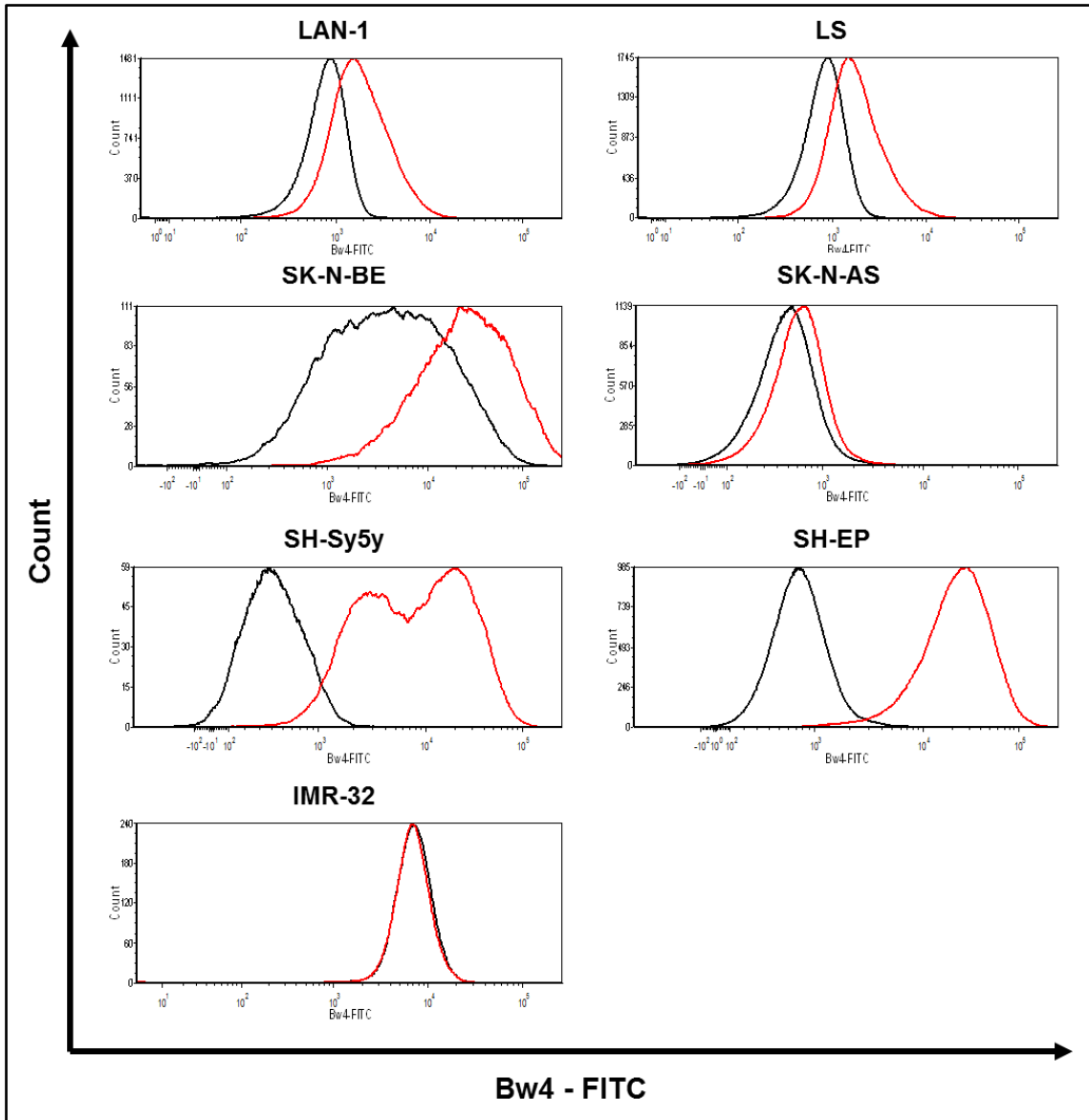


Abbildung 3.7.5 Semiquantitative Messung der Bw4-Expression

Exemplarische Darstellung der Expression von HLA-Bw4 auf der Oberfläche von 7 Neuroblastomzelllinien vor und nach IFN γ -Stimulation. Durchflusszytometrische Messung der MFI-Ratio durch Färbung mit FITC-markiertem HLA-Bw4 Antikörper, n=1 Experiment mit 3 technischen Replikaten, Inkubationszeit 72h mit IFN γ 1000 IE/ml Zellmedium vor Testung. Schwarz: vor IFN γ -Stimulation; Rot: nach IFN γ -Stimulation

In der Grafik sind exemplarisch die Histogramme der Bw4-Expression von sieben Neuroblastomzelllinien abgebildet. Nach Inkubation mit IFN γ erhöhen die Tumorzellen in unterschiedlichem Ausmaß die HLA-Bw4 Expression. SH-EP und SH-Sy5y erhöhen die Expression sehr deutlich, bei SK-N-AS und IMR-32 gibt es fast keine Zunahme der Expression, diese sind laut Genotypisierung

HLA-Bw4 negativ. Interessanterweise gibt es bei LAN-1 und LS trotz genotypisch vorhandenem HLA-Bw4 Allel nur eine sehr geringe phänotypische Expression, SK-N-BE, SH-Sy5y, und SH-EP zeigen eine deutliche Bw4-Expression.

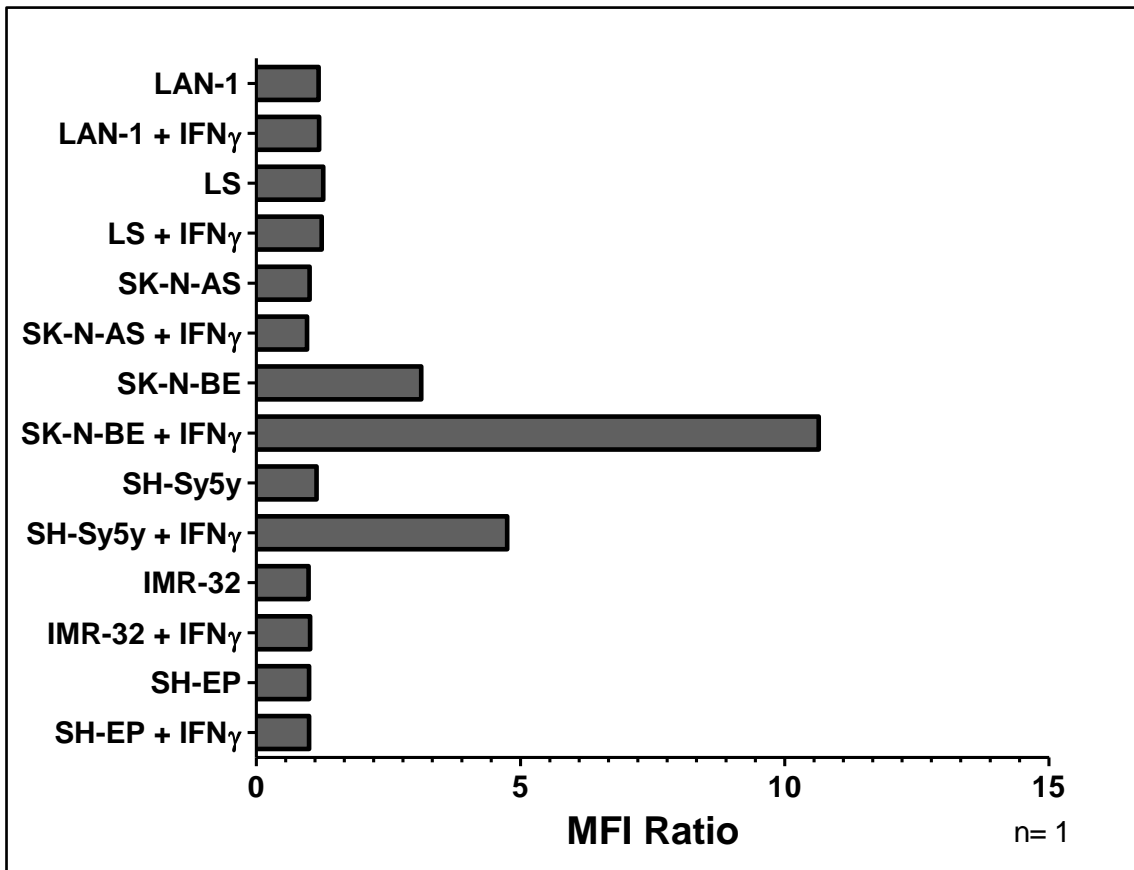


Abbildung 3.7.6 Bw4-Expression ohne und mit IFN γ -Stimulation

Semiquantitative Messung der Expression von HLA-Bw4 auf der Oberfläche von 7 Neuroblastomzelllinien vor und nach IFN γ -Stimulation mittels durchflusszytometrischer Bestimmung der MFI-Ratio (einheitenlos) durch Färbung mit FITC-markiertem HLA-Bw4 Antikörper, n=1 Experiment mit 3 technischen Replikaten, Inkubationszeit 72h mit IFN γ 1000 IE/ml Zellmedium vor Testung.

In der Abbildung sieht man die mittels FACS-Analyse ermittelte semiquantitative Expression von HLA-Bw4 auf den Zelllinien LAN-1, LS, SK-N-AS, SK-N-BE, SH-Sy5y, IMR-32 und SH-EP vor und nach Stimulation mit IFN γ . Vor Stimulation exprimieren die Zelllinien ähnliche Level von HLA-Bw4. Nach Stimulation erhöht sich die Bw4-Expression bei SH-Sy5y und SK-N-BE um den

Faktor 3-4, bei den restlichen Zelllinien verändert sich die HLA-Bw4 Expression wenig bis gar nicht.

Von großem Interesse sind auch die Unterschiede zwischen Tumorzelllinien mit und ohne HLA-I Mismatch sowie die Auswirkungen der IFN γ -Stimulation bei diesen Zelllinien. Diese Unterschiede werden im Folgenden untersucht. Dabei sind zwei Zelllinien mit Cw4-Mismatch (SH-Sy5y/SK-N-AS) und zwei Zelllinien mit Cw4-Match (SK-N-BE/NB1691) gegenübergestellt. Den HLA-Cw4 Mismatch/Match haben wir jeweils mit HLA-Cw3 verglichen, für das die Zelllinien alle positiv typisiert sind.

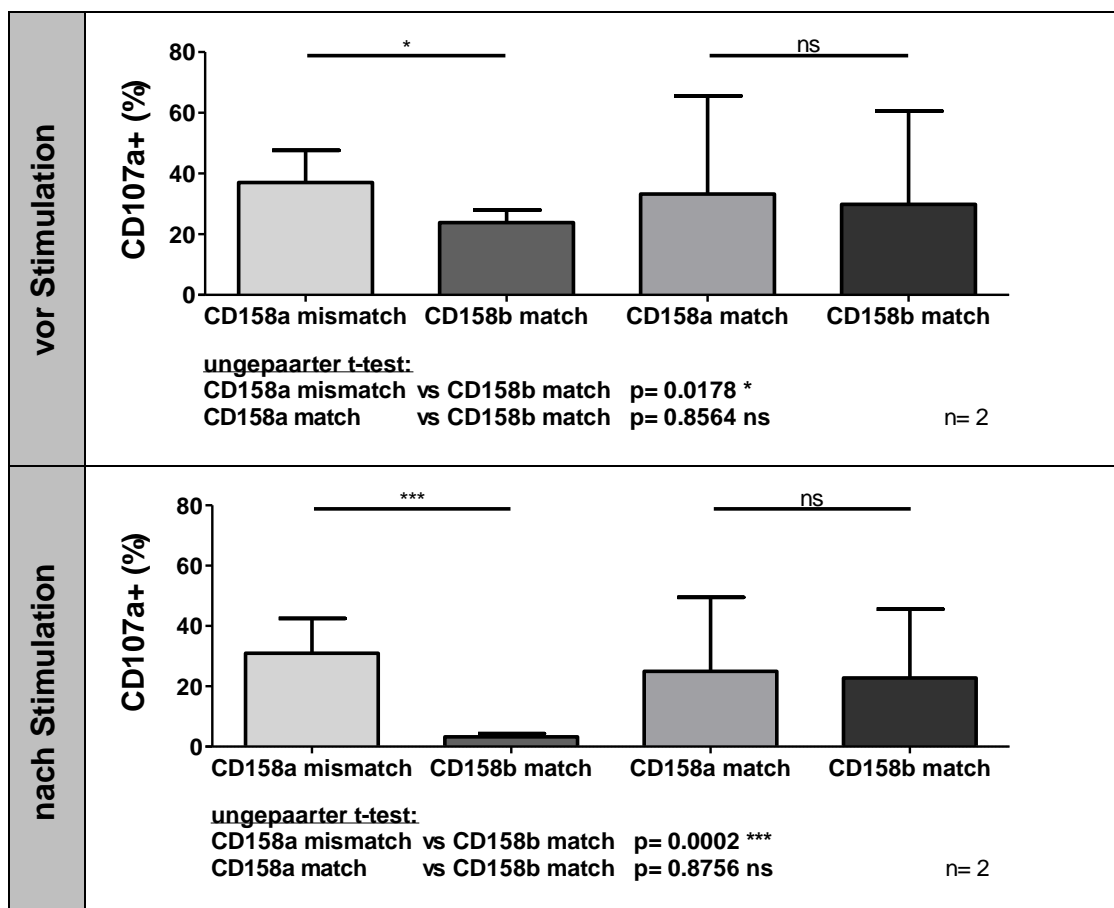


Abbildung 3.7.7 CD107a-Aktivität expandierter NK-Zellen vor und nach IFN γ -Stimulation bei HLA-I Match/Mismatch

Vergleich der CD107a-Aktivität mit (links) und ohne (rechts) HLA-I Mismatch vor (oben) und nach (unten) IFN γ -Stimulation, n=2 Versuche jeweils mit 3 technischen Replikaten, Inkubationszeit 72h mit IFN γ 1000 IE/ml Zellmedium vor Testung. Bestimmung von HLA-I Match/Mismatch anhand der HLA-Genotypisierung.

Vor Stimulation mit IFN γ unterscheidet sich bei den Zelllinien mit HLA-C2 Mismatch die NK-Zell Aktivität signifikant bei einem p-Wert von 0,0178 im ungepaarten t-Test, bei den Tumorzellen ohne Mismatch gibt es keinen signifikanten Unterschied (p=0,8564).

Nach Stimulation mit IFN γ sinkt bei allen Konditionen die NK-Zell Aktivität ab, mit KIR R/L Mismatch unterscheiden sich die CD158a- und die CD158b- Population signifikant (p=0,0002), ohne Mismatch gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Subpopulationen (p=0,8756).

3.7.3 HLA-I Blockade

Die Blockade von HLA-I mit einem HLA-I Antikörper (Klon: w6/32) steht im Gegensatz zur HLA-I Stimulation mit IFN γ . Wir ermittelten die CD107a-Aktivität expandierter NK-Zellen mit und ohne HLA-I Blockade und mit Zugabe von ch14.18.

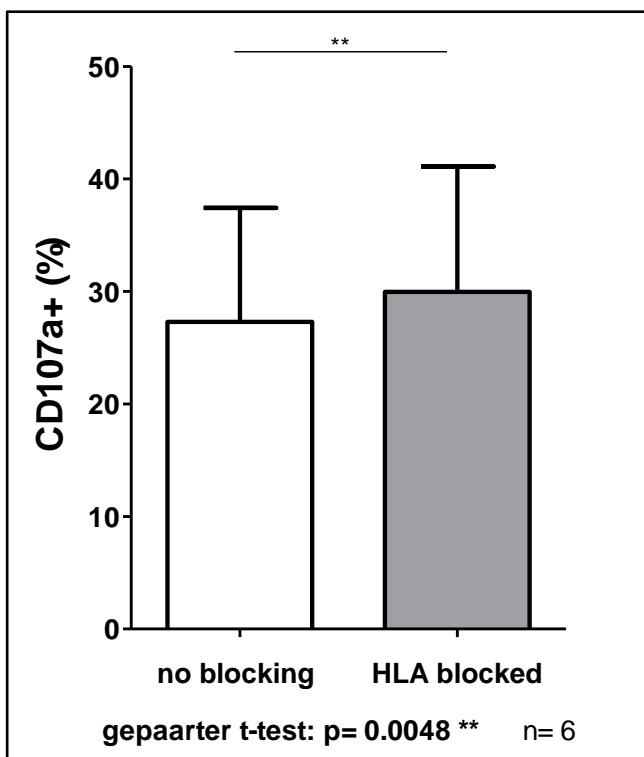


Abbildung 3.7.8 CD107a-Aktivität expandierter NK-Zellen ohne und mit HLA I Blockade

Vergleich der CD107a-Aktivität expandierter NK-Zellen ohne (weiß) und mit (grau) HLA-I Blockade durch Zugabe eines Anti-HLA-I Antikörpers (nach Anweisung des Herstellers), n=6 Versuche mit jeweils 3 technischen Replikaten, E/T Ratio 1:1, Inkubationszeit 6h.

In der Abbildung ist die CD107a-Aktivität expandierter NK-Zellen ohne und mit HLA-I Blockade dargestellt. Die Aktivität erhöht sich signifikant von durchschnittlich 27,3% ohne Blockade auf 30,0% mit Blockade.

3.7.4 Kombination von HLA-I Stimulation und HLA-I Blockade

Wir untersuchten auch die Kombination von HLA-I Stimulation und HLA-I Blockade jeweils ohne und mit Zugabe von ch14.18, dabei ergaben sich folgende Sachverhalte.

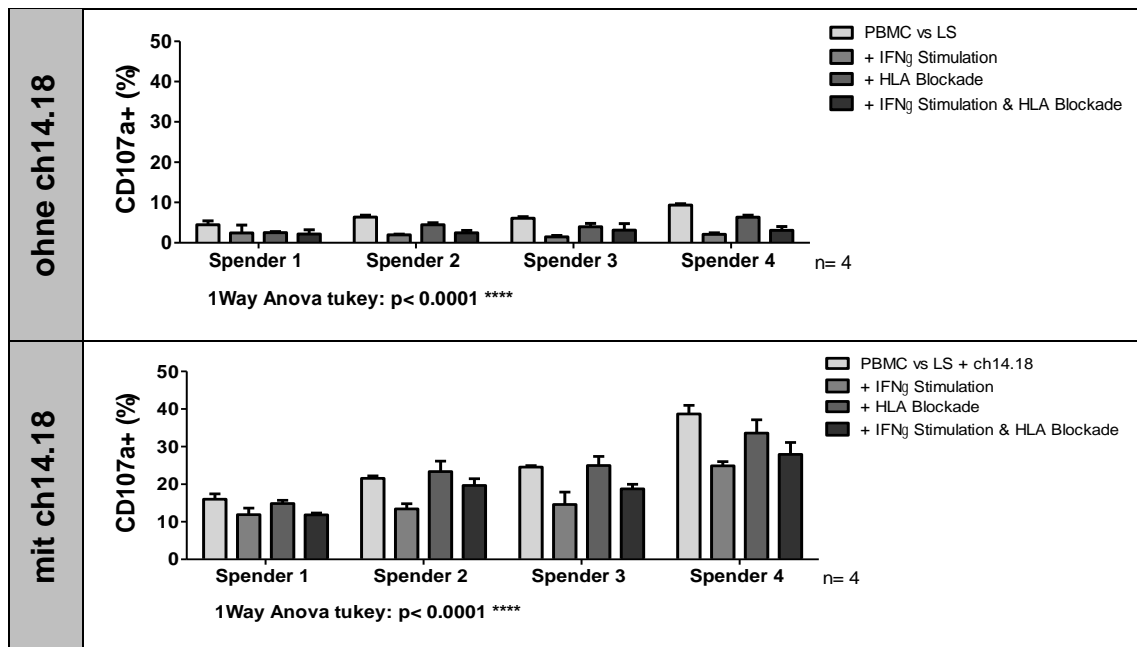


Abbildung 3.7.9 PBMC Aktivität von 4 Spendern ohne und mit Stimulation bzw. Blockade von HLA I und der Zugabe von ch14.18

Einfluss der Stimulation bzw. Blockade von HLA-I und deren Kombination auf die CD107a-Aktivität frisch isolierter PBMC von 4 Spendern ohne (oben) und mit (unten) Zugabe von ch14.18, n=4 Versuche mit jeweils 3 technischen Replikaten, E/T Ratio 1:1, Inkubationszeit 6h, Endkonzentration ch14.18 1 μ g/ml. Inkubation der Targetzellen mit IFN γ 1000 IE/ml Zellmedium für 72h vor Applikation. HLA-I Blockade durch Zugabe eines Anti-HLA-I Antikörpers (nach Anweisung des Herstellers).

Dargestellt ist die CD107a-Aktivität frisch isolierter PBMC von 4 Spendern jeweils ohne und mit IFN γ -Stimulation bzw. HLA-I Blockade sowie die Kombination von beidem. Es sind deutliche Unterschiede zwischen den Spendern zu erkennen, die Stimulation bzw. Blockade von HLA-I hat aber

immer denselben Einfluss. So wird durch HLA-I Stimulation die Aktivität herabgesetzt, durch HLA-I Blockade steigt die Aktivität und in der Kombination liegt das Aktivitätsniveau zwischen den vorherigen Konditionen. Bei Zugabe von ch14.18 ergibt sich eine starke Erhöhung der Gesamtaktivität bei allen Versuchsansätzen, die Auswirkung der die HLA-I Stimulation bzw. Blockade bleibt gleich.

3.8 Einfluss von aktivierenden Liganden

Um den Einfluss von aktivierenden Liganden auf die Aktivität der NK-Zellen zu untersuchen blockierten wir im CD107a-Assay die NKG2D- und DNAM-1 Rezeptoren auf den PBMC. Wir untersuchten die Aktivität von frisch isolierten PBMC von zwei gesunden Spendern mit unterschiedlicher HLA-I Typisierung.

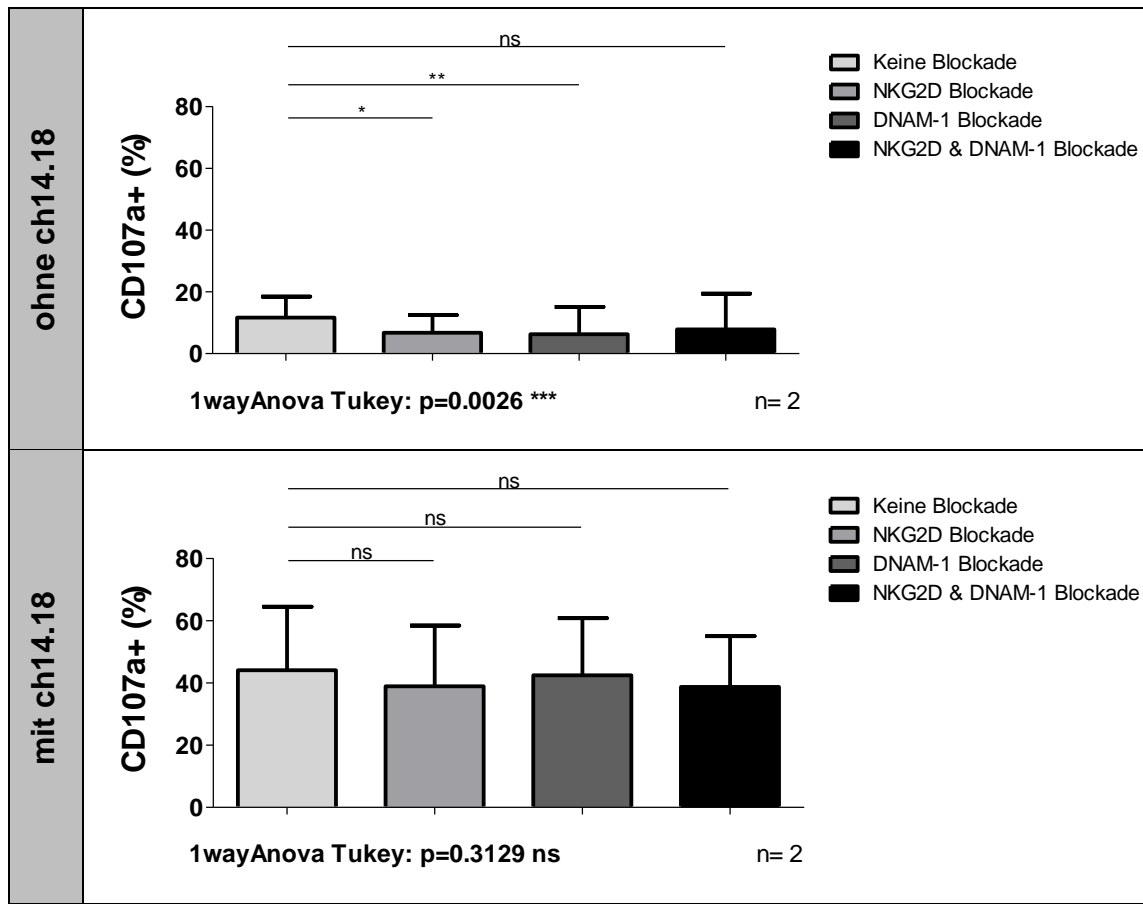


Abbildung 3.8.1 Einfluss von NKG2D/DNAM-1 Blocking auf die PBMC-Aktivität

Einfluss der Blockade von NKG2D/DNAM-1 und der Kombination auf die CD107a-Aktivität frisch isolierter PBMC von zwei Spendern gegen LAN-1 und LS ohne (oben) und mit (unten) Zugabe von ch14.18, n=2 Versuche mit jeweils 3 technischen Replikaten, E/T Ratio 1:1, Inkubationszeit 6h, Endkonzentration ch14.18 1µg/ml. Blockade von NKG2D/DNAM-1 durch Zugabe eines Anti-NKG2D/DNAM-1 Antikörpers (nach Anweisung des Herstellers).

Dargestellt ist die CD107a-Aktivität frisch isolierter PBMC ohne Blockade, mit NKG2D bzw. DNAM-1 Blockade sowie die Kombination von beidem, dabei sind die Ergebnisse beider getesteten Spender und Zelllinien zusammengefasst. Blockiert man entweder NKG2D oder DNAM-1, so verringert sich die Aktivität signifikant von 11,7% auf 6,79% (NKG2D Blockade) bzw. 6,26% (DNAM-1 Blockade). Blockiert man beide Rezeptoren gibt es keinen signifikanten Unterschied zu den Zellen ohne Rezeptorblockade. Mit Zugabe des Antikörpers ch14.18 steigt die Gesamtaktivität stark an, jedoch gibt es keine signifikanten Aktivitätsunterschiede zwischen den verschiedenen Konditionen.

3.8.1 Spender 1

Wir testeten die frisch isolierten PBMC von Spender 1 jeweils gegen LAN-1 und LS mit den bereits genannten Konditionen.

