

Aus der Universitätsklinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin Tübingen

Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. D. Niethammer

**Anreicherung von T-Zell-depletierten NK-Zellen und  
deren zytotoxische Aktivität gegenüber ALL-Blasten in  
Abhängigkeit der HLA-Klasse-I-Expression**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin  
der medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Matthias Manuel Pfeiffer  
aus Stuttgart**

**2004**

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. D. Niethammer

2. Berichterstatter: Professor Dr. L. Kanz

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>4</b>
1.1	BEHANDLUNG LYMPHATISCHER LEUKÄMIEN IM KINDESALTER	4
1.2	STAMMZELLTRANSPLANTATION	7
1.3	MINIMALE RESTKRANKHEIT – MINIMAL RESIDUAL DISEASE	8
1.4	NATÜRLICHE KILLERZELLEN	9
1.4.1	<i>Mechanismen der NK-Zell-vermittelten Zytolyse</i>	11
1.4.2	<i>Antikörper vermittelte Zytotoxizität, ADCC</i>	13
1.4.3	<i>Inhibitorische NK-Rezeptoren</i>	14
1.4.4	<i>Aktivierende NK-Rezeptoren</i>	17
1.4.5	<i>Adhäsionsmoleküle</i>	18
1.4.6	<i>NK-Zellen und Stammzelltransplantation</i>	19
1.5	FRAGESTELLUNG	20
<b>2</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>21</b>
2.1	ALLGEMEINE MATERIALIEN	21
2.1.1	<i>Geräte sowie Glas- und Plastikmaterial</i>	21
2.1.2	<i>Stammlösungen</i>	22
2.2	MATERIAL FÜR DIE ISOLIERUNG MONONUKLEÄRER ZELLEN	23
2.3	MATERIAL FÜR DIE ZELLANREICHERUNG	23
2.4	MATERIAL FÜR DIE ZELLZÄHLUNG UND MIKROSKOPIE	24
2.5	MATERIAL FÜR DEN ZYTOTOXIZITÄTSTEST	24
2.6	MATERIAL FÜR DEN PROLIFERATIONSASSAY	25
2.7	MATERIAL FÜR DIE DURCHFLUßZYTOMETRIE	26
<b>3</b>	<b>METHODEN</b>	<b>28</b>
3.1	ISOLIERUNG PERIPHERER MONONUKLEÄRER ZELLEN MIT FICOLL-HYPAQUE	28
3.1.1	<i>Hintergrundinformation</i>	28
3.1.2	<i>Durchführung</i>	28
3.2	ZELLANREICHERUNG MIT DEM MACS-SYSTEM	29
3.2.1	<i>Hintergrund</i>	29
3.2.2	<i>Durchführung</i>	29
3.3	T-ZELL-DEPLETION MIT DYNABEADS	31
3.3.1	<i>Hintergrund</i>	31
3.3.2	<i>Durchführung</i>	31
3.4	ZYTOTOXIZITÄTSTEST	32

	2
<hr/>	
3.4.1	Hintergrund..... 32
3.4.2	Durchführung..... 33
3.5	DURCHFLUßZYTOMETRIE..... 37
3.5.1	Hintergrund..... 37
3.5.2	Durchführung..... 38
3.6	QUANTITATIVE DURCHFLUßZYTOMETRIE..... 40
3.6.1	Hintergrund..... 40
3.6.2	Durchführung..... 41
3.7	PROLIFERATIONSASSAY..... 45
3.7.1	Hintergrund..... 45
3.7.2	Durchführung..... 45
3.8	ZELLKULTUR..... 46
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE..... 47</b>
4.1	ANREICHERUNG DER NK – ZELLEN..... 47
4.1.1	Anreicherung der CD 56 <sup>+</sup> - Zellen mit dem MACS – System..... 47
4.1.2	Depletion der T – Zellen mit Dynabeads..... 50
4.1.3	Zytotoxizitätstest..... 52
4.1.4	Proliferationsassay..... 53
4.2	ZYTOTOXISCHE AKTIVITÄT ANGEREICHERTER NK-ZELLEN GEGENÜBER LEUKÄMISCHEN BLASTEN..... 54
4.3	QUANTITATIVE HLA-KLASSE-I BESTIMMUNG..... 58
4.4	BESTIMMUNG DER ADHÄSIONSMOLEKÜLE..... 60
4.5	EINFLUß DER HLA-EXPRESSION UND DER ADHÄSIONSMOLEKÜLE..... 63
4.6	ADCC..... 69
<b>5</b>	<b>DISKUSSION..... 71</b>
5.1	METHODENKRITIK..... 72
5.1.1	Zellanreicherung mit MACS und Dynabeads..... 72
5.1.2	Durchflußzytometrie..... 72
5.1.3	Zytotoxizitätstest..... 73
5.1.4	Proliferationsassay..... 74
5.2	ANREICHERUNG DER NK-ZELLEN..... 74
5.3	ZYTOTOXIZITÄT DER ANGEREICHERTEN NK-ZELLEN..... 76
5.4	PROLIFERATIONSVERHALTEN DER ANGEREICHERTEN ZELLEN..... 76
5.5	EXPRESSION VON HLA-KLASSE I UND ADHÄSIONSMOLEKÜLEN AUF LEUKÄMISCHEN BLASTEN..... 77
5.6	EINFLUß DER HLA- UND DER ADHÄSIONSMOLEKÜLE AUF DIE NK-SUSCEPTIBILITÄT DER LEUKÄMISCHEN BLASTEN..... 79

---

	3
5.7 ADCC .....	83
5.8 SCHLUßFOLGERUNGEN FÜR DIE KLINISCHE ANWENDUNG .....	86
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>88</b>
<b>7 LITERATUR.....</b>	<b>90</b>
<b>8 ANHANG .....</b>	<b>100</b>
8.1 ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	100
8.2 TABELLENVERZEICHNIS .....	102

# 1 Einleitung

## 1.1 Behandlung lymphatischer Leukämien im Kindesalter

Noch in den 60er Jahren galt die Prognose der Leukämien im Kindesalter als infaust, nur sehr wenige Kinder erreichten eine Remission. Durch eine Intensivierung der Chemotherapie konnten die Remissionsraten zu Beginn der 70er Jahre deutlich gesteigert werden und durch die präventive Bestrahlung des Zentralnervensystems die Rezidivrate gesenkt werden, da die Leukämiezellen dort durch die Blut-Hirn-Schranke vor der Wirkung der Zytostatika geschützt sind.

Heute werden Kinder in Deutschland nach Plänen der BFM (Berlin-Frankfurt-Münster) Studiengruppe behandelt, wobei sich die Behandlung in mehrere Phasen gliedert. Sie beginnt mit der Induktionstherapie: Dauer 5 Wochen; 4 Medikamente (Prednison, Vincristin, Daunorubicin und l-Asparaginase); erstes Ziel ist das Erreichen einer Remission, d.h. die Wiederherstellung einer normalen Blutbildung im Knochenmark, dies gelingt bei 98% der Kinder. Im Anschluß daran werden die weiteren Therapieelemente fortgeführt (Konsolidierung, präventive Behandlung des Zentralnervensystems, Reinduktion). Wegen der ungünstigen Nebenwirkungen der ZNS-Bestrahlung ist diese nur noch für Patienten mit einem hohen Rückfallrisiko und mit einer T-ALL vorgesehen, in den übrigen Fällen erfolgt die präventive ZNS-Behandlung mit einer Kombinationstherapie aus Methotrexat, das sowohl intrathekal als auch systemisch verabreicht wird. Aufgrund zytomorphologischer und molekulargenetischer Kriterien und des Ansprechens auf die Induktionstherapie werden die Patienten verschiedenen Risikogruppen zugeordnet, für die eine jeweils spezifische Therapie angezeigt ist.

Das Ansprechen auf die Therapie wird zu festgelegten Zeitpunkten mittels mikroskopischer und molekulargenetischer Methoden kontrolliert. Mit der Behandlung nach dem BFM-Protokoll bleiben etwa 75% der Kinder nach

einmaliger Behandlung rückfallfrei und bei ca. einem Drittel der Kinder mit einem Rezidiv ist mit einer entsprechenden Rezidivtherapie eine Heilung möglich, so daß inzwischen mehr als 80% der betroffenen Kinder überleben.

Zusätzlich zum Einsatz von Chemotherapeutika und Bestrahlung kommt für einige Patienten noch die allogene Stammzell-/Knochenmarktransplantation zur Anwendung. Dabei kann entweder eine „matched family donor“-Stammzelltransplantation (MFD-SZT), eine „matched unrelated donor“ (MUD-SZT) oder bei Patienten mit sehr schlechter Prognose auch eine haploidente (mismatched family donor = MMFD) Stammzelltransplantation durchgeführt werden. Tabelle 1.1 gibt eine Übersicht über die im Protokoll verzeichneten Indikationen.

Tab. 1.1: Indikationen für die Stammzelltransplantation in der ALL-BFM 2000 Studie.  
 NRd33 = Non-response an Protokolltag 33; PPR = Prednisone-poor-response  
 ( $\geq 1000$  Leukämiezellen pro  $\mu\text{l}$  Blut an Tag 8); PGR = Prednisone-good-  
 response

Indikationen		MFD/MUD	MMFD
MRD-Niveau	an Tag 1 von Prokoll M = $10^{-3}$	+	
	an Tag 1 von Protokoll M > Tag 33 von Protokoll I und Tag 1 Protokoll M $\geq 10^{-3}$	+	+
	an Tag 1 Protokoll M > $10^{-3}$	+	+
NRd33		+	+
PPR	+ T-ALL	+	
	+ pro-B-ALL	+	
	+ WBC $\geq 100000$	+	
	+ t(9;22)	+	+
	+ t(4;11)	+	+
PGR	+ t(9;22)	+	
	+ t(4;11)	+	
HR	+ M3-Mark an Tag 15	+	



## 1.2 Stammzelltransplantation

Für einige maligne und nicht maligne Erkrankungen ist eine myeloablative Therapie mit einer anschließenden Transplantation allogener Vorläuferzellen, aus denen sich eine normale Hämatopoese entwickeln kann, der einzige kurative Therapieansatz. Die Verbesserung der technischen Möglichkeiten in der Anreicherung von CD34<sup>+</sup> Stammzellen in den letzten Jahren ermöglichte den Einsatz hochangereicherter CD34<sup>+</sup> Stammzellen zur Transplantation.

Durch die indirekte T-Zell-Depletion der CD34-Anreicherung kann eine Graft-versus-host-disease (GvHD) auch ohne zusätzliche GvHD-Prophylaxe nach Transplantation, die mit einer zusätzlichen Immunsuppression verbunden wäre, verhindert werden [1]. Jedoch hat die T-Zell-Depletion auch einige Nachteile: ein schlechteres engraftment [2], eine verzögerte Immunrestitution mit vermehrtem Auftreten von Infektionen [3] und bei manchen Malignomen eine erhöhte Rezidivrate [4].

Es konnte gezeigt werden, daß aufgrund der T-Zell-Depletion auch haploidente Stammzelltransplantationen ohne den Einsatz einer GvHD-Prophylaxe und ohne signifikante klinische GvHD-Reaktionen durchgeführt werden können. [5],[6].

In der Kinderklinik Tübingen wurden dafür CD34<sup>+</sup> hochangereicherte Stammzellen eingesetzt, die mit dem SuperMACS-System [7] oder mit dem CliniMACS-System [8] angereichert wurden.

Durch den Einsatz von OKT 3, einem T-Zell-Antikörper, als Abstoßungsprophylaxe konnten ein sicheres engraftment [5] und ohne eine Immunsuppression nach Transplantation und mit einer hohen Stammzellgabe eine schnellere Immunrestitution erreicht werden [1]. Hauptproblem nach der Transplantation ist jedoch die hohe Rezidivrate maligner Erkrankungen, so daß Rezidive bei diesen Patienten die häufigste Todesursache darstellen. Die Gabe von T-Zellen bei diesen Patienten ist mit einem hohen Risiko einer GvHD verbunden, so daß der Einsatz anderer antileukämischer Lymphozyten-

Subpopulationen wie z.B. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) eine interessante Option zur Verbesserung der Prognose nach haploidenter Stammzelltransplantation bei malignen Erkrankungen wie akuten lymphatischen Leukämien ist.

### 1.3 Minimale Restkrankheit – minimal residual disease

Eine Remission bei akuten Leukämien ist definitionsgemäß dann erreicht, wenn der Blastenanteil im Knochenmark weniger als 5% beträgt. Auch wenn lichtmikroskopisch keine Blasten entdeckt werden können, kann mit anderen Methoden wie dem durchflußzytometrischen Nachweis aberranter Immunphänotypen oder der PCR-Analyse klonaler Antigen-Rezeptor-Gen-Rearrangements eine minimale Restkrankheit (minimal residual disease, MRD) nachgewiesen werden. Neben der Beobachtung des Krankheitsverlaufs unter der Therapie läßt die MRD-Diagnostik auch prognostische Aussagen zu. So ist z.B. bei Kindern mit akuter lymphatischer Leukämie der Nachweis einer MRD  $>1\%$  am Ende der Induktionsphase mit einem hohen Risiko für das Auftreten eines Rezidivs verbunden [9]. Eine andere Studie fand bei Patienten mit einem hohen MRD-Level ( $>10^{-3}$ ) am Ende der Induktionsphase und zu Beginn der Konsolidierungsphase einen 35fachen Anstieg der Rezidivrate im Vergleich zu Patienten mit niedrigem MRD basierten Risiko [10]. Im Gegensatz dazu konnte eine andere Studie mit einer allerdings kleinen Patientenzahl einen signifikanten Zusammenhang zwischen MRD-Level und Krankheitsverlauf im Bereich von  $10^{-2}$  aber nicht für den Bereich von  $10^{-3}$  finden [11].

Auch für den Verlauf nach einer Transplantation läßt die MRD-Diagnostik Prognosen zu. So wurden in einer Studie die Patienten vor allogener KMT mit PCR auf eine MRD untersucht und in Gruppen mit hohem und niedrigem MRD-Level und nicht nachweisbarer MRD eingeteilt. In den drei Gruppen betrug das ereignisfreie Überleben 0%, 36% und 73% [12]. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommt eine andere Studie desselben Autors. Von 68 Patienten erlitten nach KMT

32 Patienten ein Rezidiv, bei 28 von ihnen konnte eine MRD nach Transplantation nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu hatten nur 8 Patienten von 36 Patienten, die in kompletter Remission blieben, eine nachweisbare MRD ( $P < 0,0001$ ) [13].

Patienten mit einer nachweisbaren MRD oder zumindest einem hohen MRD-Level haben einen schlechten Krankheitsverlauf nach Transplantation. Deshalb erscheint es notwendig, diesen entweder mit Hilfe einer intensivierten Konditionierung oder mit dem Einsatz immuntherapeutischer Strategien zu verbessern.

## 1.4 Natürliche Killerzellen

NK-Zellen wurden in den siebziger Jahren als dritte eigenständige Lymphozytenpopulation neben B- und T-Zellen erkannt [14] und machen ca. 10-15% der peripher zirkulierenden Lymphozyten aus. Die NK-Zellzahl im Blut ist eine individuelle Größe mit starken interindividuellen Abweichungen, wobei sie einer ausgeprägten Tagesrhythmik unterliegt [15]. Außerdem wird sie von zahlreichen Faktoren wie körperlicher Aktivität, Streßsituationen, Infekten oder entzündlichen Reaktionen beeinflusst. Daneben findet man NK-Zellen in unterschiedlicher Zahl auch in lymphatischen Geweben, in der Milz, in der Leber und anderen soliden Geweben. Morphologisch zeichnen sich NK – Zellen durch eine Vielzahl azurophiler Granula im Zytoplasma aus, weshalb sie auch als „large granular lymphocytes“ (LGL) bezeichnet werden. Durchflußzytometrisch werden NK – Zellen als Zellen mit dem Phänotyp  $CD 3^-$ ,  $CD 16^+$ ,  $CD56^+$  charakterisiert.

NK-Zellen und T-Zellen besitzen gemeinsame Vorläuferzellen, aus denen sich sowohl NK- als auch T-Zellen entwickeln können, nicht aber B-Zellen oder myeloische Zellen [16]. Daher ist es nicht verwunderlich, daß NK- und T-Zellen eine Vielzahl von Oberflächenmolekülen teilen und auch ähnliche Mechanismen der Target-Zell-Lyse besitzen. Im Gegensatz zu T-Zellen unterliegen NK-Zellen

aber keiner MHC-Restriktion, sie können Zellen ohne vorherige spezifische Sensibilisierung angreifen. Wie aber erkennt eine NK-Zelle eine zu zerstörende Targetzelle? Untersuchungen dazu führten Ende der achtziger Jahre zur "missing-self" – Hypothese [17] und [18]: Die Funktion der NK-Zellen besteht darin, Zellen, die die Expression von autologen MHC-Klasse I Molekülen an ihrer Oberfläche verloren haben oder keine autologen MHC-Klasse I Moleküle exprimieren, zu erkennen und zu zerstören. In den letzten Jahren gelang es dann auch, Rezeptoren auf NK-Zellen zu identifizieren, die das Erkennen von spezifischen MHC-Klasse-I Molekülen erlauben und die Aktivität der NK-Zellen regulieren. Diese Rezeptoren für MHC I sind überwiegend inhibitorischer Natur. Neben der Expression von MHC-Klasse-I scheint auch die Präsentation bestimmter Signalpeptide innerhalb des MHC-Komplexes eine Rolle in der Erkennung als normale Zelle durch NK-Zellen zu haben. Nur wenn die korrekten Eigenpeptide mit MHC-Molekülen an die Membranoberfläche transportiert werden, wird die Zelle sicher als „selbst“ erkannt und verschont [19]. Heute geht man davon aus, daß die Aktivität der NK-Zellen von aktivierend und inhibitorisch wirksamen Rezeptoren gesteuert wird, wobei unter physiologischen Bedingungen der Einfluß der inhibitorischen Rezeptoren überwiegt und dafür sorgt, daß normale Zellen von NK-Zellen nicht attackiert werden [20]. Für NK-Zellen ergeben sich daraus im Immunsystem folgende Aufgaben:

- ⇒ frühzeitige Aktivität gegenüber infizierten Zellen bei Virusinfektionen (für verschiedene Viren, z.B. Adenoviren, CMV, ist gezeigt worden, daß sie Synthese bzw. Membranexpression von MHC-Molekülen in infizierten Zellen unterdrücken oder verringern) oder Infektion durch andere zytopathische Erreger wie z.B. Listerien, Mykobakterien oder Plasmodien, bis eine Immunantwort mit zytotoxischen T-Lymphozyten hinreichend adaptiert ist.
- ⇒ kontinuierliche Kontrolle aberranter Zellen, die Tumorantigene exprimieren oder ihre MHC I – Expression reduzieren (niedrige oder fehlende NK-Zellaktivität ist im Tiermodell und beim Menschen mit der Entstehung von Tumoren bzw. progredientem Tumorwachstum assoziiert).

### 1.4.1 Mechanismen der NK-Zell-vermittelten Zytolyse

Die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen beruht im wesentlichen auf zwei verschiedenen Mechanismen:

1. Perforin-Granzym-Mechanismus
2. Fas/FasL-Mechanismus

#### 1.4.1.1 Perforin-Granzym-Mechanismus

Nachdem eine NK-Zelle an die Targetzelle gebunden hat und diese über den „missing self“- Mechanismus als solche erkannt hat, kommt es an der Zell-Zellkontaktstelle zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom. Die zytoplasmatischen Granula werden an dieser Stelle konzentriert, mit der Zellmembran fusioniert und deren Inhalt freigesetzt. Dabei kommt es unter anderem zur Freisetzung von Perforin, das eine Strukturhomologie mit der Komplementkomponente C9 aufweist und auf dieselbe Weise wirksam wird: In Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ - Ionen bilden sich zylinderförmige Polymere mit einem äußeren lipophilen und einem inneren hydrophilen Anteil. Diese bilden Poren in der Membran der Targetzelle, über die es zu einem Ladungs- und Wasserausgleich und damit zur Zerstörung der Targetzelle kommt. Zusätzlich dringen über diese Poren Granzyme in die Targetzelle ein – Enzyme, die den Zelluntergang über Apoptose induzieren und damit den lytischen Angriff der NK-Zelle komplettieren.

### 1.4.1.2 Fas/FasL-Mechanismus

Neben dem oben beschriebenen Mechanismus werden Targetzellen zusätzlich über die Expression von Fas (APO-1, CD95) identifiziert, an das die NK-Zelle mit ihrem Fas-Liganden (Fas-L) bindet. Durch die Bindung von Fas-L an Fas werden in der Targetzelle sogenannte Caspasen aktiviert – Enzyme, die zur DNA-Fragmentierung, Chromatinkondensation und Fragmentierung der Zellen in einzelne Vesikel, also zur Apoptose führen.

Aktivierte NK-Zellen, aber auch CTL werden über diesen Mechanismus selbst zerstört, wenn die Aktivität der Immunantwort wieder heruntergeregelt wird.

Neben diesen Hauptmechanismen findet bei der Targetzellyse außerdem eine Freisetzung von verschiedenen Zytokinen der NK-Zellen statt, die an der Regulation, Entwicklung und Vollendung der Immunantwort mitwirken. So kommt es zur Ausschüttung von TNF- $\alpha$ , das über Bindung an TNF-Rezeptoren der Targetzelle ebenfalls Apoptose induziert.  $\gamma$ -Interferon (INF- $\gamma$ ) und TNF- $\alpha$  prägen den Modus der zellulären Immunantwort, daneben werden IL-1, IL-3, IL-4, IL-6, GM-CSF, TGF- $\beta$  und IFN- $\alpha$  sezerniert. Mit Hilfe dieser Zytokine nehmen aktivierte NK-Zellen massiv Einfluß auf andere immunkompetente Zellen wie T-Lymphozyten, Monozyten oder Granulozyten und optimieren so die frühe Phase der natürlichen und adaptiven Immunantwort.