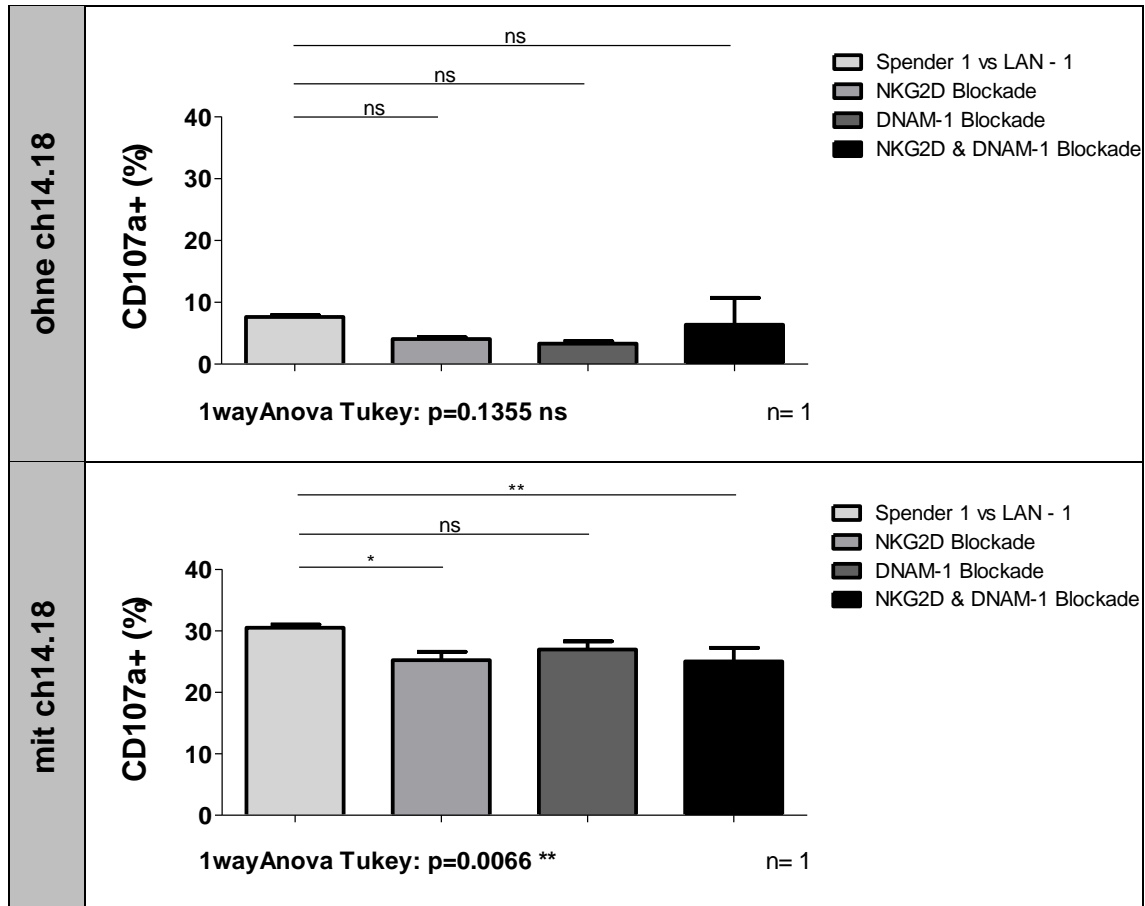


Abbildung 3.8.2 Einfluss von NKG2D/DNAM-1 Blocking auf die PBMC-Aktivität von Spender 1 gegen LAN-1

Einfluss der Blockade von NKG2D/DNAM-1 und der Kombination auf die CD107a-Aktivität frisch isolierter PBMC von Spender 1 gegen LAN-1 ohne (oben) und mit (unten) Zugabe von ch14.18, n=1 Versuch mit jeweils 3 technischen Replikaten, E/T Ratio 1:1, Inkubationszeit 6h, Endkonzentration ch14.18 1µg/ml. Blockade von NKG2D/DNAM-1 durch Zugabe eines Anti-NKG2D/DNAM-1 Antikörpers (nach Anweisung des Herstellers).

Hier ist die CD107a-Aktivität frisch isolierter PBMC von Spender 1 gegen LAN-1 ohne und mit Blockade von NKG2D bzw. DNAM-1 und deren Kombination dargestellt. Ohne ch14.18 gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den blockierten und nicht-blockierten Zellen. Mit Zugabe des Antikörpers steigt die Gesamtaktivität stark an, außerdem gibt es eine signifikante Verringerung der Aktivität durch NKG2D-Blockade von 30,5% auf 25,2% und auch durch die Blockade von NKG2D plus DNAM-1 sinkt die Aktivität signifikant auf 25,0%. Die

einzelne Blockade des DNAM-1 Rezeptors zieht keine signifikante Änderung der Aktivität nach sich.

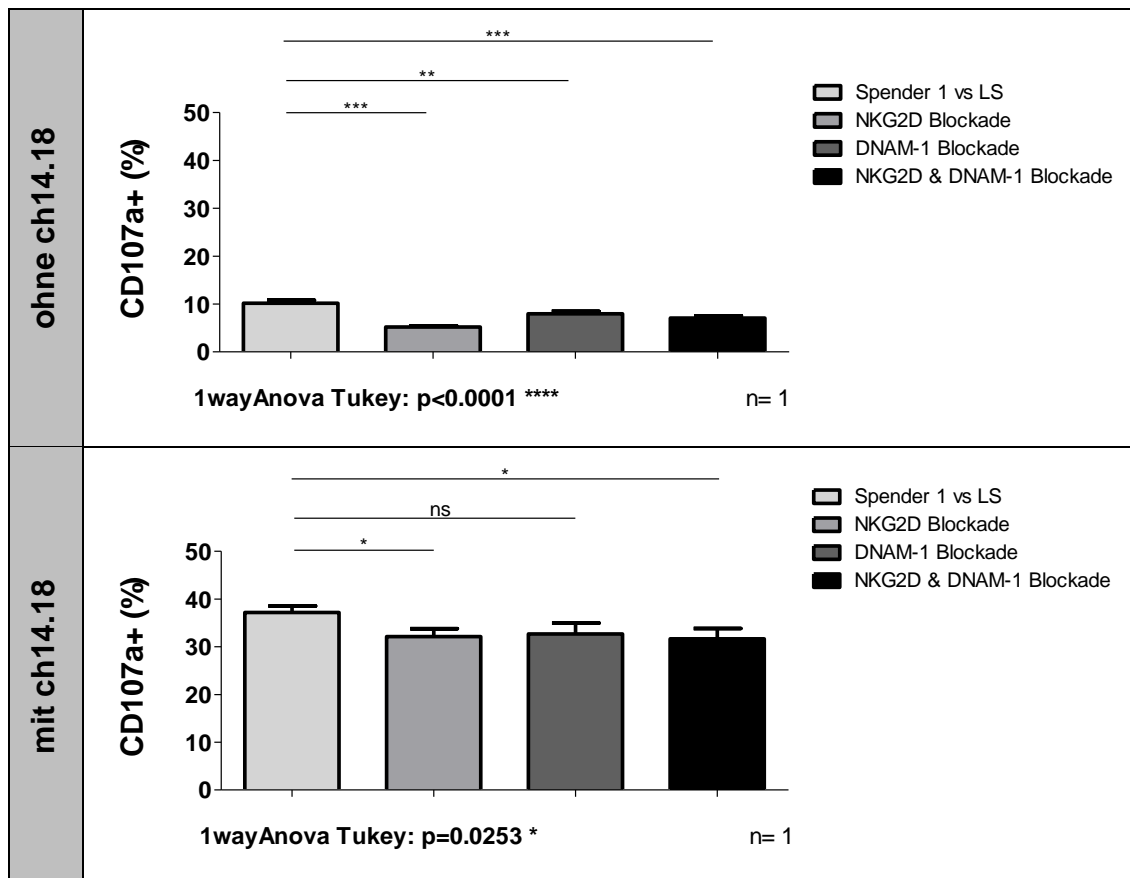


Abbildung 3.8.3 Einfluss von NKG2D/DNAM-1 Blocking auf die PBMC-Aktivität von Spender 1 gegen LS

Einfluss der Blockade von NKG2D/DNAM-1 und der Kombination auf die CD107a-Aktivität frisch isolierter PBMC von Spender 1 gegen LS ohne (oben) und mit (unten) Zugabe von ch14.18, n=1 Versuch mit jeweils 3 technischen Replikaten, E/T Ratio 1:1, Inkubationszeit 6h, Endkonzentration ch14.18 1µg/ml. Blockade von NKG2D/DNAM-1 durch Zugabe eines Anti-NKG2D/DNAM-1 Antikörpers (nach Anweisung des Herstellers).

Die Aktivität der frisch isolierten PBMC gegen LS stellt sich wie in der Abbildung gezeigt dar. Die Blockade von NKG2D, DNAM-1 und von beiden Rezeptoren zieht immer eine signifikante Verringerung der Aktivität nach sich. Dabei sinkt die Aktivität von 10,2% durch NKG2D Blockade auf 5,22%, durch DNAM-1 Blockade auf 7,97% und durch Blockade von beiden Rezeptoren auf 7,06%. Mit Zugabe des Antikörpers steigt die Gesamtaktivität stark an, durch Blockade von NKG2D sinkt die Aktivität signifikant von 37,2% auf 32,1% und durch die Blockade von NKG2D plus DNAM-1 sinkt die Aktivität signifikant auf 31,7%. Die

Blockade des DNAM-1 Rezeptors zieht keine signifikante Änderung der Aktivität nach sich.

Spender 2

Auch bei Spender 2 testeten wir die frisch isolierten PBMC jeweils gegen LAN-1 und LS mit den bereits genannten Konditionen.

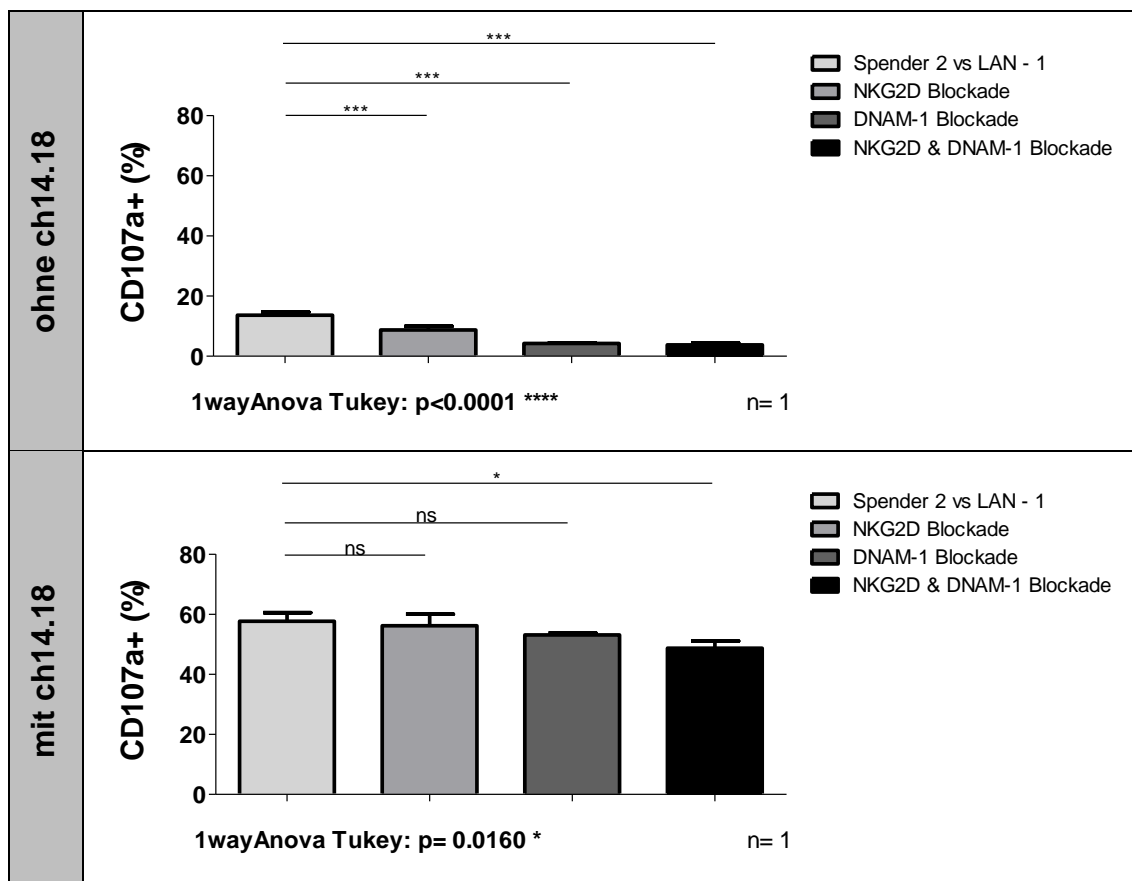


Abbildung 3.8.4 Einfluss von NKG2D/DNAM-1 Blocking auf die PBMC-Aktivität von Spender 2 gegen LAN-1

Einfluss der Blockade von NKG2D/DNAM-1 und der Kombination auf die CD107a-Aktivität frisch isolierter PBMC von Spender 2 gegen LAN-1 ohne (oben) und mit (unten) Zugabe von ch14.18, n=1 Versuch mit jeweils 3 technischen Replikaten, E/T Ratio 1:1, Inkubationszeit 6h, Endkonzentration ch14.18 1µg/ml. Blockade von NKG2D/DNAM-1 durch Zugabe eines Anti-NKG2D/DNAM-1 Antikörpers (nach Anweisung des Herstellers).

Ohne Zugabe des therapeutischen Antikörpers ch14.18 haben die Blockade von NKG2D, DNAM-1 und von beiden Rezeptoren immer eine signifikante Verringerung der Aktivität zur Folge. Dabei sinkt die Aktivität von 13,6% durch NKG2D Blockade auf 8,74%, durch DNAM-1 Blockade auf 4,22% und durch

Blockade von beiden Rezeptoren auf 3,80%. Mit Zugabe von ch14.18 steigt die Aktivität insgesamt stark an, der Einfluss von NKG2D bzw. DNAM-1 Blockade nimmt ab, es gibt keinen signifikanten Unterschied durch Blockade der einzelnen Rezeptoren. Durch die gleichzeitige Blockade von NKG2D und DNAM-1 sinkt die Aktivität jedoch signifikant von 57,7% auf 48,7%.

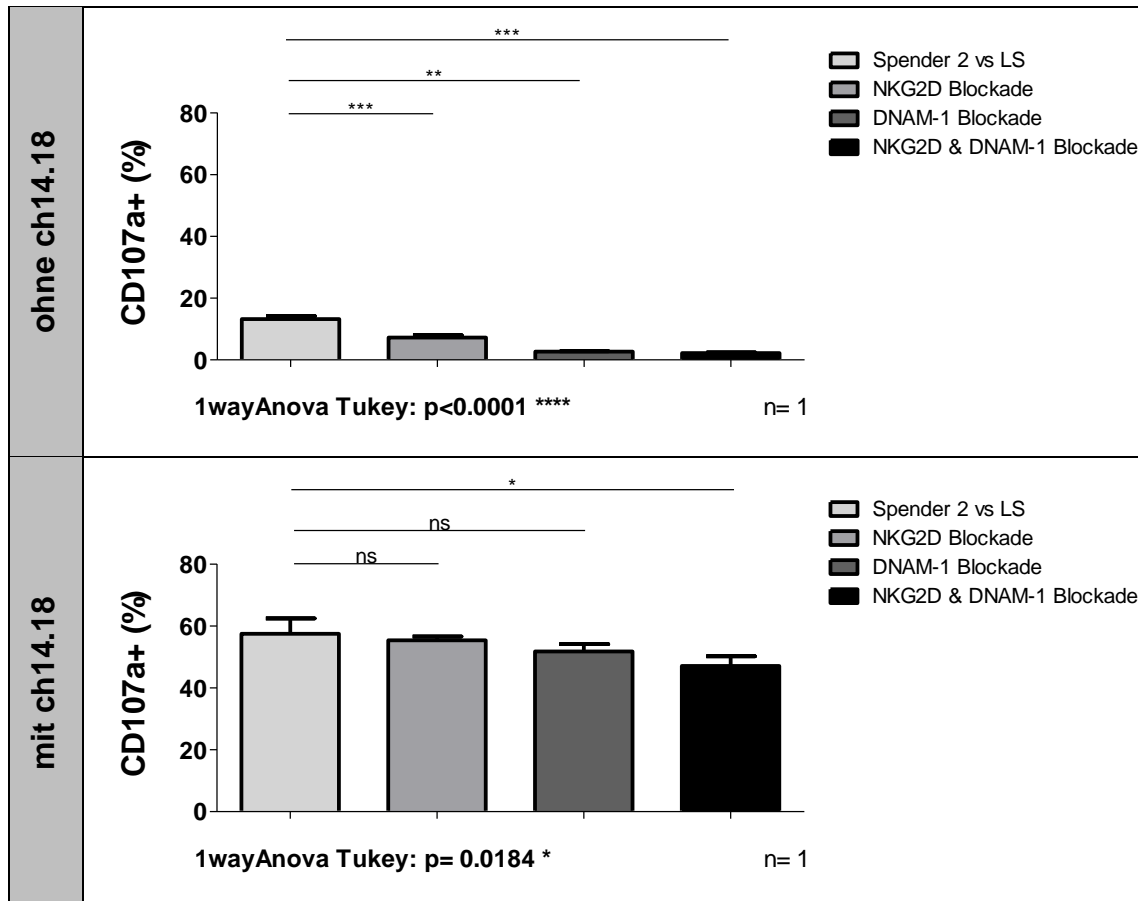


Abbildung 3.8.5 Einfluss von NKG2D/DNAM-1 Blocking auf die PBMC-Aktivität von Spender 2 gegen LS

Einfluss der Blockade von NKG2D/DNAM-1 und der Kombination auf die CD107a-Aktivität frisch isolierter PBMC von Spender 2 gegen LS ohne (oben) und mit (unten) Zugabe von ch14.18, n=1 Versuch mit jeweils 3 technischen Replikaten, E/T Ratio 1:1, Inkubationszeit 6h, Endkonzentration ch14.18 1µg/ml. Blockade von NKG2D/DNAM-1 durch Zugabe eines Anti-NKG2D/DNAM-1 Antikörpers (nach Anweisung des Herstellers).

Die Aktivität der PBMC gegen LS als Target sieht genauso aus wie bei LAN-1. Ohne ch14.18 haben alle Konditionen eine signifikante Verringerung der Aktivität zur Folge. Die Aktivität sinkt durch NKG2D Blockade von 13,2% auf 7,26%, durch DNAM-1 Blockade auf 2,70% und durch die Kombination von

NKG2D und DNAM-1 Blockade auf 2,19%. Mit Zugabe des therapeutischen Antikörpers ch14.18 steigt die Aktivität insgesamt stark an, gleichzeitig nimmt der Einfluss von NKG2D bzw. DNAM-1 Blockade ab, durch deren Blockade gibt es keinen signifikanten Aktivitätsunterschied mehr. Nur noch durch die gleichzeitige Blockade von NKG2D und DNAM-1 sinkt die Aktivität signifikant von 57,5% auf 47,1%.

3.9 Einfluss von spenderspezifischen Unterschieden

Um die spenderabhängige Lyse der Neuroblastomzelllinien zu validieren testeten wir kryokonservierte PBMCs und expandierte NK-Zellen von 24 gesunden Spendern gegen die Zelllinien LAN-1, LS, SK-N-AS und SH-Sy5y im Luciferase-Assay, von diesen 24 Spendern besaßen 5 den KIR Haplotyp A und 19 KIR Haplotyp B. Die Messung fand insgesamt über 48h statt, nachfolgend sind exemplarisch die Zeitpunkte nach 24h und 48h dargestellt.

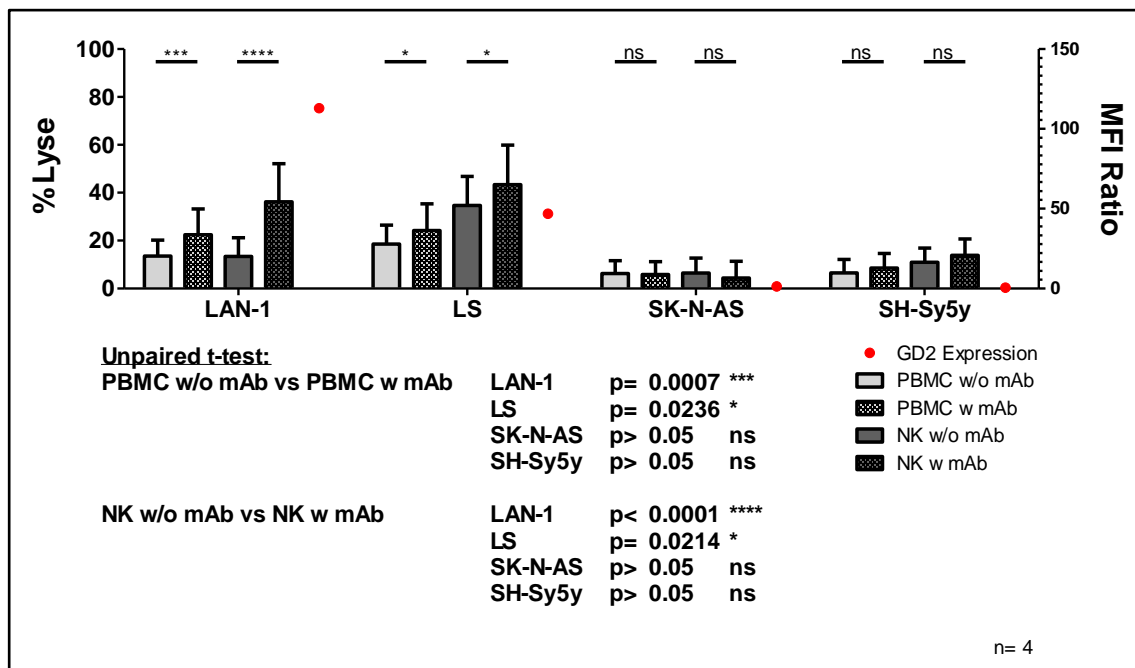


Abbildung 3.9.1 Lyse der Neuroblastomzelllinien durch PBMCs/expandierte NK-Zellen nach 24h

Vergleich zwischen PBMCs/NK-Zellen jeweils ohne und mit Zugabe von ch14.18, zusätzlich abgebildet ist die jeweilige GD2-Expression (Rot) der Zelllinie. Messung mittels Luciferase-Assay, Messzeitpunkt nach 24h Co-Inkubation, n=4 Versuche mit 24 Spender und 4 Zelllinien mit jeweils 3 technischen Replikaten, E/T Ratio 1:1, Endkonzentration ch14.18 1µg/ml.

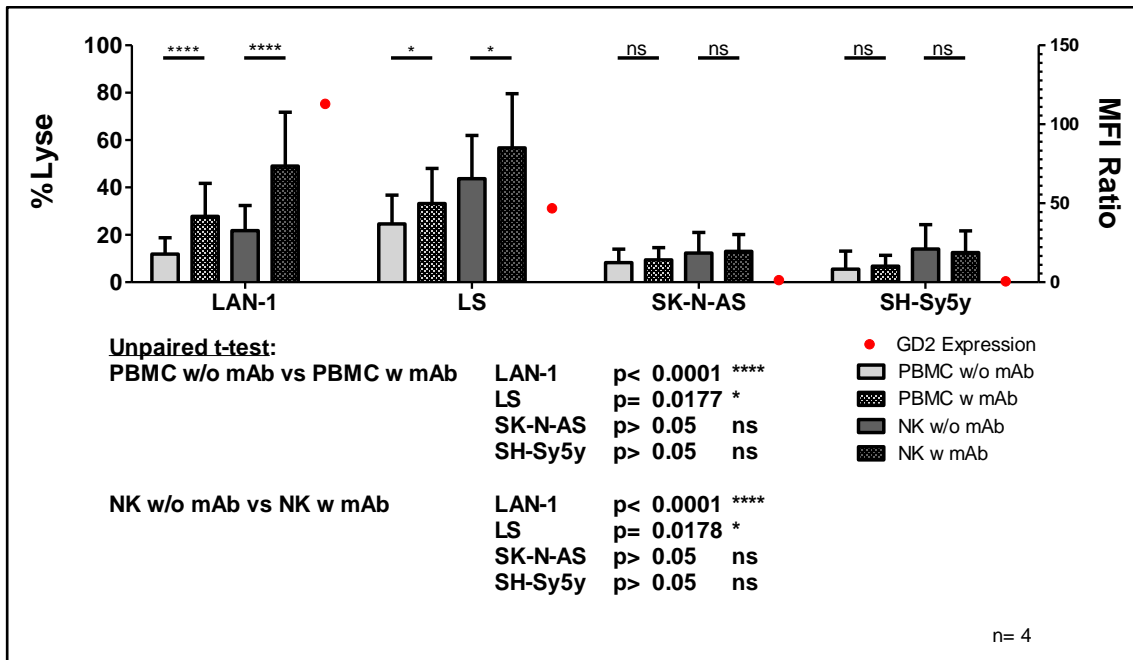


Abbildung 3.9.2 Lyse der Neuroblastomzelllinien durch PBMCs/expandierte NK-Zellen nach 48h

Vergleich zwischen PBMCs/NK-Zellen jeweils ohne und mit Zugabe von ch14.18, zusätzlich abgebildet ist die jeweilige GD2-Expression (Rot) der Zelllinie. Messung mittels Luciferase-Assay, Messzeitpunkt nach 48h Co-Inkubation, n=4 Versuche mit 24 Spender und 4 Zelllinien mit jeweils 3 technischen Replikaten, E/T Ratio 1:1, Endkonzentration ch14.18 1µg/ml.

Die Lyse nimmt mit der Dauer der Messung zu, nach 48h ist die Lyse erkennbar höher als nach 24h. Gleichzeitig sind die NK-Zellen besser in der Lage die Tumorzellen zu lysieren als die PBMCs und nach Zugabe von ch14.18 wird die Lyse bei LAN-1 und LS signifikant erhöht, jedoch bei SK-N-AS und SH-Sy5y nicht. Dies ist anhand der ebenfalls dargestellten GD2-Expression leicht zu erklären.

Bei der Auswertung der Rohdaten fiel ein Muster in der Verteilung der Spender nach ihrer Lysefähigkeit auf. Um diese zu objektivieren erstellten wir eine Rangfolge der Spender anhand ihrer absoluten Lysewerte und vergaben dann einen Score für jeden Spender: der beste Spender bekam 24 Punkte, der zweitbeste Spender 23 Punkte usw. bis zum Spender mit dem niedrigsten Lysewert, welcher einen Punkt bekam. Diesen Score erstellten wir separat für jede Zelllinie und durch Addition aller Zelllinien entstand das folgende Bild.