### 1.4.2 Antikörper vermittelte Zytotoxizität, ADCC

NK-Zellen besitzen einen Rezeptor für die konstante Region bestimmter Antikörper, den niedrig affinen IgG-Rezeptor Fc $\gamma$ RIII, der als CD 16-Oberflächenantigen klassifiziert ist. Er verleiht den NK-Zellen neben ihrer natürlichen Zytotoxizität die Fähigkeit zur Antikörper-abhängigen Zytotoxizität, ADCC (Antibody-Dependant Cell-mediated Cytotoxicity). Hat eine Zelle entsprechende Antikörper auf ihrer Oberfläche gebunden, kann die NK-Zelle diese über den Fc $\gamma$ RIII-Rezeptor erkennen und die Zelle lysieren, auch wenn diese Zelle ohne den gebundenen Antikörper nicht als Target erkannt worden wäre (s. Abb. 1.1).

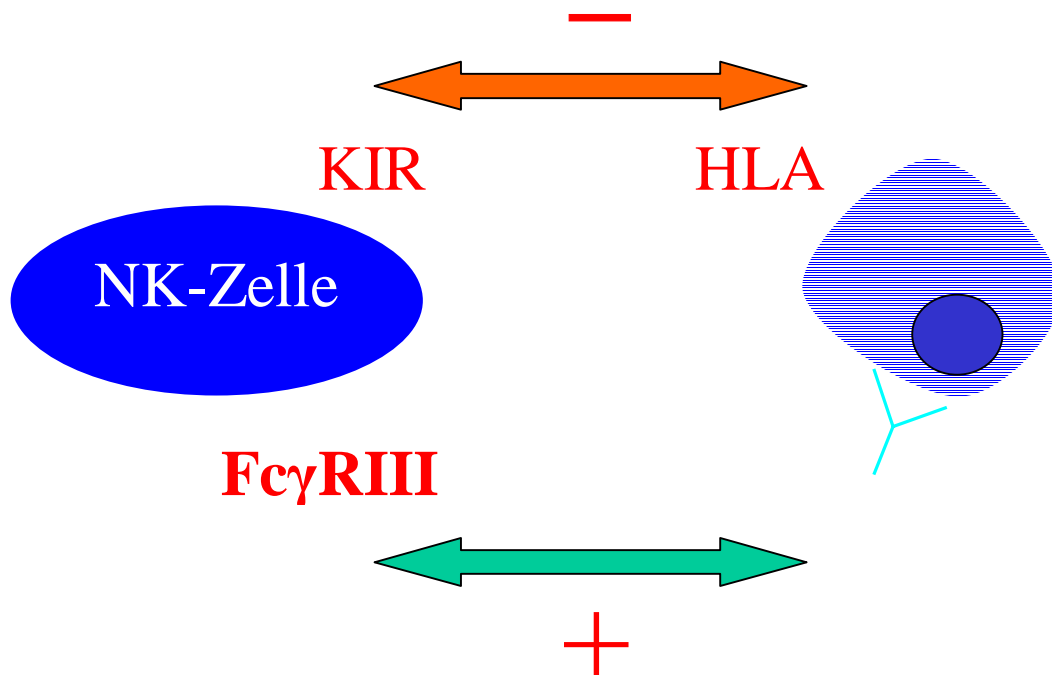


Abb. 1.1: ADCC: NK-Zellen können Antikörper-beladene Zellen als Target erkennen und lysieren, auch wenn diese MHC-I-Moleküle exprimieren.

### 1.4.3 Inhibitorische NK-Rezeptoren

Humane NK-Zellen exprimieren verschiedene inhibitorische Rezeptoren, die HLA-Klasse-I-Moleküle auf Targetzellen erkennen können. Inzwischen sind verschiedene Rezeptoren charakterisiert, die entweder zur „Immunoglobulin Superfamily“ oder zur „C-type lectin superfamily“ gehören. Die Aktivität eines der Rezeptorentypen reicht aus, um ein komplettes inhibitorisches Signal zu generieren [21]. Neben der Expression von HLA-Klasse-I scheint es aber für eine normale autologe Zelle außerdem wichtig zu sein, ob sie mit ihren HLA-Molekülen fremdes Peptid präsentiert oder nicht, um einer NK-vermittelten Lyse zu entgehen. Kärre beschreibt in einer Arbeit, daß Zellen nur dann sicher als selbst erkannt und nicht lysiert werden, wenn korrekte Eigenpeptide nach Kopplung an HLA-Moleküle mit auf die Zellmembranoberfläche transportiert werden [19]. In einer anderen Arbeit wurde für ein bestimmtes HLA-B-Molekül gezeigt, daß es nur inhibitorische Wirkung auf die NK-Lyse hat, wenn in dem präsentierten Peptid an Position 7 und 8 bestimmte Seitenketten vorhanden sind [22].

Die Herstellung von NK-Klonen zeigt die Heterogenität der NK-Zellen bezüglich ihrer HLA-Spezifität und daß eine NK-Zelle eventuell über mehrere verschiedene, jedoch mindestens immer einen bestimmten MHC-Rezeptor verfügt. Gemeinsames Merkmal der Rezeptoren ist, daß sich an die hydrophobe Transmembran-Region ein unterschiedlich langer zytoplasmatischer Teil anschließt, der zwei Tyrosin-x-x-Leucin Paare (YxxL) enthält. Bindet der Rezeptor an passende MHC-I-Moleküle, wird das zytoplasmatische Tyrosin phosphoryliert und bindet an die SH2-Domäne der Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP1, die eine zytoplasmatische Hauptkomponente negativer Signalwege ist. [23],[24],[25]. Dieser intrazytoplasmatische Teil wird auch als ITIM (Immune receptor Tyrosine-based Inhibitory Motif) bezeichnet.



#### 1.4.3.1 p58.1 und p58.2

Diese beiden Rezeptoren, die spezifisch für die beiden HLA-C-Gruppen (Gruppe 1: HLA-Cw2, -Cw4, -Cw5 und -Cw6 u.a.; Gruppe 2: HLA-Cw1, -Cw3, -Cw7 und -Cw8 u.a.) sind, sind die ersten identifizierten KIR-Rezeptoren (killer inhibitory receptor) auf NK-Zellen. Sie wurden mit Hilfe der monoklonalen Antikörper EB6 und GL183 erkannt [26],[27] und als 58 kD Glycoproteine (p58.1 und p58.2) identifiziert. p58.1 erkennt auf der Targetzelle HLA-C-Moleküle der Gruppe 1 während p58.2 die Moleküle der Gruppe 2 bindet [28]. Neben den inhibitorischen Formen der Rezeptoren werden von den beiden Antikörpern jedoch auch die aktivierenden Subtypen erkannt (s. Tab. 1.). Die prozentuale Verteilung der Rezeptoren variiert zwischen verschiedenen Spendern sehr stark.

#### 1.4.3.2 p70/NKB1 und p140

Mit den Antikörpern DX9 und Z27 konnte ein 70 kD Glycoprotein (p70) als weiterer KIR-Rezeptor identifiziert werden. [29],[30]. Dieser Rezeptor erkennt HLA-B-Moleküle die zu der serologischen Gruppe der HLA-Bw4-Allele gehören [31]. Mit den Antikörpern Q66 und Q241 konnte schließlich ein weiterer inhibitorischer Rezeptor aus der Ig-Superfamilie gefunden werden, der HLA-A3 und HLA-A11-Moleküle erkennt und als 140 kD Homodimer exprimiert wird [32]. In biochemischen Analysen wurde ein hoher Grad an Sequenzhomologien zwischen den verschiedenen KIR-Rezeptoren der Ig-Superfamilie gefunden.

Tabelle 1.1 gibt eine Übersicht über die HLA-Klasse-I-Rezeptoren der NK-Zellen, die zu Immunglobulin-Superfamilie gehören.

Tab. 1.2: Rezeptoren für HLA-Klasse I der Ig-Superfamilie auf NK-Zellen nach [33].

Reagierende Mabs	Liganden	Funktion	ITIM	cDNA	Größe in kD	Protein-Bezeichnung
EB6/XA141	Cw 2,4,5,6	inhibitorisch	ja	cl-42	58	p58.1
EB6/XA141	Cw 2,4,5,6	inhibitorisch	ja	cl-47.11	58	p58.1
EB6/XA141	Cw 2,4,5,6	aktivierend	nein	EB6-act I	50	p50.1
EB6	Cw 2,4,5,6	aktivierend	nein	EB6-act II	50	p50.1
GL183/y249	Cw 1,3,7,8	inhibitorisch	ja	cl-6	58	p58.2
GL183/y249	Cw 1,3,7,8	inhibitorisch	ja	cl-43	58	p58.2
GL183/y249	Cw 1,3,7,8	aktivierend	nein	183-act I	50	p50.2
Z27/DX9	Bw 4	inhibitorisch	ja	cl-11	70	p70
Z27/DX9	Bw 4	inhibitorisch	ja	cl-2/NKB 1	70	p70/NKB1
Q66/Q241	A3/A11	inhibitorisch	ja	cl-17.1C	140	p140
Q66/Q241	A3/A11	inhibitorisch	ja	cl-1.1	140	p140
Q66/Q241	A3/A11	inhibitorisch	ja	cl-5	140	p140

#### 1.4.3.3 CD 94-Familie

CD 94 kann mit verschiedenen anderen Proteinen Heterodimere bilden und gehört in die „C-type lectin superfamily“. Zu den Bindungspartnern gehören verschiedene Formen der NKG2-Proteinfamilie, die ebenfalls zur die „C-type lectin superfamily“ gehören: NKG2A,B,C, E und H [34]. NKG2A, zuerst als Kp43 bezeichnet, wurde dabei als erste Untereinheit von CD94 mit inhibitorischer Funktion entdeckt [35]. Neben einigen HLA-B-Allelen, die zur Gruppe Bw6 gehören, sollte dieser Rezeptorkomplex außerdem auch verschiedene HLA-A- und HLA-C-Allele erkennen, allerdings brauchte er im Vergleich zu den spezifischen p58-Molekülen eine wesentlich höhere Expression der HLA-C-Allele, um ein inhibitorisches Signal zu generieren [36]. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß die Rezeptorkomplexe aus CD94 und NKG2 lediglich HLA-E-Moleküle binden können [37]. HLA-E bindet bevorzugt Peptide, die in den Signalsequenzen verschiedener HLA-Klasse-Ia-Moleküle enthalten sind und diese

Liganden beeinflussen zum einen die Stabilität der HLA-E-Expression an der Zelloberfläche und zum anderen die Affinität zu CD94/NKG2A [38]. Aufgrund dieses Mechanismus ist der inhibitorische Einfluß auf CD94/NKG2A letztlich doch von der Expression verschiedener HLA-Klasse-Ia-Moleküle abhängig, erklärt andererseits aber auch das breite Spektrum an protektiven HLA-Molekülen. NKG2B bildet mit CD94 ebenfalls einen inhibitorischen Rezeptorkomplex und beide, NKG2A und B, besitzen eine intrazytoplasmatische ITIM-Sequenz. Im Gegensatz dazu stellen NKG2C, E und H aktivierende Untereinheiten dar. [39].

#### 1.4.4 Aktivierende NK-Rezeptoren

Die aktivierenden Rezeptoren der NK-Zellen wurden lange übersehen oder vernachlässigt, weil ihr Einfluß und ihre Aktivität meist von den inhibitorischen Rezeptoren überlagert wird. Dennoch konnten in den letzten Jahren einige der Rezeptoren erkannt und charakterisiert werden. Am besten untersucht sind dabei die Immunrezeptoren, die intrazytoplasmatisch an die sogenannte ITAM-Sequenz (immunoreceptor tyrosin-based activation motif) gekoppelt sind. Diese Kopplung erfolgt über transmembranäre Adapterproteine, von denen drei verschiedene in NK-Zellen exprimiert werden: CD3 $\zeta$ , Fc $\epsilon$ RI $\gamma$  und DAP12. Fc $\epsilon$ RI $\gamma$  und CD3 $\zeta$  können dabei als Homo- oder Heterodimer vorkommen, während DAP12 nur als Homodimer vorliegt [40],[41]. Der Signalweg über die ITAMs hat mehrere Stufen und resultiert letztendlich in erhöhter Zytotoxizität und Zytokinsekretion. Verschiedene Oberflächenrezeptoren sind an diese Adapterproteine und damit an die ITAMs gekoppelt:

- CD16: verantwortlicher Rezeptor für die ADCC (s.1.4.2), ist assoziiert mit einem Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ - und  $\zeta$ -Heterodimer. Aktivierung des Rezeptors resultiert unter anderem in: Tyrosinphosphorylierung von  $\zeta$  und Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ ; Aktivierung von Syk und ZAP 70; Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und der „mitogen-activated protein kinase“ (MAPK).
- NKp46: assoziiert mit Fc $\epsilon$ RI $\gamma$  und  $\zeta$  und wird sowohl von ruhenden als auch aktivierten NK-Zellen exprimiert, ist auf anderen Zellarten aber nicht

nachweisbar [42]. Der Ligand auf der Targetzelle ist noch nicht bekannt, es konnte über Blockierungsversuche aber gezeigt werden, daß der Ligand von manchen normalen Zellen und auch von manchen Tumorzellen exprimiert wird [43].

- NKp30: assoziiert mit FcεRIγ und ζ, wird selektiv sowohl von ruhenden als auch aktivierten NK-Zellen exprimiert. Die Expressionsdichte von NKp30 steht im Zusammenhang mit der von NKp46, der Ligand auf der Targetzelle ist noch nicht bekannt [44].
- NKp44: assoziiert mit DAP12 und wird nur von IL2-stimulierten NK-Zellen exprimiert. Auch von diesem Rezeptor ist noch kein spezifischer Ligand auf der Targetzelle bekannt. Die Expressionsdichte des Rezeptors steht ebenfalls im Zusammenhang mit jener der beiden anderen NKp-Moleküle [45],[46].
- CD94/NKG2C: assoziiert mit DAP12, bindet an HLA-E, ein MHC-Klasse-Ib-Molekül, in Abhängigkeit von dem gebundenen Peptid [47].
- CD94/NKG2D: assoziiert mit DAP 10, das keine ITAM-Sequenz enthält, aktiviert statt dessen auf einem alternativen Weg die PI3K [48],[49].

#### 1.4.5 Adhäsionsmoleküle

Für die Interaktion zwischen Lymphozyten und Leukozyten mit anderen Zellen spielen Adhäsionsmoleküle eine wichtige Rolle. Diese sind z.B. notwendig für die Leukozyten-Migration, aber auch für Zell-Zell-Kontakte wie das Binden einer Effektorzelle an eine Targetzelle. Es gibt verschiedene Klassen von Adhäsionsmolekülen, die in die Lymphozyten-Interaktionen involviert sind:

- Selektine: Sie sind Glykoproteine und sind beteiligt an der Bindung von zirkulierenden Zellen an Endothelzellen.
- Integrine: Sie sind ebenfalls Glykoproteine, die aus zwei Untereinheiten bestehen und als extrazelluläre Glykoproteinrezeptoren fungieren.
- Immunoglobulin Superfamily: Sie besteht aus einer ganzen Reihe von Molekülen, von denen die Adhäsionsmoleküle nur einen kleinen Teil ausmachen. Alle Moleküle dieser Familie haben wenigstens einen

Immunglobulin- oder immunglobulin-ähnlichen Abschnitt. Weil diese gemeinsamen Strukturen zuerst in Immunglobulinen gefunden wurden, waren diese für die Molekülfamilie namensgebend.

Über T-Zellen ist bekannt, daß der erste Kontakt zwischen einer T-Zelle und einer Target-Zelle über eine unspezifische Interaktion verschiedener Adhäsionsmoleküle auf den beiden Zellen stattfindet. Daran beteiligt sind die sogenannten intercellular adhesion molecules (ICAMs), die zur immunoglobulin superfamily gehören und die lymphocyte function-associated antigens (LFAs), die mit Ausnahme von LFA1, das zu den Integrinen gehört, ebenfalls zur immunoglobulin superfamily gehören:

- ICAM 1 (CD54): ein 90 kD großes Glykoprotein, das als Ligand für LFA 1 von zytotoxischen T-Zellen dient.
- ICAM 2 (CD102): dient als Ligand für Integrine und ermöglicht z.B. die Bindung von Lymphozyten an antigenpräsentierende Zellen.
- ICAM 3 (CD50): spielt wie ICAM 2 eine Rolle für die Interaktion zwischen Lymphozyten und antigenpräsentierenden Zellen.
- LFA 1 (CD11a/CD18): besteht aus einer 180 kD  $\alpha$ -Kette und einer 95 kD  $\beta$ -Kette und ist wichtig bei der Interaktion zwischen NK-Zellen und CTLs mit ihren Targetzellen.
- LFA 2 (CD2): ein 50 kD T-Zell-Antigen, das eine Rolle bei der Zelladhärenz zu spielen scheint und LFA 3 als Liganden bindet.
- LFA 3 (CD58): ein 60 kD Polypeptid, das u.a. auch auf B-Zellen, T-Zellen und Monozyten exprimiert wird und an CD2 bindet.

#### 1.4.6 NK-Zellen und Stammzelltransplantation

Der Erfolg einer allogenen Stammzelltransplantation hängt von zwei wesentlichen Komplikationen ab, dem Auftreten einer GvHD oder eines Rezidivs. Eine maximale T-Zell-Depletion des Transplantates kann zwar eine GvHD verhindern,

jedoch ist dies wiederum mit einem schlechteren engraftment und einer höheren Rezidivrate maligner Erkrankungen verbunden. Deshalb bietet sich für eine Immuntherapie nach einer allogenen Transplantation zum Beispiel die Gabe von Spender-NK-Zellen an.

Inwieweit sind jedoch NK-Zellen an einer GvHD beteiligt? Die Depletion von T-Zellen in einem Transplantat kann das Auftreten einer GvHD verhindern, auch wenn dieses noch NK-Zellen enthält [50]. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, daß die Gabe von allogenen IL-2-stimulierten NK-Zellen nach Transplantation mit einer deutlichen GvL-(graft versus leukaemia) Reaktion verbunden ist ohne jedoch eine GvHD hervorzurufen [51]. Eine Studie bei Patienten mit CML zeigte, daß niedrige NK-Zellzahlen mit einem höheren Risiko eines Rezidivs verbunden war, jedoch keine Korrelation zwischen hoher NK-Zellzahl und GvHD bestand [52]. Diese Studien legen alle nahe, daß die Gabe von NK-Zellen einerseits einen GvL-Effekt erzielt, andererseits nicht mit dem Auftreten einer GvHD verbunden ist.

## 1.5 Fragestellung

Ziel der Arbeit war die Untersuchung eines Verfahrens zur Anreicherung von NK-Zellen hinsichtlich der Reinheit und Funktionalität der angereicherten NK-Zellen und der Effektivität der T-Zell-Depletion. Neben FACS-Analysen zur phänotypischen Charakterisierung der angereicherten Zellen wurden dazu Zytotoxizitätstests und Proliferationsassays durchgeführt.

Außerdem sollte die zytotoxische Aktivität der so angereicherten NK-Zellen gegenüber leukämischen Blasten pädiatrischer Patienten in Abhängigkeit von verschiedenen Oberflächenmolekülen auf den leukämischen Blasten untersucht werden. Neben qualitativen FACS-Analysen verschiedener Adhäsionsmoleküle wurden dazu quantitative Analysen der HLA-Klasse-I-Expression durchgeführt. Zusätzlich sollte der Einfluß der HLA-Klasse-I-Expression durch Antikörper-Blockaden im Zytotoxizitätstest und die Effektivität der ADCC mit einem humanisierten CD19-Antikörper untersucht werden.

## 2 Material

### 2.1 Allgemeine Materialien

#### 2.1.1 Geräte sowie Glas- und Plastikmaterial

Sterile Werkbank Hera safe	Heräus
Brutschrank Hera cell	Heräus
Laborzentrifugen: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Rotixa 50 RS</li> <li>• Rotixa RP</li> </ul>	Hettich
Blutanalysegeräte: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cellcounter Advia 120</li> <li>• Minos STE</li> </ul>	Bayer Roche
Beheizbares Wasserbad	Köttermann
Ultraschallentgaser Sonorex, Super RK 106	Bandelin
Vortexer VF 2	Janke & Kunkel
Pipettiergerät Pipettboy	Tecnomara
Sterile Plastikpipetten (1, 2, 5, 10, 25ml)	Costar
Verstellbare Pipetten (Pipetman)	Gilson
Pipettenspitzen	Gilson
PPN – Röhrchen, steril, 15ml, 50ml	Greiner
Reaktionsgefäße, steril, 1,5ml	Eppendorf
Gewebekulturflasche, 250ml	Costar

Handschuhe	Safeskin
Spritzen, steril, 10ml, 20ml, 50ml	Braun
Butterfly 21	Abbott
Kanülen Sterican®, 20G, 22G, 24G	Braun

### 2.1.2 Stammlösungen

<p>Stammlösung A: Medium</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 500 ml RPMI 1640</li> <li>• 50 ml Fetales Kälberserum (FCS)</li> <li>• 5 ml L-Glutamin (200 mM)</li> <li>• 5 ml Penicillin(10000U)/Streptomycin (10mg/ml)</li> <li>• 12,5 ml Hepes-Buffer 1M</li> </ul>	<p>Biochrom</p> <p>PAA Laboratories</p> <p>Biochrom</p> <p>Biochrom</p> <p>Biochrom</p>
<p>Stammlösung B: MACS – Puffer</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 500 ml Phosphat buffered saline (PBS)</li> <li>• 10,6 ml EDTA (250 mM)</li> <li>• 10 ml Humanalbumin 20%</li> </ul>	<p>Gibco</p> <p>Universitätsapotheke</p> <p>DRK Baden-Württemberg</p>
<p>Stammlösung C: FACS – Puffer</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 500 ml Phosphat buffered saline (PBS)</li> <li>• 1,66 ml Bovine serum albumin (BSA), 30%</li> <li>• 5 ml Natriumazid, 10%</li> </ul>	<p>Gibco</p> <p>Sigma</p> <p>Sigma</p>



## 2.2 Material für die Isolierung mononukleärer Zellen

Peripheres Vollblut	Freiwillige Spender
Heparin: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Vetren® 200</li> <li>• Liquemin®</li> </ul>	Byk Gulden Roche
Ficoll	Seromed
Phosphat buffered saline (PBS)	Gibco

## 2.3 Material für die Zellanreicherung

Vario MACS (Magnet)	Miltenyi Biotec
MLC – 1 Handmagnet	Dynal
Separationssäule Typ LS <sup>+</sup>	Miltenyi Biotec
Stammlösung B	
Polyglobin 5%	Bayer
CD 56 Microbeads	Miltenyi Biotec
Dynabeads M450, CD 3	Dynal

## 2.4 Material für die Zellzählung und Mikroskopie

Neubauer Zählkammer	Brandt
Deckglas	Menzel
Trypanblau (0,4%)	Sigma
Lichtmikroskop	Zeiss
Inversionsmikroskop	Olympus

## 2.5 Material für den Zytotoxizitätstest

Sonifier Cell Disruptor B-12	Branson Sonic Power
Victor 1420 Multilabel Counter	Wallac
angeschlossene Hardware	Compaq
Software Wallac 1420 Workstation	Wallac
Mikrotiterplatte, U – Form, F - Form	Greiner
BATDA – Ligand	Wallac
Europium – Lösung	Wallac
Lyse – Puffer	Wallac
Anti – HLA ABC – Antikörper (clone W6/32, Subtyp IgG 2a,	Harlan
Anti – CD 19 – Antikörper, humanisiert	überlassen von PD Dr. Handgretinger

## 2.6 Material für den Proliferationsassay

1450 Microbeta Trilux	Wallac
angeschlossene Hardware	Compaq
Mikrobeta Windows Workstation	Wallac
Cell Harvester	Tomtec
Heat Sealer	Wallac
Mikrowelle	Siemens
Betaplate Scint	Wallac
Printed Filtermat A	Wallac
Sample Bag	Perkin Elmer
H <sub>3</sub> - Thymidin	Amersham Pharmacia Biotech
PHA – M	Sigma
Interleukin 2 (r-IL2)	Universitätsapotheke

## 2.7 Material für die Durchflußzytometrie

Geräte, Laborartikel und Reagentien

FACSCalibur	Becton Dickinson
angeschlossene Hardware	Apple
Auswertungsprogramm CellQuest	Becton Dickinson
Quifikit	Dako
Stammlösung C	
Analyseröhrchen <ul style="list-style-type: none"><li>• 5 ml, Rundboden</li><li>• spitz</li></ul>	Becton Dickinson Sarstedt

## Monoklonale Antikörper

Antikörper	Subtyp	Markierung	Hersteller
Kontrollantikörper $\gamma_1/\gamma_2$	IgG1	FITC	Becton Dickinson
	IgG2a	PE	
CD 2	IgG2a	FITC	Becton Dickinson
CD 3	IgG1	FITC	Becton Dickinson
CD 11a	IgG2a	FITC	Becton Dickinson
CD 16	IgG1	PE	Becton Dickinson
CD 19	IgG1	PE	Becton Dickinson
CD 45	IgG1	APC	Becton Dickinson
CD 50	IgG2b	FITC	Pharmingen
CD 54	IgG2b	PE	Becton Dickinson
CD 56	IgG1	PE	Becton Dickinson
CD 58	IgG2a	PE	Becton Dickinson
CD 94	IgG2a	PE	Immunotech
CD 95	IgG1	FITC	Immunotech
CD 102	IgG2a	FITC	Chemicon
CD 117	IgG1	PE	Immunotech
CD 158a	IgG1	PE	Immunotech
CD 158b	IgG1	PE	Immunotech
NKB 1	IgG1	PE	Becton Dickinson
CXCR 4	IgG2a	APC	Pharmingen
HLA-ABC	IgG2a	unmarkiert	Dako
Ziege-anti-Maus	Fab	FITC	Dako

## 3 Methoden

### 3.1 Isolierung peripherer mononukleärer Zellen mit Ficoll-Hypaque

#### 3.1.1 Hintergrundinformation

Die Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Hypaque erlaubt die Gewinnung peripherer mononukleärer Zellen (pMNC) durch die Trennung peripherer mononukleärer Zellen und anderer Blutzellen aufgrund der Dichteunterschiede der verschiedenen Zellen. Thrombozyten und pMNC haben eine geringere Dichte als Ficoll-Hypaque und sammeln sich auf der Ficollschicht an während z.B. Erythrozyten und Granulozyten eine höhere Dichte haben und sich deshalb unterhalb der Ficollschicht absetzen. Als Material diente heparinisiertes Vollblut freiwilliger Spender.

#### 3.1.2 Durchführung

1. Heparinisiertes Vollblut wird mit einer gleichen Menge PBS gemischt, 30 – 35 ml dieser Mischung werden in einem 50 ml Röhrchen vorsichtig auf 15 – 20 ml Ficoll-Hypaque aufgeschichtet.
2. Zentrifugation der Röhrchen 30 min bei Raumtemperatur mit 400g; Anlaufzeit 100s, Bremse 0.
3. Mit einer sterilen Pipette wird die oberste Schicht, die das Plasma und die Thrombozyten enthält, entfernt. Mit einer weiteren sterilen Pipette wird dann die Schicht, die die pMNC enthält, vorsichtig abgesaugt und in ein steriles 50ml Röhrchen überführt.
4. Waschen der pMNC: Röhrchen wird mit PBS aufgefüllt und bei 300g für 10 min zentrifugiert, anschließend wird der Überstand abgesaugt und das Zellpellet resuspendiert. Diese Schritte werden einmal wiederholt und je nach weiterer Verwendung das Pellet am Schluß in Medium oder PBS resuspendiert.

## 3.2 Zellanreicherung mit dem MACS-System

### 3.2.1 Hintergrund

„Magnetic-activated cell sorting“ erlaubt die Anreicherung oder Depletion bestimmter Zellen mit Hilfe immunomagnetischer Substanzen. Dazu markiert man die anzureichernden Zellen mit einem monoklonalen Antikörper, der an Epitope bindet, die für diese Zellsorte charakteristisch sind, z.B. CD 3 für T-Zellen. Diese Antikörper sind mit kleinen Metallpartikeln (Eisenoxid) konjugiert, die magnetisch sind. Läßt man das Zellgemisch nun über eine Trennsäule laufen, die mit einer paramagnetischen Eisenmatrix gefüllt ist und sich in einem starken Magnetfeld befindet, bleiben die magnetisch markierten Zellen dabei in der Säule hängen, während sich die Negativfraktion auswaschen läßt. Entfernt man danach die Säule aus dem Magnetfeld, lassen sich die markierten Zellen als Positivfraktion aus der Säule eluieren. Für die Anreicherung von NK-Zellen eignen sich gegen CD 56 gerichtete Antikörper, ein Adhäsionsmolekül (neural cell adhesion molecule, NCAM), das hauptsächlich auf NK-Zellen, allerdings auch auf bestimmten T-Zell-Subpopulationen vorkommt.

### 3.2.2 Durchführung

Die MACS – Anreicherung wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

1. Isolierung von pMNC wie in 3.1.2 beschrieben. Das Zellpellet wird dann in Puffer (Stammlösung B) aufgenommen und die Zellen auf eine Dichte 100 Mio. Zellen/ml Puffer eingestellt.

Alle nun folgenden Arbeitsschritte werden auf Eis, bei ca. 4°C durchgeführt.

2. Inkubation mit 50µl/ml Polyglobulin, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, für 10 min.

3. Inkubation mit CD 56 Beads für 30 min auf einem Schüttler, wobei 20µl Beads für  $10^7$  Zellen verwendet werden, bei einer Zelldichte von 100 Mio./ml also 200µl Beads für 1ml Zellsuspension.
4. Waschen der Zellen mit entgastem Puffer bei 300g für 10 min.
5. Resuspension des Zellpellets in 7 ml entgastem Puffer.
6. Installieren einer Trennsäule (VS )im Vario MACS und Spülen der Säule mit 10 ml entgastem Puffer.
7. Zellsuspension wird langsam auf die Säule aufgetragen und vollständig durch die Säule laufen gelassen.
8. Säule wird mit 5 mal 2ml Puffer gespült, um unmarkierte Zellen zu entfernen
9. Säule aus dem Magnet nehmen, auf ein 15ml Röhrchen aufsetzen, mit 7 ml Puffer auffüllen und diesen dann mit dem Stempel schnell und kräftig durch die Säule drücken, so daß die Zellen aus der Säule gespült werden.
10. Waschen der Zellen mit Puffer bei 300g für 10 min und Resuspendieren in Puffer
11. Zählen der Zellen in Neubauerkammer oder am Zählgerät.
12. Je nach weiterer Verwendung werden die Zellen auf eine bestimmte Zellzahl eingestellt und in Medium oder PBS aufgenommen.



### 3.3 T-Zell-Depletion mit Dynabeads

#### 3.3.1 Hintergrund

Die immunomagnetische Zellisolierung mit Dynabeads M-450 CD3 ist eine schnelle und verlässliche Methode zur T-Zell-Depletion. Dynabeads M-450 CD 3 sind magnetisierbare Polystyren-Beads, an die der für CD 3 spezifische monoklonale Primärantikörper gebunden ist. Dieser Antikörper vom Klon SPV-T3b reagiert mit dem 19-29kD CD 3 Antigen, das von allen ruhenden und aktivierten menschlichen T-Zellen exprimiert wird. Die mit den Beads markierten Zellen lassen sich dann mit einem Magneten von den unmarkierten Zellen trennen.

Die T-Zell-Depletion wurde nach der MACS-Anreicherung der CD 56 positiven Zellen durchgeführt, die dafür bereits magnetisch markiert wurden. Die magnetischen Partikel der Dynabeads sind mit einem Durchmesser von 4,5 µm jedoch wesentlich größer als die der MACS-Beads mit einem Durchmesser von 150nm, so daß für die Abtrennung der mit Dynabeads markierten Zellen ein schwächeres Magnetfeld ausreicht, das die mit MACS-Beads markierten Zellen nicht beeinflusst.

#### 3.3.2 Durchführung

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

1. Waschen der CD 56 positiven Zellen, Aufnahme in Puffer und Einstellen auf 20 Mio Zellen/ml.
2. Bestimmung der benötigten Menge der Dynabeads unter der Annahme, daß von den angereicherten Zellen noch ca. 20% CD 3/CD 56 doppelt positiv sind und ein Verhältnis von Beads zu Targetzellen von 20:1 erreicht werden soll.

3. Die Beads werden dreimal gewaschen, da diese als Suspension in einem Puffer vorliegen, der Natriumazid enthält, das toxisch für die Zellen ist.
4. Zugabe von Dynabeads im Verhältnis 20:1 und Inkubation im Überkopfschüttler bei 4°C für 30 Minuten.
5. Rörchen auf 7 ml Gesamtvolumen mit kaltem Puffer auffüllen.
6. Rörchen für 2 Minuten in den Magneten stellen und dann den Puffer, in dem sich die CD 3 negativen Zellen befinden, vom Rand her vorsichtig mit einer Pasteurpipette abpipettieren und in ein anderes Rörchen überführen.
7. Die im ursprünglichen Rörchen verbliebenen Zellen und Beads werden nochmals in 7 ml kalten Puffer resuspendiert und Schritt 6 noch einmal wiederholt, um die Ausbeute an CD 3<sup>-</sup>/CD 56<sup>+</sup> - Zellen zu erhöhen.
8. Die Zellen werden in der Neubauerkammer oder am Zählgerät gezählt.
9. Zellen werden gewaschen, in Medium aufgenommen und auf die gewünschte Zellzahl eingestellt.

### **3.4 Zytotoxizitätstest**

#### **3.4.1 Hintergrund**

Bei der hier angewandten Methode des BATDA – release assay handelt es sich um einen nicht – radioaktiven Zytotoxizitätstest, der als Alternative zum klassischen <sup>51</sup>Chromfreisetzungstest verwendet wurde. Die Methode wurde weitgehend so verwendet, wie sie von K. Blomberg et al. veröffentlicht wurde [53] und dient zur Bestimmung der Zytotoxizität von Lymphozyten gegenüber verschiedenen Targetzellen.

Das Prinzip des Test beruht auf dem Nachweis eines intrazellulären fluoreszenzverstärkenden Liganden im Zellüberstand, der nur von lysierten Zellen freigesetzt wird. Dazu werden zuerst die Targetzellen mit dem fluoreszenzverstärkenden Liganden (BATDA) inkubiert, der als hydrophobe

Verbindung die Zellmembran leicht passiert. Intrazellulär werden die Esterbindungen des Liganden hydrolysiert, so dass ein eine hydrophile Verbindung (TDA) entsteht, die die Zellmembran nicht mehr passieren kann. Die so markierten Targetzellen werden dann zusammen mit den Effektorzellen, z.B. T-Zellen oder NK – Zellen, inkubiert. Werden Targetzellen von den zytotoxischen Effektorzellen lysiert, tritt der hydrophile Ligand TDA in den Überstand über. Durch Zugabe von Europiumlösung läßt sich die Menge des freigesetzten Liganden über eine zeitverzögerte Fluoreszenz im Fluorometer messen, da er mit Europium einen stark fluoreszierenden und stabilen Chelatkomplex, EuTDA, bildet. Die Zytotoxizität der Effektorzellen, ausgedrückt in einem prozentualen Anteil an lysierten Targetzellen, kann nur errechnet werden, indem das Ergebnis auf die Anzahl der maximal lysierbaren Zellen bezogen wird. Im Test müssen deshalb folgende Werte zusätzlich bestimmt werden:

Maximallyse: Sie bezeichnet den Wert, der maximal erreicht werden kann, wenn alle Targetzellen lysiert werden.

Spontanlyse: Sie bezeichnet den Wert, der dadurch zustande kommt, daß Targetzellen ohne Einfluß von Effektorzellen absterben und den Liganden freisetzen.

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

$$\text{Spezifische Lyse in \%} = \frac{\text{Meßwert} - \text{Spontanlyse}}{\text{Maximallyse} - \text{Spontanlyse}} \times 100 \quad (3.1)$$

### 3.4.2 Durchführung

#### A Markierung der Targetzellen

1. Targetzellen werden in einem 15ml Röhrchen auf 1 Mio Zellen / ml Medium eingestellt.

2. Zugabe des BATDA – Liganden: 2,5µl / ml Zellsuspension für K562, 4µl / ml Zellsuspension für Blasten.
3. Inkubation für 30 min (K562) bzw. 60 min (Blasten) im Brutschrank bei 37° C.
4. Die Röhren werden mit auf 37° C angewärmtem Medium aufgefüllt und für 5 min bei 200g zentrifugiert (Blasten: 7 min, 300g). Dieser Waschschrift wird insgesamt fünfmal durchgeführt.
5. Die Zellen werden nun in der Neubauerzählkammer gezählt und auf 50000 / ml eingestellt (Blasten 200000 / ml), wobei durch die Zugabe von Trypanblau tote Zellen erkannt werden. Ist der Anteil toter Zellen nach dem Waschen zu groß, ist eine hohe Spontanlyse im Test zu erwarten, die das Testergebnis eventuell nicht auswertbar macht. Durch wiederholtes Waschen kann versucht werden, den Anteil toter Zellen zu vermindern.
6. Ein Teil dieser Zellen wird erneut zentrifugiert, da man den Überstand für die Backgroundbestimmung im Test benötigt (s.u.).

#### B Gewinnung der Effektoren und Herstellung einer Verdünnungsreihe

1. Effektoren werden am Vortag mit o.g. Methoden isoliert, in Medium aufgenommen und auf 2 Röhren verteilt in einer Konzentration von 1Mio Zellen / ml Medium. Zu einem Röhren wird r-IL 2 pipettiert in einer Endkonzentration von 1000 IE /ml und beide Röhren werden bis zum Zytotoxizitätstest am nächsten Tag in den Brutschrank gestellt.
2. Bei dem Nachweis zytotoxischer Eigenschaften werden die Effektorzellen in unterschiedlichen Verhältnissen zu einer gleichbleibenden Anzahl von Targetzellen pipettiert (E/T – Verhältnis), um zu verdeutlichen, daß sich die gemessene Zelllyse auf die zugegebenen Effektorzellen zurückführen läßt. Da beim Testansatz 100µl Effektorzellen pro well eingesetzt werden und die Zahl der Targetzellen durchgehend 5000 beträgt, muß für ein E/T – Verhältnis von 20 : 1 die Ausgangskonzentration der Effektoren  $1 \times 10^6$  Zellen / ml betragen.

3. Da mehrere E/T – Verhältnisse getestet werden, wird eine 1:2 Verdünnungsreihe über 4 Stufen hergestellt.

### C Testansatz

1. Der Test wird in einer Mikrotiterplatte (U – Form, 96 Kavitäten) angesetzt, wobei Background, Spontanlyse und Maximallyse jeweils 4-fach, die anderen Werte 3-fach bestimmt werden.
2. Für den Background werden 100 µl Überstand (s. Schritt A 6) und 100 µl Medium angesetzt, bei Blasten 25 µl Überstand und 175µl Medium
3. Der Ansatz für die Spontanlyse ergibt sich aus 100 µl Targetzellen (25µl bei Blasten) und 100 µl Medium (175 µl bei Blasten).
4. Der Ansatz für die Maximallyse wird zweimal auf unterschiedliche Weise angesetzt: Einmal werden 100 µl Targetzellen mit 20 µl Lysepuffer und 80 µl Medium angesetzt (Blasten 25 µl Targetzellen, 20 µl Lysepuffer, 155 µl Medium), ein zweiter Ansatz ergibt sich aus 100 µl Ultraschall – zertrümmerter Targetzellen und 100 µl Medium (bei Blasten 25 µl Targetzellen und 175 µl Medium)
5. Nun wird die benötigte Anzahl an wells mit einer entsprechenden Menge an Targetzellen beladen.
6. Soll eine ADCC (antibody dependent cellular cytotoxicity) durchgeführt werden, wird nun in die entsprechenden wells der Antikörper zu den Targetzellen pipettiert und die Platte 30 min inkubiert. Die ADCC wurde nur für Blasten getestet, weshalb diese auch in einer höheren Konzentration verwendet werden, um die Inkubation mit den Antikörpern in einem kleineren Volumen durchführen zu können. Die Antikörper werden in einer Konzentration von 1 µg/ml eingesetzt (= 0,2 µg/ well). Um eine Lyse durch Komplement auszuschließen, muß für die ADCC noch eine zusätzliche

Kontrolle aus 25 µl Targetzellen, Antikörper und 175µl Medium angesetzt werden.

7. Zu den Targetzellen werden nun jeweils 100µl der Effektorzellen in entsprechender Verdünnung pipettiert und die Platte anzentrifugiert (100g, 2 min, Bremse 3) und 2 Stunden im Brutschrank inkubiert.
8. Die Platte wird nun nochmals zentrifugiert (200g, 5 min, Bremse 3), da für den Nachweis des Liganden nur Überstand verwendet wird.
9. Eine entsprechende Anzahl an wells einer Flachbodenplatte wird nun mit 200 µl Europiumlösung und je 20 µl Überstand aus dem entsprechenden well der Testansatzplatte beladen und die Flachbodenplatte für 20 min auf einem Schüttler inkubiert.
10. Die Platte wird nun in den Multilabel-Counter gestellt und kann gemessen werden
11. Die gemessenen counts werden entsprechen der obigen Formel (3.1) in Prozentzahlen umgerechnet, wobei aus den 3fach und 4fach Bestimmungen jeweils Mittelwerte gebildet werden. Um die Güte des Tests abzuschätzen, wird eine Spontanlyse des Assays errechnet:

$$\text{Spontanlyse des Assays in \%} = \frac{\text{Spontanlyse} - \text{Background}}{\text{Maximallys e} - \text{Background}} \times 100 \quad (3.2)$$

Die Spontanlyse sollte nicht mehr als 30% betragen.

## 3.5 Durchflußzytometrie

### 3.5.1 Hintergrund

Die Durchflußzytometrie erlaubt die simultane Messung verschiedener physikalischer und chemischer Zelleigenschaften in einer Zellsuspension auf Einzelzellebene. Die Zellsuspension wird dazu von dem Meßgerät mit Überdruck in eine Meßküvette eingeführt und die Zellen werden stark beschleunigt. Dadurch trennen sich Aggregate auf und die Zellen können sequentiell durch einen Laserstrahl geführt werden. Dabei werden Streuungseffekte der Zellen und Fluoreszenzen der verwendeten fluoreszierenden Antikörper gemessen.

Faktoren, die auf die Lichtstreuung Einfluß nehmen, sind Zellgröße, Struktur der Zellmembran und intrazelluläre Bestandteile. Das Vorwärtsstreulicht (forward light scatter, FSC) ist ein Maß für die Zellgröße, während das dazu im rechten Winkel gestreute Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) von der intrazellulären Granularität abhängt. Es ergibt sich in der Darstellung Seitwärtsstreulicht gegen Vorwärtsstreulicht für Vollblut eine charakteristische Aufteilung der Zellen, in der Lymphozyten von Monozyten und Granulozyten unterschieden werden können.