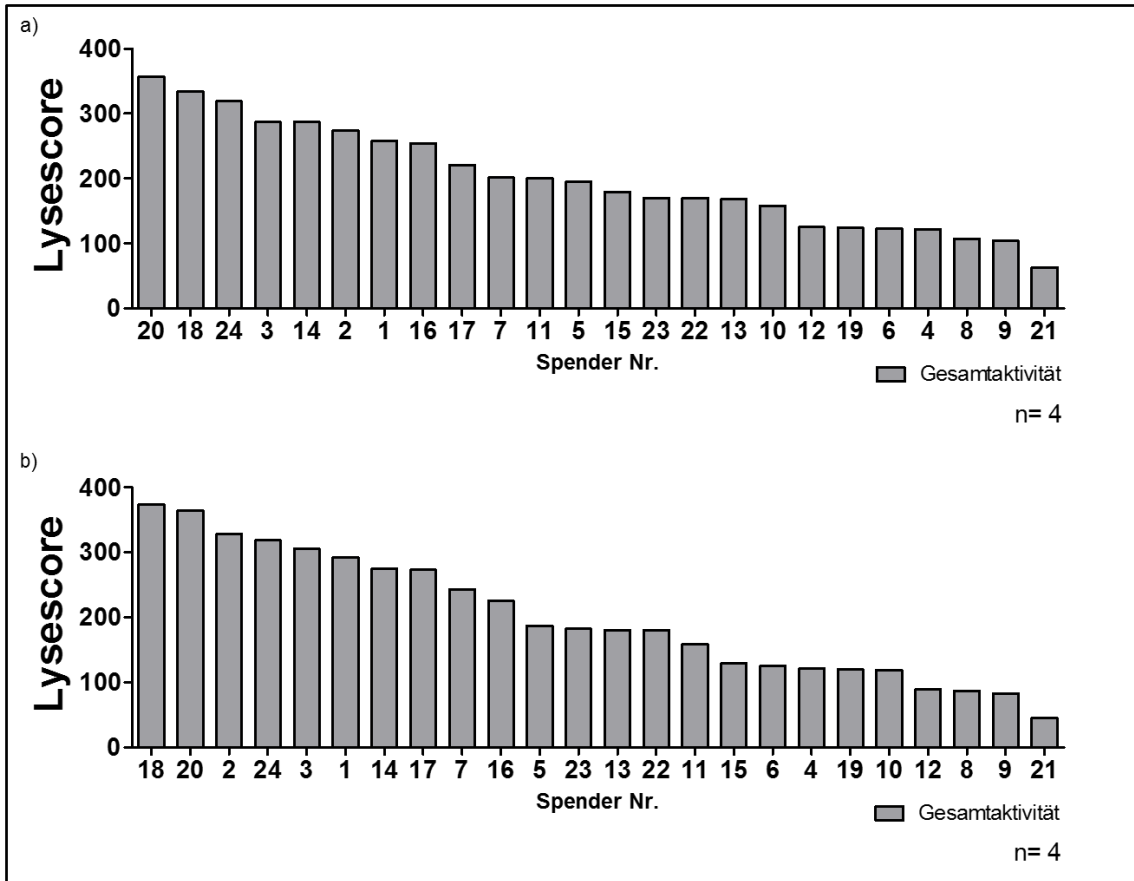


Abbildung 3.9.3 Meta-Analyse der spenderspezifischen Lyseunterschiede von PBMCs und expandierten NK-Zellen

Kumulativer Lysescore über alle Zelllinien hinweg, d.h. der Spender mit den höchsten Lysewerten der einzelnen Zelllinien hatte am Ende den höchsten Wert und der Spender mit den niedrigsten Lysewerten hatte den schlechtesten Wert. Abb. a) zeigt den Lysescore der PBMC und Abb. b) den Lysescore der NK-Zellen.

Es ergibt sich sowohl für PBMCs als auch für expandierte NK-Zellen ein ähnliches Bild, so sind die Spender 18, 20 und 24 immer am oberen Ende des Spektrums zu finden und Spender 8, 9 und 21 immer am unteren Ende. Analysiert man die Zelllinien separat erkennt man auch auf Ebene der Zelllinien dieses festgelegte Muster.

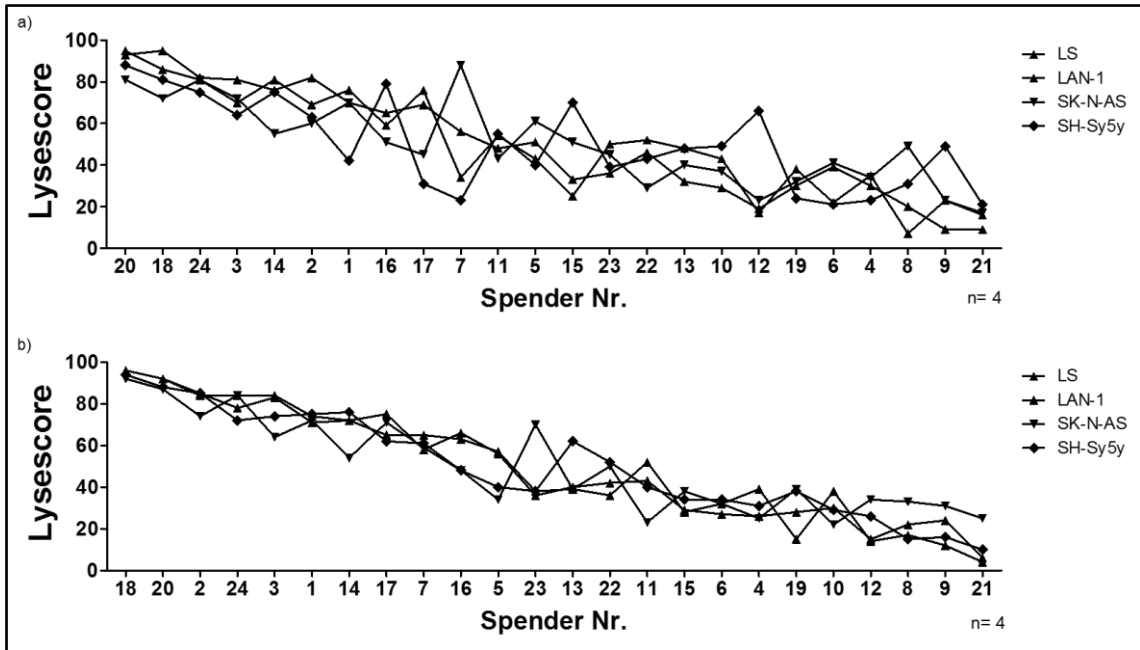
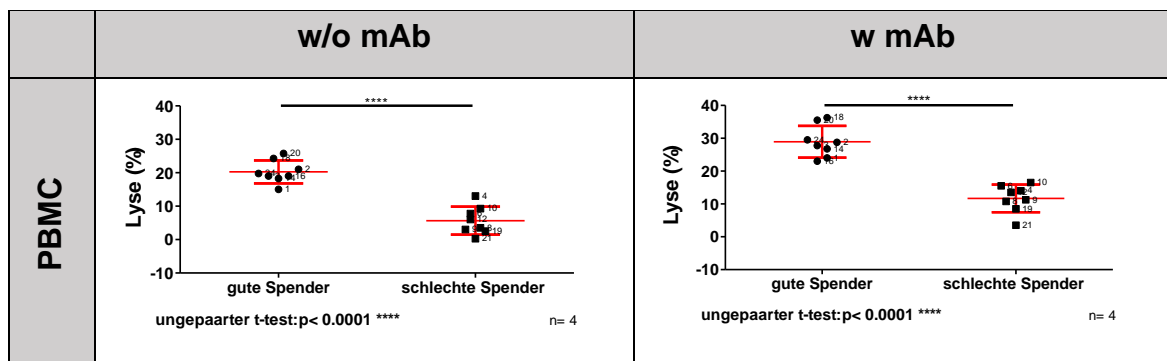


Abbildung 3.9.4 Analyse spenderspezifischer Lyseunterschiede der einzelnen Zelllinien durch PBMCs und expandierte NK-Zellen

Abb. a) zeigt den Lysescore der PBMC und Abb. b) den Lysescore der NK-Zellen. Die niedrigeren Lysescores der einzelnen Zelllinien erklären sich aus der fehlenden Addition der Werte. Die Abfolge der Spender ist exakt dieselbe wie bei der Gesamtanalyse.

Die einzelnen Zelllinien unterscheiden sich leicht voneinander was die Rangfolge der Spender angeht, insbesondere im mittleren Bereich kann man sehr schwer ein Muster ausmachen.

Insgesamt aber kann man sehr deutlich Spender unterscheiden die eher „gut“ sind und solche die eher „schlecht“ sind. Diese beiden Gruppen unterscheiden sich signifikant in ihrer Fähigkeit zur Targetzelllyse wie die folgende Grafik zeigt.



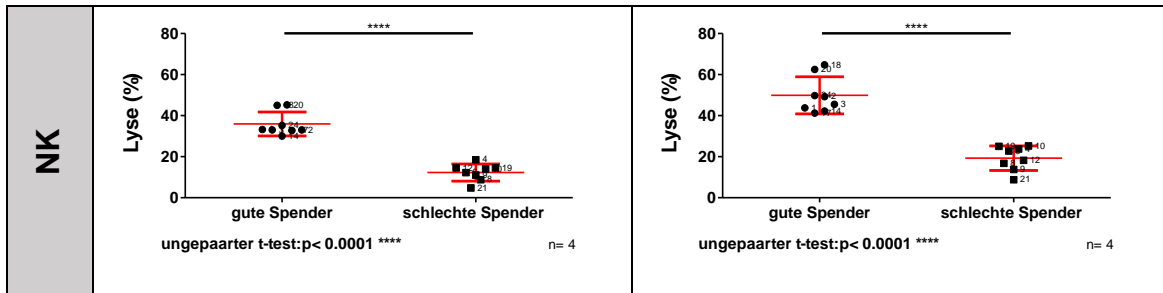


Abbildung 3.9.5 Vergleich der PBMC-/NK-Aktivität von guten und schlechten Spendern

Es wurden jeweils die besten und die schlechtesten 8 Spender in einer Gruppe zusammengefasst und miteinander verglichen, n=4 Versuche mit jeweils 3 technischen Replikaten, E/T Ratio 1:1, Messung nach 48h, Endkonzentration ch14.18 1µg/ml.

Der KIR Haplotyp hat auf die Lyse der getesteten Zelllinien keinen Einfluss, weder ohne noch mit Zugabe des therapeutischen Antikörpers ch14.18 ist ein signifikanter Unterschied zwischen KIR Haplotyp A und Haplotyp B auszumachen. Dies gilt sowohl für PBMCs als auch für expandierte NK-Zellen, der einzige Unterschied zwischen den beiden Effektoren ist die höhere Lyse durch die expandierten NK-Zellen.

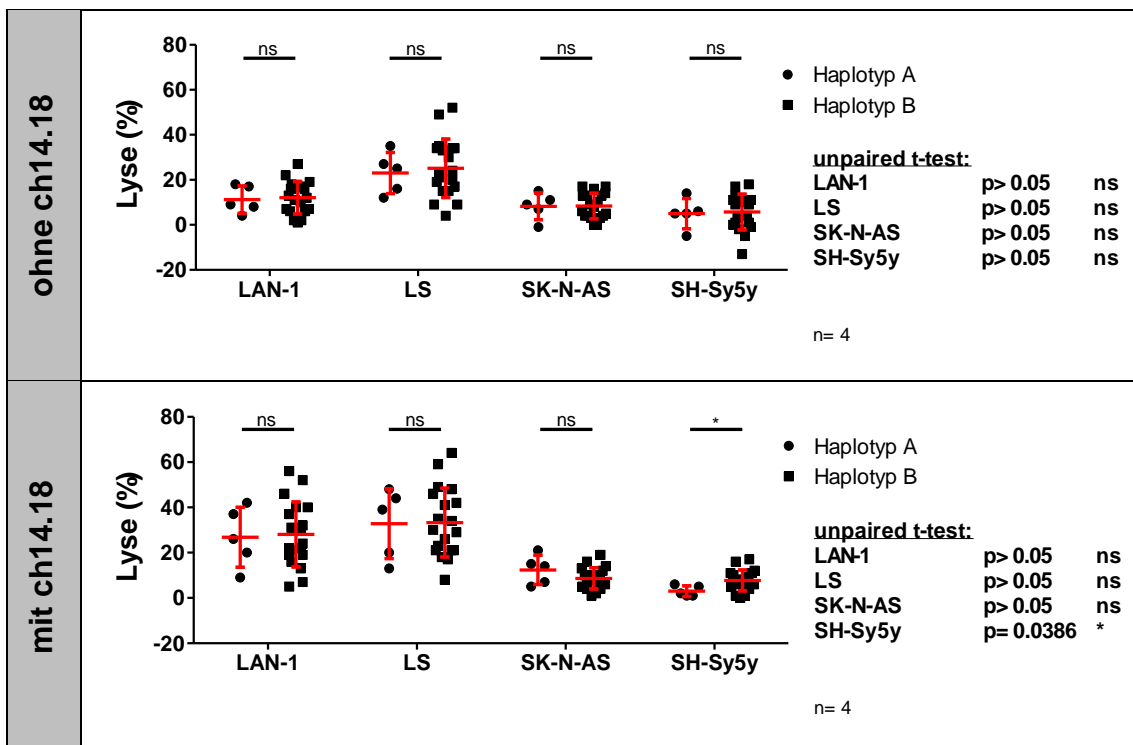


Abbildung 3.9.6 Einfluss des KIR Haplotyp auf die Lyse der getesteten Tumorzellen durch PBMC

Vergleich der Lysefähigkeit von kryokonservierten PBMC mit KIR-Haplotyp A (Kreis)/ -Haplotyp B (Quadrat) ohne (oben) und mit (unten) Zugabe von ch14.18. Getestet wurden 5 Spender mit Haplotyp A und 19 Spender mit Haplotyp B, n=4 Versuche mit jeweils 3 technischen Replikaten,

E/T Ratio 1:1, Messung nach 48h, Endkonzentration ch14.18 1 µg/ml. Rot: Mittelwert mit Standardabweichung.

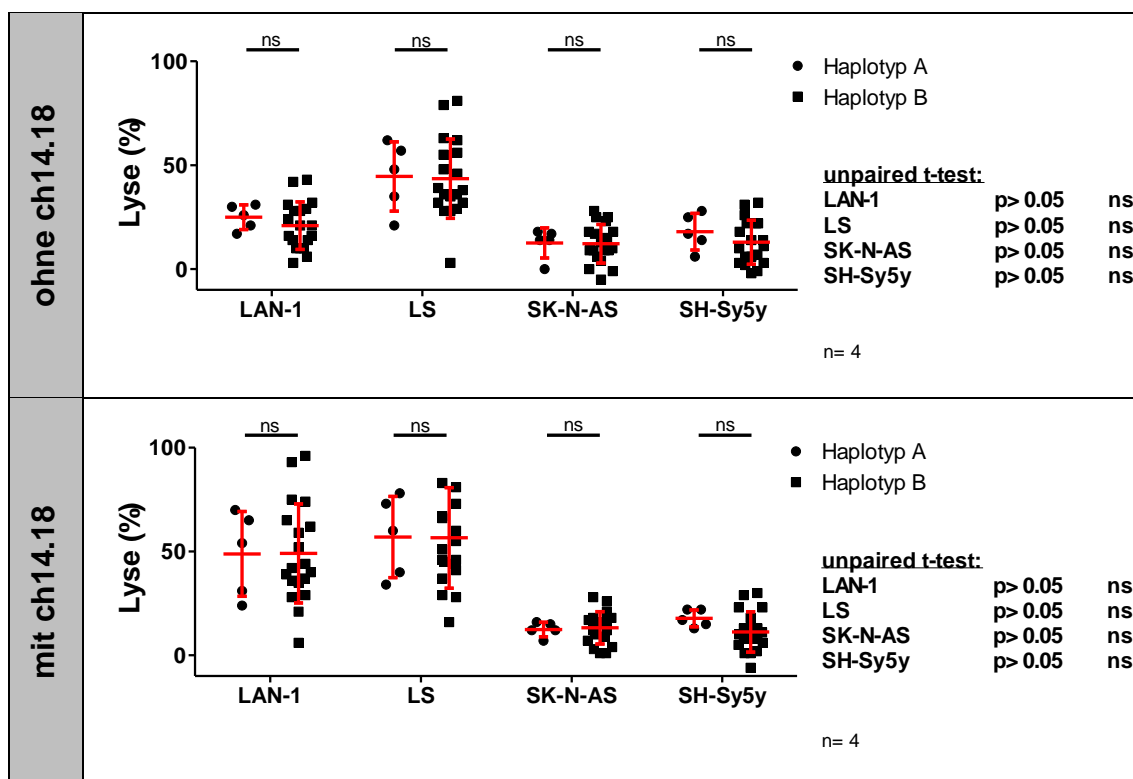


Abbildung 3.9.7 Einfluss von KIR Haplotyp auf die Lyse der getesteten Tumorzellen durch expandierte NK-Zellen

Vergleich der Lysefähigkeit von expandierte NK-Zellen mit KIR-Haplotyp A (Kreis)/ -Haplotyp B (Quadrat) ohne (oben) und mit (unten) Zugabe von ch14.18. Getestet wurden 5 Spender mit Haplotyp A und 19 Spender mit Haplotyp B, n=4 Versuche mit jeweils 3 technischen Replikaten, E/T Ratio 1:1, Messung nach 48h, Endkonzentration ch14.18 1 µg/ml. Rot: Mittelwert mit Standardabweichung.

3.10 γδT-Zellaktivität

In der vorliegenden Arbeit haben wir analog zur den NK-Zellen auch die Aktivität von γδT-Zellen mittels Durchflusszytometrie untersucht, die Daten wurden in denselben Experimenten erhoben. Prinzipiell lassen sich auch γδT-Zellen durch Neuroblastomzellen aktivieren, analog zu den NK-Zellen führt auch hier der GD2-Antikörper ch14.18 zu einer signifikanten Steigerung der Aktivität.

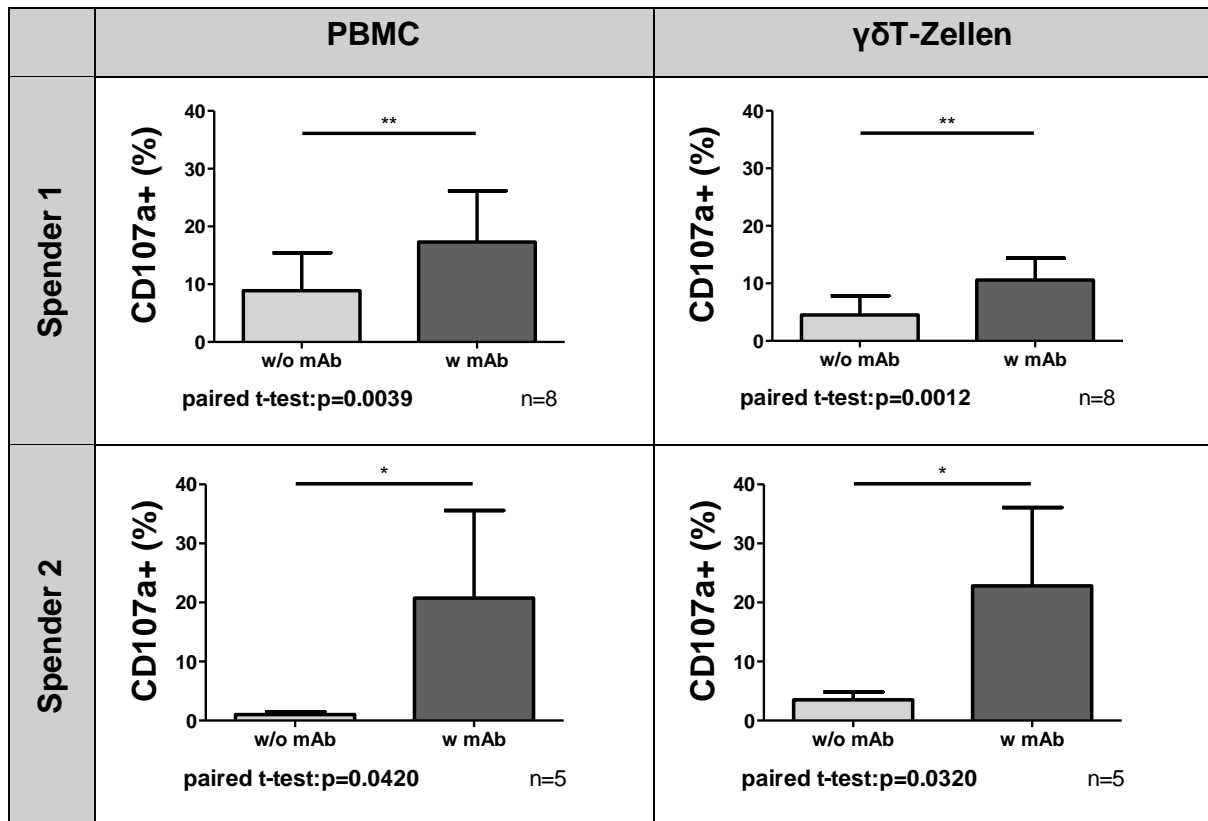


Abbildung 3.10.1 Einfluss von ch14.18 auf die CD107a-Aktivität von $\gamma\delta$ T-Zellen bei beiden Spendern (isoliert aus Peripherblut/NK-Expansion)

Dargestellt sind links $\gamma\delta$ T-Zellen isoliert aus frischem Peripherblut und rechts aus NK-Expansion, die Ergebnisse aller Zelllinien wurden dabei zusammengefasst (Spender 1: 8 Zelllinien, Spender 2: 5 Zelllinien), n=5 Versuche mit jeweils 3 technischen Replikaten, E/T Ratio 1:1, Inkubationszeit 6h, Endkonzentration ch14.18 1 μ g/ml.

Betrachtet man die Ergebnisse der einzelnen Zelllinien, so ist hier durch Zugabe des therapeutischen Antikörpers ebenso eine deutliche Aktivitätssteigerung zu erkennen, diese ist bei den frisch isolierten Zellen stärker ausgeprägt als bei den expandierten Zellen. Die folgenden Darstellungen zeigen exemplarisch anhand eines Experiments die Unterschiede hinsichtlich der Aktivität zwischen den einzelnen Zelllinien.

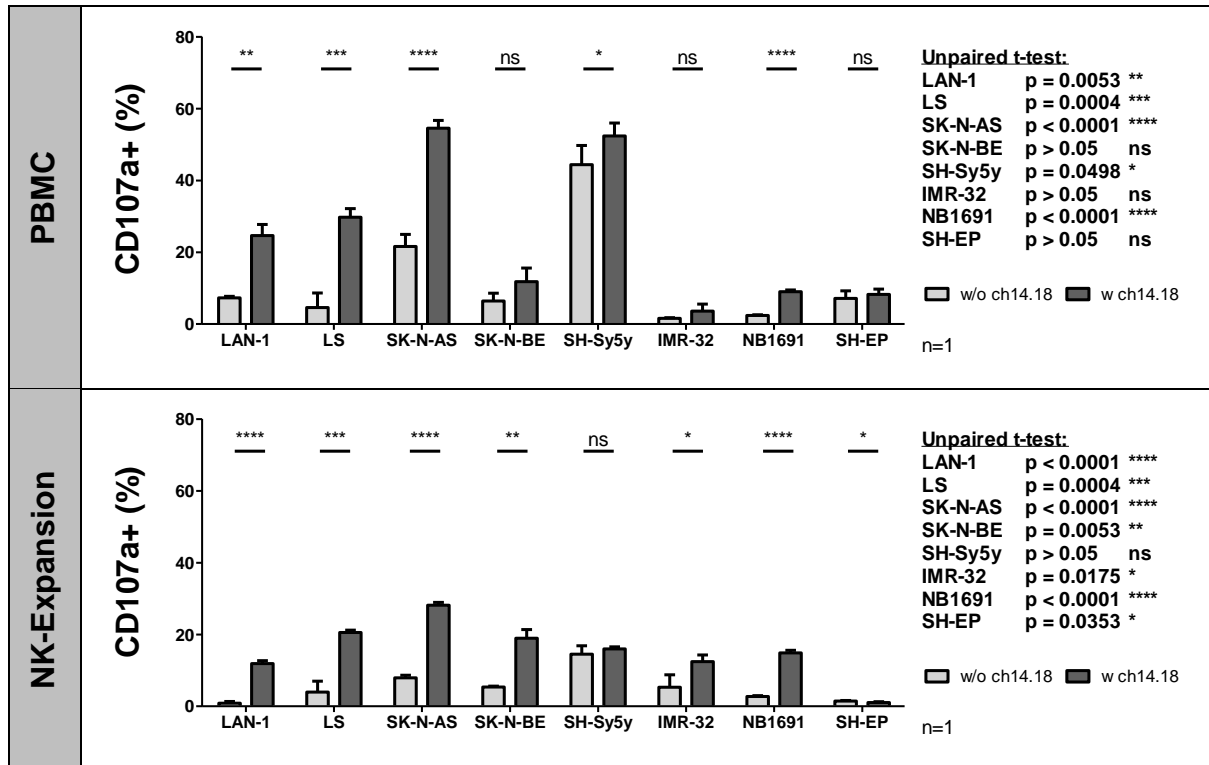


Abbildung 3.10.2 Einfluss von ch14.18 auf die CD107a-Aktivität der $\gamma\delta$ T-Zellen von Spender 1 gegen 8 Zelllinien (exemplarisch)

Exemplarische Darstellung der CD107a-Aktivität ohne und mit Zugabe von ch14.18 von $\gamma\delta$ T-Zellen von Spender 1 aus frisch isolierten PBMC (oben) und NK-Zellexpansion (unten) gegen 8 Zelllinien, n=1 Versuch mit jeweils 3 technischen Replikaten, E/T Ratio 1:1, Inkubationszeit 6h, Endkonzentration ch14.18 1 μ g/ml.

Bei Spender 1 wurden alle 8 verfügbare Zelllinien getestet, gemäß der GD2-Expression gibt es bei SK-N-BE, SH-Sy5y und SH-EP keine bzw. geringe Unterschiede, bei den anderen Zelllinien sind diese deutlicher zu sehen.

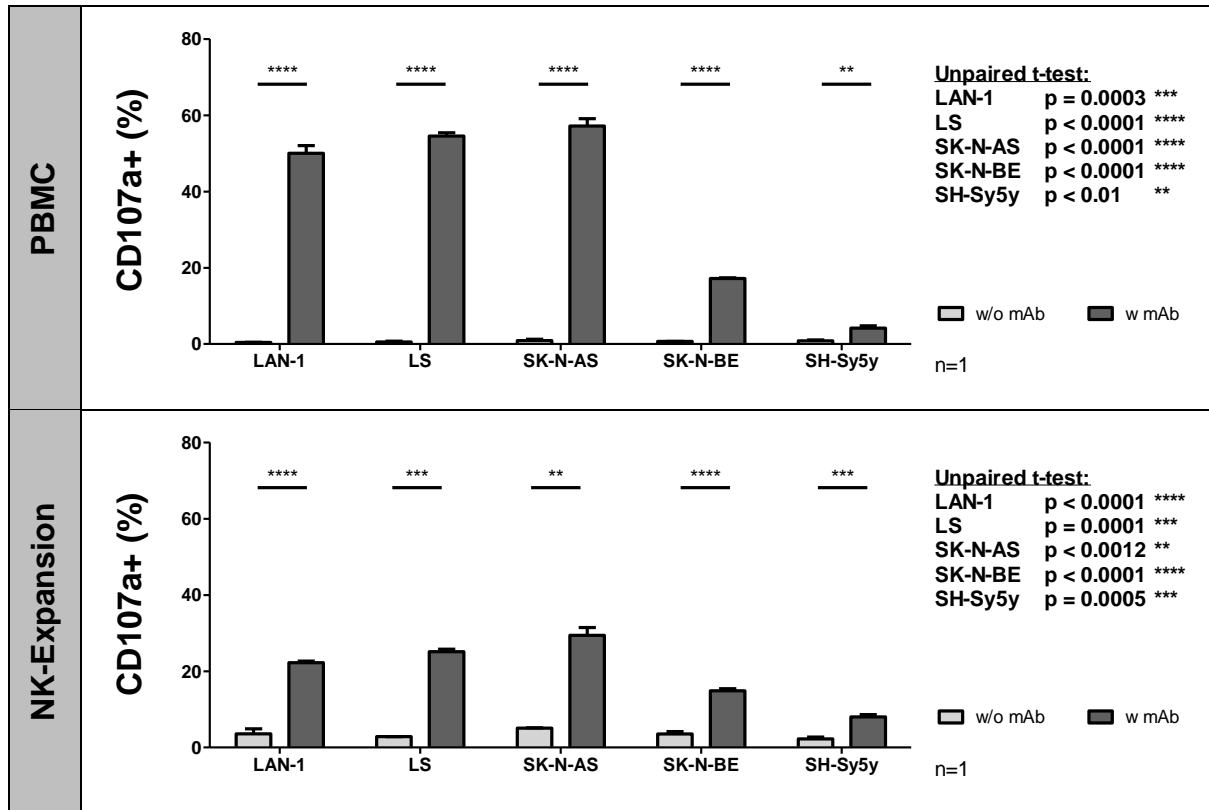


Abbildung 3.10.3 Einfluss von ch14.18 auf die CD107a-Aktivität der $\gamma\delta$ T-Zellen von Spender 2 gegen 5 Zelllinien (exemplarisch)

Exemplarische Darstellung der CD107a-Aktivität ohne und mit Zugabe von ch14.18 von $\gamma\delta$ T-Zellen von Spender 2 aus frisch isolierten PBMC (oben) und NK-Zellexpansion (unten) gegen 5 Zelllinien, n=1 Versuch mit jeweils 3 technischen Replikaten, E/T Ratio 1:1, Inkubationszeit 6h, Endkonzentration ch14.18 1 μ g/ml.