Zur immunologischen Phänotypisierung werden die Zellen mit monoklonalen Antikörpern inkubiert, an die fluoreszierende Farbstoffe gekoppelt sind. Verwendet man unterschiedlich markierte Antikörper, können mehrere Antigene auf einer Zelle gleichzeitig nachgewiesen werden. Voraussetzung dafür ist jedoch neben einer gemeinsamen Anregbarkeit der Farbstoffe bei einer bestimmten Wellenlänge, daß die Gipfel der einzelnen Emissionsmaxima deutlich unterschiedlich sind und so mit verschiedenen Detektoren getrennt voneinander in bestimmten Kanälen gemessen werden können. Moderne FACS – Geräte besitzen deshalb mehrere Laser mit unterschiedlicher Wellenlänge, so daß sich das Spektrum der gleichzeitig einsetzbaren Farbstoffe deutlich erweitert. Häufig verwendete Farbstoffe sind z.B. Fluorescein-isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), PerCP oder Allophycocyanin (APC). Das für die Messungen dieser Arbeit verwendete Gerät arbeitet mit zwei Lasern unterschiedlicher Wellenlänge und es

können bis zu vier verschiedene Farbstoffe gleichzeitig verwendet werden, für die meisten Messungen wurde jedoch nur eine Doppelmarkierung durchgeführt.

Die Fluoreszenzintensität ist ein Maß für die Anzahl der gebundenen Antikörper auf der Zelle. Da die meisten Zellen auch ohne eine Anfärbung eine gewisse Autofluoreszenz zeigen, muß immer eine Kontrolle der Zellen gemessen werden und damit festgelegt werden, ab welcher Fluoreszenzintensität die Zelle als positiv gelten, d.h. die Fluoreszenz auf den gebundenen Antikörper und den entsprechenden Farbstoff zurückgeführt werden kann.

### **3.5.2 Durchführung**

#### A Immunfluoreszenzfärbung

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



## B Messung und Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung

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

1. Die Verstärkerspannungen für FSC und SSC werden so eingestellt, daß in der Darstellung SSC gegen FSC (SSC: y-Achse, FSC: x-Achse) die übliche Zellverteilung zustande kommt. Um die Zielpopulation, die Lymphozyten, kann in dieser Darstellung ein sogenanntes Gate gesetzt werden; dies erlaubt die Darstellung nur dieser Zellen hinsichtlich ihrer Fluoreszenz in einem weiteren Diagramm.
2. Anhand der Kontrollfärbung werden nun die Verstärkerspannungen der verschiedenen Meßkanäle so eingestellt, daß sich die Zellen im jeweiligen Kanal zwischen  $10^0$  und  $10^1$  der Fluoreszenzskala befinden.
3. Nach der Geräteeinstellung erfolgt die Messung der Proben. Zur Auswertung wird wieder ein Gate auf die Lymphozytenpopulation gesetzt; diese Zellen werden dann in einem weiteren Diagramm hinsichtlich ihrer Fluoreszenz dargestellt, wobei immer zwei Kanäle gegeneinander dargestellt werden, z.B. FITC gegen PE. Zur statistischen Auswertung wird in dieses Diagramm eine Quadrant gesetzt, der es erlaubt, Zellen als doppelt negativ, einfach positiv oder doppelt positiv zu definieren. Die absoluten und relativen Häufigkeiten dieser verschiedenen Zellen werden von der Software automatisch berechnet.

## 3.6 Quantitative Durchflußzytometrie

### 3.6.1 Hintergrund

Während in herkömmlichen FACS-Analysen Aussagen gemacht werden können, ob eine Zellpopulation z.B. ein bestimmtes Antigen an der Oberfläche präsentiert oder nicht, kann mit der quantitativen FACS-Analyse eine Aussage darüber getroffen werden, wieviel des jeweiligen Antigens pro Zelle exprimiert wird.

Wie bereits oben erwähnt, ist die Fluoreszenzintensität ein Maß für die Anzahl der gebundenen und entsprechend markierten Antikörper pro Zelle. Vergleicht man die Fluoreszenzintensität einer Zellpopulation mit der einer anderen, läßt sich unter der Voraussetzung, daß der zur Markierung verwendete Antikörper im Überschuß vorlag, eine Aussage darüber machen, welche Zellpopulation mehr der jeweiligen Moleküle exprimiert. Um aber nicht nur Zellen in einer Messung in Relation zueinander beurteilen zu können, ist es notwendig, die Zellen gegen Proben zu messen, deren genaue Antigenexpressionsdichte bekannt ist.

Für diese Arbeit wurde dafür das Qifikit von Dako verwendet. Es enthält als Referenzproben Beads, die mit einer definierten Menge eines Mausantikörpers markiert wurden und einen FITC-markierten Ziege-anti-Maus – Antikörper, der als Sekundärantikörper eingesetzt wird. Zum einen werden sogenannte Set-Up-Beads verwendet, die aus unmarkierten Beads und Beads mit einer hohen Zahl an Mausantikörper bestehen und zur Einstellung der Verstärkungen des FACS-Gerätes dienen. Zum anderen werden sogenannte Calibration-Beads verwendet, die aus fünf verschiedenen Beads mit bekannter Antikörperdichte bestehen.

Die Beads aus dem Kit werden mit einem FITC konjugierten Ziege-anti-Maus – Antikörper markiert und am Durchflußzytometer gemessen. Die Set-Up-Beads dienen dabei zur Verstärkereinstellung des FITC-Kanals. Die Einstellung wird so gewählt, daß sich die unmarkierte Population im Bereich zwischen  $10^0$  und  $10^1$  darstellt und die hochmarkierten Beads noch deutlich zur Darstellung kommen. Die eingestellte Verstärkung im FITC-Kanal muß für alle weiteren Messungen beibehalten werden. Es werden nun die Calibration-Beads und anschließend die

zu untersuchenden Zellen gemessen. Die Zellen, deren Antigenexpression bestimmt werden soll, werden dazu vorher mit einem gegen das entsprechende Antigen gerichteten Mausantikörper inkubiert und anschließend mit dem FITC-konjugierten Sekundärantikörper markiert, der auch für die Markierung der Beads verwendet wurde. Durch rechnerischen Vergleich lassen sich dann Aussagen über die Antigendichte auf den untersuchten Zellen machen.

In dieser Arbeit erfolgte die Bestimmung der HLA – Klasse I – Expression mit Hilfe der quantitativen Durchflußzytometrie. Als Primärantikörper wurde ein unmarkierter W6/32 – Antikörper der Firma Dako eingesetzt.

### **3.6.2 Durchführung**

#### A Immunfluoreszenzfärbung

1. Zellen werden auf eine Zellzahl von 1 – 2 Mio pro ml eingestellt.
2. In 2 Probenröhrchen werden jeweils 10µl Kontrollantikörper und Antikörper gegen HLA – Klasse I pipettiert, je 100 µl der Zellsuspension hinzugegeben und die Röhrchen geschüttelt (Vortexer).
3. Die Röhrchen werden anschließend für 45 min im Kühlschrank unter Lichtabschluß inkubiert.
4. Kurz vor Ablauf der Inkubationszeit werden jeweils 100µl der gut gemischten Set-Up-Beads und der Calibration-Beads in 2 Röhrchen pipettiert.
5. Alle Röhrchen werden dann mit Stammlösung C aufgefüllt, abzentrifugiert (400g, 10 min, 10°C) und dekantiert.
6. In jedes Röhrchen werden jeweils 100µl des Sekundärantikörpers pipettiert, der zuvor 1:10 mit Stammlösung C verdünnt wurde.
7. Die Röhrchen werden anschließend für 45 min im Kühlschrank unter Lichtabschluß inkubiert.

8. Die Röhren werden dann mit Stammlösung C aufgefüllt, abzentrifugiert (400g, 10 min, 10°C) und dekantiert.
9. Erfolgt keine weitere Markierung, können die Proben resuspendiert und am FACS – Gerät gemessen werden.
10. Sollen die Zellen mit einem weiteren Antikörper (APC oder PerCP) markiert werden, werden jeweils 100 µl Mausserum in die Probenröhren pipettiert und 10 min im Kühlschrank inkubiert. Die Beads werden während dieser Schritte bis zur Messung unter Lichtabschluß im Kühlschrank aufbewahrt.
11. Nun werden 10µl des entsprechenden Antikörpers hinzupipettiert und die Röhren für weitere 15 min im Kühlschrank inkubiert.
12. Die Röhren werden dann nochmals mit Stammlösung C aufgefüllt, abzentrifugiert (400g, 10 min, 10°C) und dekantiert.
13. Die Zellen werden resuspendiert und bis zur Messung unter Lichtabschluß im Kühlschrank aufbewahrt.

#### B Messung und Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung

Die Messung erfolgt wie bereits oben (3.5.2) beschrieben, wobei die Verstärkung des FITC – Kanals anhand der Set-Up-Beads so eingestellt wird, daß sich die unmarkierte Population in einem Histogramm im Bereich zwischen  $10^0$  und  $10^1$  darstellt und die hochmarkierten Beads noch deutlich zur Darstellung kommen

Abb. 3.1). Anschließend werden mit derselben Einstellung für den FITC-Kanal die Calibration – Beads und die Zellen gemessen. Um die Zellen im Scatter gut zur Darstellung bringen zu können, muß eventuell die Verstärkerspannung für den Side Scatter verändert werden.

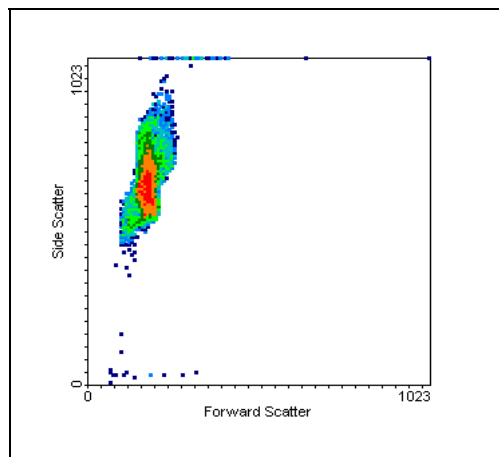


Abb. 3.1: Set-Up-Beads im Scatter

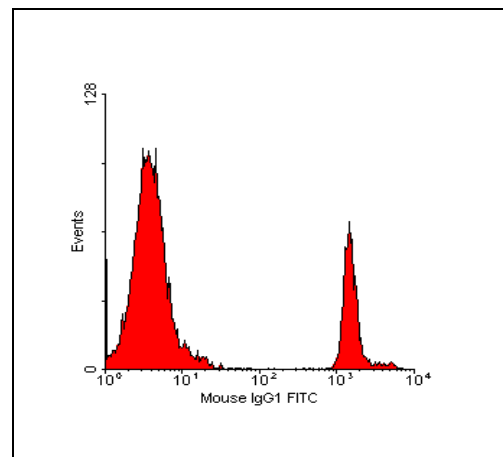


Abb. 3.2: Set-Up-Beads im Histogramm

Man läßt sich die Meßergebnisse in einem Histogramm darstellen und kann das geometrische Mittel der Fluoreszenzintensität der zugehörigen Histogrammstatistik entnehmen. Die verschiedenen Populationen der Calibration-Beads müssen im Histogramm markiert werden, um getrennte Werte der Fluoreszenzintensität zu erhalten. Die Antigendichte der Beads ist chargenspezifisch und kann der Packungsbeilage des Kits entnommen werden. Man legt nun eine Tabelle an, z.B. in Excel, in der die Fluoreszenz der fünf Populationen der Calibration-Beads und die jeweilige Antigendichte eingetragen werden. Diese Tabelle dient als Grundlage für ein Diagramm, in dem man sich die Formel der aus den eingetragenen Werten resultierenden Geraden anzeigen läßt. Setzt man nun in diese Formel die Fluoreszenz der untersuchten Zellen ein, läßt sich die Antigendichte auf den Zellen berechnen. Dabei ist jedoch zu beachten, daß die Anzahl der Oberflächenmoleküle der Kontrolle noch von dem errechneten Wert für Probe abgezogen werden muß:

$$SABC = ABC - BAE \quad (3.3)$$

wobei SABC (Specific Antibody-Binding Capacity) die Anzahl der pro Zelle gebundenen Primärantikörper nach Abzug des Backgrounds bezeichnet, ABC

(Antibody-Binding Capacity) die Anzahl der gebundenen Primärantikörper pro Zelle und BAE (Background Antibody Equivalent) die gemessene ABC der Negativkontrolle, die sich aufgrund der Eigenfluoreszenz und der unspezifisch gebundenen Kontrollantikörper ergibt.

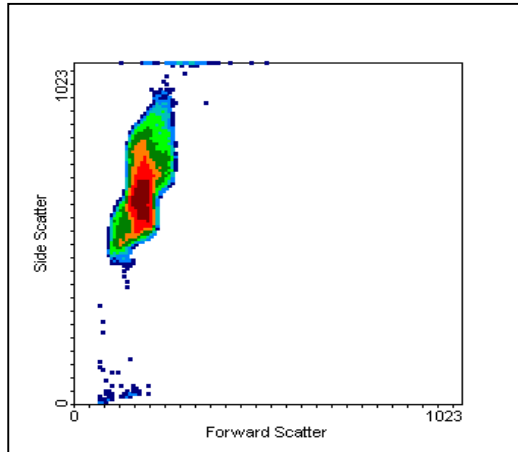


Abb. 3.3: Calibration-Beads im Scatter

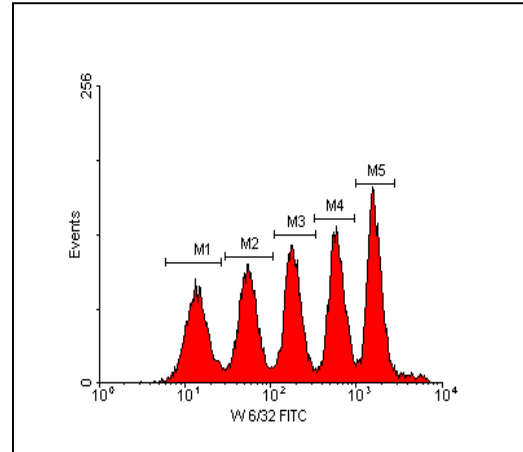


Abb. 3.4: Calibration-Beads im Histogramm: die fünf unterschiedlichen Populationen sind erkennbar

Abb. 3.5: Zu Abb. 3.4 gehörende Histogramm – Statistik; die Geomean – Werte der fünf Populationen können abgelesen werden.	M	Low,High	Events	%Total	%Gated	GMean	CV
	0	0,1023	32730	100.00	100.00	204.54	32.77
	1	200, 370	5678	17.35	17.35	13.98	11.14
	2	378, 521	5881	17.97	17.97	55.66	6.28
	3	525, 649	6300	19.25	19.25	186.46	4.16
	4	645, 768	6837	20.89	20.89	600.27	3.31
	5	768, 884	7430	22.70	22.70	1648.77	2.59

## 3.7 Proliferationsassay

### 3.7.1 Hintergrund

Der Proliferationsassay dient zum Nachweis alloreaktiver T-Lymphozyten und wird auch als MLR (mixed lymphocyte reaction) oder MLC (mixed lymphocyte culture) bezeichnet. Dabei werden die Lymphozyten eines Spenders mit den zuvor bestrahlten Lymphozyten eines potentiellen Empfängers mehrere Tage inkubiert. Die bestrahlten Zellen dienen dabei als Stimulatorzellen, die selber nicht mit Zellteilung oder DNA-Synthese auf eine Stimulation durch die Lymphozyten des anderen Spenders reagieren können. Nach mehrtägiger Inkubation erfolgt die Messung der Zellproliferation über den Einbau von  $^3\text{H}$ -Thymidin in die sich vermehrenden Zellen.

### 3.7.2 Durchführung

Es wurden jeweils  $5 \times 10^4$  Zellen nach den verschiedenen Anreicherungsschritten in 96-Loch-Mikrotiterplatten pipettiert und entweder mit  $5 \times 10^4$  bestrahlten Stimulatorzellen (3000 cGy) eines anderen Spenders, mit Medium oder mit mitogenhaltigem Medium (PHA) gemischt wobei jeder Ansatz 3-fach pipettiert wurde. Als Kontrolle, ob die NK-Zellen noch eine Proliferationskapazität besitzen, wurde zusätzlich ein Ansatz mit den angereicherten Zellen und IL-2-haltigem Medium (1000 IE/ml) pipettiert.

Nach einer 5-tägigen Inkubation im Brutschrank bei  $37^\circ$  wurde zu den Ansätzen  $^3\text{H}$ -Thymidin (46.25 kBq pro Ansatz) in  $10 \mu\text{l}$  Kulturmedium pipettiert und die Inkubation für 18h fortgesetzt. Anschließend wurden die Platten bei  $-20^\circ \text{C}$  eingefroren.

Zur Messung wurden die Platten aufgetaut und die Zellkerne mit dem Cell Harvester auf Nitrocellulose-Filter übertragen und so von nicht eingebautem  $^3\text{H}$ -Thymidin befreit. Nach dem Trocknen der Filter in der Mikrowelle wurden diese in Plastikbeutel nach Zugabe von Szintillationsflüssigkeit eingeschweißt und im Beta-Counter gemessen.

### **3.8 Zellkultur**

Die erythroleukämische Zelllinie K562 wurde als typische NK-sensitive Targetzelle eingesetzt. Sie wurde als Suspensionskultur in Stammlösung A geführt. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage umgesetzt, zudem einen Tag vor jedem Zytotoxizitätstest, um für den Test eine hohe Vitalität der Zellen und damit eine möglichst geringe Spontanlyse (s. 3.4.1) zu erreichen.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Anreicherung der NK – Zellen

Ziel dieser Untersuchung war ein Methode zu evaluieren, mit der es möglich ist, NK – Zellen in hoher Zahl und guter zytotoxischer Funktion zu isolieren und gleichzeitig die Zahl von T – Zellen möglichst gering zu halten. Dazu wurden aus Vollblut freiwilliger Spender über einen Ficoll – Gradienten pMNC isoliert, diese wurden mit dem MACS – System nach CD 56 angereichert, anschließend erfolgte eine T – Zell – Depletion mit Dynabeads, die gegen CD 3 gerichtet sind. Die Zahl der unterschiedlichen Zellen wurde berechnet, indem mit einer durchflußzytometrischen Untersuchung der prozentuale Anteil der jeweiligen Zellen an der Gesamtzahl der Lymphozyten im Differentialblutbild ermittelt wurde. Nach den einzelnen Anreicherungs – bzw. Depletionsschritten wurde dazu eine FACS – Analyse durchgeführt, außerdem wurden die zytotoxische Aktivität gegenüber K562 und das Proliferationsverhalten in einer MLC gegenüber allogener und mitogener Stimulation untersucht.

#### 4.1.1 Anreicherung der CD 56<sup>+</sup>- Zellen mit dem MACS – System

Als Ausgangszellen für die MACS-Anreicherung dienten pMNC freiwilliger Spender, die über eine Ficoll – Dichtezentrifugation gewonnen wurden. Der Anteil der NK-Zellen betrug in diesen Ausgangszellen durchschnittlich  $22,38 \pm 5,40\%$ , der der T-Zellen  $64,21 \pm 5,25\%$  (Tab. 4.).

Tab. 4.1: Zusammensetzung der Lymphozyten vor MACS-Anreicherung

Versuch	Zellzahl der Lymphozyten x 10 <sup>9</sup>	CD 56 <sup>+</sup> , CD 3 <sup>-</sup>		CD 3 <sup>+</sup>	
		in %	in Millionen	in %	in Millionen
1	0,10	23,53	23,53	64,44	64,44
2	0,13	12,01	15,01	72,29	90,36
3	0,05	23,31	11,02	65,2	30,84
4	0,07	27,03	20	59,03	43,68
5	0,10	26,18	26,63	60,1	61,12
6	0,11	22,2	24,32	57,05	62,55
Median	0,10	23,42	21,77	64,44	61,84
Minimum	0,05	12,01	11,02	59,03	30,84
Maximum	0,13	27,03	26,63	72,29	90,36
<b>Mittelwert</b>	<b>0,09</b>	<b>22,38</b>	<b>20,09</b>	<b>64,21</b>	<b>58,83</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,03</b>	<b>5,40</b>	<b>6,01</b>	<b>5,25</b>	<b>20,29</b>

Nach der MACS – Anreicherung wurde aus den absoluten Zahlen die Ausbeute der NK - Zellen berechnet. Dazu wurde die Zahl der CD 56<sup>+</sup>/CD 3<sup>-</sup> - Zellen nach der Anreicherung auf deren Zahl vor der Anreicherung prozentual bezogen:

$$\text{Ausbeute in \%} = \frac{\text{Anzahl CD 56}^+, \text{CD 3}^- \text{ nach Anreicherung}}{\text{Anzahl CD 56}^+, \text{CD 3}^- \text{ vor Anreicherung}} \times 100 \quad (4.1)$$

Dabei wurden von den CD 56<sup>+</sup>/CD 3<sup>-</sup> - Zellen vor Anreicherung noch gemäß dem prozentualen Anteil die Zahl der Zellen abgezogen, die für die FACS – Analyse und den Proliferationsassay verwendet wurden.

Tab. 4.2: Zusammensetzung der Lymphozyten nach MACS-Anreicherung

Versuch	Zellzahl der Lymphozyten x 10 <sup>6</sup>	CD 56 <sup>+</sup> , CD 3 <sup>-</sup>		CD 3 <sup>+</sup>	
		in %	in Millionen	in %	in Millionen
1	25	77,09	19,3	15,1	3,775
2	9,2	79,18	7,3	13,13	1,21
3	11,9	89,37	10,6	9,97	1,19
4	20,9	87,78	18,3	11,75	2,46
5	24,7	88,51	21,9	10,84	2,68
6	22,44	80,67	18,1	19,06	4,28
Median	21,67	84,23	18,22	12,44	2,57
Minimum	9,20	77,09	7,28	9,97	1,19
Maximum	25,00	89,37	21,86	19,06	4,28
<b>Mittelwert</b>	<b>19,02</b>	<b>83,77</b>	<b>15,92</b>	<b>13,31</b>	<b>2,60</b>
<b>Standard- abweichung</b>	<b>6,79</b>	<b>5,39</b>	<b>5,65</b>	<b>3,35</b>	<b>1,28</b>

#### 4.1.2 Depletion der T – Zellen mit Dynabeads

Um den Anteil der T – Zellen nach MACS – Anreicherung zu vermindern und die Reinheit der NK – Zellen zu erhöhen wurde im Anschluß eine Depletion der T-Zellen mit Dynabeads durchgeführt.

Der Anteil der NK – Zellen nach T-Zell-Depletion betrug durchschnittlich  $96,84 \pm 3,43\%$ , der der T-Zellen  $0,39 \pm 0,29 \%$  (s. Tab. 4.).

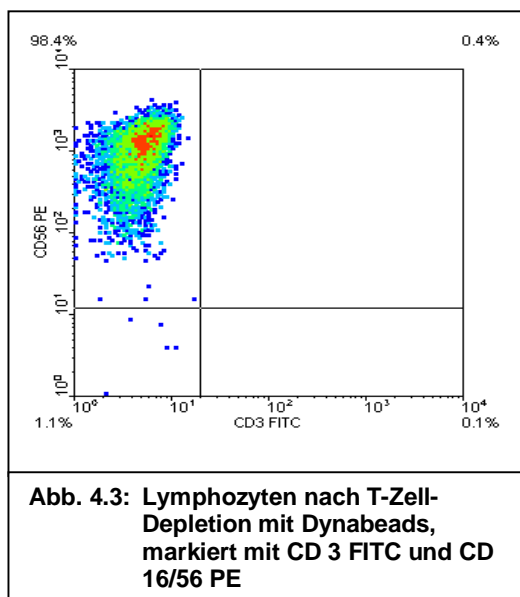
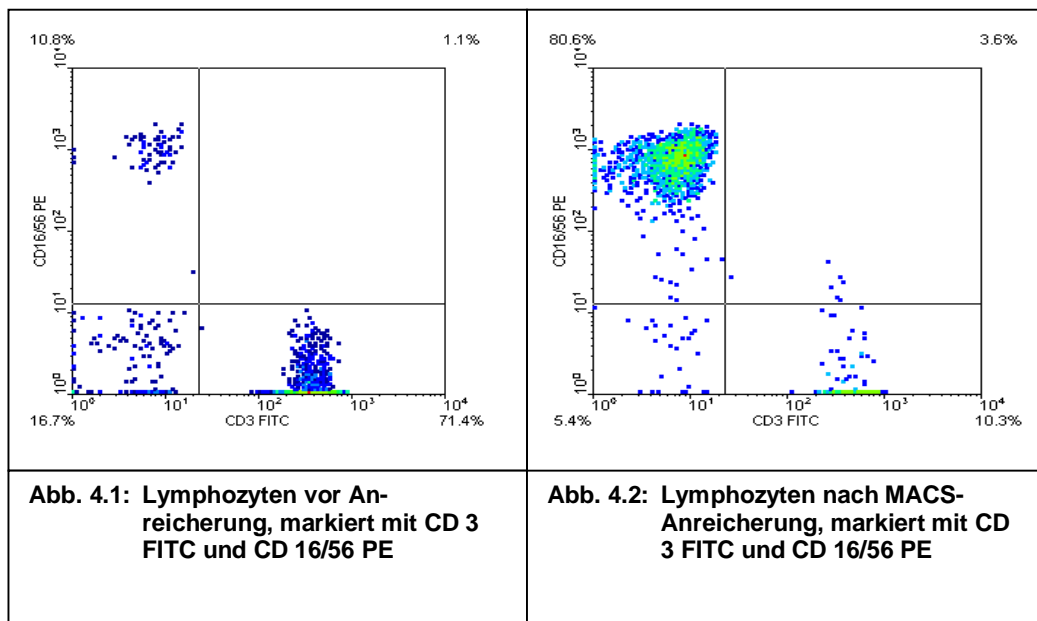
Die Ausbeute betrug  $85,27 \pm 9,3 \%$ , das heißt, circa 15% der CD 56<sup>+</sup>/CD 3<sup>-</sup> gingen bei der T-Zell-Depletion verloren.

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

Versuch	Zellzahl der Lymphozyten $\times 10^6$	CD 56 <sup>+</sup> , CD 3 <sup>-</sup>		CD 3 <sup>+</sup>	
		in %	in Millionen	in %	in Millionen
1	19	94,85	18,0	0,57	0,1083
2	7,2	90,67	6,5	0,9	0,0648
3	8,4	98,55	8,3	0,21	0,018
4	12	99,12	11,9	0,14	0,017
5	12,35	99,05	12,2	0,22	0,027
6	11,7	98,78	11,6	0,3	0,035
Median	11,85	98,67	11,73	0,26	0,03
Minimum	7,20	90,67	6,53	0,14	0,02
Maximum	19,00	99,12	18,02	0,90	0,11
<b>Mittelwert</b>	<b>11,78</b>	<b>96,84</b>	<b>11,42</b>	<b>0,39</b>	<b>0,05</b>
<b>Standard-abweichung</b>	<b>4,12</b>	<b>3,43</b>	<b>3,95</b>	<b>0,29</b>	<b>0,04</b>

Insgesamt ergab sich bei der 2 Stufen NK – Anreicherung also eine Reinheit von  $96,84 \pm 3,43\%$  und eine Ausbeute von  $71,4 \pm 15,79 \%$ . Während der Anteil der  $CD 56^+/CD 3^-$  - Zellen im Vergleich zu den Ausgangszellen um den Faktor 4,32 erhöht werden konnte, gelang eine T-Zell-Depletion um den Faktor  $4,52 \times 10^{-3}$ .

Abbildungen 4.1 – 4.3 zeigen Beispiele für typische Ergebnisse der FACS – Analyse vor und nach den einzelnen Anreicherungsschritten. Dabei wurde zuvor im Scatterbild ein Gate auf die Lymphozyten gesetzt, so daß nur diese im „density plot“ zur Darstellung kommen.



### 4.1.3 Zytotoxizitätstest

Die Funktion der NK – Zellen vor und nach den einzelnen Anreicherungsritten wurde in Zytotoxizitätsassays ermittelt. Um zusätzlich die Stimulierbarkeit durch IL 2 zu testen, wurden die Zellen über Nacht bei 37°C in Stammlösung 1 inkubiert, wobei einem Teil der Zellen 1000 U/ml IL 2 zugesetzt wurden.

Die zytotoxische Potenz der Zellen wurde dann am nächsten Tag gegenüber der NK sensitiven Zelllinie K562 getestet. Dieser Test wurde bei vier der sechs Anreicherungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 4.4 und 4.5 und in Tabelle 4.4 dargestellt. Es zeigt sich eine deutliche Zunahme der Zytotoxizität nach den Anreicherungsritten und eine zusätzliche Erhöhung durch die Inkubation mit Interleukin 2.

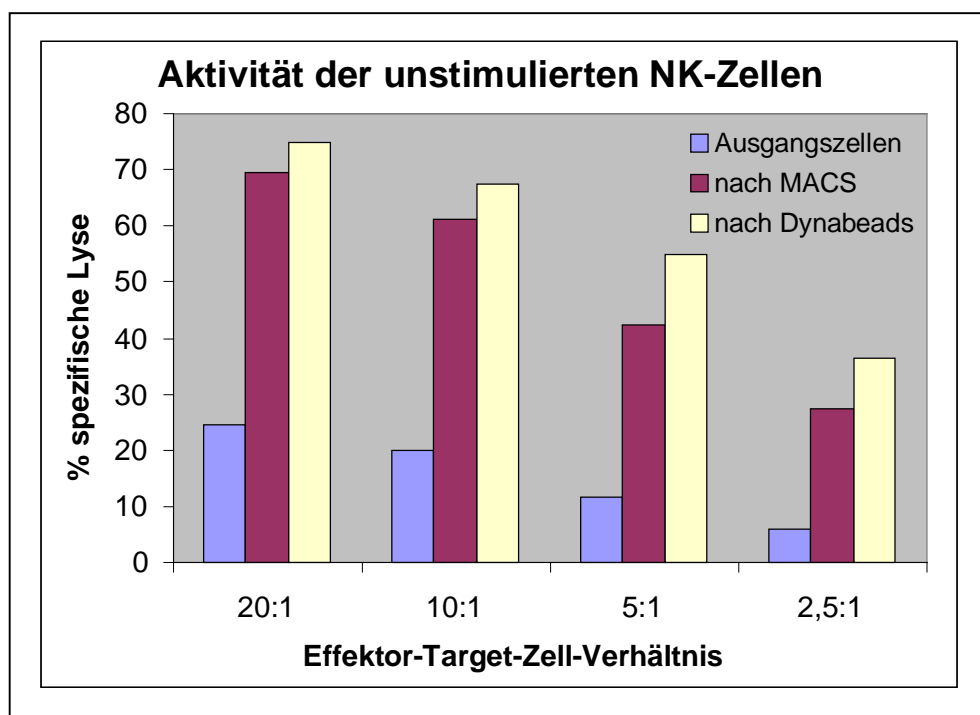
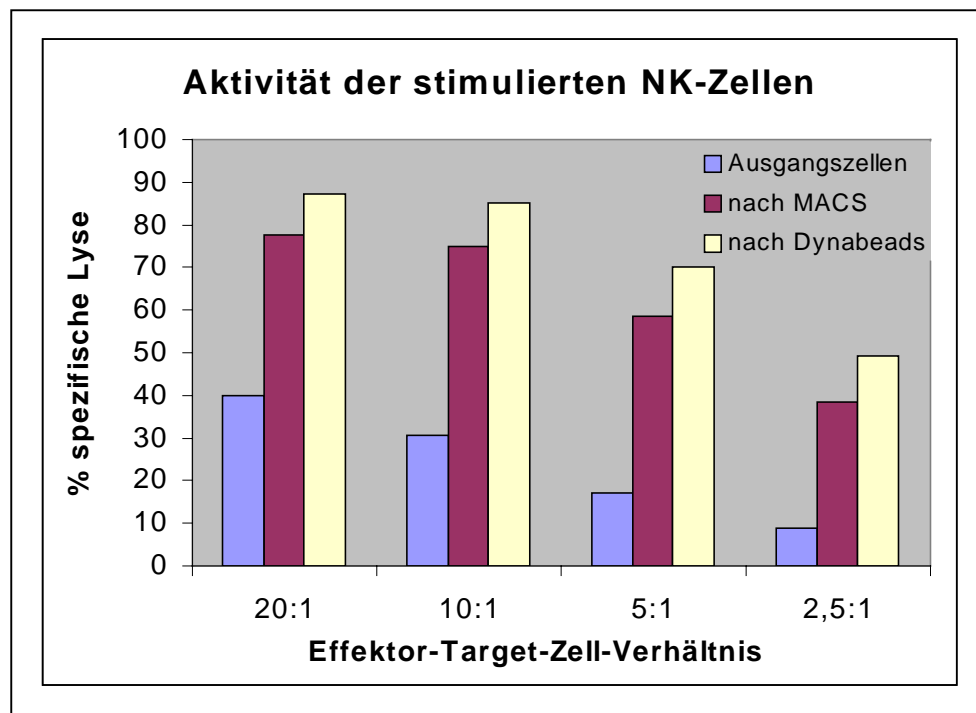


Abb. 4.4: Durchschnittliche zytotoxische Aktivität der unstimulierten Zellen nach den verschiedenen Anreicherungsritten

**Tab. 4.4: Steigerung der Zytotoxizität durch die Anreicherungsschritte bei einem E:T - Verhältnis von 20:1 als repräsentatives Beispiel**

Spezifische Lyse der unstimulierten Zellen				Spezifische Lyse der stimulierten Zellen			
vor Anreicherung	nach MACS	nach Dynabeads	x-fache Steigerung	vor Anreicherung	nach MACS	nach Dynabeads	x-fache Steigerung
24	70	75	3,125	40	78	87	2,175



**Abb. 4.5: Durchschnittliche zytotoxische Aktivität der stimulierten Zellen nach den verschiedenen Anreicherungsschritten**

#### 4.1.4 Proliferationsassay

In diesem Test wurde das Proliferationsverhalten der Lymphozyten vor und nach den Anreicherungsschritten untersucht, um die Effektivität der T-Zell-Depletion zu verdeutlichen. Das Proliferationsvermögen der nach den Anreicherungs- und Depletionsschritten noch enthaltenen T-Zellen wurde mit PHA – Stimulation untersucht, Interleukin 2 wurde als Positivkontrolle für die NK-Zellen verwendet.

Das alloreaktive Reaktionsvermögen der T-Zellen wurde simuliert, indem die Zellen mit bestrahlten pMNC einer nicht HLA-identischen Person inkubiert wurden.

Bei der PHA-Stimulation konnte die Aktivität durch die MACS-Anreicherung auf  $3,22 \pm 4\%$  der Aktivität der Ausgangszellen, durch die T-Zell-Depletion weiter auf  $0,83 \pm 1\%$  gesenkt werden, während die Stimulierbarkeit mit IL2 auch nach den Anreicherungsschritten erhalten blieb.

Die alloreaktive Aktivität betrug nach MACS  $18,87 \pm 15\%$ , nach der T-Zell-Depletion  $12,14 \pm 9\%$  des Ausgangswertes (s. Abb. 4.6)

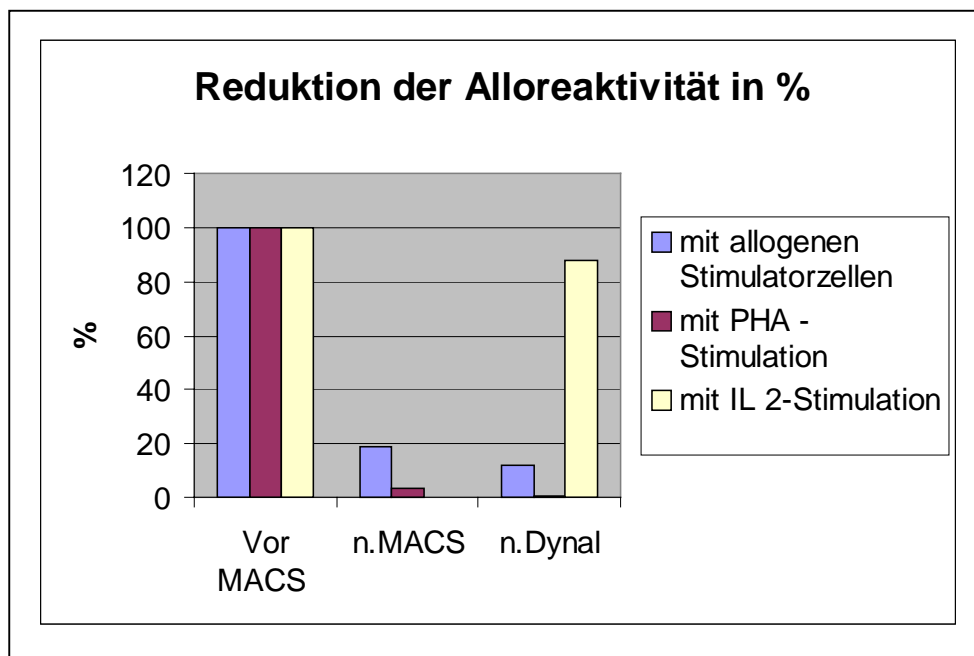


Abb. 4.6: Reduktion der Alloreaktivität und des Proliferationsverhaltens auf PHA nach den einzelnen Anreicherungsschritten bezogen auf die Werte der Ausgangszellen.

## 4.2 Zytotoxische Aktivität angereicherter NK-Zellen gegenüber leukämischen Blasten

Die Aktivität der nach o.g. Methoden angereicherten NK-Zellen wurde gegenüber leukämischen Blasten von 27 verschiedenen Patienten getestet. Davon hatten 21



Patienten eine Leukämie der B-Zell-Reihe (cALL, prä-B-ALL, B-ALL) und 6 Patienten eine Leukämie der T-Zell-Reihe (prä-T-ALL, T-ALL). Einschlusskriterium war ein hoher prozentualer Anteil (>80%) in der Peripherie oder im Knochenmark, da im Zytotoxizitätstest ein für die Blasten spezifisches Ergebnis erreicht werden sollte.

Die Reinheit der NK-Zellen wurde nach dem letzten Anreicherungsschritt mittels einer FACS-Analyse getestet. In Tabelle 4.5 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen für verschiedene Oberflächenmoleküle angegeben. Die NK-Zellen stammten in diesen Versuchen immer von demselben Spender, um den Einfluß der unterschiedlichen Zusammensetzung der NK-Zellen auf die Tumorlyse möglichst gering zu halten. Die HLA-Phänotypisierung des Spenders, die in der Abteilung für Transfusionsmedizin der Universität Tübingen durchgeführt wurde, ergab folgenden Befund: A 2/-, B 35/52, Cw4/Cw9. Da Cw9 an KIR-Rezeptoren der Gruppe 2 bindet und B 52 serologisch zur Gruppe HLA-Bw4 gehört und an den entsprechenden KIR-Rezeptor bindet, verfügt der Spender über potentiell alloreaktive NK-Zellen gegenüber Leukämien, die nur HLA-Moleküle aus einer oder zwei der drei HLA-Gruppen exprimieren.

**Tab. 4.5: Charakterisierung der angereicherten NK-Zellen**

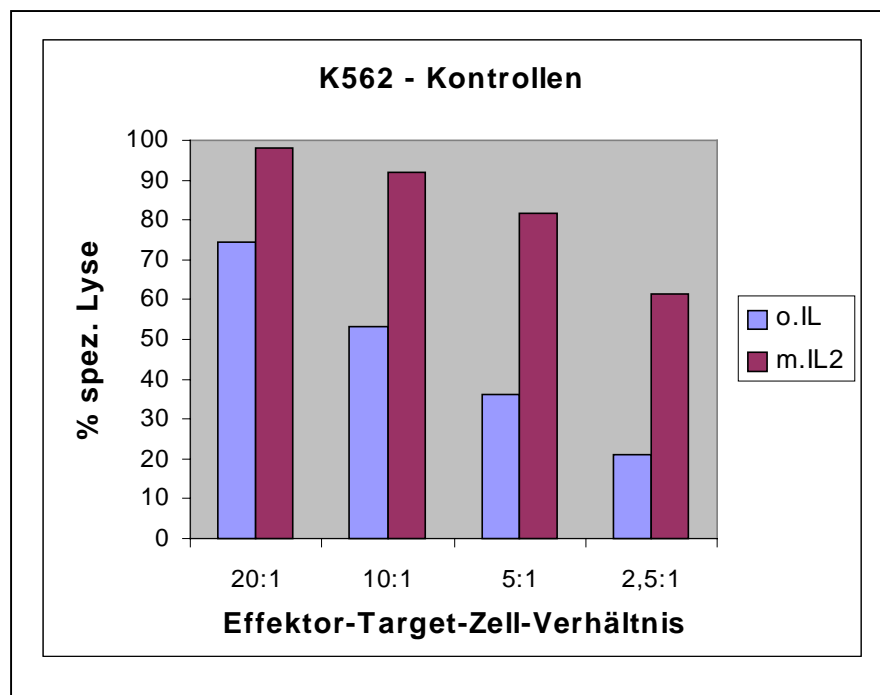
	<b>CD 3</b>	<b>CD 16/56</b>	<b>CD94</b>	<b>CD158a</b>	<b>CD158b</b>	<b>NKB1</b>
<b>Mittelwert</b>	0,23	98,04	86,55	45,68	29,44	17,63
<b>Standard-abweichung</b>	0,10	0,86	10,42	7,33	0,74	1,05

Da die Tumorzellen akuter lymphatischer Leukämien als wenig NK-empfindlich gelten, wurden als Kontrolle für die Aktivität der NK-Zellen zusätzlich immer auch K562 Zellen verwendet, die als typisches NK-Target gelten, da unstimulierte und stimulierte NK-Zellen diese Zelllinie sehr gut lysieren können. Die Ergebnisse gegenüber K562 zeigen bei unstimulierten NK-Zellen große Schwankungen, während mit IL2 stimulierten NK-Zellen und hohen E:T-

Verhältnissen stabilere Ergebnisse erzielt wurden, erkennbar an den großen bzw. kleinen Standardabweichungen (s. Tab. 4.6 und Abb. 4.7).