Die $\gamma\delta$ T-Zellen von Spender 2 wurden gegen 5 Zelllinien getestet, insgesamt sind hier die Unterschiede vor und nach Zugabe von ch14.18 viel deutlicher ausgeprägt. Die unbehandelten $\gamma\delta$ T-Zellen zeigen fast keine CD107a-Aktivität, gibt man den Antikörper hinzu steigert sich diese um ein Vielfaches, insbesondere auch bei den Zelllinien, die eigentlich kein GD2 exprimieren.

4 Diskussion

4.1 Antitumorale Aktivität von NK-Zellen

Die NK-Zell Aktivierung ist der wichtigste Schritt in der NK-Zell vermittelten Immunabwehr, diese ist als Teil des angeborenen Immunsystems an der Abwehr virusinfizierter und entarteter Zellen beteiligt. NK-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche zahlreiche (aktivierende, inhibierende und costimulatorische) Rezeptoren, deren höchst komplexen Wechselwirkung miteinander und mit ihren entsprechenden Liganden auf der Zelloberfläche gesunder und infizierter bzw. entarteter Zellen letztendlich die Aktivität der NK-Zellen bestimmt [129]. Letztendlich gibt die Summe aus aktivierenden und hemmenden Signalen den Ausschlag ob die NK-Zelle aktiviert oder gehemmt wird [130].

NK-Zellen besitzen verschiedene Möglichkeiten entartete Zellen zu erkennen und diese zu vernichten, beispielsweise aufgrund verringerter HLA I Expression („missing self“) oder gesteigerter Expression von NKG2D, DNAM-1 und anderen aktivierenden Liganden („induced self“) [85, 131-133]. Solide Tumoren wie etwa Osteosarkome, Nierenzellkarzinome, Melanome und insbesondere Neuroblastome bedienen sich ebenfalls der eben genannten Methoden, um dem Immunsystem zu entgehen und eignen sich deshalb gut als Ziele für NK-Zell basierten Immuntherapien [134-136].

Darüber hinaus ist die Erkennung antikörpermarkierter Zellen eine zentrale Funktion von NK-Zellen, die zusätzlich noch das zytotoxische Potential steigert. Dabei binden Antikörper an Oberflächenmoleküle von Tumorzellen, diese werden aber in den allermeisten Fällen nicht exklusiv von den Tumorzellen exprimiert, sodass auch gesunde Zellen die dieses Antigen besitzen von NK-Zellen erkannt und angegriffen was zu unerwünschten Effekten führt [137, 138]. Solcherart gebundene Antikörper werden von Fc-Rezeptoren erkannt, im Fall der NK-Zellen handelt es sich um den FcγIIIa Rezeptor. Dieser Rezeptor vermittelt ein stark aktivierendes Signal und führt so zur Lyse der Targetzellen [139]. Im klinischen Alltag sind bereits zahlreiche Antikörper in Gebrauch die durch gezielte Markierung von Tumorzellen eine spezifische NK-basierte Immuntherapie ermöglichen [140-143]. So ist etwa die GD2-Antikörpertherapie

seit einiger Zeit eine der zentralen Säulen in der Neuroblastomtherapie von Hochrisikopatienten dar [12]. Und nicht nur beim Neuroblastom stellt das Digangliosid GD2 ein gutes Target für die Antikörpertherapie dar, mittlerweile weiß man auch, dass auch auf Melanomen, Osteosarkomen und kleinzelligen Lungenkarzinomen GD2 in relevanten Mengen exprimiert wird [97, 144, 145].

4.2 Expansion und Charakterisierung der NK-Zellen

Das in Kapitel 2.9 beschriebene Expansionsprotokolle ermöglichte eine effektive Expansion von NK-Zellen aus frisch isolierten PBMCs, was die Grundlage für die funktionelle Testung der expandierten NK-Zellen in KIR Match bzw. Mismatch Situationen war. Diese Situationen treten im Rahmen der allogenen bzw. haploidenten Stammzelltransplantation auf was für die vorliegende Arbeit von besonderem Interesse war.

Im Laufe der 12-20-tägigen Expansion proliferierten die NK-Zellen unter Stimulation durch IL-2, mbIL-15 und mb41-BBL sehr gut, die Gesamtzellzahl sowie der prozentuale Anteil an Lymphozyten nahm stetig zu (Abbildung 3.1.1 & Abbildung 3.1.2). Wie in Abbildung 3.1.3 zu sehen ist wurden nicht nur NK-Zellen expandiert, sondern auch andere Leukozytenpopulationen wie $\gamma\delta$ T-Zellen und NKT-/CIK-Zellen, der Anteil der NK-Zellen im endgültigen Zellprodukt war jedoch sehr zufriedenstellend (Abbildung 3.1.4).

NKT-Zellen sind eine heterogene Gruppe von Lymphozyten, die Eigenschaften von sowohl T-Zellen als auch NK-Zellen besitzen. So werden sie in der Literatur definiert als CD1d-restringierte T-Zellen die einen semi-invarianten $\alpha\beta$ T-Zell Rezeptor exprimieren sowie verschiedene NK-Zell Marker wie NK1.1 oder CD56 [146]. CIK-Zellen (Cytokine Induced Killer Cells) sind eine künstlich erzeugte $CD3^+CD56^+$ Unterart der NKT-Zellen, die durch Inkubation mit verschiedenen Zytokinen (z.B. IFN γ /IL-1/IL-2) im Zellkulturmedium induziert werden [147]. Sie vermitteln eine nicht-MCH-abhängige Anti-Tumor Aktivität [148] und stellen eine gute Möglichkeit zur Immuntherapie verschiedener Tumorentitäten wie etwa der AML [149] oder dem nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom dar [150].

NK-Zellexpansionen aus frisch isolierten PBMCs sind somit klinisch gut einsetzbar, es lassen sich hohe NK-Zellzahlen aus einer überschaubaren Menge Vollblut generieren und es ist auch keine T-Zell-Depletion notwendig, da die T-Zellen zugrunde gehen bzw. ihre MHC-restringierte Alloreaktivität verlieren [151]. Nach Expansion und Zytokinexposition zeigen die NK-Zellen eine deutlich gesteigerte Expression von CD56 (vgl. Abbildung 3.1.3) und KIR-Rezeptoren. Dieses Phänomen wurde bereits in der Literatur beschrieben [152] sowie in Vorläuferarbeiten unserer Arbeitsgruppe reproduziert [121, 153]. Ebenso wird die Expression aktivierender Rezeptoren wie NKG2D oder DNAM-1 gesteigert [154], diese spielen ebenfalls eine wichtige Rolle für die stärkere Aktivität der expandierten NK-Zellen. Diese CD56^{bright} Population ist vor allem zytotoxisch aktive und exprimiert im Gegensatz zu immunregulatorischen NK-Zellen CD16 [152, 154, 155]. Durch die Zytokinstimulation und veränderte Milieufaktoren verändert sich das Expressionsprofil der Oberflächenmoleküle und damit auch der Phänotyp der NK-Zellen, diese Zellen haben vermutlich wenig gemein mit den in vivo gereiften CD56^{bright} NK-Zellen [154].

4.3 Charakterisierung der Neuroblastom-Zelllinien

In Tabelle 3.1 sind die verwendeten Zelllinien dargestellt sowie ihre HLA-Allele und die entsprechende Mismatch bzw. Match Situation. Der Großteil der möglichen Kombinationen ist dabei abgedeckt, einzig eine Zelllinie mit Cw3 Mismatch fehlt.

Diese 8 Zelllinien stehen repräsentativ für die Gesamtheit aller Neuroblastome, somit ist es nicht überraschend, dass die Zelllinien sich stark unterscheiden bezüglich ihres Wachstumsverhaltens sowie ihrer Suszeptibilität gegenüber NK-Zellen bzw. $\gamma\delta$ T-Zellen und der Antikörpertherapie. Ebenso unterscheidet sich die GD2-Expression stark zwischen den Zelllinien (Abbildung 3.2.1), zum Teil exprimieren sie sehr hohe GD2-Level wie LAN-1 oder NB1691, andere Zelllinien wiederum wie etwa SH-Sy5y, SK-N-BE oder SH-EP exprimieren fast gar kein GD2. Diese Unterschiede in der GD2-Expression finden sich auch in der Literatur wieder, beispielsweise zeigten Acosta et al. deutliche phänotypische Unterschiede zwischen verschiedenen Neuroblastom-Zelllinien,

insbesondere der GD2-Expression [156]. In Abbildung 3.2.2 zeigen sich ebenfalls deutliche Unterschiede in der Expression von NKG2D bzw. DNAM-1 Liganden sowie HLA Klasse I. Unsere Untersuchungsergebnisse stehen dabei in Einklang mit z.B. von Raffaghello et al. bereits veröffentlichten Daten verschiedener Neuroblastom-Zelllinien [157].

Die differenzielle Expression von GD2/NKG2DL/DNAM-1L/HLA-I erklärt sehr gut das unterschiedliche Lyseverhalten der verschiedenen Neuroblastom-Zelllinien, da entsprechend dem in Kapitel 1.2.2 diskutierten Mechanismus der NK-Zell Aktivierung das Gleichgewicht zwischen aktivierenden und inhibierenden Signalen den Aktivitätsstatus der NK-Zelle bestimmt. Im Vergleich zu maligne entarteten Zellen exprimieren gesunde Zellen weniger aktivierende Liganden (NKG2DL bzw. DNAM-1L) und werden deshalb nicht von NK-Zellen angegriffen. Die veränderte Expression von NKG2DL/DNAM-1L spielt auch bei anderen onkologischen Erkrankungen wie etwa dem multiplen Myelom [158], myeloischen und lymphatischen Leukämien [159], Ovarialzellkarzinomen [160], Melanomen [161] sowie verschiedenen pädiatrischen soliden Tumoren [46] eine wichtige Rolle in der Aktivierung von NK-Zellen.

4.4 Funktionelle Testung

Die Aktivität von NK-Zellen unterscheidet sich von Individuum zu Individuum, um einen möglichst geeigneten Spender zu finden testeten wir deshalb expandierte NK-Zellen von vier verschiedenen Spendern gegen die Neuroblastom-Zelllinien LAN-1 und LS (Kapitel 3.3). Es zeigten sich deutlich Unterschiede zwischen den Spendern bezüglich des Ausmaßes und der Geschwindigkeit mit der die Targetzellen lysiert werden. Zwischen den beiden im xCELLigence getesteten Zelllinien ist kein deutlicher Unterschied im Lyseverhalten erkennbar, dies liegt möglicherweise daran, dass die durch Zytokinstimulation hochaktivierten NK-Zellen [154, 162] die Targetzellen zu schnell lysieren und somit im xCELLigence kein Unterschied mehr erkennbar ist. Einen deutlichen Unterschied zeigt sich durch die Applikation des therapeutischen Antikörpers ch14.8, mit Zugabe von ch14.18 sinkt der Anteil der lebendigen Tumorzellen rascher und deutlicher als ohne Zugabe. Nach

Auswertung der Ergebnisse und unter dem Aspekt der besseren Verfügbarkeit wählten wir die Spender PS & AJ für die funktionelle Testung der expandierten NK-Zellen aus.

4.5 Einfluss von GD2, HLA-I, aktivierenden Liganden und KIR Haplotyp

4.5.1 HLA-I

Das Immunsystem besitzt viele verschiedene Mechanismen zur Überwachung und Erkennung maligne entarteter Zellen. Im Gegenzug beherrschen die Tumorentitäten unterschiedlichste Strategien um der Überwachung des Immunsystems zu entkommen („tumor escape“) [163]. Eine zentrale Rolle spielt dabei die Herunterregulation von HLA-I auf der Zelloberfläche, dadurch entgehen die Tumorzellen zwar der Erkennung durch T-Zellen aber werden gleichzeitig vulnerabler für die NK-Zell vermittelte Lyse [132, 164]. Insbesondere Neuroblastome sind bekannt dafür sehr wenig bzw. gar kein HLA-I auf der Zelloberfläche zu exprimieren wodurch sie ein exzellentes Target für NK-Zellen darstellen [165, 166]. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass die Hochregulation von HLA-I zu einer verminderten NK-Zell Aktivierung und Lyse der Targetzellen führt und im Umkehrschluss die Herunterregulation zu einer erhöhten Aktivierung der NK-Zellen führt [167, 168]. Überdies wurde in einer Arbeit von Pfeiffer et al. für die B-ALL ein direkter Zusammenhang zwischen Höhe der HLA-I Expression und der Suszeptibilität für NK-Zellen gezeigt [169].

Die Analyse der Neuroblastomzelllinien ergab eine heterogene, jedoch durchweg niedrige HLA-I Expression (Abbildung 3.2.2). Die Höhe der HLA-I Expression spielt auch für das Killing der Neuroblastomzellen durch NK-Zellen eine wichtige Rolle, in Abbildung 3.7.2 ist der Einfluss der Hochregulation von HLA-I mittels IFN γ – Stimulation deutlich erkennbar. Daraus folgt, dass auch bei geringer Expression der Einfluss von HLA-I nicht zu vernachlässigen ist („**HLA does matter**“). Bei anderen Tumorentitäten mit hoher HLA-I Expression, wie z.B. der pädiatrischen AML, ist bekannt, dass diese trotz der hohen HLA-I

Expression gut lysiert werden, da die aktivierenden Liganden (NKG2DL/DNAM-1L) ebenfalls stärker exprimiert werden [170]. Im Unterschied dazu steht die kindliche ALL, die eher weniger aktivierende Liganden exprimiert und dadurch HLA-I eine größere Rolle für die Suszeptibilität einnimmt [171]. Unabhängig von der Tumorentität scheint insgesamt nicht alleine die HLA-I Expression für die NK-Zell Aktivierung ausschlaggebend zu sein, sondern ebenso die Expression der aktivierenden Liganden auf der Zelloberfläche und insbesondere das Verhältnis zwischen aktivierenden und inhibierenden Oberflächenmolekülen [172, 173].

Bei Analyse der HLA-Bw4 Expression zeigte sich ebenfalls eine durchweg niedrige Expression, die jedoch zwischen den Zelllinien sehr unterschiedlich war (Abbildung 3.7.5). Interessanterweise fiel bei den Zelllinien LAN-1 und LS eine Diskrepanz zwischen HLA Genotyp und tatsächlichen Phänotyp auf, so sollten laut Genotypisierung beide Zelllinien HLA-Bw4 exprimieren aber in der Durchflusszytometrie stellten sich die Zellen als HLA-Bw4 negativ dar. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit Erkenntnissen aus vorherigen Arbeiten [97, 121]. Passend dazu war die HLA-Bw4 Expression von LAN-1 und LS nach IFN γ -Stimulation ebenfalls nicht erhöht. Der HLA-I R/L-Mismatch ist nach dem in Kapitel 1.2.3.5 vorgestellten Licensing Modell einer der zentralen Mechanismen des Graft-vs-Leukemia-Effekts (GvL) und eines der wichtigsten Argumente für die haploidente SZT [76, 97]. Wir konnten den positiven Einfluss der Mismatch-Situation auf die NK-Zell Aktivität bestätigen und auch theoriekonform die zunehmende Bedeutung des R/L-Mismatch mit steigender HLA-I Expression (Abbildung 3.7.7). Die Bedeutung der Expressionsdichte von HLA-I auf der Oberfläche von Neuroblastomzellen wird unterstrichen durch die zunehmende NK-Aktivität bei Blockade von HLA-I (Abbildung 3.7.8). Die Höhe der HLA-I Expression und folglich die NK-Zell Aktivität ist abhängig vom Gleichgewicht aus HLA-I inhibierenden und stimulierenden Faktoren wie etwa IFN γ [174]. Betrachtet man nun die in Abbildung 3.7.9 dargestellte Kombination aus HLA-I Stimulation und Blockade wird klar, dass die Hochregulierung der HLA-I Expression durch Stimulation mit IFN γ einen größeren Einfluss auf die NK-vermittelte Lyse hat als die Blockade von HLA-I.

IFN γ spielt eine sehr komplexe Rolle im Immunsystem und eine Vielzahl von Funktionen sowohl pro- als auch antitumoröser Natur [175]. Trotz dieser vielfältigen und noch nicht vollständig verstandenen Wirkungen wird IFN γ therapeutisch bei einigen Tumoren eingesetzt, allerdings mit gemischten Ergebnissen [176]. Vor diesem Hintergrund muss eine therapeutische Anwendung von IFN γ – und möglicherweise gewünschter Induktion von HLA-I – im Zusammenhang mit einer NK-Zelltherapie gut durchdacht und streng indiziert werden.

4.5.2 GD2

Bei dem Glykolipid GD2 handelt es sich um ein Disialogangliosid neuroektodermalen Ursprungs, das physiologischerweise nur in geringen Mengen auf Zelloberflächen im Körper vorkommt [19] aber auf Neuroblastomen in hoher Dichte und nahezu unabhängig vom Erkrankungsstadium exprimiert wird [17, 18] (vgl. Kapitel 1.1.2.1). Da GD2 kein Oberflächenrezeptor mit nachfolgender Signalkaskade ist erfolgt auch keine aktive Internalisierung wie etwa bei T-Zell oder B-Zell Rezeptoren (CD3/CD19/CD22) [21, 177, 178]. Dadurch stellt es eine hervorragende Zielstruktur für eine gezielte Immuntherapie dar und ist deshalb auch eines der wichtigsten Zielantigene in der Antikörpertherapie des Neuroblastoms und anderer Tumoren [27].

Für die Antikörpertherapie spielt auch die Expressionsdichte des Antigens, neben Affinität und Spezifität des Antikörpers, eine entscheidende Rolle für die Effektivität der ADCC [179]. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die semiquantitative GD2-Expression auf den verwendeten Neuroblastomzelllinien untersucht sowie der Einfluss des therapeutischen Antikörpers ch14.18 auf die Lyse durch frisch isolierte PBMCs bzw. expandierte NK-Zellen. Wie bereits in Kapitel 3.2 (Abbildung 3.2.1) beschrieben ist die Expression von GD2 auf den Neuroblastomen sehr heterogen. Insgesamt ist der Effekt des therapeutischen Antikörpers ch14.18 sowohl bei frisch isolierte PBMCs (Abbildung 3.5.1) als auch bei expandierten NK-Zellen (Abbildung 3.5.2) nicht zu übersehen. Die größere Aktivitätssteigerung durch Zugabe des Antikörpers bei frisch isolierten PBMCs verglichen mit den expandierten NK-Zellen könnte an der höheren

intrinsischen Aktivität der NK-Zellen aufgrund der Expansion liegen [180], sodass eine deutlichere Zunahme der Aktivität und damit des spezifischen Antikörpereffekts durch die bereits sehr hohe Grundaktivität kaschiert wird. Betrachtet man nun die einzelnen Zelllinien so erkennt man bei beiden getesteten Spendern eine Zunahme der Aktivität bei den positiv auf GD2-Expression getesteten Zelllinien.

Bei den Zelllinien ohne GD2-Expression sieht man zwar auch eine Zunahme der Aktivität, jedoch erwies diese sich in der statistischen Auswertung als nicht signifikant. Einzig die Zelllinie SK-N-AS fällt aus dem Muster, diese wurde von uns als GD2-negativ eingestuft (Abbildung 3.2.1), jedoch ist immer eine signifikante Aktivitätssteigerung durch den therapeutischen Antikörper ch14.18 zu sehen, außer bei den expandierten NK-Zellen von Spender 2. In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben zur GD2-Expression von SK-N-AS, so werden sie in manchen Arbeiten als kaum GD2 exprimierend beschrieben [156, 181], in anderen wiederum als GD2-positiv [182].

In der Therapie von Neuroblastomen der Hochrisikogruppe ist die Antikörpertherapie mit einem GD2-Antikörper mittlerweile fest etabliert. Es sind bereits mehrere Studien erschienen, die einen eindrucklichen Vorteil der Immuntherapie gegenüber der konventionellen Therapie mit Chemotherapie und Retinoidgabe beweisen. Beispielsweise veröffentlichten Yu et al. 2010 eine Phase III Studie mit 226 Neuroblastom-Hochrisikopatienten nach myeloablativer Chemotherapie und anschließender autologer Stammzelltransplantation. Diese zeigte über einen Beobachtungszeitraum von 2 Jahren eine Verbesserung des ereignisfreien Überlebens um 20% und eine Steigerung des Gesamtüberlebens um 10% bei Patienten die eine Immuntherapie mit ch14.18, GM-CSF und IL-2 erhalten haben gegenüber den Patienten mit Standardkonsolidierungstherapie [12]. Unveröffentlichte Daten einer an der Universitätskinderklinik Tübingen von Lang et al. durchgeführten Phase II Studie (NCT02258815) mit Patienten in kompletter Remission vor haploidenter SZT zeigen nach 5 Jahren ein Gesamtüberleben von über 50% bei Haplo-SZT mit anschließender Gabe von ch14.18 und IL-2 gegenüber 23% bei alleiniger Haplo-SZT [40]. Trotz dieser vielversprechenden Daten ist diese Therapie meist nicht ausreichend und

hinzukommen dosislimitierende Nebenwirkungen wie Schmerzen, Fieber, Blutdruckinstabilität und das Capillary-Leak-Syndrom [12]. Aus diesem Grund ist es wichtig neue Therapieansätze zu verfolgen und die bestehenden Protokolle weiterzuentwickeln.

4.5.3 Aktivierende Liganden

Infizierte oder maligne entartete Zellen exprimieren vermehrt sog. Stressliganden, die zu einer vermehrten Aktivierung von NK-Zellen führen. Letztendlich entscheidet das Gleichgewicht zwischen aktivierenden und hemmenden Signalen über die Aktivität der NK-Zelle. Sind die aktivierenden Signale im Übergewicht, v.a. durch NKG2D und andere NCRs (Natural Cytotoxicity Receptors) vermittelt, so kommt es zur Ausbildung einer zytolytischen Synapse und konsekutiv zur Lyse der Targetzelle [75, 183]. In diesem Sinne beruht auch die gesteigerte Zytotoxizität der mit IL2 stimulierten NK-Zellen vor allem auf einer erhöhten Expression aktivierender Rezeptoren [171]. Für die vorliegende Arbeit waren vor allem die NKG2D und DNAM-1 Liganden von Interesse. Die Expression der aktivierenden Liganden war verglichen mit PBMCs durchweg erhöht, jedoch unter den Zelllinien unterschiedlich stark ausgeprägt. Die selektive Blockade von NKG2D bzw. DNAM-1 führe zu einer signifikanten Verminderung der NK-Aktivität. Unter Zugabe von ch14.18 jedoch nivellierten sich die Unterschiede, d.h. Einfluss der ADCC überwiegt den der blockierenden Antikörper. Dies ist eine gute Nachricht für alle Patienten, da selbst diejenigen mit einer geringen intrinsischen NK-Aktivität nicht nur von der CDC, sondern auch in erheblichem Maß von der ADCC profitieren können. Dies bietet z.B. in der post-SZT Situation große Vorteile, da im Rahmen einer zielgerichteten Immuntherapie zum Zeitpunkt der minimalen Tumorlast auch schwer aktivierbare NK-Zellen rekrutieren werden können und somit alle immunologischen Ressourcen optimal genutzt werden [12]. Bei beiden getesteten Spendern waren LS empfänglicher für NK-vermittelte Lyse als LAN-1, in Bezug auf die aktivierenden Liganden zeigt LS eine höhere Expression sowohl der NKG2D/DNAM-1 Liganden als auch von HLA-I. Insgesamt scheinen bei Neuroblastomen die aktivierenden Rezeptoren

eine tragende Rolle in der NK-vermittelten Zytotoxizität zu spielen und die HLA-I vermittelte Inhibition eher nachgeordnet zu sein [131].

4.5.3.1 NKG2D Liganden

Die wichtigsten der aktivierenden NKG2D Liganden sind MIC A/B, ULBP-1 und ULBP-2/5/6, bei den von uns getesteten Neuroblastomzelllinien waren vor allem ULBP-1 in starkem Maß erhöht. Die höchste Expression der NKG2D Liganden zeigte die Zelllinie LS, bei gleichzeitig hoher HLA-I Expression vermittelte LS die stärkste NK-Zell Aktivierung. Dies ist gut vereinbar mit der bereits erwähnten Theorie, dass im Falle von niedrig HLA-I exprimierenden Tumoren die NKG2D Rezeptor-Ligand Interaktion für die NK-Aktivierung die weitaus bedeutendere Rolle einnimmt als die HLA-I vermittelte Inhibition. Bei Tumoren mit hoher HLA Klasse I Expression wie z.B. der kindlichen AML wurde dieser Mechanismus bereits in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe aufgezeigt [170].

Um der Erkennung durch das Immunsystem zu entgehen besitzen Neuroblastomzellen zahlreiche Methoden, unter anderem scheint MIC A in diesem Zusammenhang eine besondere Rolle einzunehmen. Im Plasma von Patienten mit unterschiedlichen Tumorerkrankungen, darunter auch Neuroblastome, wurden erhöhte Konzentrationen von MIC A in gelöster Form gefunden (sMIC A = soluble MIC A) [157]. Zurzeit werden zwei Mechanismen diskutiert mittels derer sMIC A die NK-Aktivität beeinflussen kann, einerseits beobachtet man eine Abnahme der NKG2D Rezeptordichte auf NK-Zellen bei erhöhten sMIC A Spiegeln und dadurch eine Abnahme der NK-vermittelten Zytotoxizität. Andererseits belegt sMIC A die Bindungsstellen der NKG2D Rezeptoren und behindert so die Zell-Zell-Interaktion und infolgedessen die Ausbildung einer zytolytischen Synapse [157]. Kloess et al. fanden eine inverse Korrelation zwischen der NK-Zell Aktivität gegen die Neuroblastomzelllinie UKF-NB-3 und der Plasmakonzentration von sMIC A. Laut den Autoren bestünde ein Ansatz um die Effektivität der Immuntherapie mit NK-zellen zu steigern darin, überschüssiges sMIC A abzufangen und damit die Plasmakonzentration zu normalisieren. Beispielsweise könnte die NKG2D Rezeptorexpression auf

expandierten Spender NK-Zellen durch Zugabe von IL2 gesteigert werden und gleichzeitig die Applikation einer hohen Dosis solcherart aktivierter NK-zellen zu einer effektiveren Erkennung und Lyse der Zielzellen führen, da der vermehrte sMIC A Sekretion der Tumorzellen eine verbesserte sMIC A Elimination gegenübersteht [184]. In diesem Zusammenhang muss auch erwähnt werden, dass auf frisch isolierten Neuroblastomzellen, im Gegensatz zu vielen etablierten Neuroblastomzelllinien, kein MIC A auf der Zelloberfläche exprimiert wird und daher der *in vivo* Effekt einer sMIC A Reduktion unklar bleibt [157].