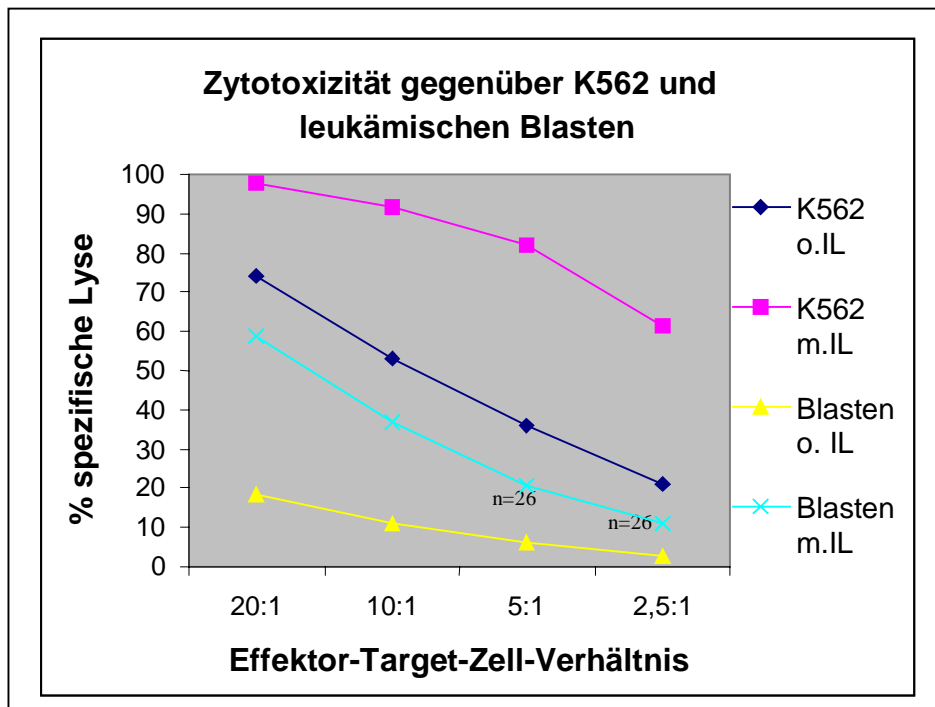
**Tab. 4.6: Ergebnisse der K562 - Kontrollen im Zytotoxizitätstest, Mittelwerte und Standardabweichung aus 13 unabhängigen Versuchen**

E:T-Verhältnis	ohne IL 2		mit IL 2	
	Mittelwert	Standardabw.	Mittelwert	Standardabw.
20:1	74	20,33	98	2,33
10:1	53	23,44	92	7,59
5:1	36	14,18	82	15,35
2,5:1	21	8,77	61	16,65



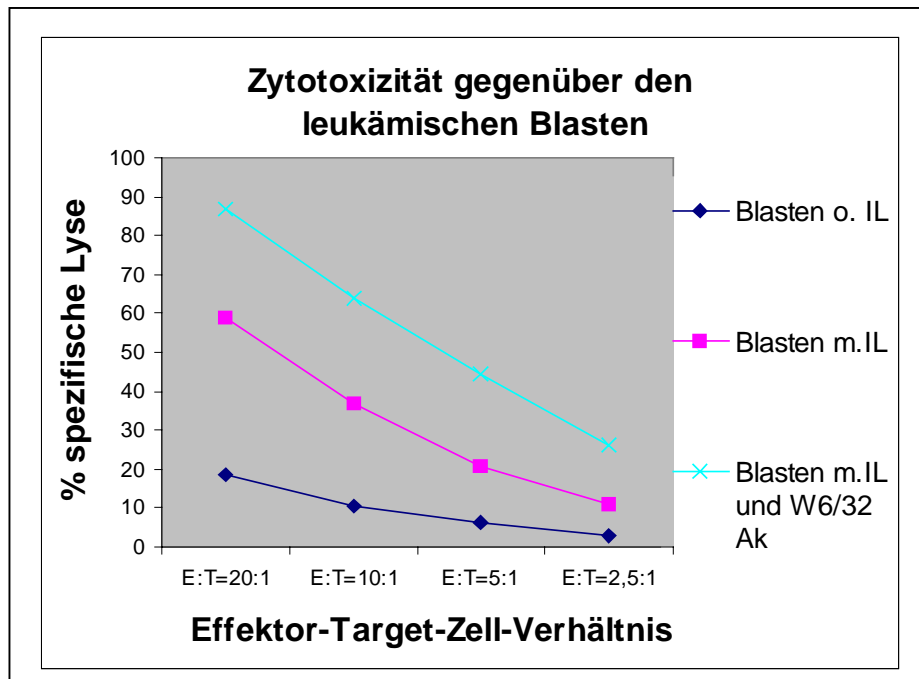
**Abb. 4.7: Zytotoxizität der angereicherten NK-Zellen gegenüber K562 aus 13 unabhängigen Versuchen**

Im Vergleich mit den K562-Zellen zeigen die NK-Zellen gegenüber den leukämischen Blasten eine deutlich geringere lytische Aktivität. Selbst die IL2 stimulierten NK-Zellen zeigen geringere spezifische Lysen gegenüber den Blasten als unstimulierte NK-Zellen gegenüber K562 (s. Abb. 4.8).



**Abb. 4.8:** Vergleich der Zytotoxizität der angereicherten NK-Zellen gegenüber leukämischen Blasten (für Blasten mit IL n=27, für Blasten o.IL n=25) und den K562-Kontrollen (n=13).

Als Grund für die unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber NK-Zellen wurde die Expression von HLA-Klasse I - Molekülen der Leukämiezellen angenommen und deshalb versucht, diese Moleküle auf der Oberfläche der Leukämiezellen mit einem Antikörper zu maskieren und damit die Lysierbarkeit durch NK-Zellen weiter zu erhöhen. Dazu wurden die Zellen 30 Minuten mit einem Antikörper inkubiert (Klon W6/32), der an HLA-Klasse I Moleküle der Untergruppen A,B und C bindet. Dadurch konnte die Empfindlichkeit gegenüber den NK-Zellen nochmals deutlich gesteigert werden (s. Abb. 4.9).



**Abb. 4.9:** Steigerung der NK-Empfindlichkeit durch Maskierung von HLA-Klasse I (für Blasten mit W6/32 AK n=26)

### 4.3 Quantitative HLA-Klasse-I Bestimmung

Um den Einfluß der HLA-Klasse-I-Moleküle auf die Tumorzellyse in seiner Bedeutung besser zu erfassen, wurde deren Expression mittels FACS-Analyse quantitativ erfaßt. Dabei zeigte sich eine große Variabilität der Expressionsdichte zwischen den Leukämiezellen verschiedener Patienten. Die Abbildungen 4.10 und 4.11 zeigen eine Übersicht getrennt für Leukämien der B- und der T-Zell-Reihe.

Um die unterschiedlichen Expressionsgrade einordnen zu können, wurde die Expression von HLA-Klasse I auf den T- und B-Zellen gesunder Spender ebenfalls mittels quantitativer FACS-Analyse ermittelt. Dazu wurden die Zellen zusätzlich mit einem APC- bzw. PerCP-markierten Antikörper für CD3 bzw. CD19 inkubiert. Außerdem wurde aus Apheresen verschiedener Stammzellspender die HLA-Expression von CD34<sup>+</sup>-Stammzellen bestimmt. Für

die CD34<sup>+</sup> Zellen (n=3) aus den Apheresen ergab sich ein Wert von 285496 ± 23597, für die CD19<sup>+</sup> B-Zellen (n=4) ein Wert von 258735 ± 21032 und für die CD3<sup>+</sup> T-Zellen (n=5) ein Wert von 185357 ± 6283. Neben der großen Variationsbreite fällt auf, daß bei den meisten Leukämiezellen die HLA-Expression niedriger ist als bei den entsprechenden ausgereiften normalen Zellen und den Stammzellen, bei denen der Grad der HLA-Expression wesentlich einheitlicher ist.

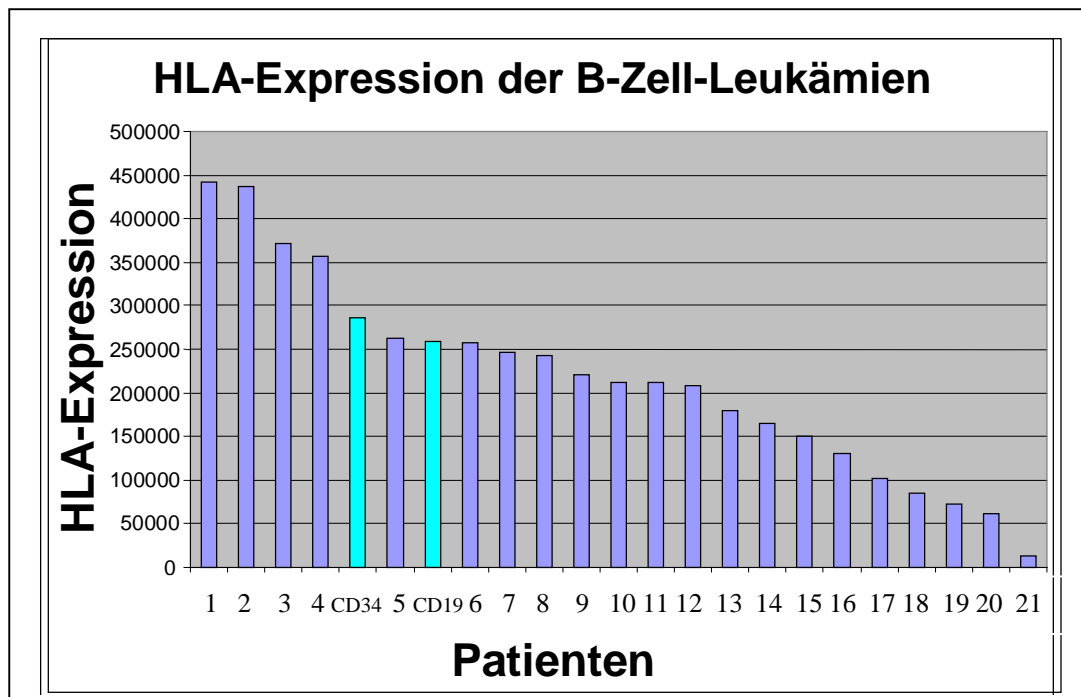


Abb. 4.10: HLA-Klasse I Expression der B-Zell-Leukämien und Durchschnittswerte für CD19 und CD34 positive Zellen gesunder Spender

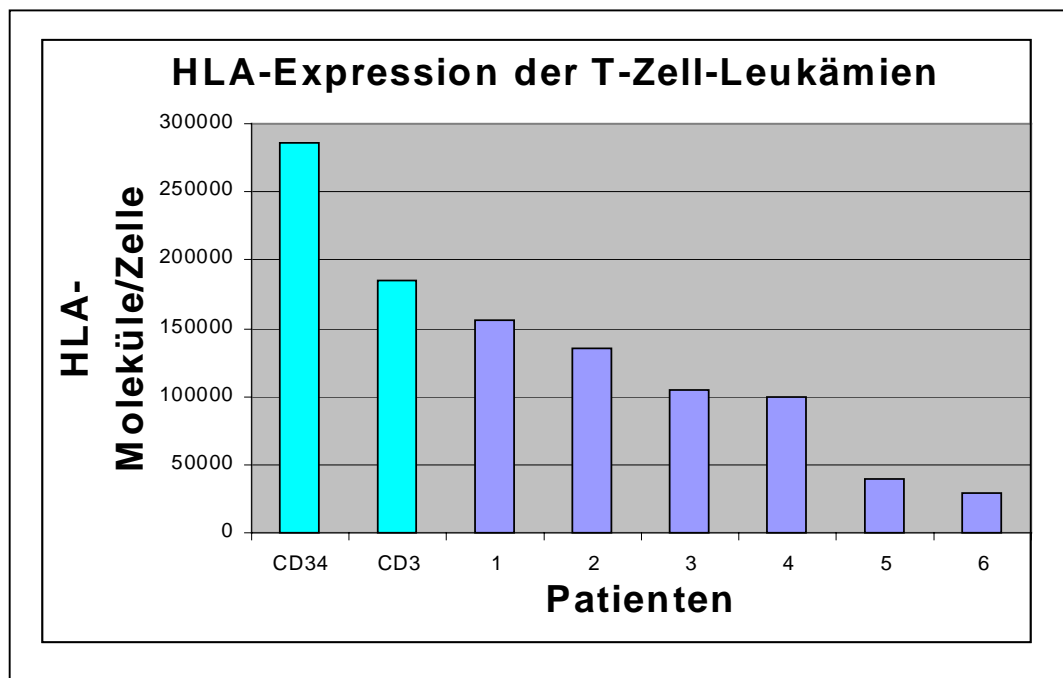


Abb. 4.11: HLA-Klasse I Expression der T-Zell-Leukämien und Durchschnittswerte für CD3 und CD34 positive Zellen gesunder Spender

#### 4.4 Bestimmung der Adhäsionsmoleküle

Als weiterer möglicher Einflußfaktor auf die NK-Susceptibilität der Leukämiezellen wurden eine Reihe von Adhäsionsmolekülen in einer FACS-Analyse auf den Leukämiezellen bestimmt. Dabei wurden LFA 1 und LFA 3 (CD11a und CD58) und ICAM 1-3 (CD54, CD102 und CD50) bestimmt. Als weiterer Einflußfaktor wurde außerdem CD95 (Fas) bestimmt, das als Rezeptor für den CD95-Liganden (Fas-L) der NK-Zellen dient und über den in der Zielzelle Apoptose ausgelöst werden kann.

Für diese Moleküle wurde aufgrund des zu hohen Umfangs keine quantitative, sondern lediglich eine qualitative FACS-Analyse durchgeführt. Die Leukämiezellen der Patienten zeigten jeweils für die verschiedenen Adhäsionsmoleküle eine recht einheitliche Expression, so daß es nicht sinnvoll

erschien, für diese einheitlichen Zellpopulationen Prozentzahlen der positiven oder negativen Zellen anzugeben. Um dennoch das unterschiedliche Ausmaß der Expression zu berücksichtigen, erfolgte die Einteilung in negativ (neg), niedrig positiv (low pos), positiv (pos) und hoch positiv (high pos), s. Tabellen 4.7 und 4.8.

**Tab. 4.7: Expression der Adhäsionsmoleküle auf leukämischen Blasten der T-Zell-Reihe**

<b>Patient</b>	<b>CD 11a</b>	<b>CD 50</b>	<b>CD 54</b>	<b>CD 58</b>	<b>CD 95</b>	<b>CD 102</b>
<b>1</b>	low pos	pos.	neg	pos	neg	pos
<b>2</b>	low pos	pos.	neg	low pos	pos	pos
<b>3</b>	pos	pos.	neg	neg	neg	pos
<b>4</b>	low pos	pos.	neg	neg	low pos	low pos
<b>5</b>	pos	pos.	neg	low pos	neg	pos
<b>6</b>	pos	pos.	pos	pos	neg	pos
<b>% positiv</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>16,67</b>	<b>66,67</b>	<b>33,34</b>	<b>100</b>

Tab. 4.8: Expression der Adhäsionsmoleküle auf leukämischen Blasten der B-Zell-Reihe

Patient	CD 11a	CD 50	CD 54	CD 58	CD 95	CD 102
1	low pos	low pos	low pos	pos	neg	pos
2	low pos	pos.	pos	pos	pos	pos
3	neg	pos.	low pos	high pos	low pos	pos
4	low pos	pos.	pos	pos	neg	pos
5	neg	neg	neg	pos	neg	low pos
6	low pos	pos.	pos	pos	neg	pos
7	pos	pos.	pos	high pos	neg	pos
8	neg	pos.	neg	pos	neg	pos
9	neg	pos.	pos	pos	neg	pos
10	neg	low pos	low pos	pos	neg	low pos
11	neg	low pos	low pos	pos	neg	low pos
12	neg	pos.	pos	pos	neg	pos
13	low pos	pos.	pos	neg	neg	pos
14	pos	low pos	low pos	pos	neg	low pos
15	neg	neg	neg	pos	neg	pos
16	neg	pos.	pos	pos	neg	pos
17	neg	low pos	pos	high pos	neg	pos
18	neg	pos.	neg	pos	neg	pos
19	neg	neg	low pos	pos	neg	low pos
20	pos	neg	low pos	high pos	pos	pos
21	neg	pos.	neg	neg	neg	pos
<b>% positiv</b>	<b>38,1</b>	<b>80,95</b>	<b>76,19</b>	<b>90,05</b>	<b>14,29</b>	<b>100</b>



## 4.5 Einfluß der HLA-Expression und der Adhäsionsmoleküle

Um den Einfluß der HLA-Klasse I-Moleküle zu erfassen, wurde einerseits eine Blockade der Moleküle im Zytotoxizitätstest durchgeführt (s. 4.2), andererseits wurde über statistische Auswertungsmethoden versucht, einen Zusammenhang zwischen der HLA-Klasse-I-Expression und der Expression der Adhäsionsmoleküle mit der spezifischen Lyse der Tumorzellen durch die NK-Zellen im Zytotoxizitätstest nachzuweisen.

Blasten mit geringer HLA-Expression wurden schon durch die unstimulierten NK-Zellen lysiert. Die Stimulation mit Interleukin 2 führte zu einer noch höheren Lyse, die durch die Blockade der HLA-Moleküle noch weiter gesteigert werden konnte. Blasten mit hoher HLA-Expression zeigten sich recht unempfindlich gegenüber den unstimulierten und stimulierten NK-Zellen, jedoch führte die Blockade der HLA-Moleküle bei diesen Patienten zu einer massiven Steigerung der Zellyse (s. Abb. 4.12 und 4.13).

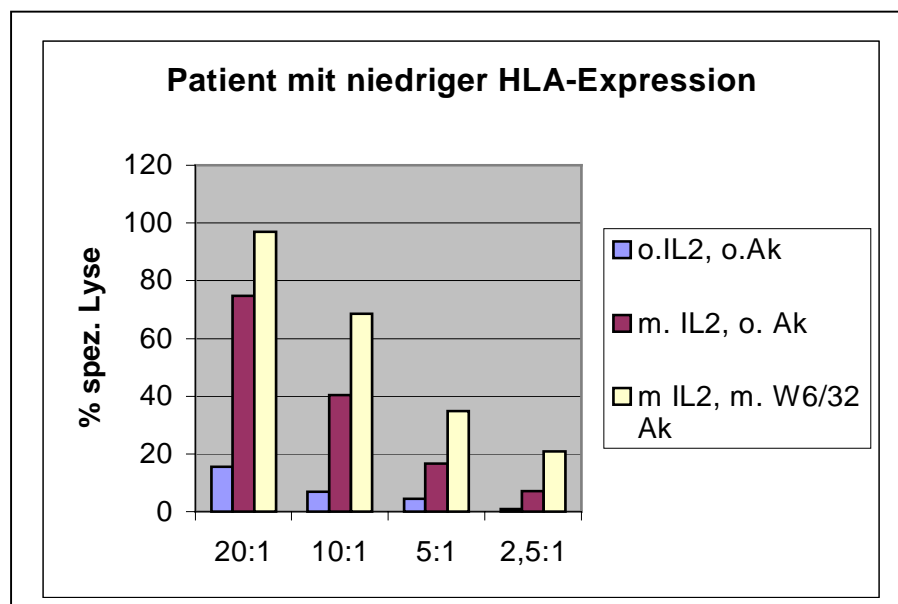


Abb. 4.12: Patient mit niedriger HLA-Expression auf den leukämischen Blasten (Patient 20 aus Abb. 4.10)

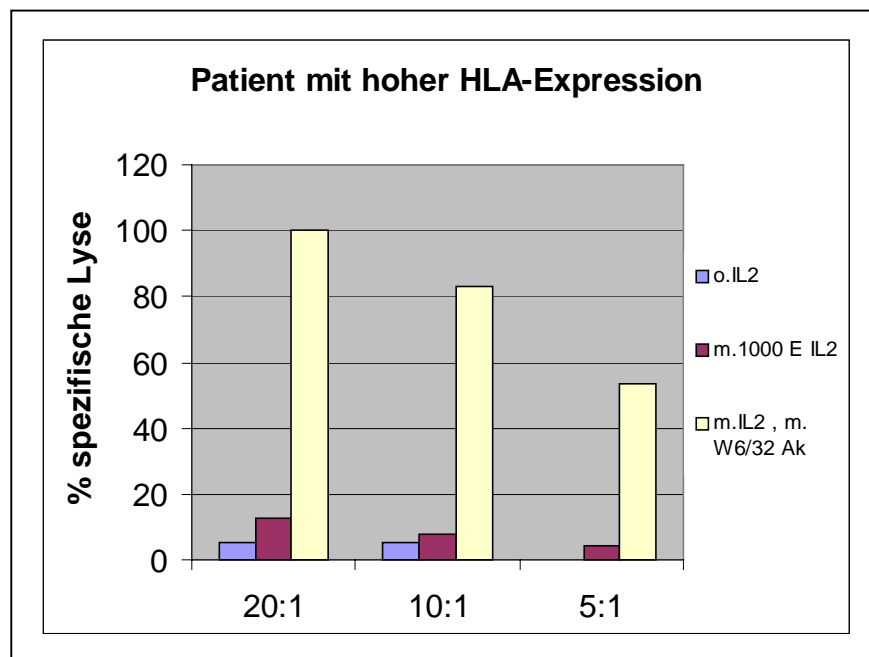


Abb. 4.13: Patient mit hoher HLA-Expression auf den leukämischen Blasten (Patient 1 aus Abb. 4.10)

Die durchschnittliche Lyse aller untersuchten leukämischen Blasten der B- und T-Zell-Reihe sind in den Tabellen 4.9 und 4.10 dargestellt.

Tab. 4.9: Durchschnittliche Lyse der Blasten der B-Zell-Reihe

E:T-Verhältnis	o. HLA-Blockade	m. HLA-Blockade	x-fache Steigerung
20:1	59	91	1,54
10:1	36	68	1,89
5:1	21	47	2,23
2,5:1	12	30	2,5

Tab. 4.10: Durchschnittliche Lyse der Blasten der T-Zell-Reihe

E:T-Verhältnis	o. HLA-Blockade	m. HLA-Blockade	x-fache Steigerung
20:1	21	50	2,38
10:1	12	35	2,92
5:1	7	20	2,86
2,5:1	4	7	1,75

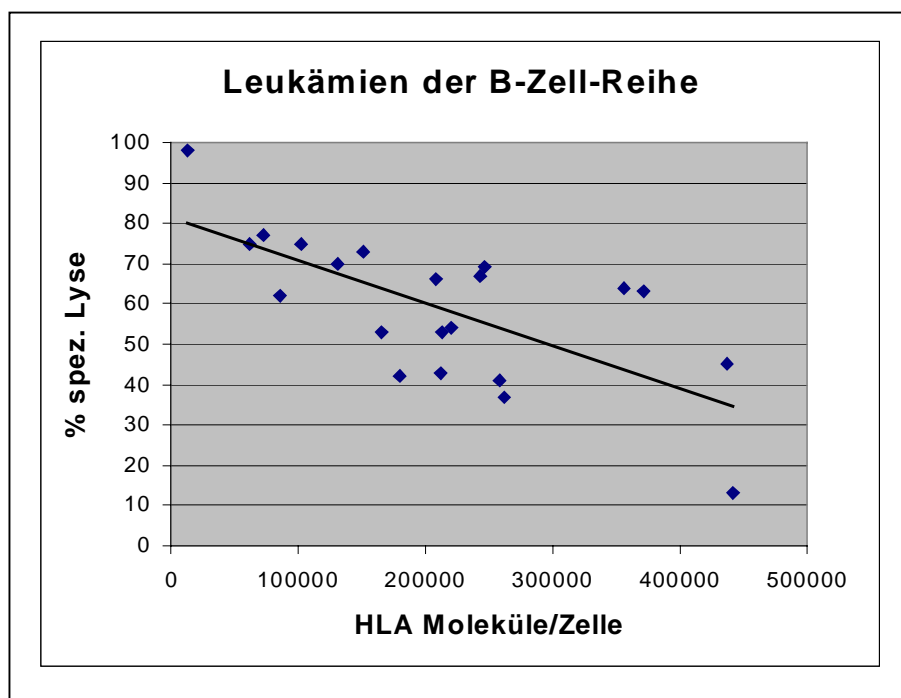
Eine statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für medizinische Informationsverarbeitung der Universität Tübingen. Die Zahl der Patienten mit B-Zell-Leukämien betrug zu diesem Zeitpunkt 19, die Zahl der Patienten mit T-Zell-Leukämien 6. Aufgrund der geringen Patientenzahl von  $n=6$  konnte für die T-Zell-Leukämien keine statistische Analyse durchgeführt werden, da viele mögliche Ausprägungen innerhalb der Variablen nicht vorkommen und zudem die Bedingung der Normalverteilung der Residuen nicht erfüllt ist. Als Werte für die spezifische Lyse wurden nur die bei einem E:T-Verhältnis von 20:1 erzielten Werte berücksichtigt, weil dabei gegenüber den Kontrollen mit K562 maximale Werte erzielt werden konnten und die Unterschiede zwischen den verschiedenen Blasten ebenfalls am größten sind, während bei kleineren E:T-Verhältnissen bei den meisten Blasten nur kleine Lyseraten erzielt werden konnten.

Aufgrund der Verteilung der Adhäsionsmoleküle auf den B-Zell-Leukämien – CD102 ließ sich bei allen, CD58 bei 90% und CD95 nur bei 14% der Patienten nachweisen – konnten neben der HLA-Expression lediglich CD11a, CD50 und CD54 in die statistische Analyse eingeschlossen werden.

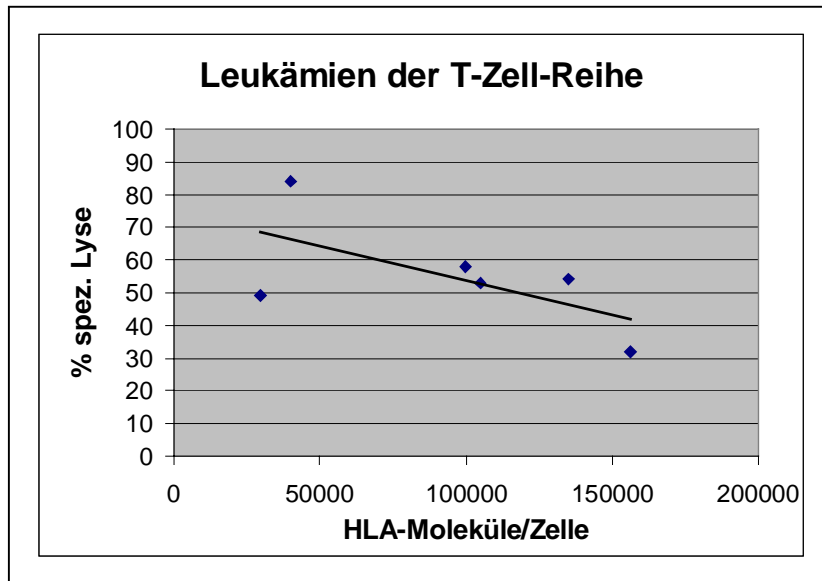
In einer linearen Regressionsanalyse wird die HLA-Dichte mit einem  $r = 0.71$  bei einem p-Wert von 0,007 signifikant und erklärt damit 50% ( $r^2$ ) der Variabilität der spezifischen Lyse.

Eine Kovarianzanalyse mit allen vier Faktoren ergab keine Signifikanzen für die einzelnen Faktoren, jedoch erwies sich als bestes Modell für eine Kovarianzanalyse das Modell mit den Faktoren HLA-Dichte und CD50. Das Modell erklärt 62,8% der Variabilität der spezifischen Lyse und wird mit einem p-Wert von 0,0016 für das Gesamtmodell signifikant, wobei die HLA-Dichte mit einem p-Wert von 0,0017 signifikant wird, CD 50 mit einem p-Wert von 0,115 jedoch nicht.

Eine lineare Regression mit dem einzigen Faktor HLA-Dichte für die Leukämien der T-Zell-Reihe ergibt ein  $r$  von 0,62, mit einem p-Wert von 0,1857 ergibt sich jedoch keine Signifikanz und ist auf Grund der geringen Patientenzahl statistisch nicht auswertbar. In den Abbildungen 4.14 und 4.15 ist die HLA-Expression der leukämischen Blasten gegen die spezifische Lyse aufgetragen.

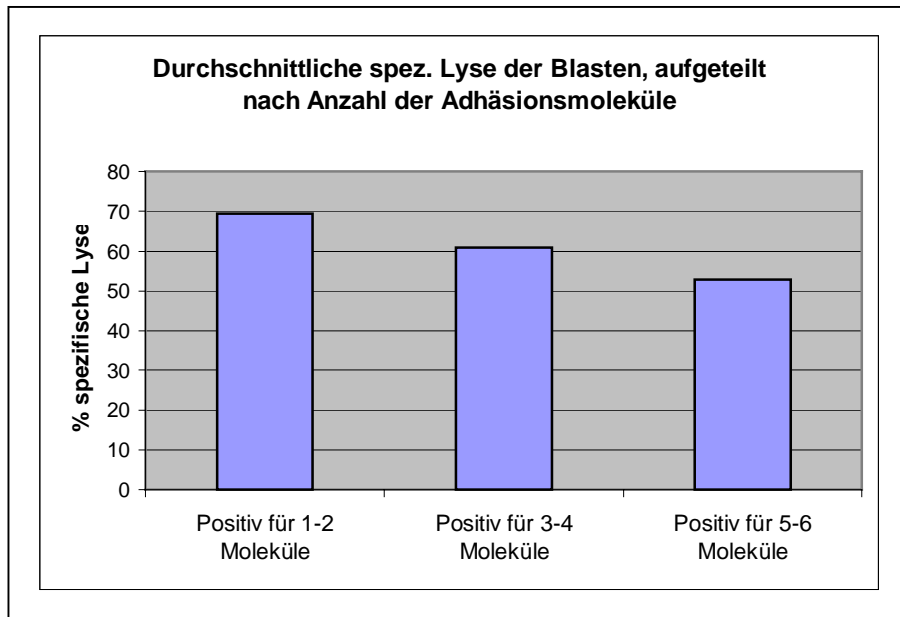


**Abb. 4.14:** Lineare Abhängigkeit der spezifischen Lyse von der HLA-Klasse-I-Expression, statistische Einzelheiten s. Text



**Abb. 4.15:** Lineare Abhängigkeit der spezifischen Lyse von der HLA-Klasse-I-Expression, statistische Einzelheiten s. Text

Die Abbildung 4.16 zeigt, daß auch kein Zusammenhang zwischen der Summe der Adhäsionsmoleküle ohne Berücksichtigung der HLA-Expression besteht. Die Blasten der B-Zell-Reihe wurden in dieser Abbildung in Gruppen eingeteilt, die entweder 1-2, 3-4 oder 5-6 der untersuchten Moleküle exprimieren. Auch eine Einteilung unter Berücksichtigung des Expressionsgrades ergibt keine deutlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen.



**Abb. 4.16:** Durchschnittliche spezifische Lyse der Blasten der B-Zell-Reihe in Abhängigkeit der Anzahl der exprimierten Adhäsionsmoleküle (für 1-2 n=3, für 3-4 n=10, für 5-6 n=8)

Da keine NK-Klone sondern frisch angereicherte NK-Zellen des Spenders verwendet wurden, sollten einzelne NK-Zellen, die nur einen KIR-Rezeptor exprimieren und damit alloreaktiv gegenüber Blasten reagieren, die das entsprechend passende HLA-Molekül nicht exprimieren, nur einen geringen Anteil der spezifischen Lyse verursachen, da sie in vivo nur in geringer Frequenz auftreten. Dennoch wurde versucht, die Blasten im Nachhinein in zwei Gruppen einzuteilen, eine, für die keine potentiell alloreaktiven NK-Zellen in den angereicherten NK-Zellen vorhanden sein können, weil sie HLA-Moleküle aus allen relevanten HLA-Gruppen (Bw4-, Cw3- und Cw4-Gruppe) exprimieren und eine, für die potentiell alloreaktive NK-Zellen vorhanden sind. Da nicht von allen Patienten eine komplette HLA-Typisierung vorlag, konnten nur 19 der 21 Patienten aus der Gruppe der B-Zell-Leukämien berücksichtigt werden. In dieser Gegenüberstellung konnte kein Unterschied in der durchschnittlichen spezifischen Lyse zwischen diesen beiden Gruppen festgestellt werden (s. Abb. 4.17)

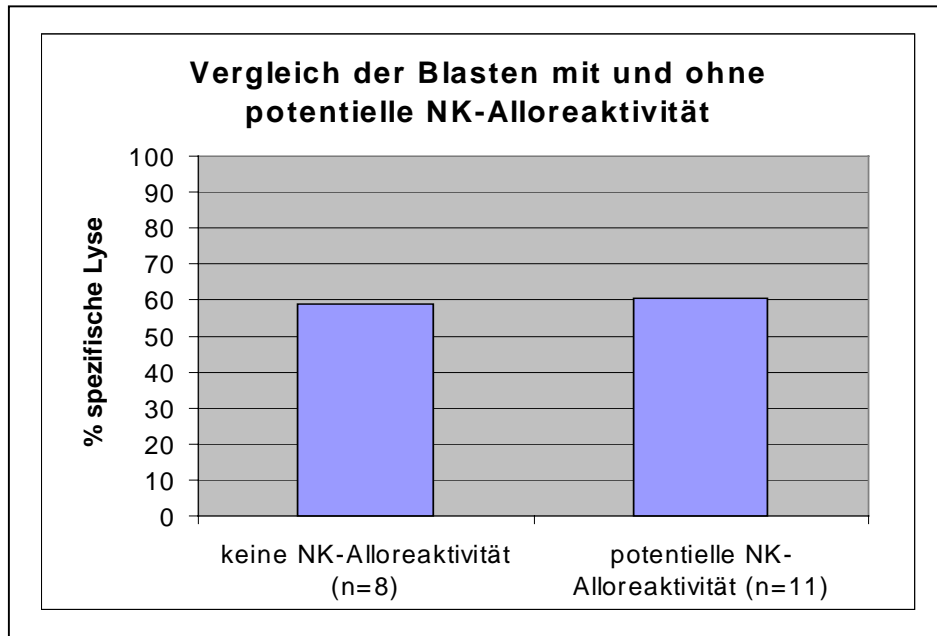


Abb. 4.17: Vergleich der spezifischen Lysen zwischen Blasten ohne und mit potentiell alloreaktiven NK-Zellen

## 4.6 ADCC

Bei fünf der Patienten mit einer Leukämie der B-Zell-Reihe wurde als zusätzlicher Versuch, die spezifische Lyse zu erhöhen, der Mechanismus der ADCC ausgenutzt. Als Antikörper wurde ein humanisierter CD 19 Antikörper eingesetzt. In Tabelle 4.11 sind die Ergebnisse für die fünf Patienten zusammengefaßt dargestellt.

Tab. 4.11: Ergebnisse der ADCC bei fünf Patienten mit Leukämien der B-Zell-Reihe

E:T-Verhältnis	o.IL2, o.Ak	m. IL2, o. Ak	m IL2, m. W6/32 Ak	m.IL2, m. CD19 Ak
20:1	9	54	90	89
10:1	5	38	77	78
5:1	3	23	58	60
2,5:1	1	13	39	42

Es zeigte sich eine Lyse, die im Bereich der Lyse mit der HLA-Klasse-I-Maskierung liegt. Besonders eindrucksvoll zeigte sich die Erhöhung der spezifischen Lyse bei Patienten mit einer hohen HLA-Klasse-I-Expression, bei denen auch mit IL2-stimulierten NK-Zellen nur eine geringe spezifische Lyse zu erzielen war. In Abbildung 4.18 ist dies für einen Patienten dargestellt, es handelt sich dabei um denselben wie in Abbildung 4.13.

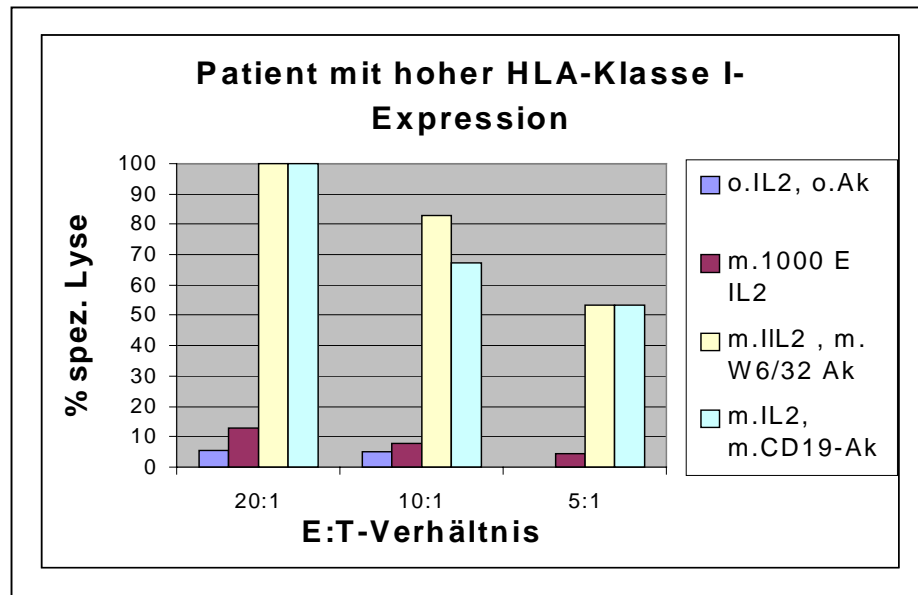


Abb. 4.18: ADCC bei einem Patienten mit hoher HLA-Klasse-I-Expression (Patient 1 aus Abb. 4.10)



## 5 Diskussion

Eine zelluläre Immuntherapie nach einer Stammzelltransplantation in der Behandlung maligner Erkrankungen ist eine vielversprechende Methode, die Rezidivrate nach der Transplantation zu verringern. Insbesondere nach haploidenten Transplantationen ist eine T-Zell-Gabe mit einem hohen GvHD-Risiko verbunden, so daß der Einsatz von NK-Zellen eine wichtige alternative Strategie der Immuntherapie darstellt.

In ersten Teil dieser Arbeit wurde eine Methode zur Anreicherung von NK-Zellen untersucht, die bisher so noch nicht beschrieben wurde. Neben der Beurteilung der Effektivität der Methode im Hinblick auf die Reinheit der NK-Zellen und die Depletion unerwünschter Zellen, wurde die Funktionsfähigkeit der NK-Zellen nach den einzelnen Anreicherungsschritten und ihr Ansprechen auf eine Interleukin-2-Stimulation untersucht.

Im zweiten Teil wurden die nach dieser Methode angereicherten NK-Zellen auf ihre Reaktivität gegenüber den Leukämiezellen verschiedener Patienten getestet. Außerdem wurde versucht, einen Zusammenhang zwischen der Empfindlichkeit der Leukämiezellen gegenüber den NK-Zellen aufgrund durchflußzytometrisch bestimmbarer Oberflächenmoleküle herzustellen.

## 5.1 Methodenkritik

### 5.1.1 Zellanreicherung mit MACS und Dynabeads

Die Anreicherung bestimmter Zellen durch den Einsatz von magnetisch markierten Antikörpern ist inzwischen eine etablierte Methode, bei der eine Reinheit der Zellen von bis zu 99% erreicht werden kann [54]. Die Vitalität und das Proliferationsverhalten werden durch die Markierung und Separation nicht beeinflusst [55]. Das Problem dieser Methode besteht darin, daß CD56<sup>+</sup> T-Zellen mitangereichert werden. Um diese Zellpopulation zu eliminieren und die Reinheit der Anreicherung insgesamt zu verbessern, wurde im Anschluß eine T-Zell-Depletion mit Dynabeads durchgeführt. Da diese Antikörper mit einem wesentlich größeren magnetischen Anteil versehen sind, ist es möglich, die damit markierten Zellen in einem schwachen Magnetfeld zu entfernen, das die mit MACS-Beads markierten Zellen nicht beeinflusst. Die höhere Reinheit der Zellen nach diesem zweiten Teil der Anreicherung geht allerdings mit einem Verlust von NK-Zellen durch die verschiedenen notwendigen Waschschrte einher. Ein möglicher negativer Einfluß auf die Funktionsfähigkeit der NK-Zellen durch den längeren Anreicherungsprozeß wurde untersucht (s. 5.3).

### 5.1.2 Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie erlaubt die Untersuchung einer großen Zellzahl auf verschiedene Oberflächenantigene in kurzer Zeit. Schwierigkeiten ergaben sich bei der Auswertung einzelner Adhäsionsmoleküle, da diese zum Teil nicht sehr stark exprimiert werden. Da jedoch auch immer für das jeweilige Molekül negative Zellen in den Proben vorhanden waren, konnte in allen Fällen eine Abgrenzung zwischen negativen und positiven Zellen getroffen werden. Dem unterschiedlich starken Expressionsgrad der Adhäsionsmoleküle wurde mit einer

Einteilung in negative (neg), niedrig positive (low pos), positive (pos) und hoch positive (high pos) Zellen Rechnung getragen.

Die quantitative Durchflußzytometrie erlaubt genauere Aussagen über den Expressionsgrad eines Antigens und wurde zur Bestimmung der HLA-Klasse I-Moleküle verwendet. Die indirekte Markierung der Zellen und der Beads mit demselben Sekundärantikörper, wie sie beim Quifikit von Dako zur Anwendung kommt, bietet den Vorteil, daß die Zahl der Fluorochrom-Moleküle pro Antikörper zur Berechnung der gebundenen Antikörper/Zelle nicht bekannt sein muß. Verschiedene Studien haben einen Einfluß unterschiedlicher Antikörper auf die ermittelte Antigendichte nachgewiesen [56], [57], [58], [59], was sich wahrscheinlich aus der unterschiedlichen Kinetik der Interaktion der Antikörper mit den entsprechenden Epitopen ergibt. In dieser Arbeit wurden deshalb alle Messungen mit denselben Reagentien durchgeführt. Wichtige Voraussetzungen zur Ermittlung genauer Werte sind eine Zugabe der Antikörper im Überschuß und damit verbunden das Einstellen der Zellen auf eine bestimmte Zellzahl [57]. Im Vergleich mit unterschiedlichen Methoden zur quantitativen Durchflußzytometrie gelten das Quifikit von Dako und vergleichbare andere Kits als die genauesten, auch was die Vergleichbarkeit der Daten zwischen verschiedenen Geräten oder Laboren betrifft [56], [60].

### 5.1.3 Zytotoxizitätstest

Als alternative zu dem weitverbreiteten  $^{51}\text{Cr}$ Chromfreisetzungstest wurde ein nichtradioaktiver BATDA-release-assay verwendet, wie er von Blomberg et. al. beschrieben wurde [53] und inzwischen etabliert ist. Als Problem erwies sich der abhängig von den Targetzellen manchmal zu geringe Unterschied zwischen Spontan- und Maximallyse, so daß einige der Tests wiederholt werden mußten, um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten. Bei insgesamt sechs Patienten von allen, bei denen die Spontanlyse des Tests mehr als 30% betrug, konnte aufgrund

fehlenden Zellmaterials keine Wiederholung durchgeführt werden bzw. lag bei der Wiederholung die Spontanlyse ebenfalls über 30%.

#### 5.1.4 Proliferationsassay

Er wurde als eine „Mixed Lymphocyte Culture“ (MLC) durchgeführt, bei der neben der Stimulation durch bestrahlte fremde pMNC auch Interleukin 2 (IL 2) und Phytohämagglutinin (PHA) eingesetzt wurden. Es sollte die verminderte Proliferationskapazität der Zellen aufgrund des minimalen T-Zell-Gehaltes nach der Anreicherung demonstriert werden. Die proliferative Antwort auf PHA kann dabei den T-Zellen zugeschrieben werden, die Antwort auf IL 2 und die bestrahlten pMNC besteht wahrscheinlich in der Reaktion der NK- und der verbliebenen T-Zellen. Die Proliferation von NK-Zellen auf IL 2 wurde schon mehrfach beschrieben [54] und sollte als Kontrolle für die generell vorhandene Proliferationskapazität der Zellen dienen.