4.5.3.2 DNAM-1 Liganden

Wie bereits erwähnt spielt die Stärke der Expression der DNAM-1 Liganden CD155 (PVR) und CD112 (Nectin-2) auf der Zelloberfläche eine entscheidende Rolle für die Aktivierung von NK-Zellen [85], dies steht in Einklang mit unseren Untersuchungsergebnissen. Klinisch gibt es einen von Castriconi et al. aufgezeigten Zusammenhang zwischen der CD155 Expression auf frisch isolierten Neuroblastomzellen und deren NK-vermittelten Lyse. Therapierefraktäre Neuroblastome entgehen dem Immunsystem durch einen sog. Immune-Escape-Mechanismus indem sie die Expression von DNAM-1 Liganden unterdrücken, dies wurde bei Patienten mit rezidierten Neuroblastomen nachgewiesen [185]. Aus diesem Grund stellt CD155 ein interessantes Ziel für neuartige Immuntherapien dar, durch eine Induktion von aktivierenden Liganden auf der Targetzelle könnte eine bessere Wirksamkeit der NK-Zelltherapie erreicht werden. Zu bedenken ist jedoch die Tatsache das CD155 und CD112 nicht tumorspezifisch sind, sondern auch auf körpereigenen Strukturen wie z.B. Endothelien oder Neuronen vorkommen. Dadurch könnte möglicherweise eine On-Target-Off-Tumor-Toxizität gegen gesundes Gewebe ausgelöst werden, die im schlimmsten Fall zum Gewebsuntergang führen könnte [186].

4.6 Anwendung der Alloreaktivitätsmodelle

Die in Kapitel 1.2.3 beschriebenen Alloreaktivitätsmodelle dienen alle zur Prognose des Verhaltens von NK-Zellen bei Kontakt mit infizierten oder maligne

entarteten Zellen. Das Verständnis der NK-Aktivität auf molekularer Ebene ist in den letzten Jahren und Jahrzehnten immer besser geworden und damit wurden auch die bestehenden Modelle immer weiter ausgebaut und entwickelt. Unter vereinfachten Bedingungen sind sie sehr gut geeignet, die Alloreaktivität von NK-Zellen vorherzusagen und sind dadurch z.B. bei der Spenderauswahl für HSZT von Nutzen. Jedoch können die Modelle aufgrund der komplexen und vielschichtigen Regulationsmechanismen von NK-Zellen nie die genaue Wirklichkeit abbilden und sind damit in ihren Anwendungsmöglichkeiten limitiert. Nachfolgende werden die Alloreaktivitätsmodelle in Bezug auf unsere experimentell erhobenen Daten diskutiert.

4.6.1 Ligand-Ligand Modell

Das LL Modell wurde von der Perugia-Gruppe aufgestellt und ist eines der ersten Modelle zur Vorhersage der NK-Alloreaktivität, es ist auch das Vorläufermodell des genaueren RL Modells [42]. Nach diesem Modell liegt ein LL Match vor, wenn Spender und Empfänger die gleichen HLA Liganden besitzen. Ein LL Mismatch hingegen liegt vor, wenn beim Spender ein Ligand vorliegt, welchen der Empfänger nicht exprimiert (Graft-vs-Host Richtung). Für alle Alloreaktivitätsmodelle sind die HLA Klasse I Liganden der Gruppen Cw3 (C1), Cw4 (C2) und Bw4 sowie HLA A3/A11 von Interesse, da diese für die Aktivierung der KIR Rezeptoren und damit die NK-Alloreaktivität von maßgeblicher Bedeutung sind [42, 88]. In unserer Studie besteht nach dem LL Modell ein Mismatch von Spender 1 (HLA-C1 negativ) zu den Zelllinien LAN-1, SK-N-AS, SH-Sy5y, NB1691 und IMR-32, zu den Zelllinien LS, SK-N-BE und NB1691 bestand kein Mismatch, bei Spender 2 lag kein LL Mismatch vor. Bei der funktionellen Testung der Zelllinien im CD107a-Assay sind zwar signifikante Unterschiede zu Tage getreten, jedoch waren diese nicht auf den LL Mismatch zurückzuführen und bei Spender 2 ebenso vorhanden wie bei Spender 1 (vgl. Kapitel 3.6.1 & 3.6.2).

Der größte Schwachpunkt des LL Modells ist in der Methodik begründet, da vom HLA I Ligand auf das KIR Repertoire geschlossen wird. Dies kann aber nicht immer zutreffend sein, da die Vererbung von HLA Klasse I und KIR

Rezeptoren unabhängig voneinander auf den Chromosomen 19 und 6 erfolgt [75]. Aus diesem Grund kann es vorkommen, dass ein Spender entweder nur den HLA I Liganden oder nur den passenden Rezeptor exprimiert. Ist dies der Fall so wird die Vorhersage des LL Modells nicht stimmen [75, 88]. In einer Studie von Leung et al. gehen die Autoren von 24-36% [88] Fehlerquote aus, Hsu et al. gehen sogar von bis zu 63% [187] der untersuchten Spender aus, die einen der KIR Rezeptoren CD158a/CD158b/CD158e tragen ohne den korrespondierenden HLA Liganden zu exprimieren. Im umgekehrten Fall trugen jedoch nur 0-8% der Spender einen HLA Klasse I Liganden ohne den zugehörigen KIR Rezeptor [88].

Dieselbe Beobachtung war auch bei uns zu machen, der HLA C1 negative Spender 1 wies trotzdem alle drei KIR Rezeptoren CD158a/CD158b/CD158e auf. Dies erklärt auch, warum das LL Modell in bis zu einem Drittel der Fälle bezüglich der Interaktion zwischen HLA Ligand und KIR Rezeptor nicht zutreffend sein kann. Die Weiterentwicklung des LL Modells zum prädiktiveren RL Modell durch direkte Untersuchung der KIR Genotypisierung des Empfängers zusätzlich zur HLA Typisierung des Spender war demnach der logische nächste Schritt [75, 88].

4.6.1.1 Klinische Anwendung

Das LL Modell wurde von der Perugia-Gruppe auf Grundlage von Studienergebnissen mit haploident transplantierten adulten AML und CML Patienten entwickelt und 1999 erstmalig veröffentlicht [188]. Dieses Modell war in den nachfolgenden Jahren Gegenstand intensiver Forschung, so stellten Ruggeri et al. in ihren Studien fest, dass die adulte ALL bei LL Mismatch keine bessere Gesamtüberlebensrate aufwies, die adulte AML hingegen schon. Für die adulte AML bot ein vorhandener LL Mismatch deutlich geringere Rezidivraten sowie weniger Transplantatabstoßung und weniger GvHD. Weiterhin war bei Rezidiv-Patienten mit LL Mismatch ebenfalls ein besseres ereignisfreies Überleben und auch Gesamtüberleben zu beobachten [42, 189]. Allerdings werden diese Studienergebnisse auch heute noch kontrovers diskutiert denn es gibt einige Arbeiten, die zu dem Schluss kommen dass das

Vorhandensein eines LL Mismatches keinen oder sogar einen negativen Effekt auf das Gesamtüberleben der Patienten hat [75, 190]. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass sich die angeführten Studien in vielen Faktoren unterscheiden wie z.B. haploidente SZT vs. allogene SZT, Kriterien zur Spenderauswahl oder Zusammensetzung des Transplantats.

Bezogen auf das Neuroblastom sieht die Datenlage deutlich magerer aus, es gibt eine aktuelle Phase I/II Studie von Illhardt et al. aus dem Jahr 2018 mit 26 Neuroblastompatienten im fortgeschrittenen Stadium. Es fand sich kein Hinweis auf einen signifikanten Vor- oder Nachteil des LL Mismatches auf die Rezidivrate nach haploidenter Stammzelltransplantation. Die statistische Aussagekraft der Studie ist allerdings aufgrund der geringen Kohortengröße eingeschränkt, denkbar wäre aber auch eine Kaschierung des Effekts durch die hohe Tumorlast der Patienten im fortgeschrittenen Krankheitsstadium [40].

Letztendlich ist das LL Modell in der Praxis zwar leicht anwendbar da nur die HLA Klasse I Liganden von Spender und Empfänger bekannt sein müssen, aber um die Basis für eine valide Spenderauswahl zu bilden ist das Modell zu ungenau. Denn wie bereits am Anfang des Kapitels beschrieben ist der Rückschluss von den HLA I Liganden auf das Vorhandensein der zugehörigen KIR Rezeptoren fehlerbehaftet, damit sinkt die Qualität des LL Modells und die Anwendbarkeit für die Spenderauswahl in der klinischen Praxis.

4.6.2 Rezeptor-Ligand Modell

Nach dem RL Modell liegt analog zum LL Modell ein Mismatch vor, wenn der Spender einen KIR Rezeptor trägt, der Empfänger aber den dazu passenden HLA Klasse I Liganden nicht exprimiert [88]. Wir bestimmten neben der HLA-Typisierung auf Genomebene auch die phänotypische Expression der KIR Liganden auf der Oberfläche der Neuroblastomzellen, beide Spender exprimieren alle relevanten KIR Rezeptoren, sodass die Match/Mismatch-Situation bei beiden Spendern gleich ist. In der nachfolgenden Tabelle sind die Zelllinien und die jeweilige Mismatch-Situation dargestellt:

Zelllinie	HLA Typisierung	Mismatch zu Spender 1&2
LAN-1	Cw3/Cw3/Bw4/A3	CD158a
LS	Cw3/Cw4/Bw4	Kein MM
SK-N-AS	Cw3/Cw3	CD158a/CD158e
SK-N-BE	Cw3/Cw4/Bw4/Bw4	Kein MM
SH-Sy5y	Cw3/Bw4	CD158a
IMR-32	Cw3/Cw3/A11	CD158a/CD158e
NB1691	Cw3/Cw3	CD158a
SH-EP	Cw3/Bw4	CD158a

Tabelle 4.1 Mismatch-Situation der Neuroblastomzelllinien

Aufgeführt sind die verwendeten Zelllinien und die jeweilige Mismatch-Situation auf den jeweiligen Spender bezogen
Abkürzungen: MM=Mismatch

Interessanterweise waren die Zelllinien LAN-1 und LS zwar laut HLA-Typisierung HLA Bw4 positiv, in der Durchflusszytometrie jedoch stellten sie sich als HLA Bw4 negativ dar. Somit liegt bei LAN-1 und LS zusätzlich auf phänotypischer Ebene ein Mismatch zu CD158e positiven NK-Zellen vor. Diese Beobachtung steht in Einklang mit Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe [121] und wurde für LAN-1 bereits von Tarek et al. beschrieben [97].

In den durchgeführten CD107a-Assays konnte das RL Modell grundsätzlich nicht widerlegt werden da es signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen NK-Subpopulationen gab, diese konnten aber nicht auf einen bestimmten KIR R/L Mismatch zurückgeführt werden. Vielmehr scheinen sowohl bei frisch isolierten PBMCs als auch bei expandierten NK-Zellen spenderspezifische Unterschiede einen größeren Einfluss auf die NK-vermittelte Lyse zu haben als jeder KIR R/L Mismatch. So scheinen bei jedem Spender bestimmte Subpopulationen grundsätzlich aktiver zu sein als andere, bei Spender 1 ist dies die CD158e Subpopulation und gleichzeitig ist bei diesem Spender die CD158b Subpopulation immer signifikant weniger aktiv sowohl bei expandierten NK-Zellen als auch bei frisch isolierten PBMCs (Abbildung 3.6.3 & Abbildung 3.6.1). Nach Zugabe von ch14.18 werden die Unterschiede zwischen den Zelllinien hinsichtlich ihrer Gesamtaktivität geringer, die Subpopulationen

hingegen bleiben in ihrem Aktivitätsmuster fast unverändert (Abbildung 3.6.4 & Abbildung 3.6.2). Bei den frisch isolierten PBMCs liegen die Subpopulationen aufgrund der fehlenden Voraktivierung durch die Expansion viel enger beieinander, hier sind die Unterschiede schwerer auszumachen. Für Spender 2 gilt dasselbe Prinzip, hier ist die CD158b Population die aktivste und die CD158e Population scheint die am wenigsten aktive zu sein. Generell zeigt Spender 2 geringere Unterschiede zwischen den Subpopulationen und auch insgesamt eine geringere NK-Aktivität.

Insgesamt scheint also die Aktivität der NK-Zell Subpopulationen innerhalb der Spender konserviert zu sein und unabhängig von einem etwaigen KIR R/L Mismatch zu sein. An dieser Stelle muss noch erwähnt werden, dass die KIR Rezeptoren nicht gleichwertig in ihrem Einfluss auf die NK-vermittelte Alloreaktivität sind, d.h. dass je nach KIR Rezeptor das aktivierende bzw. inhibierende Signal unterschiedlich stark ausfällt [83].

Genau wie das LL Modell erweist sich das RL Modell als zu ungenau für die Vorhersage der NK-Aktivität. Wie in unserer Studie beschrieben kann eine Diskrepanz zwischen Genotyp und tatsächlichem Phänotyp vorliegen wodurch die Vorhersage des RL Modells beruhend auf der HLA Typisierung von Spender und Empfänger hinfällig wird. Die fehlende Expression von Proteinen die auf genetischer Ebene vorhanden sind wurde für eine Vielzahl von Tumorentitäten beschrieben, dabei ist die HLA Expression explizit mitinbegriffen [132]. Die daraus resultierende Diskrepanz zwischen HLA Genotyp und Phänotyp führt zu einem funktionellen Mismatch, der für die Rezeptorinteraktion gleichwertig ist wie ein auf genetischer Ebene fehlendes HLA Klasse I Allel. Um das RL Modell zu verbessern könnte zusätzlich eine Genexpressionsanalyse, eine RNA-Sequenzierung oder der direkte Nachweis der HLA Liganden auf der Zelloberfläche durchgeführt werden [191].

4.6.2.1 Klinische Anwendung

Die Gültigkeit des RL Modells wurde bereits in verschiedenen Studien und für unterschiedlichen Tumorentitäten wie die pädiatrische AML/ALL, Osteo- und Ewing-Sarkome oder Neuroblastome gezeigt [41, 88, 192, 193].

Interessanterweise hat das RL Modell Einfluss auf sowohl die allogene als auch auf die autologe Stammzelltransplantation. Venstrom et al. konnten zeigen, dass Patienten mit Hochrisiko-Neuroblastomen nach autologer SZT mit RL Mismatch signifikant länger überlebten als ohne [194, 195]. Die Mortalität der Patienten mit RL Mismatch war um 46% reduziert und das Progressionsrisiko ebenfalls um 34% über den Beobachtungszeitraum von 3 Jahren [195].

Im autologen Setting kommt es automatisch zu einer Überschneidung des RL Modells mit dem Licensing Modell. Denn bei den NK-Zellen mit KIR RL Mismatch handelt es sich aufgrund der nicht stattfindenden KIR-HLA Interaktion während der Maturation per definitionem um unlicensed NK-Zellen [97, 195]. In der genannten Studie wurde ein Großteil der Patienten zusätzlich mit einem GD2-Antikörper behandelt. Bekanntermaßen existieren verschiedene Mechanismen mittels derer hyporesponsive unlicensed NK-Zellen aktiviert werden können (vgl. Kapitel 4.6.4) und in diesem Studiensetting ist es durchaus nachvollziehbar, dass die Kombination aus Antikörpertherapie, Tumormilieu und Stammzelltransplantation die unlicensed NK-Zellen mit RL Mismatch leichter aktiviert werden als die licensed NK-Zellen, die über mehr inhibitorischen KIR Rezeptoren verfügen und somit eher ein inhibierendes Signal erhalten. Folglich scheint die Applikation von Fc-rekrutierenden Antikörpern ein probates Mittel zu sein um die Effektorfunktion von unlicensed/licensed NK-Zellen umzukehren. Dieser Effekt wurde bereits für verschiedene Fc-rekrutierenden Antikörper gezeigt [97, 196, 197].

Das RL Modell ist für die Vorhersage der NK-Alloreaktivität und des Rezidivrisikos bspw. für die pädiatrische AML und ALL besser geeignet als das LL Modell, dies liegt in der genaueren Untersuchungsmethode des Spender-KIR-Repertoires. Das LL Modell schließt vom KIR Liganden des Spenders auf dessen Ausstattung mit KIR Rezeptoren wohingegen im RL Modell die KIR Rezeptoren des Spenders direkt identifiziert werden. Wie in Kapitel 4.6.1 bereits erwähnt liegt das LL Modell bei der Vorhersage der KIR Rezeptoren in ca. einem Drittel der Spender falsch, diese Spender exprimieren einen der KIR Rezeptoren CD158a/CD158b/CD158e ohne den passenden HLA Liganden [75, 88].

In ihren Untersuchungen beobachteten Leung et al. *in vitro* eine positive Korrelation zwischen Anzahl der RL Mismatches und antileukämischem Effekt. Außerdem konnte die KIR-HLA I vermittelte Hemmung bei RL Match durch Stimulation der NK-Zellen mit IL-12 und IL-18 aufgehoben werden kann [88].

4.6.3 KIR-Genotyping Modell

Die Gene für KIR Rezeptoren und HLA Liganden werden wie in Kapitel 1.2.3.4 dargestellt unabhängig voneinander vererbt und unterliegen beide einem ausgeprägten Polymorphismus. Bestimmte KIR Gene treten häufiger auf als andere und so besitzt jeder Mensch ein individuelles KIR Rezeptorrepertoire [198]. Das KIR-Genotyping Modell bezieht in die Vorhersage der NK-Alloreaktivität das molekulare Aktivierungspotential der KIR Gene mit ein, dabei ist die Anzahl der aktivierenden KIR Rezeptoren eines Spenders von Bedeutung für das Ausmaß der NK-Aktivierung. Nach dem KIR-Genotyping Modell ist es möglich die Spender in zwei Gruppen einzuteilen: KIR Haplotyp A und KIR Haplotyp B. Haplotyp A Spender besitzen als einziges das Gen für den aktivierenden Rezeptor KIR2DS4, dagegen tragen Haplotyp B Spender zusätzlich noch Gene für einen oder mehrere aktivierende Rezeptoren aus der Gruppe KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3 oder KIR2DS5. Folglich sind KIR Haplotyp B auf genetischer Ebene mit mehr aktivierenden Rezeptoren ausgestattet als KIR Haplotyp A Spender. Daraus resultiert die Annahme, dass NK-Zellen mit einer größeren Anzahl an aktivierenden KIR Rezeptoren über unterschiedliche Liganden auf Tumorzellen aktiviert werden können und daher eine gesteigerte Alloreaktivität aufweisen [66].

Trifft das KIR Genotyping Modell zu so sollten bei der funktionellen Testung Spender mit Haplotyp B eine höhere NK-Aktivität zeigen als Spender mit Haplotyp A.

Die funktionelle Testung der Zelllinien im CD107a Assay ist vom Experimentaufbau nicht geeignet, um das KIR Genotyping Modell zu überprüfen, da nur zwei Spender getestet wurden und beide denselben Haplotyp aufweisen (Haplotyp A). Im Luciferase Assay jedoch wurden 24 Spender getestet, davon wiesen 5 Haplotyp A auf und 19 Haplotyp B. Dabei

konnte das KIR Genotyping Modell nicht bestätigt werden, zwischen Haplotyp A und Haplotyp B gab es keinen signifikanten Unterschied. Die Anwendung des therapeutischen Antikörpers ch14.18 bewirkte zwar insgesamt eine Steigerung der Lyse, jedoch war weiterhin kein Unterschied zwischen den Haplotypen festzustellen (Abbildung 3.9.6 & Abbildung 3.9.7).

Interessanterweise war jedoch eine gewisse Konstanz der Spender bezüglich der Lysefähigkeit zu beobachten, so waren beispielsweise Spender 18 und 20 immer unter den besten Spendern zu finden und Spender 21 war immer einer der schlechtesten. Gute und schlechte Spender definierten wir in unserem Falle anhand der prozentualen Lyse der Targetzellen durch die Spender-Effektorzellen. Die Beobachtung von besseren und schlechteren Spendern wurde in unserer Forschungsgruppe schon früher gemacht (unveröffentlichte Daten) aber noch nie wie in Kapitel 3.9 objektiviert. In der Arbeit von Wiedenmann konnte unsere Arbeitsgruppe dieses Muster für die kindliche ALL ebenfalls aufzeigen [199].

Sollte sich diese Einteilung in gute und schlechte Spender in weiteren Studien bestätigen so hätte dies immense Auswirkungen auf die Praxis der Spenderauswahl für die haploidente Stammzelltransplantation. Momentan werden bei der Spenderauswahl für die Haplo-SZT viele verschiedene Faktoren wie z.B. Blutgruppenantigene, Alter, Geschlecht oder NK-Alloreaktivität berücksichtigt, jedoch gibt es keinen festgelegten Algorithmus nach dem der Spender aus einer meist recht großen Auswahl an verwandten Spendern ausgewählt wird [200]. Die Auswahl des am besten geeigneten Spenders ließe sich stark vereinfachen, beispielsweise ließen sich mit einem einfachen Kill-Assay alle verfügbaren Spender auf ihre potenzielle Lysefähigkeit testen und dadurch könnte der beste Spender sehr leicht identifiziert werden.

4.6.3.1 Klinische Anwendung

Das KIR Genotyping Modell wurde in verschiedenen Studien überprüft und hat seine Bedeutung für das Überleben von Patienten nach allogener Stammzelltransplantation gezeigt [66, 67, 201]. Cooley et al. beobachteten in zwei Studien mit AML Patienten nach allogener SZT vom Fremdspender ein

signifikant besseres 3-Jahresüberleben und ein um 30% verringertes relatives Risiko für ein Rezidiv bei Patienten mit KIR Haplotyp B Spendern verglichen mit KIR Haplotyp A Spendern. Zudem entwickelten diejenigen Patienten, die einen Haplotyp B Spender hatten öfter eine chronische GvHD wohingegen die Rate an akuter GvHD bei Haplotyp A und B Spendern gleich war [66, 67].

Später wurde das Modell noch um den B-Content Score ergänzt, die aktivierenden und inhibierenden Gene sind auf Chromosom 19 in der Zentromer- (Cen-) sowie der Telomerregion (Tel-) lokalisiert. In der Zentromerregion liegen die Gene für KIR2DS2, KIR2DL2 und KIR2DL3, in der Telomerregion die Gene für KIR3DL1, KIR3DS1, KIR2DS1 und KIR2DS4. Entsprechend der Anzahl an Cen-B oder Tel-B Allelen wird der B-Content Score erhoben, dieser kann Werte von 0 bis 4 annehmen. Dementsprechend ist ein B-Content Score von 0 gleichbedeutend mit KIR Haplotyp A und ein B-Content Score von 1-3 gleichbedeutend mit KIR Haplotyp B [67]. Für die adulte AML konnte eine positive Korrelation des Gesamtüberlebens nach allogener Stammzelltransplantation mit der Höhe des B-Content Scores gezeigt werden, für die adulte ALL galt dies nicht. Dieser Effekt war bei Cen-B/B homozygoten Spendern am deutlichsten [67].

Die pädiatrische ALL steht dem entgegen, in einer Untersuchung von Oevermann et al. war das ereignisfreie Überleben nach 5 Jahren bei Patienten mit KIR Haplotyp B Spendern nach haploidenter Stammzelltransplantation gegenüber Haplotyp A Spendern signifikant überlegen (50,6% vs. 29,5%). Auch war ein hoher B-Content Score (B-Content 3/4) von Vorteil da dieser ebenfalls mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für ein ereignisfreies Überleben einherging als ein niedriger B-Content Score (B-Content 1/2) [202]. Der Grund für die Anwendbarkeit des KIR Genotyping Modells nur bei der pädiatrischen ALL und nicht bei der adulten ALL liegt möglicherweise in der höheren Expression von aktivierenden Liganden auf pädiatrischen ALL Blasten, wodurch die NK-vermittelte Lyse verstärkt wird [171]. Für haploidente Stammzelltransplantationen zur Therapie der pädiatrischen ALL ist das KIR Genotyping Modell für die Spenderauswahl also von Nutzen. Betrachtet man die AML so ist die Anwendung des KIR Genotyping Modell für die

Spenderauswahl von Vorteil sowohl für das Überleben der Patienten nach allogener Stammzelltransplantation vom Fremdspender als auch für Patienten nach haploidenter SZT mit T-Zell-depletiertem Graft [67, 201].

Für Neuroblastome sieht die Studienlage schlechter aus, bis Heute gibt es nur wenige Studien, die sich mit dem KIR Genotyping Modell beim Neuroblastom beschäftigen. In einer Studie von Siebert et al. mit Neuroblastompatienten und ch14.18/CHO Therapie konnte *in vitro* der bedeutende Einfluss des aktivierenden KIR Rezeptors KIR2DS2 auf die Höhe der ADCC gezeigt werden. Gleichzeitig wurde die Bedeutung der Rezeptoraffinität von FCGR2A/3A untersucht, ein hochaffiner Rezeptor war mit einem signifikant längeren Überleben der Patienten unter GD2-Antikörpertherapie mit ch14.18 verbunden. Die Autoren der Studie gehen dabei von Synergieeffekten des hochaffinen FCGR2A/3A Rezeptors und des aktivierenden KIR Rezeptors KIR2DS2 aus [203]. Lee et al. verglichen in einer sehr kleinen Studie mit 7 Neuroblastompatienten nach haploidenter Stammzelltransplantation drei Patienten mit KIR Haplotyp B Spender und vier Patienten mit KIR Haplotyp A. Die Patienten mit Haplotyp B Spendern waren nach 3 Jahren progressionsfrei, während die Patienten mit Haplotyp A Spendern alle progredient waren [204]. Demgegenüber steht eine Arbeit von Venstrom et al. die 169 Patienten nach autologer SZT untersuchten, dabei spielte der KIR Haplotyp keine Rolle für das Gesamtüberleben des Patienten [195]. Die beiden letztgenannten Studien unterscheiden sich allerdings völlig in der Art der Stammzelltransplantation (haploident vs. autolog) und sind somit nicht miteinander vergleichbar.

4.6.4 Licensing Modell

Die Erkennung und Unterscheidung körpereigener von körperfremden Zellen ist die wichtigste Voraussetzung für die Funktion von NK-Zellen und daher ist der Erwerb dieser Fähigkeit ein zentrales Element im Reifungsprozess von NK-Zellen. Ein Teil dieses Reifungsprozesses ist das sog. „Licensing“ von NK-Zellen, dies bezeichnet die *in vivo* Interaktion zwischen körpereigenen HLA Klasse I Liganden und den korrespondierenden KIR Rezeptoren auf der Oberfläche von NK-Zellen während der Maturation. Solcherart mit „Selbst“-HLA

in Kontakt getretene NK-Zellen bezeichnet man als „licensed“ oder „educated“. Bleibt dieser Schritt aus aufgrund fehlender HLA I Liganden sind diese NK-Zellen „unlicensed“ oder „uneducated“ und immunologisch hyporesponsiv [205, 206]. Tarek et al. konnten in einer Studie mit Neuroblastomzelllinien zeigen, dass diese hyporesponsiven unlicensed NK-Zellen durch aktivierende Signale, z.B. im Rahmen der ADCC, rekrutiert werden können und es sogar durch Hochregulierung von HLA Klasse I zu einer stärkeren Alloreaktivität verglichen mit licensed NK-Zellen kommen kann. Denn es scheint als sei die KIR Rezeptor vermittelte Hemmung nach Interaktion mit den entsprechenden HLA I Liganden auf licensed NK-Zellen stärker als bei unlicensed NK-Zellen, wodurch wiederum letztere unter bestimmten Voraussetzungen eine stärkere Alloreaktivität zeigen können als licensed NK-Zellen. Dieser Effekt tritt besonders unter Einfluss einer Antikörpertherapie mit ch14.18 zu Tage, die fehlende Inhibition führt zu einer besseren Aktivierbarkeit der hyporesponsiven NK-Zellen und damit zur Lyse der Targetzellen [97].

In unserer Studie konnten wir keine endgültige Bewertung über das Licensing Modell abgeben, so war einerseits die CD107a Aktivität der unlicensed CD158b Population sowohl von frisch isolierten PBMCs als auch von expandierten NK-Zellen bei Spender 1 signifikant verringert gegenüber den licensed CD158a und CD158e Populationen (Abbildung 3.4.1 & Abbildung 3.4.3), andererseits lag bei Spender 2 nach dem Licensing Modell keine unlicensed NK-Subpopulation vor und trotzdem zeigte die CD158e Population bei den expandierten NK-Zellen gegen alle Zelllinien eine signifikant geringere Aktivität als die anderen Subpopulationen (Abbildung 3.4.7). Die frisch isolierten PBMCs von Spender 2 boten auf Ebene der Subpopulationen keine signifikanten Aktivitätsunterschiede. Entgegen dem von Tarek et al. beschriebenen Mechanismus der Umkehr des Licensing Modells kam es nach Anwendung von ch14.18 nicht zu einer Aktivitätssteigerung der hyporesponsiven CD158b Population von Spender 1 sondern die Verteilung der Aktivität unter den Subpopulationen blieb, wie bereits in Kapitel 4.6.2 beschrieben, gleich. Wie auch von den Autoren der eben genannten Studie stimulierten wir die HLA Klasse I Expression auf den Neuroblastomzelllinien mit IFN γ [97], dabei konnte die zunehmende Bedeutung

des KIR R/L Mismatches und des Licensings mit steigender Höhe der HLA I Expression bestätigt werden (vgl. Kapitel 4.5.1). In diesem Zusammenhang muss noch erwähnt werden, dass sich unser *in vitro* Milieu der NK-Zellexpansion mit dem Zusatz von IL-2 und der Stimulation durch K562mb15-41BBL stark von den *in vivo* Bedingungen der natürlichen NK-Zellreifung unterscheiden, unter denen die Daten von Tarek et al. erhoben wurden [97]. Möglicherweise liegen darin die Unterschiede in unserer Studie bezüglich der NK-Aktivität und der Aktivierbarkeit von „licensed“ vs. „unlicensed“ NK-Zellen begründet. Dagegen spricht allerdings die Tatsache, dass die von uns getesteten frisch isolierten PBMCs nicht stimuliert wurden und somit den natürlichen Reifungsprozess durchgemacht haben, es aber trotzdem zu keiner Umkehr der NK-Alloreaktivität nach Zugabe von ch14.18 kam.

Letztendlich bleibt das Licensing ein höchst komplexer und weiterhin noch nicht zur Gänze verstandener Mechanismus in der Maturation von NK-Zellen für den verschiedenste bekannte und unbekannt Elemente von Bedeutung sind. So hat sich herausgestellt, dass CD158e⁺ NK-Zellen homozygoter Bw4/Bw4 Spender gegenüber heterozygoter Bw4/Bw6 Spender eine stärkere NK-Alloreaktivität zeigen. Mögliche Erklärungen sind Gendosiseffekte auf die Affinität der KIR-Rezeptoren für ihre Liganden und auf das Licensing der NK-Zellen [207]. Analog zu dieser Studie waren auch in unserer Arbeit die CD158e⁺ NK-Zellen des Bw4/Bw4 homozygoten Spenders 1 gegen alle getesteten Zelllinien stärker aktiviert als die CD158e Subpopulation des Bw4/Bw6 heterozygoten Spenders 2.

4.6.4.1 Klinische Anwendung

Das Licensing Modell hat in der klinischen Praxis durchaus Relevanz, jedoch sollte eine abschließende Beurteilung noch zurückhaltend bewertet werden. Tarek et al. konnten in einer Studie mit 242 Neuroblastompatienten die eine Therapie mit dem GD2-Antikörper 3F8 erhielten zeigen, dass diejenigen Patienten mit KIR RL Mismatch und somit unlicensed NK-Zellen für einen bestimmten KIR Rezeptor eine bessere Überlebenschance hatten als Patienten ohne unlicensed NK-Zellen [97]. Aufgrund dieser Ergebnisse musste die Rolle

der unlicensed NK-Zellen bei der Tumorabwehr überdacht werden. Hyporesponsive unlicensed NK-Zellen konnten durch das proinflammatorische Tumormilieu und die Antikörpertherapie ihren Zustand ändern und eine starke Alloreaktivität ausüben. Diese Alloreaktivität konnte sogar, zumindest *in vitro*, die der licensed NK-Zellen übertreffen und dadurch sozusagen zu einer „Umkehr“ des Licensing Modells führen. Dabei konnte vor allem die gesteigerte HLA Klasse I Expression auf den Neuroblastomzellen durch IFN γ diese Umkehr der Verhältnisse verstärken, was durch die vermehrte Hemmung der licensed NK-Zellen bei stärkerer Expression der korrespondierenden HLA I Liganden erklärt werden kann. Ebenso schütten aktivierte NK-Zellen vermehrt IFN γ aus was wiederum auch zu einer Steigerung der HLA I Expression auf Tumorzellen führt. Dieser Mechanismus der Zytokinausschüttung nach NK-Zell Aktivierung und folglich gesteigerter HLA Klasse I Expression ist auch *in vivo* gut möglich, in der Literatur ist ein Zusammenhang zwischen HLA I Expression auf Tumoren und Chemo- bzw. Immuntherapie bereits beschrieben worden [[168](#), [208](#), [209](#)]. Im Falle der autologen SZT überschneiden sich das Licensing Modell und das RL Modell (vgl. Kapitel 4.6.2.1), per definitionem besitzen alle unlicensed NK-Zellen einen RL Mismatch.

4.6.5 Zusammenfassende Beurteilung der Modelle

Alle aufgeführten NK-Alloreaktivitätsmodelle bieten gute Ansätze zur Vorhersage der NK-Alloreaktivität nach Stammzelltransplantation, jedoch hat jedes der Modelle auch seine Schwachstellen und auf der Basis eines einzelnen Modells lässt sich keine allgemeingültige Vorhersage treffen. Der stetige Wissenszuwachs bezüglich der molekularen Mechanismen der NK-Alloreaktivität führte einerseits zur Weiterentwicklung des LL Modells zum RL Modell, andererseits wurden aufgrund neuer Erkenntnisse das KIR Genotyping und das Licensing Modell aufgestellt. Durch diese Entwicklungshistorie der Modelle ist verständlich warum sich die Modelle teilweise stark überschneiden und keines allgemeingültig anwendbar ist [[42](#), [88](#), [90](#), [206](#)].

Das älteste Modell ist das LL Modell und das wichtigste Argument für dieses Modell ist die einfache Anwendung da allein die HLA-Typisierung von Spender

und Empfänger vorliegen muss [42]. Genau aus diesem Grund ist die Anwendbarkeit aber auch eingeschränkt, der Schluss von der HLA Typisierung des Spenders auf dessen KIR Rezeptorausstattung [75] hat sich als nicht präzise genug herausgestellt, denn es gibt Spender die trotz der Expression eines HLA Klasse I Liganden den zugehörigen KIR Rezeptor nicht exprimieren oder umgekehrt [88, 187].

Das RL Modell ist die logische Weiterentwicklung des LL Modells und daher genauer und hat zusätzlich auch im autologen Setting seine Gültigkeit [194]. Beide diese Modelle haben allerdings einen gemeinsamen Schwachpunkt, sie berücksichtigen nur die Expression der HLA I Liganden von Spender und Empfänger auf Genebene. In der vorliegenden Studie wie auch in vorausgegangen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe fanden wir eine Diskrepanz zwischen HLA Genotyp und Immunphänotyp der Tumorzellen, somit ist es ohne Genexpressionsanalyse nicht möglich funktionelle RL Mismatches zu erkennen und zu berücksichtigen [132, 191].

Nach dem Licensing Modell ist für die letztliche NK-Alloreaktivität das Licensing während der Heranreifung der NK-Zellen maßgeblich, allerdings kann die Hyporesponsivität der unlicensed NK-Zellen durch starke aktivierende Signale aufgehoben werden [96, 97, 206]. Bei Spendern mit unlicensed NK-Zellen liegt per definitionem auch ein RL Mismatch vor, dies ist unter anderem beim Einsatz von therapeutischen Antikörpern von Bedeutung [97, 195].

Das KIR Genotyping Modell spielt insbesondere bei der pädiatrischen ALL und der adulten AML eine interessante Rolle, je nach KIR Genotyp des Spenders war ein signifikanter Unterschied bezogen auf den Krankheitsverlauf und das Gesamtüberleben der Patienten zu beobachten [67, 201, 202]. Im Widerspruch zu der Vermutung, dass das Überleben von Patienten nach Transplantation mit KIR Haplotyp B Spendern insgesamt besser ist stehen die Beobachtungen von McQueen et al. die herausfinden konnten, dass die Kombination der Haplotypen von Spender und Empfänger ausschlaggebend für den Krankheitsverlauf ist. In ihrer Studie zeigen die Autoren, dass Patienten mit Haplotyp A, die aber von Spendern mit Haplotyp B transplantiert wurden, durch eine höhere Rate an Rezidiven und akuter GvHD auffielen [90]. Diese

Beobachtung war auffälliger Weise nur bei Patienten zu machen, die HLA C1 homozygot waren und einen Spender mit KIR Haplotyp B hatten. Möglicherweise ist die Ursache dafür die niedrigere Affinität von HLA C1 zum KIR2DL2/3 Rezeptor und eine damit verbundene geringere Hemmung der NK-Zellen im Vergleich zur Interaktion mit HLA C2 [210]. Spender mit KIR Haplotyp B besitzen verschiedene hemmende als auch aktivierende Rezeptoren, die durch HLA C1 nicht oder nur ungenügend inhibiert werden und wodurch das Auftreten einer akuten GvHD gefördert und gleichzeitig die Tumorabwehr geschwächt wird [90]. Im Gegensatz zu Cooley et al. war das Studienkollektiv von McQueen et al. allerdings deutlich kleiner. Für solide Tumoren wie das Neuroblastom sind, vor allem in Bezug auf die haploidente Stammzelltransplantation, erst wenige Studien erschienen und es ist noch viel Forschungsarbeit in diesem Bereich zu leisten.

In allen genannten NK-Alloreaktivitätsmodellen kommen ausschließlich die KIR Rezeptoren als immunologische Einflussfaktoren in Betracht, andere aktivierende Rezeptoren wie etwa NKG2D oder DNAM-1 Rezeptoren werden nicht berücksichtigt. Aber vor allem bei niedrig HLA Klasse I exprimierenden Tumoren wie dem Neuroblastom sind diese aktivierenden Rezeptoren von Bedeutung. Denn die KIR RL Interaktion hat zwar einen nachweisbaren Einfluss auf die NK-Alloreaktivität [41, 211] aber insgesamt scheinen andere Mechanismen die NK-Aktivität zu steuern [131].

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren auf die NK-vermittelte Lyse und ADCC gegenüber 8 Neuroblastomzelllinien gezeigt, dabei hat sich herausgestellt, dass die Lysefähigkeit der NK-Zellen hauptsächlich von Spenderspezifischen Unterschieden bestimmt wird. Insbesondere scheint die Potenz der NK-Zellen über alle Zelllinien hinweg und auch zwischen den Spendern konserviert zu sein, d.h. ein Spender mit „guter“ Lysefähigkeit wird immer eine starke NK-Alloreaktivität zeigen, unabhängig von einem etwaigen KIR RL Mismatch. Im nachfolgenden Bild ist noch einmal die feste Verteilung der Spender am Beispiel der expandierten NK-Zellen dargestellt (s.a. Abbildung 3.9.5).

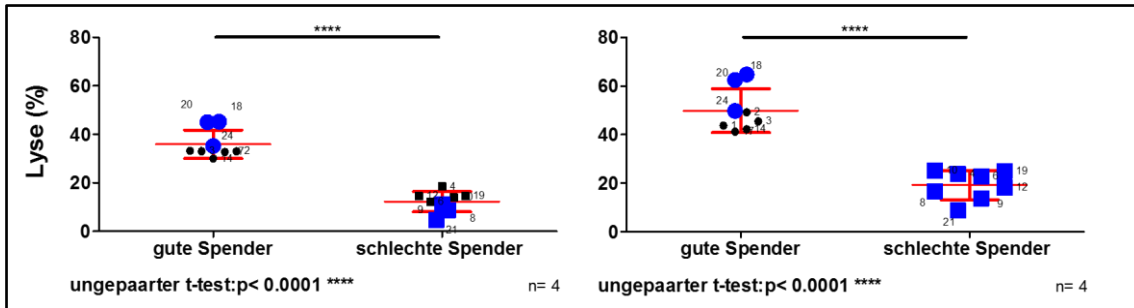


Abbildung 4.6.1 Vergleich der NK-vermittelten Lyse von guten und schlechten Spender nach 48h ohne und mit ch14.18 (E/T 1:1)

Jeweils die besten und die schlechtesten drei Spender sind blau hervorgehoben, diese waren über alle Zelllinien hinweg in diesen Gruppen zu finden.

Diese Beobachtung der konservierten Lysefähigkeit eines Spenders wurde nicht nur über alle Neuroblastomzelllinien hinweg gezeigt, sondern auch für die gänzlich unterschiedliche Tumorentität der kindlichen ALL [199].

Als Fazit lässt sich daraus ziehen, dass bei der Spenderauswahl an erster Stelle ein funktioneller Test stehen sollte, um die allgemeine Lysefähigkeit eines Spenders einzuschätzen und erst nachfolgend das Vorhandensein eines RL Mismatches und des KIR Genotyps. Dieses Prinzip muss noch in weiteren klinischen Studien mit unterschiedlichen Tumorentitäten bestätigt werden, sollte es sich jedoch bewahrheiten würde die Spenderauswahl für die haploidente Stammzelltransplantation stark vereinfacht werden.

4.7 Antitumorale Aktivität von $\gamma\delta$ T-Zellen

Die antitumorale Aktivität von $\gamma\delta$ T-Zellen gegen verschiedenste maligne hämatologische Erkrankungen ist bereits seit längerem bekannt und in zahlreichen Studien für untersucht worden [212-215]. Auch in der Vorliegenden Arbeit ist die Fähigkeit der $\gamma\delta$ T-Zellen zur Lyse von verschiedenen Neuroblastomzelllinien gut zu erkennen (Abbildung 3.10.2), allerdings zeigen die $\gamma\delta$ T-Zellen im Vergleich mit NK-Zellen eine deutlich geringere Gesamtaktivität. Dies steht in Einklang mit vorhergehenden Arbeiten unserer Arbeitsgruppe [216] und auch in der Literatur wurde dies beschrieben [217, 218]. Wie bereits in Kapitel 1.3 beschrieben erkennen $\gamma\delta$ T-Zellen ihre Targets über NKRs wie NKG2D oder DNAM-1 und die entsprechenden Liganden [106,

[107](#), [111-114](#)]. Betrachtet man die ADCC der $\gamma\delta$ T-Zellen so zeigt sich diese ebenfalls deutlich geringer ausgeprägt als bei NK-Zellen (Abbildung 3.10.1). Von entscheidender Bedeutung ist dabei die Höhe der Expression von CD16 auf der Zelloberfläche, da CD16 als Fc-Rezeptor der Effektorzellen über Bindung des Fc-Teils eines Antikörpers letztendlich durch die Ausschüttung von Granzymen und Perforin die Lyse der Zielzelle vermittelt [\[62\]](#). 90% aller im peripheren Blut zirkulierenden NK-Zellen exprimieren CD16 [\[72\]](#), im Vergleich dazu exprimieren nur etwa 27% aller $\gamma\delta$ T-Zellen nach Expansion CD16 [\[218\]](#). Die logische Schlussfolgerung ist, dass die Höhe der CD16 Expression ursächlich für die Stärke der ADCC von Effektorzellen ist, in einer Untersuchung von Seidel et al. konnte dieser Zusammenhang auch bereits aufgezeigt werden [\[218\]](#).

Physiologischerweise sind $\gamma\delta$ T-Zellen und NK-Zellen nie isoliert anzutreffen, daher ist für eine Prognose des *in vivo* Verhaltens die Interaktion zwischen $\gamma\delta$ T-Zellen und NK-Zellen von großem Interesse. Maniar et al. konnten zeigen, dass CD137 eine Schlüsselrolle in der Kommunikation zwischen $\gamma\delta$ T-Zellen und NK-Zellen einnimmt. So führte die Inkubation von $\gamma\delta$ T-Zellen und NK-Zellen mit immobilisiertem humanem IgG1 (hIgG1) zu einer vermehrten Expression von CD137L auf $\gamma\delta$ T-Zellen und CD137 auf NK-Zellen. Die Bindung von CD137L an CD137 führt zu einer gesteigerten Expression von NKG2D auf NK-Zellen und somit zu einer gesteigerten NK-vermittelten Lyse der Tumorzellen [\[219\]](#). Dieser Mechanismus konnte auch in vorhergehenden Arbeiten unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dabei wurden ebenfalls $\gamma\delta$ T-Zellen mit hIgG1 inkubiert und anschließend die NK-Zellaktivität nach Co-Inkubation mit den $\gamma\delta$ T-Zellen im CD107a-Assay gemessen. Im Vergleich zu nicht vorinkubierten $\gamma\delta$ T-Zellen war die Expression von CD107a auf den NK-zellen signifikant gesteigert. Interessanterweise scheinen die $\gamma\delta$ T-Zellen sogar direkt NK-Zellen aktivieren zu können, so war bereits ohne Zugabe von Targetzellen eine erhöhte Expression von verschiedenen Aktivitätsmarkern (CD69, CD54, CD107a) zu messen. Hierbei muss allerdings das Verhältnis zwischen $\gamma\delta$ T-Zellen und NK-Zellen beachtet werden, idealerweise sollte dies 0.125-0.5:1 ($\gamma\delta$ T- zu NK-Zellen)

betragen, ab einem Verhältnis von 4:1 nimmt die CD107a-Expression und Zytokinproduktion der NK-Zellen wieder ab [216, 219].

Im Gegensatz zu $\alpha\beta$ T-Zellen induzieren $\gamma\delta$ T-Zellen keine Graft-vs-Host-Disease da der $\gamma\delta$ T-Zellrezeptor MHC-unabhängig Antigene erkennt, diese bestehen aus einem breiten Spektrum von strukturell unterschiedlichen Molekülen wie z.B. Phosphoantigene, Peptiden und löslichen Proteinen [220] (vgl. Kap. 1.3). In der klinischen Praxis hat sich gezeigt, dass bei pädiatrischen ALL Patienten mit guter $\gamma\delta$ T-Zell Regeneration ($>150/\mu\text{l}$) nach Stammzelltransplantation sowohl die Infektionsrate als auch das Gesamtüberleben signifikant verbessert war als bei Patienten mit niedrigerer $\gamma\delta$ T-Zellzahl ($<150/\mu\text{l}$) [221]. Die TcR $\alpha\beta$ /CD19-Depletion stellt die neueste Entwicklung in der Graft-Manipulation vor Stammzelltransplantation dar, um das Risiko einer akuten oder chronischen GvHD zu minimieren und gleichzeitig den Graft-vs-Leukemia-Effekt, vermittelt von alloreaktiven NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen, zu maximieren [222]. Airoidi et al. konnten im Setting der haploidenten SZT zeigen, dass in den ersten Wochen (d+20 bis d+90) nach SZT $\gamma\delta$ T-Zellen die dominierende T-Zellpopulation sind. Interessanterweise war bei Patienten die kurz nach Transplantation eine CMV-Infektion erlitten die Rekonstitution der $\gamma\delta$ T-Zellen, insbesondere der V δ 1⁺ T-Zellen, um einiges schneller als bei Patienten ohne CMV Reaktivierung [223]. Eine CMV Reaktivierung führt auch zu einer schnelleren Rekonstitution von NK-Zellen nach Stammzelltransplantation [224], in diesem Sinne scheint eine CMV-induzierte Aktivierung von sowohl $\gamma\delta$ T-Zellen als auch NK-Zellen zu einem Überlebensvorteil und geringeren Rückfallrisiko nach Haplo-SZT zu führen [225]. In unserer Studie konzentrierten wir uns auf die Untersuchung der $\gamma\delta$ T-Zellaktivität von unterschiedlichen Spendern sowohl expandierter als auch frisch isolierter $\gamma\delta$ T-Zellen. Letztendlich bestätigt sich auch bei den $\gamma\delta$ T-Zellen was in den vorigen Kapiteln für die NK-Zellen beschrieben wurde. Sowohl expandierte als auch frisch isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen sind ohne Antikörperstimulation mäßig aktiv, lassen sich durch Zugabe von ch14.18 in Abhängigkeit von der GD2-Expression aber gut stimulieren.

5 Zusammenfassung

Beim Neuroblastom handelt es sich um den häufigsten soliden extrakraniellen Tumor im Kindesalter, die Rate an Neuerkrankungen in Deutschland beträgt ca. 120 pro Jahr. Trotz intensiver Therapieschemata mit multimodalen Konzepten haben Patienten mit metastasiertem Tumorstadium oder genetischen Risikofaktoren eine ungünstige Prognose.

Ein multimodales Therapiekonzept bestehend aus (neo-)adjuvanter Chemotherapie, chirurgischer Resektion, MIBG- und Bestrahlungstherapie sowie haploidenter Stammzelltransplantation mit nachfolgender GD2-Antikörpertherapie (Dinutuximab beta ch14.18/CHO) und IL-2 Immunstimulation verbessern das 5 Jahresüberleben von Patienten mit rezidiviertem Neuroblastom Stadium IV (MRD-negativ vor Transplantation) von etwa 20% bei alleiniger haploidenter Stammzelltransplantation auf über 50%. Die entscheidende Rolle für die Verbesserung des Überlebens nimmt die an die haploidente SZT anschließende Therapie mit dem chimären GD2-Antikörper. Die Antikörpervermittelte Rekrutierung von NK-Zellen führt zu einer besseren Rezidivkontrolle da sie minimale, durch die vorhergehende Therapie nicht eradizierte Tumorherde eliminiert.

NK-Zellen sind ein Teil des angeborenen Immunsystems und spielen eine zentrale Rolle in der Abwehr infizierter oder entarteter Zellen. Neuroblastomzellen sind sehr empfänglich für die NK-vermittelte Lyse. Durch den Einsatz von GD2-Antikörpern kann der antitumorale Effekt signifikant gesteigert werden.

Im Fokus der vorliegenden Arbeit lag die Untersuchung des Einflusses aktivierender und inhibierender Rezeptoren auf die *in vitro* Aktivität frisch isolierter PBMC und expandierter NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen gegen 8 verschiedene Neuroblastomzelllinien. Unser Expansionsprotokoll gewährleistete eine qualitativ und quantitativ hochwertige Expansion von NK-Zellen mit stabilem KIR Immunphänotyp. Der KIR Immunphänotyp war die Grundlage für die funktionelle Testung frisch isolierter PBMC und expandierter NK-Zellen in KIR R/L Match und Mismatch Situationen, welche nach allogener und insbesondere

haploidenter Stammzelltransplantationen vorkommen. Dabei wurden die Major KIR Rezeptoren KIR2DL1, KIR2DL2/KIR2DL3 und KIR3DL1 mit ihren korrespondierenden Liganden HLA C1, C2 und Bw4 berücksichtigt. Es konnte eine gesteigerte NK-Aktivität bei KIR RL Mismatch verglichen mit KIR RL Match gezeigt werden. Folglich hat die KIR-HLA I Interaktion einen Einfluss auf die NK-vermittelte Lyse von Neuroblastomzellen. Jedoch war zu beobachten, dass die Aktivität der NK-Zellen stärker von spenderspezifischen Eigenschaften abhängig ist als von einem eventuell vorhandenen KIR RL Mismatch.

Die verschiedenen NK-Alloreaktivitätsmodelle waren nur eingeschränkt geeignet, um eine Vorhersage über die NK-vermittelte Lyse zu treffen. Beim Ligand-Ligand Modell wird ausschließlich anhand der HLA-Genotypisierung von Spender und Empfänger (Hier: Tumorzellen) auf deren KIR Repertoire geschlossen und anhand dessen die Alloreaktivität vorhergesagt. In unserer Untersuchung erwies sich dieses Modell als unzureichend. Ebenfalls war das RL Modell ungenau in der Vorhersage der NK-Alloreaktivität, da bei der Untersuchung des Immunphänotyps der NK-Zellen eine Diskrepanz zwischen HLA-Genotypisierung und der realen Expression der HLA I Liganden auf einigen der Neuroblastomzelllinien auffiel. Folglich sollte neben der HLA-Genotypisierung immer auch eine Untersuchung des HLA I Phänotyps erfolgen, um die NK-Alloreaktivität besser vorhersagen zu können. Jedoch sind aktuell keine Antikörper zur Unterscheidung aller HLA C Untergruppen verfügbar. Daher konnten wir in der vorliegenden Arbeit nur die HLA Gruppe B Liganden mittels Antikörper unterscheiden und untersuchen.

Aktivierende Liganden für die NKG2D und DNAM-1 Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle für die NK-vermittelte Lyse der Neuroblastomzelllinien. Eine Blockade der Rezeptoren führt zu einer signifikant verminderten Lyse. Die Aktivierung der NK-Zellen durch NKG2D/DNAM-1 Liganden scheint im Vergleich zur HLA Klasse I vermittelten Inhibition eine übergeordnete Rolle einzunehmen.

Die Anwendung des therapeutischen Antikörpers ch14.18 bewirkte spenderunabhängig eine signifikante Steigerung der Lyse. Gleichzeitig wird der Einfluss der aktivierenden Liganden auf die NK-vermittelte Lyse durch den

GD2-Antikörper verringert. Dies ist für Patienten mit geringer Expression von aktivierenden Liganden bzw. geringer intrinsischer NK-Aktivität eine gute Nachricht, da sie ebenfalls von einer GD2-Antikörpertherapie profitieren können.

$\gamma\delta$ T-Zellen sind potente Effektorzellen, die sich ebenfalls wie NK-Zellen durch Antikörper stimulieren lassen. Insbesondere die gegenseitige Beeinflussung von $\gamma\delta$ T-Zellen und NK-Zellen ist sowohl *in vitro* als auch *in vivo* von Bedeutung für die Abwehr von maligne entarteten Zellen. Da $\gamma\delta$ T-Zellen im Gegensatz zu $\alpha\beta$ T-Zellen ihre Targetzellen MHC unabhängig erkennen können, lösen sie keine Graft-vs-Host-Disease aus. Dies macht $\gamma\delta$ T-Zellen im Rahmen der allogenen Stammzelltransplantationen besonders interessant.

Abschließend hat sich gezeigt, dass sich die Spender kategorisch in „gute“ und „schlechte“ Spender einteilen lassen. Interessanterweise bleiben diese Kategorien zwischen den einzelnen Zelllinien und sogar bei der gänzlich anderen Tumorentität der kindlichen ALL erhalten. Sollte sich diese Beobachtung in weiteren Untersuchungen bestätigen könnte die Spenderauswahl in der klinischen Praxis stark vereinfacht werden, indem die verfügbaren Spender mittels funktioneller Testung evaluiert und anhand objektiver Effektorfunktion der beste Spender identifiziert werden.

Für die Behandlung solider Tumoren wie dem Neuroblastom sind Immuntherapien ein wichtiger Bestandteil und werden in Zukunft noch weiter an Bedeutung gewinnen. In unserer Arbeit konnten wir einen Einfluss der KIR Rezeptor - HLA Klasse I Interaktion auf die NK-vermittelte Lyse zeigen, jedoch spielt die Expression der aktivierenden Liganden sowie die ADCC durch den therapeutischen GD2-Antikörper ch14.18 eine größere Rolle für die Bekämpfung der Tumorzellen. Darüber hinaus scheinen spenderspezifische Unterschiede die wichtigste Determinante der NK-Aktivität zu sein, d.h. ein „guter“ Spender wird, unabhängig von einem eventuell vorhandenen KIR RL Mismatch, eine gesteigerte Lyse verglichen mit einem „schlechten“ Spender zeigen. Ebenso besitzen $\gamma\delta$ T-Zellen, wenn auch in geringerem Maße als NK-

Zellen, die Fähigkeit zur ADCC und sind somit im Zusammenspiel mit letzteren potente Effektoren in der Bekämpfung von Tumorzellen.

Das Ziel unserer Forschungsarbeit ist die Weiterentwicklung der bestehenden Immuntherapien für das Neuroblastom, um damit das Überleben zu verlängern und therapiebedingte Nebenwirkungen zu reduzieren.

6 Literaturverzeichnis

1. Berthold, F., et al., *Incidence, Survival, and Treatment of Localized and Metastatic Neuroblastoma in Germany 1979-2015*. Paediatr Drugs, 2017. **19**(6): p. 577-593.
2. Brodeur, G.M., et al., *Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment*. J Clin Oncol, 1993. **11**(8): p. 1466-77.
3. He, W.G., et al., *Clinical and biological features of neuroblastic tumors: A comparison of neuroblastoma and ganglioneuroblastoma*. Oncotarget, 2017. **8**(23): p. 37730-37739.
4. Monclair, T., et al., *The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report*. J Clin Oncol, 2009. **27**(2): p. 298-303.
5. Cohn, S.L., et al., *The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report*. J Clin Oncol, 2009. **27**(2): p. 289-97.
6. Seeger, R.C., et al., *Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas*. N Engl J Med, 1985. **313**(18): p. 1111-6.
7. Park, J.R., et al., *Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: neuroblastoma*. Pediatr Blood Cancer, 2013. **60**(6): p. 985-93.
8. Matthay, K.K., et al., *Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group*. N Engl J Med, 1999. **341**(16): p. 1165-73.
9. Weinstein, J.L., H.M. Katzenstein, and S.L. Cohn, *Advances in the diagnosis and treatment of neuroblastoma*. Oncologist, 2003. **8**(3): p. 278-92.
10. Hero, B., et al., *Localized infant neuroblastomas often show spontaneous regression: results of the prospective trials NB95-S and NB97*. J Clin Oncol, 2008. **26**(9): p. 1504-10.
11. Matthay, K.K., et al., *Long-term results for children with high-risk neuroblastoma treated on a randomized trial of myeloablative therapy followed by 13-cis-retinoic acid: a children's oncology group study*. J Clin Oncol, 2009. **27**(7): p. 1007-13.
12. Yu, A.L., et al., *Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma*. N Engl J Med, 2010. **363**(14): p. 1324-34.
13. Yalcin, B., L.C. Kremer, and E.C. van Dalen, *High-dose chemotherapy and autologous haematopoietic stem cell rescue for children with high-risk neuroblastoma*. Cochrane Database Syst Rev, 2015(10): p. CD006301.
14. *Dinutuximab approved for high-risk neuroblastoma*. Cancer Discov, 2015. **5**(6): p. OF5.
15. Maris, J.M., et al., *Neuroblastoma*. Lancet, 2007. **369**(9579): p. 2106-20.
16. Cheresh, D.A., et al., *Disialogangliosides GD2 and GD3 are involved in the attachment of human melanoma and neuroblastoma cells to extracellular matrix proteins*. J Cell Biol, 1986. **102**(3): p. 688-96.
17. Schulz, G., et al., *Detection of ganglioside GD2 in tumor tissues and sera of neuroblastoma patients*. Cancer Res, 1984. **44**(12 Pt 1): p. 5914-20.
18. Wu, Z.L., et al., *Expression of GD2 ganglioside by untreated primary human neuroblastomas*. Cancer Res, 1986. **46**(1): p. 440-3.
19. Lammie, G., et al., *Ganglioside gd(2) expression in the human nervous-system and in neuroblastomas - an immunohistochemical study*. Int J Oncol, 1993. **3**(5): p. 909-15.
20. Cheung, N.K. and M.A. Dyer, *Neuroblastoma: developmental biology, cancer genomics and immunotherapy*. Nat Rev Cancer, 2013. **13**(6): p. 397-411.
21. Kramer, K., et al., *Disialoganglioside GD2 loss following monoclonal antibody therapy is rare in neuroblastoma*. Med Pediatr Oncol, 2001. **36**(1): p. 194-6.
22. Cheung, N.K., et al., *Monoclonal antibodies to a glycolipid antigen on human neuroblastoma cells*. Cancer Res, 1985. **45**(6): p. 2642-9.
23. Mujoo, K., et al., *Functional properties and effect on growth suppression of human neuroblastoma tumors by isotype switch variants of monoclonal antiganglioside GD2 antibody 14.18*. Cancer Res, 1989. **49**(11): p. 2857-61.
24. Siebert, N., et al., *Functional bioassays for immune monitoring of high-risk neuroblastoma patients treated with ch14.18/CHO anti-GD2 antibody*. PLoS One, 2014. **9**(9): p. e107692.

25. Gul, N. and M. van Egmond, *Antibody-Dependent Phagocytosis of Tumor Cells by Macrophages: A Potent Effector Mechanism of Monoclonal Antibody Therapy of Cancer*. *Cancer Res*, 2015. **75**(23): p. 5008-13.
26. Weiskopf, K. and I.L. Weissman, *Macrophages are critical effectors of antibody therapies for cancer*. *MAbs*, 2015. **7**(2): p. 303-10.
27. Yang, R.K. and P.M. Sondel, *Anti-GD2 Strategy in the Treatment of Neuroblastoma*. *Drugs Future*, 2010. **35**(8): p. 665.
28. Saleh, M.N., et al., *Phase I trial of the chimeric anti-GD2 monoclonal antibody ch14.18 in patients with malignant melanoma*. *Hum Antibodies Hybridomas*, 1992. **3**(1): p. 19-24.
29. Mueller, B.M., et al., *Enhancement of antibody-dependent cytotoxicity with a chimeric anti-GD2 antibody*. *J Immunol*, 1990. **144**(4): p. 1382-6.
30. Angheliescu, D.L., et al., *Comparison of pain outcomes between two anti-GD2 antibodies in patients with neuroblastoma*. *Pediatr Blood Cancer*, 2015. **62**(2): p. 224-228.
31. Isaacs, J.D., J. Greenwood, and H. Waldmann, *Therapy with monoclonal antibodies. II. The contribution of Fc gamma receptor binding and the influence of C(H)1 and C(H)3 domains on in vivo effector function*. *J Immunol*, 1998. **161**(8): p. 3862-9.
32. Modak, S., et al., *Monoclonal antibody 8H9 targets a novel cell surface antigen expressed by a wide spectrum of human solid tumors*. *Cancer Res*, 2001. **61**(10): p. 4048-54.
33. Yankelevich, M., et al., *Anti-CD3 x anti-GD2 bispecific antibody redirects T-cell cytolytic activity to neuroblastoma targets*. *Pediatr Blood Cancer*, 2012. **59**(7): p. 1198-205.
34. Matthay, K.K., et al., *Allogeneic versus autologous purged bone marrow transplantation for neuroblastoma: a report from the Childrens Cancer Group*. *J Clin Oncol*, 1994. **12**(11): p. 2382-9.
35. Ciurea, S.O. and U.D. Bayraktar, *"No donor"? Consider a haploidentical transplant*. *Blood Rev*, 2015. **29**(2): p. 63-70.
36. Lv, M., Y. Chang, and X. Huang, *Everyone has a donor: contribution of the Chinese experience to global practice of haploidentical hematopoietic stem cell transplantation*. *Front Med*, 2018.
37. Marabelle, A., et al., *Graft-versus-tumour effect in refractory metastatic neuroblastoma*. *Bone Marrow Transplant*, 2007. **39**(12): p. 809-10.
38. Hirayama, M., et al., *Evidence of graft-versus-tumor effect in refractory metastatic neuroblastoma*. *Transplantation*, 2006. **82**(1): p. 142-4.
39. Kanold, J., et al., *Allogeneic or haploidentical HSCT for refractory or relapsed solid tumors in children: toward a neuroblastoma model*. *Bone Marrow Transplant*, 2008. **42 Suppl 2**: p. S25-30.
40. Illhardt, T., et al., *Haploidentical Stem Cell Transplantation for Refractory/Relapsed Neuroblastoma*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2018. **24**(5): p. 1005-1012.
41. Perez-Martinez, A., et al., *Natural killer cells can exert a graft-vs-tumor effect in haploidentical stem cell transplantation for pediatric solid tumors*. *Exp Hematol*, 2012. **40**(11): p. 882-891 e1.
42. Ruggeri, L., et al., *Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants*. *Science*, 2002. **295**(5562): p. 2097-100.
43. Miller, J.S., et al., *Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer*. *Blood*, 2005. **105**(8): p. 3051-7.
44. Yoon, S.R., et al., *Generation of donor natural killer cells from CD34(+) progenitor cells and subsequent infusion after HLA-mismatched allogeneic hematopoietic cell transplantation: a feasibility study*. *Bone Marrow Transplant*, 2010. **45**(6): p. 1038-46.
45. Pfeiffer, M.M., et al., *IL-15-stimulated CD3/CD19-depleted stem-cell boosts in relapsed pediatric patients after haploidentical SCT*. *Leukemia*, 2012. **26**(11): p. 2435-9.
46. Cho, D., et al., *Cytotoxicity of activated natural killer cells against pediatric solid tumors*. *Clin Cancer Res*, 2010. **16**(15): p. 3901-9.
47. Liu, Y., et al., *Growth and activation of natural killer cells ex vivo from children with neuroblastoma for adoptive cell therapy*. *Clin Cancer Res*, 2013. **19**(8): p. 2132-43.
48. Passweg, J.R., et al., *Purified donor NK-lymphocyte infusion to consolidate engraftment after haploidentical stem cell transplantation*. *Leukemia*, 2004. **18**(11): p. 1835-8.

49. Koehl, U., et al., *Ex vivo expansion of highly purified NK cells for immunotherapy after haploidentical stem cell transplantation in children*. *Klin Padiatr*, 2005. **217**(6): p. 345-50.
50. Eshhar, Z., et al., *Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(2): p. 720-4.
51. Gross, G., T. Waks, and Z. Eshhar, *Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(24): p. 10024-8.
52. Turtle, C.J., et al., *Engineered T cells for anti-cancer therapy*. *Curr Opin Immunol*, 2012. **24**(5): p. 633-9.
53. Sadelain, M., R. Brentjens, and I. Riviere, *The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors*. *Curr Opin Immunol*, 2009. **21**(2): p. 215-23.
54. Brentjens, R.J., et al., *Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias*. *Blood*, 2011. **118**(18): p. 4817-28.
55. Kochenderfer, J.N., et al., *Donor-derived CD19-targeted T cells cause regression of malignancy persisting after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. *Blood*, 2013. **122**(25): p. 4129-39.
56. Pule, M.A., et al., *Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma*. *Nat Med*, 2008. **14**(11): p. 1264-70.
57. Singh, N., et al., *Nature of tumor control by permanently and transiently modified GD2 chimeric antigen receptor T cells in xenograft models of neuroblastoma*. *Cancer Immunol Res*, 2014. **2**(11): p. 1059-70.
58. Kannan, G.S., A. Aquino-Lopez, and D.A. Lee, *Natural killer cells in malignant hematology: A primer for the non-immunologist*. *Blood Rev*, 2017. **31**(2): p. 1-10.
59. Vivier, E., et al., *Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells*. *Science*, 2011. **331**(6013): p. 44-9.
60. Caligiuri, M.A., *Human natural killer cells*. *Blood*, 2008. **112**(3): p. 461-9.
61. Smyth, M.J., et al., *Activation of NK cell cytotoxicity*. *Mol Immunol*, 2005. **42**(4): p. 501-10.
62. Lanier, L.L., J.J. Ruitenberg, and J.H. Phillips, *Functional and biochemical analysis of CD16 antigen on natural killer cells and granulocytes*. *J Immunol*, 1988. **141**(10): p. 3478-85.
63. Romain, G., et al., *Antibody Fc engineering improves frequency and promotes kinetic boosting of serial killing mediated by NK cells*. *Blood*, 2014. **124**(22): p. 3241-9.
64. Karre, K., et al., *Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy*. *Nature*, 1986. **319**(6055): p. 675-8.
65. Cheng, M., et al., *NK cell-based immunotherapy for malignant diseases*. *Cell Mol Immunol*, 2013. **10**(3): p. 230-52.
66. Cooley, S., et al., *Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia*. *Blood*, 2009. **113**(3): p. 726-32.
67. Cooley, S., et al., *Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia*. *Blood*, 2010. **116**(14): p. 2411-9.
68. O'Sullivan, T.E., J.C. Sun, and L.L. Lanier, *Natural Killer Cell Memory*. *Immunity*, 2015. **43**(4): p. 634-45.
69. Fu, B., Z. Tian, and H. Wei, *Subsets of human natural killer cells and their regulatory effects*. *Immunology*, 2014. **141**(4): p. 483-9.
70. Kimura, M.Y. and T. Nakayama, *Differentiation of NK1 and NK2 cells*. *Crit Rev Immunol*, 2005. **25**(5): p. 361-74.
71. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri, *The biology of human natural killer-cell subsets*. *Trends Immunol*, 2001. **22**(11): p. 633-40.
72. Cooper, M.A., et al., *Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset*. *Blood*, 2001. **97**(10): p. 3146-51.

73. Cheent, K. and S.I. Khakoo, *Natural killer cells: integrating diversity with function*. Immunology, 2009. **126**(4): p. 449-57.
74. Farag, S.S. and M.A. Caligiuri, *Human natural killer cell development and biology*. Blood Rev, 2006. **20**(3): p. 123-37.
75. Leung, W., *Use of NK cell activity in cure by transplant*. Br J Haematol, 2011. **155**(1): p. 14-29.
76. Handgretinger, R., P. Lang, and M.C. Andre, *Exploitation of natural killer cells for the treatment of acute leukemia*. Blood, 2016. **127**(26): p. 3341-9.
77. Kulkarni, S., M.P. Martin, and M. Carrington, *The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease*. Semin Immunol, 2008. **20**(6): p. 343-52.
78. Aribi, M., *Introductory Chapter: A Brief Overview on Natural Killer Cells*. 2017.
79. Robinson, J., et al., *IPD--the Immuno Polymorphism Database*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(Database issue): p. D523-6.
80. Vilches, C. and P. Parham, *KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 217-51.
81. Bryceson, Y.T., et al., *Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells*. Immunol Rev, 2006. **214**: p. 73-91.
82. Rajagopalan, S. and E.O. Long, *Understanding how combinations of HLA and KIR genes influence disease*. J Exp Med, 2005. **201**(7): p. 1025-9.
83. de Smith, A.J., et al., *The role of KIR genes and their cognate HLA class I ligands in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 2014. **123**(16): p. 2497-503.
84. Stern-Ginossar, N. and O. Mandelboim, *An integrated view of the regulation of NKG2D ligands*. Immunology, 2009. **128**(1): p. 1-6.
85. Bottino, C., et al., *Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule*. J Exp Med, 2003. **198**(4): p. 557-67.
86. Shibuya, K., et al., *Physical and functional association of LFA-1 with DNAM-1 adhesion molecule*. Immunity, 1999. **11**(5): p. 615-23.
87. Radaev, S., et al., *The structure of a human type III Fc γ receptor in complex with Fc*. J Biol Chem, 2001. **276**(19): p. 16469-77.
88. Leung, W., et al., *Determinants of antileukemia effects of allogeneic NK cells*. J Immunol, 2004. **172**(1): p. 644-50.
89. Gagne, K., et al., *Relevance of KIR gene polymorphisms in bone marrow transplantation outcome*. Hum Immunol, 2002. **63**(4): p. 271-80.
90. McQueen, K.L., et al., *Donor-recipient combinations of group A and B KIR haplotypes and HLA class I ligand affect the outcome of HLA-matched, sibling donor hematopoietic cell transplantation*. Hum Immunol, 2007. **68**(5): p. 309-23.
91. Uhrberg, M., et al., *Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes*. Immunity, 1997. **7**(6): p. 753-63.
92. Moesta, A.K., et al., *Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand-binding site makes KIR2DL2 a stronger receptor for HLA-C than KIR2DL3*. J Immunol, 2008. **180**(6): p. 3969-79.
93. Yawata, M., et al., *MHC class I-specific inhibitory receptors and their ligands structure diverse human NK-cell repertoires toward a balance of missing self-response*. Blood, 2008. **112**(6): p. 2369-80.
94. Brodin, P., K. Karre, and P. Hoglund, *NK cell education: not an on-off switch but a tunable rheostat*. Trends Immunol, 2009. **30**(4): p. 143-9.
95. Germain, R.N., *An innately interesting decade of research in immunology*. Nat Med, 2004. **10**(12): p. 1307-20.
96. Orr, M.T., W.J. Murphy, and L.L. Lanier, *'Unlicensed' natural killer cells dominate the response to cytomegalovirus infection*. Nat Immunol, 2010. **11**(4): p. 321-7.
97. Tarek, N., et al., *Unlicensed NK cells target neuroblastoma following anti-GD2 antibody treatment*. J Clin Invest, 2012. **122**(9): p. 3260-70.
98. Bank, I., et al., *A functional T3 molecule associated with a novel heterodimer on the surface of immature human thymocytes*. Nature, 1986. **322**(6075): p. 179-81.

99. Vantourout, P. and A. Hayday, *Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(2): p. 88-100.
100. Silva-Santos, B., K. Serre, and H. Norell, *gammadelta T cells in cancer*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(11): p. 683-91.
101. Toulon, A., et al., *A role for human skin-resident T cells in wound healing*. J Exp Med, 2009. **206**(4): p. 743-50.
102. Kazen, A.R. and E.J. Adams, *Evolution of the V, D, and J gene segments used in the primate gammadelta T-cell receptor reveals a dichotomy of conservation and diversity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(29): p. E332-40.
103. Chen, Z.W., *Immune biology of Ag-specific gammadelta T cells in infections*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(14): p. 2409-17.
104. Gober, H.J., et al., *Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells*. J Exp Med, 2003. **197**(2): p. 163-8.
105. 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*. J Immunol, 2010. **184**(6): p. 3260-8.
106. Correia, D.V., A. Lopes, and B. Silva-Santos, *Tumor cell recognition by gammadelta T lymphocytes: T-cell receptor vs. NK-cell receptors*. Oncoimmunology, 2013. **2**(1): p. e22892.
107. Rincon-Orozco, B., et al., *Activation of V gamma 9V delta 2 T cells by NKG2D*. J Immunol, 2005. **175**(4): p. 2144-51.
108. Martin, B., et al., *Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals*. Immunity, 2009. **31**(2): p. 321-30.
109. Skeen, M.J. and H.K. Ziegler, *Activation of gamma delta T cells for production of IFN-gamma is mediated by bacteria via macrophage-derived cytokines IL-1 and IL-12*. J Immunol, 1995. **154**(11): p. 5832-41.
110. 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*. J Immunol, 2001. **166**(12): p. 7190-9.
111. Groh, V., et al., *Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells*. Science, 1998. **279**(5357): p. 1737-40.
112. Kong, Y., et al., *The NKG2D ligand ULBP4 binds to TCRgamma9/delta2 and induces cytotoxicity to tumor cells through both TCRgammadelta and NKG2D*. Blood, 2009. **114**(2): p. 310-7.
113. Poggi, A., et al., *Vdelta1 T lymphocytes from B-CLL patients recognize ULBP3 expressed on leukemic B cells and up-regulated by trans-retinoic acid*. Cancer Res, 2004. **64**(24): p. 9172-9.
114. Catellani, S., et al., *Expansion of Vdelta1 T lymphocytes producing IL-4 in low-grade non-Hodgkin lymphomas expressing UL-16-binding proteins*. Blood, 2007. **109**(5): p. 2078-85.
115. 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): p. 4013-6.
116. Moser, B. and M. Brandes, *Gammadelta T cells: an alternative type of professional APC*. Trends Immunol, 2006. **27**(3): p. 112-8.
117. Brandes, M., et al., *Cross-presenting human gammadelta T cells induce robust CD8+ alphabeta T cell responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(7): p. 2307-12.
118. Deetz, C.O., 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*. Infect Immun, 2006. **74**(8): p. 4505-11.
119. Wesch, D., et al., *Direct costimulatory effect of TLR3 ligand poly(I:C) on human gamma delta T lymphocytes*. J Immunol, 2006. **176**(3): p. 1348-54.
120. Bandrowski, A.E. and M.E. Martone, *RRIDs: A Simple Step toward Improving Reproducibility through Rigor and Transparency of Experimental Methods*. Neuron, 2016. **90**(3): p. 434-6.
121. Matela, M., *In vitro Untersuchung der Alloreaktivität von NK-Einzelzellklonen gegenüber Neuroblastomzelllinien unter Berücksichtigung des KIR-Rezeptor-Ligand-Modells*. 2018, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

122. Boyum, A., *Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g.* Scand J Clin Lab Invest Suppl, 1968. **97**: p. 77-89.
123. Overton, W.R., *Modified histogram subtraction technique for analysis of flow cytometry data.* Cytometry, 1988. **9**(6): p. 619-26.
124. Ponzoni, M., et al., *Uncoordinate induction and differential regulation of HLA class-I and class-II expression by gamma-interferon in differentiating human neuroblastoma cells.* Int J Cancer, 1993. **55**(5): p. 817-23.
125. Kaskova, Z.M., A.S. Tsarkova, and I.V. Yampolsky, *1001 lights: luciferins, luciferases, their mechanisms of action and applications in chemical analysis, biology and medicine.* Chem Soc Rev, 2016. **45**(21): p. 6048-6077.
126. Gates, B.J. and M. DeLuca, *The production of oxyluciferin during the firefly luciferase light reaction.* Arch Biochem Biophys, 1975. **169**(2): p. 616-21.
127. Zhang, Y., et al., *ABCG2/BCRP expression modulates D-Luciferin based bioluminescence imaging.* Cancer Res, 2007. **67**(19): p. 9389-97.
128. Ke, N., et al., *The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability.* Methods Mol Biol, 2011. **740**: p. 33-43.
129. Chiossone, L., et al., *Natural killer cell immunotherapies against cancer: checkpoint inhibitors and more.* Semin Immunol, 2017. **31**: p. 55-63.
130. Vivier, E., et al., *Functions of natural killer cells.* Nat Immunol, 2008. **9**(5): p. 503-10.
131. Bottino, C., et al., *Natural killer cells and neuroblastoma: tumor recognition, escape mechanisms, and possible novel immunotherapeutic approaches.* Front Immunol, 2014. **5**: p. 56.
132. Garrido, F., et al., *Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours.* Immunol Today, 1997. **18**(2): p. 89-95.
133. Raulet, D.H., et al., *Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor.* Annu Rev Immunol, 2013. **31**: p. 413-41.
134. Atkins, D., et al., *Down-regulation of HLA class I antigen processing molecules: an immune escape mechanism of renal cell carcinoma?* J Urol, 2004. **171**(2 Pt 1): p. 885-9.
135. Vitale, M., et al., *Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function.* Eur J Immunol, 2014. **44**(6): p. 1582-92.
136. Aptsiauri, N., F. Ruiz-Cabello, and F. Garrido, *The transition from HLA-I positive to HLA-I negative primary tumors: the road to escape from T-cell responses.* Curr Opin Immunol, 2018. **51**: p. 123-132.
137. Hinrichs, C.S. and N.P. Restifo, *Reassessing target antigens for adoptive T-cell therapy.* Nat Biotechnol, 2013. **31**(11): p. 999-1008.
138. Svennerholm, L., et al., *Gangliosides and allied glycosphingolipids in human peripheral nerve and spinal cord.* Biochim Biophys Acta, 1994. **1214**(2): p. 115-23.
139. Bryceson, Y.T., et al., *Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion.* Blood, 2006. **107**(1): p. 159-66.
140. Gennari, R., et al., *Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumors overexpressing HER2.* Clin Cancer Res, 2004. **10**(17): p. 5650-5.
141. Laurent, S., et al., *The engagement of CTLA-4 on primary melanoma cell lines induces antibody-dependent cellular cytotoxicity and TNF-alpha production.* J Transl Med, 2013. **11**: p. 108.
142. Marechal, R., et al., *Putative contribution of CD56 positive cells in cetuximab treatment efficacy in first-line metastatic colorectal cancer patients.* BMC Cancer, 2010. **10**: p. 340.
143. Wang, W., et al., *NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy.* Front Immunol, 2015. **6**: p. 368.
144. Yamane, B.H., et al., *The development of antibody-IL-2 based immunotherapy with hu14.18-IL2 (EMD-273063) in melanoma and neuroblastoma.* Expert Opin Investig Drugs, 2009. **18**(7): p. 991-1000.
145. Aixinjueluo, W., et al., *Mechanisms for the apoptosis of small cell lung cancer cells induced by anti-GD2 monoclonal antibodies: roles of anoikis.* J Biol Chem, 2005. **280**(33): p. 29828-36.

146. Godfrey, D.I., et al., *NKT cells: what's in a name?* Nat Rev Immunol, 2004. **4**(3): p. 231-7.
147. Schmidt-Wolf, I.G., et al., *Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity.* J Exp Med, 1991. **174**(1): p. 139-49.
148. Schmeel, L.C., et al., *Cytokine-induced killer (CIK) cells in cancer immunotherapy: report of the international registry on CIK cells (IRCC).* J Cancer Res Clin Oncol, 2015. **141**(5): p. 839-49.
149. Marin, V., et al., *Cytokine-induced killer cells for cell therapy of acute myeloid leukemia: improvement of their immune activity by expression of CD33-specific chimeric receptors.* Haematologica, 2010. **95**(12): p. 2144-52.
150. Wang, M., et al., *Adoptive immunotherapy of cytokine-induced killer cell therapy in the treatment of non-small cell lung cancer.* PLoS One, 2014. **9**(11): p. e112662.
151. Wang, X., et al., *Membrane-bound interleukin-21 and CD137 ligand induce functional human natural killer cells from peripheral blood mononuclear cells through STAT-3 activation.* Clin Exp Immunol, 2013. **172**(1): p. 104-12.
152. Peragine, N., et al., *Immunophenotypic and functional characterization of ex vivo expanded natural killer cells for clinical use in acute lymphoblastic leukemia patients.* Cancer Immunol Immunother, 2015. **64**(2): p. 201-11.
153. Horrer, A., *In vitro Untersuchung antileukämischer NK-Zell Subpopulationen auf ihre Lysefähigkeit gegenüber primärer pädiatrischer BPC-ALL Blasten.* 2015, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
154. Fujisaki, H., et al., *Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy.* Cancer Res, 2009. **69**(9): p. 4010-7.
155. Fehniger, T.A., et al., *CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity.* Blood, 2003. **101**(8): p. 3052-7.
156. Acosta, S., et al., *Comprehensive characterization of neuroblastoma cell line subtypes reveals bilineage potential similar to neural crest stem cells.* BMC Dev Biol, 2009. **9**: p. 12.
157. Raffaghello, L., et al., *Downregulation and/or release of NKG2D ligands as immune evasion strategy of human neuroblastoma.* Neoplasia, 2004. **6**(5): p. 558-68.
158. Fionda, C., et al., *NKG2D and DNAM-1 Ligands: Molecular Targets for NK Cell-Mediated Immunotherapeutic Intervention in Multiple Myeloma.* Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 178698.
159. Pende, D., et al., *Analysis of the receptor-ligand interactions in the natural killer-mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias: evidence for the involvement of the Poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112).* Blood, 2005. **105**(5): p. 2066-73.
160. Carlsten, M., et al., *DNAX accessory molecule-1 mediated recognition of freshly isolated ovarian carcinoma by resting natural killer cells.* Cancer Res, 2007. **67**(3): p. 1317-25.
161. Morgado, S., et al., *NK cell recognition and killing of melanoma cells is controlled by multiple activating receptor-ligand interactions.* J Innate Immun, 2011. **3**(4): p. 365-73.
162. Garg, T.K., et al., *Highly activated and expanded natural killer cells for multiple myeloma immunotherapy.* Haematologica, 2012. **97**(9): p. 1348-56.
163. Swann, J.B. and M.J. Smyth, *Immune surveillance of tumors.* J Clin Invest, 2007. **117**(5): p. 1137-46.
164. Campoli, M., C.C. Chang, and S. Ferrone, *HLA class I antigen loss, tumor immune escape and immune selection.* Vaccine, 2002. **20 Suppl 4**: p. A40-5.
165. Whelan, J.P., J. Chatten, and L.A. Lampson, *HLA class I and beta 2-microglobulin expression in frozen and formaldehyde-fixed paraffin sections of neuroblastoma tumors.* Cancer Res, 1985. **45**(11 Pt 2): p. 5976-83.
166. Wolf, M., et al., *Expression of MHC class I, MHC class II, and cancer germline antigens in neuroblastoma.* Cancer Immunol Immunother, 2005. **54**(4): p. 400-6.
167. Jonges, L.E., et al., *NK cells modulate MHC class I expression on tumor cells and their susceptibility to lysis.* Immunobiology, 2000. **202**(4): p. 326-38.

168. Neal, Z.C., et al., *NXS2 murine neuroblastomas express increased levels of MHC class I antigens upon recurrence following NK-dependent immunotherapy*. *Cancer Immunol Immunother*, 2004. **53**(1): p. 41-52.
169. Pfeiffer, M., et al., *Intensity of HLA class I expression and KIR-mismatch determine NK-cell mediated lysis of leukaemic blasts from children with acute lymphatic leukaemia*. *Br J Haematol*, 2007. **138**(1): p. 97-100.
170. Schlegel, P., et al., *NKG2D Signaling Leads to NK Cell Mediated Lysis of Childhood AML*. *J Immunol Res*, 2015. **2015**: p. 473175.
171. Torelli, G.F., et al., *Recognition of adult and pediatric acute lymphoblastic leukemia blasts by natural killer cells*. *Haematologica*, 2014. **99**(7): p. 1248-54.
172. Holmes, T.D., et al., *A human NK cell activation/inhibition threshold allows small changes in the target cell surface phenotype to dramatically alter susceptibility to NK cells*. *J Immunol*, 2011. **186**(3): p. 1538-45.
173. Pende, D., et al., *Major histocompatibility complex class I-related chain A and UL16-binding protein expression on tumor cell lines of different histotypes: analysis of tumor susceptibility to NKG2D-dependent natural killer cell cytotoxicity*. *Cancer Res*, 2002. **62**(21): p. 6178-86.
174. Chang, C.H., et al., *The activation of major histocompatibility complex class I genes by interferon regulatory factor-1 (IRF-1)*. *Immunogenetics*, 1992. **35**(6): p. 378-84.
175. Zaidi, M.R. and G. Merlino, *The two faces of interferon-gamma in cancer*. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(19): p. 6118-24.
176. Miller, C.H., S.G. Maher, and H.A. Young, *Clinical Use of Interferon-gamma*. *Ann N Y Acad Sci*, 2009. **1182**: p. 69-79.
177. Du, X., et al., *Differential cellular internalization of anti-CD19 and -CD22 immunotoxins results in different cytotoxic activity*. *Cancer Res*, 2008. **68**(15): p. 6300-5.
178. Telerman, A., et al., *Internalization of human T lymphocyte receptors*. *Eur J Immunol*, 1987. **17**(7): p. 991-7.
179. Velders, M.P., et al., *The impact of antigen density and antibody affinity on antibody-dependent cellular cytotoxicity: relevance for immunotherapy of carcinomas*. *Br J Cancer*, 1998. **78**(4): p. 478-83.
180. Lee, H.R., et al., *Expansion of cytotoxic natural killer cells using irradiated autologous peripheral blood mononuclear cells and anti-CD16 antibody*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 11075.
181. Dijkhuis, A.J., et al., *Differential expression of sphingolipids in P-glycoprotein or multidrug resistance-related protein 1 expressing human neuroblastoma cell lines*. *FEBS Lett*, 2003. **548**(1-3): p. 28-32.
182. Craddock, J.A., et al., *Enhanced tumor trafficking of GD2 chimeric antigen receptor T cells by expression of the chemokine receptor CCR2b*. *J Immunother*, 2010. **33**(8): p. 780-8.
183. Eleme, K., et al., *Cell surface organization of stress-inducible proteins ULBP and MICA that stimulate human NK cells and T cells via NKG2D*. *J Exp Med*, 2004. **199**(7): p. 1005-10.
184. Kloess, S., et al., *IL-2-activated haploidentical NK cells restore NKG2D-mediated NK-cell cytotoxicity in neuroblastoma patients by scavenging of plasma MICA*. *Eur J Immunol*, 2010. **40**(11): p. 3255-67.
185. Castriconi, R., et al., *Natural killer cell-mediated killing of freshly isolated neuroblastoma cells: critical role of DNAX accessory molecule-1-poliovirus receptor interaction*. *Cancer Res*, 2004. **64**(24): p. 9180-4.
186. Campadelli-Fiume, G., et al., *The novel receptors that mediate the entry of herpes simplex viruses and animal alphaherpesviruses into cells*. *Rev Med Virol*, 2000. **10**(5): p. 305-19.
187. Hsu, K.C., et al., *Improved outcome in HLA-identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukemia predicted by KIR and HLA genotypes*. *Blood*, 2005. **105**(12): p. 4878-84.
188. Ruggeri, L., et al., *Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation*. *Blood*, 1999. **94**(1): p. 333-9.
189. Ruggeri, L., et al., *Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value*. *Blood*, 2007. **110**(1): p. 433-40.

190. Davies, S.M., et al., *Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatched unrelated donor hematopoietic transplants. Killer immunoglobulin-like receptor*. Blood, 2002. **100**(10): p. 3825-7.
191. Hicklin, D.J., F.M. Marincola, and S. Ferrone, *HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story*. Mol Med Today, 1999. **5**(4): p. 178-86.
192. Leung, W., et al., *Inhibitory KIR-HLA receptor-ligand mismatch in autologous haematopoietic stem cell transplantation for solid tumour and lymphoma*. Br J Cancer, 2007. **97**(4): p. 539-42.
193. Delgado, D., et al., *KIR receptor-ligand incompatibility predicts killing of osteosarcoma cell lines by allogeneic NK cells*. Pediatr Blood Cancer, 2010. **55**(7): p. 1300-5.
194. Venstrom, J.M., et al., *Lack of HLA Class I Ligands for Autologous Inhibitory KIR Is Associated with Improved Survival Following Autologous Stem Cell Transplant for Children with Neuroblastoma*. Blood, 2008. **112**(11): p. 3322.
195. Venstrom, J.M., et al., *KIR and HLA genotypes are associated with disease progression and survival following autologous hematopoietic stem cell transplantation for high-risk neuroblastoma*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(23): p. 7330-4.
196. Du, J., et al., *CALGB 150905 (Alliance): rituximab broadens the antilymphoma response by activating unlicensed NK cells*. Cancer Immunol Res, 2014. **2**(9): p. 878-89.
197. Yu, J., et al., *Breaking tolerance to self, circulating natural killer cells expressing inhibitory KIR for non-self HLA exhibit effector function after T cell-depleted allogeneic hematopoietic cell transplantation*. Blood, 2009. **113**(16): p. 3875-84.
198. Middleton, D. and F. Gonzelez, *The extensive polymorphism of KIR genes*. Immunology, 2010. **129**(1): p. 8-19.
199. Wiedenmann, M., *In vitro Untersuchung spenderspezifischer Unterschiede in der antileukämischen Lysefähigkeit von NK-Zellen gegenüber pädiatrischer B-Zell-Leukämien mit und ohne CD19-Antikörper*. 2020, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
200. Ciurea, S.O. and R.E. Champlin, *Donor selection in T cell-replete haploidentical hematopoietic stem cell transplantation: knowns, unknowns, and controversies*. Biol Blood Marrow Transplant, 2013. **19**(2): p. 180-4.
201. Michaelis, S.U., et al., *KIR haplotype B donors but not KIR-ligand mismatch result in a reduced incidence of relapse after haploidentical transplantation using reduced intensity conditioning and CD3/CD19-depleted grafts*. Ann Hematol, 2014. **93**(9): p. 1579-86.
202. Oevermann, L., et al., *KIR B haplotype donors confer a reduced risk for relapse after haploidentical transplantation in children with ALL*. Blood, 2014. **124**(17): p. 2744-7.
203. Siebert, N., et al., *Neuroblastoma patients with high-affinity FCGR2A, -3A and stimulatory KIR 2DS2 treated by long-term infusion of anti-GD2 antibody ch14.18/CHO show higher ADCC levels and improved event-free survival*. Oncoimmunology, 2016. **5**(11): p. e1235108.
204. Lee, J.W., et al., *Incorporation of high-dose (131) I-metaiodobenzylguanidine treatment into killer immunoglobulin-like receptor/HLA-ligand mismatched haploidentical stem cell transplantation for children with neuroblastoma who failed tandem autologous stem cell transplantation*. Pediatr Blood Cancer, 2017. **64**(6).
205. Anfossi, N., et al., *Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I*. Immunity, 2006. **25**(2): p. 331-42.
206. Kim, S., et al., *Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules*. Nature, 2005. **436**(7051): p. 709-13.
207. Kim, S., et al., *HLA alleles determine differences in human natural killer cell responsiveness and potency*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(8): p. 3053-8.
208. Vertuani, S., et al., *Retinoids act as multistep modulators of the major histocompatibility class I presentation pathway and sensitize neuroblastomas to cytotoxic lymphocytes*. Cancer Res, 2003. **63**(22): p. 8006-13.
209. Favrot, M.C., et al., *Expression of leucocyte adhesion molecules on 66 clinical neuroblastoma specimens*. Int J Cancer, 1991. **48**(4): p. 502-10.

210. Ahlenstiel, G., et al., *Distinct KIR/HLA compound genotypes affect the kinetics of human antiviral natural killer cell responses*. J Clin Invest, 2008. **118**(3): p. 1017-26.
211. de Witte, M.A., et al., *Early Reconstitution of NK and gammadelta T Cells and Its Implication for the Design of Post-Transplant Immunotherapy*. Biol Blood Marrow Transplant, 2018. **24**(6): p. 1152-1162.
212. Kunzmann, V., et al., *Tumor-promoting versus tumor-antagonizing roles of gammadelta T cells in cancer immunotherapy: results from a prospective phase I/II trial*. J Immunother, 2012. **35**(2): p. 205-13.
213. Lamb, L.S., Jr., et al., *Human gammadelta(+) T lymphocytes have in vitro graft vs leukemia activity in the absence of an allogeneic response*. Bone Marrow Transplant, 2001. **27**(6): p. 601-6.
214. Saitoh, A., et al., *Anti-tumor cytotoxicity of gammadelta T cells expanded from peripheral blood cells of patients with myeloma and lymphoma*. Med Oncol, 2008. **25**(2): p. 137-47.
215. Wilhelm, M., et al., *Gammadelta T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies*. Blood, 2003. **102**(1): p. 200-6.
216. Schilling, A., *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 Stammzelltransplantation*. 2019.
217. Fisch, P., et al., *Gamma/delta T cell clones and natural killer cell clones mediate distinct patterns of non-major histocompatibility complex-restricted cytotoxicity*. J Exp Med, 1990. **171**(5): p. 1567-79.
218. Seidel, U.J., et al., *gammadelta T Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity with CD19 Antibodies Assessed by an Impedance-Based Label-Free Real-Time Cytotoxicity Assay*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 618.
219. Maniar, A., et al., *Human gammadelta T lymphocytes induce robust NK cell-mediated antitumor cytotoxicity through CD137 engagement*. Blood, 2010. **116**(10): p. 1726-33.
220. Minculescu, L. and H. Sengelov, *The role of gamma delta T cells in haematopoietic stem cell transplantation*. Scand J Immunol, 2015. **81**(6): p. 459-68.
221. 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*. Biol Blood Marrow Transplant, 2015. **21**(1): p. 130-6.
222. Locatelli, F., et al., *Negative depletion of alpha/beta+ T cells and of CD19+ B lymphocytes: a novel frontier to optimize the effect of innate immunity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation*. Immunol Lett, 2013. **155**(1-2): p. 21-3.
223. Airoidi, I., et al., *gammadelta T-cell reconstitution after HLA-haploidentical hematopoietic transplantation depleted of TCR-alpha/beta+/CD19+ lymphocytes*. Blood, 2015. **125**(15): p. 2349-58.
224. Della Chiesa, M., et al., *Human cytomegalovirus infection promotes rapid maturation of NK cells expressing activating killer Ig-like receptor in patients transplanted with NKG2C-/- umbilical cord blood*. J Immunol, 2014. **192**(4): p. 1471-9.
225. Elmaagacli, A.H., et al., *Early human cytomegalovirus replication after transplantation is associated with a decreased relapse risk: evidence for a putative virus-versus-leukemia effect in acute myeloid leukemia patients*. Blood, 2011. **118**(5): p. 1402-12.

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 Die wichtigsten aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren und ihre Liganden.	17
Tabelle 2.1 Zelllinien	35
Tabelle 2.2 Neuroblastomzelllinien.....	36
Tabelle 2.3 Kultur der adhärennten Zelllinien	39
Tabelle 3.1 HLA-I Allele der verwendeten Tumorzelllinien	62
Tabelle 4.1 Mismatch-Situation der Neuroblastomzelllinien.....	133

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.2.1 Die Entwicklung menschlicher NK-Zellen	15
Abbildung 1.2.2 NK-Zell Rezeptoren und deren Liganden.....	16
Abbildung 1.2.3 Proteinstruktur aktivierender und inhibierender KIR-Rezeptoren	19
Abbildung 1.2.4 Möglichkeiten der NK-Alloreaktivität	23
Abbildung 2.15.1 Pipettierschema für Luciferase-Assay.....	54
Abbildung 3.1.1 Die durchschnittliche Zellzahl der NK-Expansionen.....	58
Abbildung 3.1.2 Der durchschnittliche prozentuale Anteil von Lymphozyten und LUC an allen gemessenen Zellen	59
Abbildung 3.1.3 Veränderung der CD56 ⁺ /CD3 ⁻ Population vor und nach Expansion.....	60
Abbildung 3.1.4 Prozentualer Anteil der NK-Zellen vor und nach Expansion...	61
Abbildung 3.2.1 Semiquantitative Bestimmung der GD2-Expression der Tumorzellen.....	62
Abbildung 3.2.2 Semiquantitative Darstellung der aktivierenden/inhibierenden Liganden.....	63
Abbildung 3.3.1 NK-vermittelte Lyse von 4 Spendern vs LAN-1 ohne/mit ch14.18 im xCELLigence	64
Abbildung 3.3.2 NK-vermittelte Lyse von 4 Spendern vs LS ohne/mit ch14.18 im xCELLigence	65
Abbildung 3.4.1 CD107a-Aktivität frisch isolierter PBMC von Spender 1 gegen alle Targets mit und ohne ch14.18	66
Abbildung 3.4.2 Aktivität der frisch isolierten PBMC von Spender 1 gegen alle getesteten Zelllinien mit und ohne ch14.18	68
Abbildung 3.4.3 CD107a-Aktivität expandierter NK-Zellen von Spender 1 gegen alle Targets mit und ohne ch14.18	70
Abbildung 3.4.4 Aktivität der expandierten NK-Zellen von Spender 1 gegen alle getesteten Zelllinien mit und ohne ch14.18	73
Abbildung 3.4.5 CD107a-Aktivität frisch isolierter PBMC von Spender 2 gegen alle Targets mit und ohne ch14.18	76

Abbildung 3.4.6 Aktivität der frisch isolierten PBMC von Spender 2 gegen alle getesteten Zelllinien mit und ohne ch14.18	78
Abbildung 3.4.7 CD107a-Aktivität expandierter NK-Zellen gegen alle Targets	79
Abbildung 3.4.8 Aktivität der expandierten NK-Zellen von Spender 2 gegen alle getesteten Zelllinien mit und ohne ch14.18	81
Abbildung 3.5.1 Einfluss von ch14.18 auf die CD107a-Aktivität frisch isolierter PBMC	83
Abbildung 3.5.2 Einfluss von ch14.18 auf die CD107a-Aktivität expandierter NK-Zellen.....	83
Abbildung 3.5.3 Einfluss von ch14.18 auf die CD107a-Aktivität frisch isolierter PBMC (Spender 1).....	84
Abbildung 3.5.4 Einfluss von ch14.18 auf die CD107a-Aktivität expandierter NK-Zellen (Spender 1)	85
Abbildung 3.5.5 Einfluss von ch14.18 auf die CD107a-Aktivität frisch isolierter PBMC (Spender 2).....	86
Abbildung 3.5.6 Einfluss von ch14.18 auf die CD107a-Aktivität expandierter NK-Zellen (Spender 2)	86
Abbildung 3.6.1 CD107a-Aktivität verschiedener PBMC-Populationen ohne ch14.18.....	87
Abbildung 3.6.2 CD107a-Aktivität verschiedener PBMC-Populationen mit ch14.18.....	88
Abbildung 3.6.3 CD107a-Aktivität verschiedener NK-Zellpopulationen ohne ch14.18.....	89
Abbildung 3.6.4 CD107a-Aktivität verschiedener NK-Zellpopulationen mit ch14.18.....	90
Abbildung 3.6.5 CD107a-Aktivität verschiedener PBMC-Populationen ohne ch14.18.....	91
Abbildung 3.6.6 CD107a-Aktivität verschiedener PBMC-Populationen mit ch14.18.....	92
Abbildung 3.6.7 CD107a-Aktivität verschiedener NK-Zellpopulationen ohne ch14.18.....	93

Abbildung 3.6.8 CD107a-Aktivität verschiedener NK-Zellpopulationen mit ch14.18.....	94
Abbildung 3.7.1 HLA-I Expression vor und nach IFN γ -Stimulation von LS	95
Abbildung 3.7.2 Einfluss von IFN γ -Stimulation auf NK-Aktivität.....	96
Abbildung 3.7.3 Vergleich der PBMC-Aktivität ohne und mit IFN γ -Stimulation	97
Abbildung 3.7.4 Vergleich der NK-Aktivität ohne und mit IFN γ -Stimulation	98
Abbildung 3.7.5 Semiquantitative Messung der Bw4-Expression	99
Abbildung 3.7.6 Bw4-Expression ohne und mit IFN γ -Stimulation	100
Abbildung 3.7.7 CD107a-Aktivität expandierter NK-Zellen vor und nach IFN γ -Stimulation bei HLA-I Match/Mismatch.....	101
Abbildung 3.7.8 CD107a-Aktivität expandierter NK-Zellen ohne und mit HLA I Blockade	102
Abbildung 3.7.9 PBMC Aktivität von 4 Spendern ohne und mit Stimulation bzw. Blockade von HLA I und der Zugabe von ch14.18	103
Abbildung 3.8.1 Einfluss von NKG2D/DNAM-1 Blocking auf die PBMC-Aktivität	105
Abbildung 3.8.2 Einfluss von NKG2D/DNAM-1 Blocking auf die PBMC-Aktivität von Spender 1 gegen LAN-1.....	106
Abbildung 3.8.3 Einfluss von NKG2D/DNAM-1 Blocking auf die PBMC-Aktivität von Spender 1 gegen LS	107
Abbildung 3.8.4 Einfluss von NKG2D/DNAM-1 Blocking auf die PBMC-Aktivität von Spender 2 gegen LAN-1.....	108
Abbildung 3.8.5 Einfluss von NKG2D/DNAM-1 Blocking auf die PBMC-Aktivität von Spender 2 gegen LS	109
Abbildung 3.9.1 Lyse der Neuroblastomzelllinien durch PBMCs/expandierte NK-Zellen nach 24h	110
Abbildung 3.9.2 Lyse der Neuroblastomzelllinien durch PBMCs/expandierte NK-Zellen nach 48h	111
Abbildung 3.9.3 Meta-Analyse der spenderspezifischen Lyseunterschiede von PBMCs und expandierten NK-Zellen.....	112
Abbildung 3.9.5 Analyse spenderspezifischer Lyseunterschiede der einzelnen Zelllinien durch PBMCs und expandierte NK-Zellen.....	113

Abbildung 3.9.6 Vergleich der PBMC-/NK-Aktivität von guten und schlechten Spendern	114
Abbildung 3.9.7 Einfluss des KIR Haplotyp auf die Lyse der getesteten Tumorzellen durch PBMC	114
Abbildung 3.9.8 Einfluss von KIR Haplotyp auf die Lyse der getesteten Tumorzellen durch expandierte NK-Zellen	115
Abbildung 3.10.1 Einfluss von ch14.18 auf die CD107a-Aktivität von $\gamma\delta$ T-Zellen bei beiden Spendern (isoliert aus Peripherblut/NK-Expansion)	116
Abbildung 3.10.2 Einfluss von ch14.18 auf die CD107a-Aktivität der $\gamma\delta$ T-Zellen von Spender 1 gegen 8 Zelllinien (exemplarisch).....	117
Abbildung 3.10.3 Einfluss von ch14.18 auf die CD107a-Aktivität der $\gamma\delta$ T-Zellen von Spender 2 gegen 5 Zelllinien (exemplarisch).....	118
Abbildung 4.6.1 Vergleich der NK-vermittelten Lyse von guten und schlechten Spender nach 48h ohne und mit ch14.18 (E/T 1:1)	145

9 Erklärung zum Eigenanteil

Die vorliegende Arbeit wurde an der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen unter der Betreuung von Dr. med. P. Schlegel und Prof. Dr. P. Lang durchgeführt. Die Betreuung beinhaltete die gemeinsame Versuchsplanung, Besprechung der Ergebnisse, gemeinschaftliche Konzeption und Korrektur der Arbeit.

Nach Einarbeitung durch Dr. med. P. Schlegel, Anne Schilling und Chihab Klose erfolgte die Vorbereitung, Durchführung der Versuche sowie die Datenauswertung und Verfassung der Arbeit durch mich. Alle dargestellten Daten, sofern nicht gesondert gekennzeichnet, wurden von mir selbst erhoben und nicht durch andere Labormitglieder ergänzt.

Unterstützung erhielt ich von Dr. med. P. Schlegel bei der durchflusszytometrischen Zellanalyse und der Erstellung des Auswertetemplates für die Luciferase-Assays. Bei der Durchführung der aufwendigeren CD107a-Assays unterstützten mich darüber hinaus Maximilian Wiedenmann und Desiree Syring.

Die HLA-Typisierung der Neuroblastomzelllinien erfolgte durch das HLA-Labor der Medizinischen Klinik Tübingen, die KIR-Genotypisierung durch das Chimärismuslabor der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin unter der Leitung von Dr. med. Dr. rer. Nat. Mezger.

Die Feeder-Zelllinie K562-mb15-41BBL wurde freundlicherweise durch Dr. D. Campana MD (Khoo Teck Puat, National University Children's Medical Institute Singapore) zur Verfügung gestellt.

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

Tübingen, den 18.02.2020

10 Danksagung

Ich möchte mich von ganzem Herzen bei allen Jenen bedanken, die mir geholfen haben die vorliegende Arbeit zu vollenden.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Rupert Handgretinger für die Aufnahme an sein Institut und das ehrliche Interesse an meiner Arbeit sowie Herrn Prof. Dr. med. Peter Lang für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe meinen Dokortitel zu erlangen und die freundliche Unterstützung und Beratung während der Durchführung des Projektes.

Ganz besonders möchte ich Dr. med. Patrick Schlegel für die hervorragende Betreuung und seine ständige Motivation mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen. Im Laufe der Jahre war er mir nicht nur ein Mentor, sondern ist auch zu einem guten Freund geworden, dessen Begeisterung und Energie für die Forschung in höchstem Maße ansteckend ist. Diese Begeisterung war es auch, die in mir den Wunsch hat reifen lassen über diese Dissertation hinaus in der medizinischen Forschung tätig zu sein.

Danken möchte ich dem Sonderforschungsbereich SFB 685, dieser bot mir die Möglichkeit mein Wissen über die Immunologie im Austausch mit vielen anderen jungen Forschern erweitern und meine Ergebnisse auf internationalen Kongressen präsentieren.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei meinem Freund und Kollegen Max Wiedenmann bedanken, er war mir in unserer langen gemeinsamen Zeit im Labor eine große Hilfe in jeder Hinsicht, die vielen gemeinsam verbrachten Stunden werden mir immer in besonderer Erinnerung bleiben. Darüber hinaus gilt mein Dank auch allen anderen Kollegen im Labor, insbesondere Marie Matela, Annika Horrner, Desiree Syring, Anne Schilling, Chihab Klose sowie den Kollegen der benachbarten Arbeitsgruppen.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei allen meinen Freunden, die mir die Studienzeit unvergesslich gemacht haben und bei meinen Eltern und meinem Bruder für ihre stetige Unterstützung und ihr Vertrauen in mich.