## 5.2 Anreicherung der NK-Zellen

Die Isolierung der NK-Zellen erfolgte in einer einfachen Anreicherung der CD56<sup>+</sup> NK-Zellen und einer anschließenden Depletion der T-Zellen. Der Anteil der CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> lag nach der Positivanreicherung bei  $83,77 \pm 5,39\%$ , eine Reinheit, die etwas höher ist als in einer älteren Studien [61] zur Anreicherung von NK-Zellen mit CD56-Beads, jedoch geringer als in der Studie von Geiselhart et al., in der eine indirekte Markierung der Zellen mit einem magnetisch markierten Sekundärantikörper verwendet wurde und eine Reinheit von 98% erreicht werden konnte [54]. Allerdings wurde dort die Gesamtzahl der CD56<sup>+</sup> Zellen angegeben, der Anteil der CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> Zellen betrug dabei jedoch  $35,6 \pm 13,7\%$ . Die

Ausbeute lag in der Studie von Geiselhart bei  $57,2 \pm 9,1\%$ , in dieser Arbeit jedoch bei  $84,63 \pm 20,45\%$ , so daß man davon ausgehen kann, daß in dieser Studie aufgrund einer schwächeren Markierung der NK-Zellen oder effektiveren Spülung der Säule zur Elution der ungebundenen Zellen eine größere Reinheit der Zellen, verbunden mit einem größeren Zellverlust, erreicht werden konnte.

Nach Schritt 2 der Isolation, der Depletion der noch vorhandenen T-Zellen mit Dynabeads, betrug der Anteil der  $CD56^+/CD3^-$  Zellen  $96,84 \pm 3,34\%$ , der der T-Zellen  $0,39 \pm 0,29\%$ . Dieser zusätzliche Schritt erlaubte also eine weitere Steigerung der Reinheit und vor allem noch einmal eine deutliche Reduzierung der T-Zellen. Die Ausbeute betrug  $85,27 \pm 9,3\%$ , so daß also ca. 15% der NK-Zellen durch diesen zweiten Schritt verloren gingen. Insgesamt lag die Ausbeute mit  $71,4 \pm 15,79\%$  trotz des zweiten Schrittes deutlich über der, die für die indirekte Markierung beschrieben wurde [54]. Es gelang eine T-Zell-Depletion um den Faktor  $4,52 \times 10^{-3}$  auf 0,39%, die es erlauben würde, auch eine größere Menge von NK-Zellen zu infundieren, ohne dabei eine kritische Zahl von infundierten T-Zellen zu erreichen. Ein Vorteil gegenüber einer indirekten Anreicherung der NK-Zellen durch alleinige Depletion von B- und T-Zellen, wie sie auch als Kit kommerziell angeboten wird, besteht darin, daß man aufgrund der positiven Anreicherung im ersten Schritt und der Depletion im zweiten Schritt nur eine geringe Zahl der magnetisch markierten Antikörper benötigt, was aus ökonomischer Sicht für die klinische Anwendung durchaus von Relevanz ist.

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, daß eine Anreicherung analog zu der hier durchgeführten Methode im klinischen Maßstab unter Reinraumbedingungen und mit entsprechendem Material auch unter GMP-Bedingungen möglich ist [62]. Der erste Anreicherungsschritt wurde dazu mit dem CliniMACS-System durchgeführt. Insgesamt war die Ausbeute schlechter als mit dem VarioMACS-System, jedoch konnte ein noch geringerer T-Zell-Gehalt von 0,09% erreicht werden.

Der Zeitaufwand für beide Methoden liegt bei ca. 4 Stunden, so daß die Anreicherung der NK-Zellen inklusive einer Leukapherese an einem Tag durchgeführt werden kann.

### 5.3 Zytotoxizität der angereicherten NK-Zellen

Die Funktionalität der NK-Zellen wurde nach den einzelnen Anreicherungsschritten in einem Zytotoxizitätstest gegen die Zelllinie K562 überprüft. Zusätzlich wurde die Stimulierbarkeit der Zellen durch Interleukin 2 getestet. Gegen K562 zeigte sich eine deutliche Zunahme der Zytotoxizität nach den einzelnen Anreicherungsschritten, die auf den höheren Anteil der NK-Zellen an den Effektorzellen zurückzuführen ist. Die NK-Zellaktivität konnte durch die Stimulation mit Interleukin 2 noch weiter erhöht werden und erreichte bei einem E:T-Verhältnis von 20:1 maximale Werte von bis zu 100% Targetzellyse.

Auch die bereits zitierten Studien von Geiselhart et al. und Pflueger et al. ([54], [61]) zeigten, daß sich die Isolation der NK-Zellen mit den magnetisch markierten Antikörpern nicht negativ auf deren zytotoxische Funktionalität auswirkt. In diesen Studien wurden allerdings nicht so hohe Lyseraten der Zelllinie K562 erzielt, was sich wahrscheinlich auf den niedrigeren Anteil der CD56<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> NK-Zellen zurückführen läßt.

### 5.4 Proliferationsverhalten der angereicherten Zellen

Die MLC diente zum funktionellen Nachweis der Effektivität der T-Zell-Depletion. Es zeigte sich eine deutliche Reduktion der T-Zell-Antwort auf alloreaktive und mitogene Stimulation, während die Stimulierbarkeit der NK-Zellen auf Interleukin 2 erhalten blieb. Bei der MLC handelt es sich um ein sehr einfaches Modell, um die Alloreaktivität von Zellen zu untersuchen. Ob die nachgewiesene Reduktion der alloreaktiven Reaktion der angereicherten Zellen mit einer vergleichbaren Reduktion des Risikos einer GvHD einher geht, ist schwer zu sagen. Klinische Erfahrungen haben jedoch gezeigt, daß eine minimale

Infusion von T-Zellen bis zu einer bestimmten Grenze auch nach haploidenten Transplantationen tolerabel ist [1]. Auch gibt es bisher keine stichhaltigen Hinweise auf eine NK-Zell-vermittelte GvHD beim Menschen, so daß man davon ausgehen kann, daß die Gabe von hoch angereicherten und T-Zell-depletierten NK-Zellen mit keinem hohen GvHD-Risiko verbunden ist. Im Mausmodell konnte dagegen gezeigt werden, daß die Gabe von IL-2-stimulierte NK-Zellen nach allogener Knochenmarktransplantation das Auftreten einer GvHD verhindern kann [63] und die Gabe von allogenen IL-2-stimulierten NK-Zellen nach Transplantation mit einer deutlichen GvL-(graft versus leukaemia) Reaktion verbunden ist ohne jedoch eine GvHD hervorzurufen [51].

## **5.5 Expression von HLA-Klasse I und Adhäsionsmolekülen auf leukämischen Blasten**

Es zeigte sich bei der quantitativen Bestimmung der HLA-Klasse-I-Moleküle, daß diese sehr unterschiedlich stark auf den Leukämiezellen der untersuchten pädiatrischen Patienten exprimiert werden. Bei Leukämien der B-Zell-Reihe differierten die Werte um den Faktor 33,6 zwischen 13149 und 441962, bei denen der T-Zell-Reihe um den Faktor 5,2 zwischen 29815 und 156269. Die Leukämien der B-Zell-Reihe exprimierten also durchschnittlich deutlich mehr HLA-Klasse-I-Moleküle als die Leukämien der T-Zell-Reihe. Neben deren Expression auf den Leukämiezellen wurde auch die Expression auf den Zellen gesunder freiwilliger Spender untersucht. Dabei zeigte sich einerseits, daß auch normale T-Zellen weniger HLA-Klasse-I-Moleküle exprimieren als die B-Zellen derselben Spender, andererseits, daß im Vergleich zu den Durchschnittswerten der gesunden Spender die HLA-Klasse-I-Expression bei allen Blasten der T-Zell-Leukämien und bei 17 von 21 der B-Zell-Leukämien erniedrigt ist. Dies könnte zum einen ein Grund dafür sein, daß die Zellen einer effektiven T-Zell-Antwort entgehen, für die die Expression von HLA-Klasse-I-Molekülen auf den Targetzellen notwendig ist,

zum anderen dafür, daß diese Zellen empfindlich gegenüber einer NK-Zell-vermittelten Lyse werden.

Eine Veränderung der HLA-Expression in Tumorzellen wurde schon vor vielen Jahren beschrieben [64] und der Verlust der HLA-Expression oder einzelner Haplotypen wird heute als der wichtigste Mechanismus angesehen, mit dem Tumorzellen einer T-Zell-Antwort entgehen [65]. Allerdings müssen die Tumorzellen dadurch nicht zwangsläufig empfindlich gegenüber NK-Zellen werden, da z.B. durch die alleinige Expression nicht klassischer HLA-Moleküle wie z.B. HLA-G die NK-Antwort gehemmt und gleichzeitig eine T-Zell-Antwort vermieden werden kann [65], [66].

Die Expression nicht-klassischer HLA-Klasse-I-Moleküle wie HLA-E und HLA-G wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, allerdings hängt die Expression von HLA-E mit der Expression verschiedener Moleküle der Gruppen HLA-A, B und C zusammen und eine Untersuchung von einigen Tumoren und Tumor-Zelllinien zeigte keine Expression von HLA-G auf diesen Zellen [67]. Dennoch wäre es eine sinnvolle Ergänzung, die leukämischen Blasten auf das Vorhandensein dieser Moleküle zu untersuchen.

Bei den Adhäsionsmolekülen zeigt sich ebenfalls eine unterschiedliche Verteilung zwischen den B- und T-Zell-Leukämien. Während bei allen Patienten mit einer T-Zell-Leukämie die Blasten das Adhäsionsmolekül CD11a (LFA-1) exprimieren, wird dies nur von einem kleinen Teil der Blasten der Patienten mit einer B-Zell-Leukämie exprimiert. CD54 (ICAM-1) wird hingegen von mehr als dreiviertel der B-Zell-Leukämiezellen exprimiert, während es sich bei nur einem der sechs untersuchten Patienten mit einer T-Zell-Leukämie auf den Blasten fand.

CD 95 wurde in beiden Patientengruppen nur selten gefunden, so daß der Fas/Fas-L-Mechanismus bei der Lyse der Blasten nur eine untergeordnete Rolle spielen kann.

CD 102 wurde im Gegensatz dazu bei allen Patienten in beiden Gruppen gefunden und für CD50 und CD58 zeigte sich ein in etwa ähnliches Expressionsmuster in den beiden Patientengruppen.



Einschränkend muß gesagt werden, daß es aufgrund der kleinen Patientenzahl vor allem in der Gruppe der T-Zell-Leukämien nicht möglich ist, allgemeingültige Aussagen über die Verteilung der Adhäsionsmoleküle auf leukämischen Blasten zu treffen, da sich bei einer so kleinen Fallzahl eine rein zufällige Verteilung nicht ausschließen läßt, jedoch können die Aussagen über die unterschiedliche Verteilung der Moleküle bezogen auf die untersuchte Patientengruppe getroffen werden.

## **5.6 Einfluß der HLA- und der Adhäsionsmoleküle auf die NK-Suszeptibilität der leukämischen Blasten**

Aufgrund der geringen Patientenzahl in der Gruppe der T-Zell-Leukämien konnten hier nur die 21 Patienten aus der Gruppe der B-Zell-Leukämien berücksichtigt werden. Allerdings zeigt auch schon der Unterschied in der HLA-Expression der normalen T- und B-Zellen wie auch der B- und T-Zell-Leukämien, daß diese sinnvollerweise getrennt betrachtet werden sollten. Gegenüber leukämischen Blasten zeigten die angereicherten NK-Zellen durchschnittlich nur eine geringe Spontanaktivität, da die NK-Zellen über eine Interaktion ihrer KIR-Rezeptoren mit den HLA-Molekülen der Blasten in ihrer Aktivität gehemmt wurden. Blasten mit geringer HLA-Expression ließen sich auch von unstimulierten NK-Zellen lysieren, während sich Blasten mit hoher HLA-Expression selbst den mit Interleukin 2 stimulierten NK-Zellen gegenüber resistent erwiesen. Für alle Blasten konnte jedoch gezeigt werden, daß sich durch die Blockade der HLA-Moleküle die Lyse bis in den Bereich der Kontrollen mit K562 steigern lassen, was einen großen Einfluß dieser Moleküle auf die Empfindlichkeit gegenüber den NK-Zellen nahelegt; daß der W6/32-Antikörper tatsächlich HLA-Moleküle in ihrer Wirkung auf KIR-Rezeptoren blockieren kann und die Steigerung nicht mit dem Effekt der ADCC zusammenhängt, zeigten Komatsu et al. in Untersuchungen mit der NK-Zelllinie NK-92 [68]. Außerdem

bindet der Fc-Rezeptor Fc $\gamma$  RIII der NK-Zellen IgG1 und IgG3, der W6/32 Antikörper ist jedoch ein IgG2a-Antikörper.

Die statistische Auswertung der linearen Abhängigkeit der spezifischen Lyse von dem Maß der HLA-Expression ergibt einen Korrelationskoeffizienten  $r = 0.71$ , wird mit einem p-Wert von 0,007 signifikant und erklärt damit 50% ( $r^2$ ) der Variabilität der spezifischen Lyse. Daraus läßt sich schließen, daß es also nicht nur darauf ankommt, ob sondern auch wieviel HLA-Klasse-I-Moleküle von einer Zelle exprimiert werden, um einer NK-Lyse entgehen zu können. Die Tatsache, daß die Blasten der T-Zell-Reihe weniger HLA-Klasse-I exprimieren als die Blasten der B-Zell-Reihe und dennoch schlechter lysiert werden, spricht dafür, daß für unterschiedliche Targetzellen eine unterschiedliche Gewichtung der inhibitorischen und aktivierenden Signale notwendig ist (s.u.).

Bei der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der spezifischen Lyse und der Expression der Adhäsionsmoleküle konnten aufgrund der z.T. ungünstigen Verteilung (manche werden auf allen, andere nur von sehr wenigen exprimiert) neben der HLA-Expression nicht alle gemessenen Moleküle einbezogen werden, sondern lediglich CD11a, CD50 und CD54. Eine Kovarianzanalyse mit allen vier Einflußfaktoren ergab keine Signifikanzen für die einzelnen Faktoren, während sich die Kovarianzanalyse mit HLA-Expression und Expression von CD50 als bestes Modell erwies, das 62,8% der Variabilität der spezifischen Lyse erklärt und mit einem p-Wert von 0,0016 für das Gesamtmodell signifikant wird, wobei die HLA-Dichte mit einem p-Wert von 0,0017 signifikant wird, CD 50 mit einem p-Wert von 0,115 jedoch nicht.

Über den Einfluß der Adhäsionsmoleküle gibt es zum Teil recht widersprüchliche Veröffentlichungen. Zu den Ergebnissen dieser Arbeit muß gesagt werden, daß der Einfluß der Adhäsionsmoleküle nicht direkt z.B. durch Blockade mit einem Antikörper untersucht wurde, sondern lediglich, ob ein Zusammenhang zwischen der spezifische Lysierbarkeit der Blasten durch NK-Zellen und durchflußzytometrisch bestimmten Expression der Adhäsions- und der HLA-moleküle besteht.

Komatsu et al. untersuchten in einer Studie den Zusammenhang der Zytotoxizität von NK-Zellen, LAK-Zellen und der Zelllinie NK-92 gegenüber verschiedener Zelllinien und verschiedenen Adhäsionsmolekülen. Dabei zeigte sich, daß sich die Zytotoxizität IL2 stimulierter NK-Zellen gegenüber entsprechenden Zelllinien durch die Blockade von CD58 senken ließ, nicht jedoch durch die Blockade von CD54 und CD102 [68]. Gwin et al. kommen in einer Studie zu dem Schluß, daß eine gewisse CD58- und CD54-Expression auf Tumorzellen notwendig ist, um ein Anbinden von NK-Zellen möglich zu machen und daß die Expression von HLA-Klasse I nicht das Anbinden, jedoch eine effektive Zelllyse verhindern kann [69]. Weitere Studien aus verschiedenen Arbeitsgruppen belegen eine wichtige Rolle der CD54-Expression für den Zellkontakt zwischen NK- und Tumorzellen [70], [71], während andere Studien keinen Einfluß von CD11a, CD54, CD58 [72], CD54, CD102 [73] bzw. CD11a, CD54, CD56 [74] auf die NK-Suszeptibilität verschiedener Tumorzellen bzw. Tumorzelllinien ergaben. Diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten auch auf die Verwendung unterschiedlicher Targetzelllinien zurückzuführen sein, da sich immer mehr abzeichnet, daß für unterschiedliche Targetzellen verschiedene Signale eine wichtige Bedeutung für die NK-Suszeptibilität haben.

Es wird erkennbar, daß sich die Variabilität der spezifischen Lyse wohl nicht allein durch Bestimmung der HLA-Expression und der untersuchten Adhäsionsmoleküle erklären läßt. Die HLA-Expression scheint aber ein sehr entscheidender Faktor zu sein, wofür auch die Tatsache spricht, daß nach Blockade der HLA-Moleküle sehr hohe Lyseraten erzielt werden konnten.

Bereits Ende der achtziger Jahre konnte gezeigt werden, daß eine Korrelation zwischen der HLA-Klasse-I-Expression und einer NK-Zell-vermittelten Lyse besteht, indem auf HLA-negativen Zellen verschiedene HLA-Expressionsraten durch Gentransfer induziert wurden und deren Einfluß auf die NK-Suszeptibilität untersucht wurde [75]

Der dominierende Einfluß der HLA-Moleküle konnte auch in vivo im Mausmodell belegt werden [76], wobei dort eine Blockade des für die

Leukämiezellen spezifischen KIR-Rezeptors auf den infundierten NK-Zellen im Vergleich zu nicht vorbehandelten NK-Zellen zu einer deutlich verlängerten Überlebenszeit der Mäuse führte.

Ruggeri kam in einer Studie zu dem Schluß, daß ALL-Blasten erstens nur von alloreaktiven NK-Zell-Klonen lysiert werden, d.h. von NK-Klonen, die nur einen bestimmten KIR-Rezeptor exprimieren, der kein HLA auf den Blasten erkennt und zweitens auch nur dann, wenn die Blasten LFA-1 exprimieren [77]. Dies deckt sich nicht mit den Ergebnissen dieser Arbeit, da der lineare Zusammenhang zwischen HLA-Expressionsdichte und spezifischer Lyse ausschließt, daß die Tumorzellen nur von alloreaktiven NK-Zellen lysiert werden, da für diese NK-Zellen ja kein passendes HLA-Molekül auf den Blasten exprimiert wird und damit auch das Maß der übrigen HLA-Expression keine Rolle spielt. Da die Versuche nicht auf klonaler Ebene durchgeführt wurden, kann nicht erwartet werden, einen Effekt alloreaktiver NK-Zellen zu beobachten, da diese normalerweise nur in sehr kleiner Zahl vorhanden sind und so in ihrer Wirkung in der Gesamtzahl der NK-Zellen untergehen. Auch wird das Adhäsionsmolekül LFA-1 nur von einem kleinen Teil der B-Zell-Leukämien exprimiert, jedoch gibt es etliche Blasten, die eine niedrige HLA-Expression besitzen, kein LFA-1 exprimieren und trotzdem gut von den NK-Zellen lysiert werden. Die Zahl der untersuchten Leukämien in der Studie von Ruggeri ist jedoch klein (n=5) und es ist nicht näher spezifiziert, ob es sich um Leukämien der B- oder der T-Zell-Reihe handelt. Der Effekt, daß in dieser Studie Blasten nur durch alloreaktive NK-Zellen lysiert werden konnten, könnte darauf zurückzuführen sein, daß die Blasten eine hohe HLA-Expression aufwiesen, was leider nicht untersucht wurde. Beide Modelle ließen sich kombinieren, wenn man annimmt, daß Zellen mit erniedrigter HLA-Expression per se Targetzellen für NK-Zellen darstellen, d.h. für die Lyse dieser Zellen keine alloreaktiven NK-Zellen notwendig sind. Die Tatsache, daß alloreaktive NK-Zellen entsprechende Leukämiezellen lysieren können bleibt aber natürlich unbestritten.

Die klinische Relevanz alloreaktiver NK-Zellen konnte in einer neueren Studie aus derselben Arbeitsgruppe belegt werden, in der gezeigt wurde, daß Patienten mit AML nach Transplantation eine wesentlich niedrigere Rezidivrate aufweisen,

wenn zwischen Spender und Empfänger eine KIR-Ligand Inkompatibilität vorliegt [78]. Interessanterweise wurde dieser Effekt bei ALL-Patienten nicht beobachtet und es stellt sich deshalb die Frage, warum ALL-Blasten kein geeignetes Target für alloreaktive NK-Zellen sind.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß in der Wechselwirkung zwischen NK- und Targetzellen die NK-Zytotoxizität durch eine Kombination von aktivierenden und inhibitorischen Signalen beeinflußt wird und für unterschiedliche Targetzellen eine eigene Gewichtung dieser Signale notwendig ist. Für die Leukämien der B-Zell-Reihe konnte gezeigt werden, daß der Grad der HLA-Klasse-I-Expression einen Hauptfaktor für die NK-Suszeptibilität darstellt, während sich der Einfluß verschiedener Adhäsionsmoleküle als gering erwies. Als weitere wichtige Einflußfaktoren sollten die Liganden für die NCR-Rezeptoren oder NKG2D in Betracht gezogen und deren Expression auf den Blasten untersucht werden.

## 5.7 ADCC

Die Inkubation der Targetzellen mit dem humanisierten CD 19-Antikörper führte zu einer starken Erhöhung der Targetzellyse, die dann im Bereich der Lyse mit der HLA-Klasse-I-Blockade liegt. Auch Tumorzellen, die sich als resistent gegenüber den aktivierten NK-Zellen zeigten, ließen sich mittels ADCC von den NK-Zellen lysieren. Auch bei diesen Versuchen verringert sich die Lyse mit abnehmendem Effektor:Target-Zell-Verhältnis entsprechend und mit Antikörper inkubierte Targetzellen ohne NK-Zellen zeigen eine Lyse, die im Bereich der Spontanlyse des Tests liegt; deshalb kann man davon ausgehen, daß der Targetzellyse tatsächlich der NK-vermittelte Mechanismus der ADCC zugrunde liegt und nicht durch Komplementlyse oder durch eventuelle Vernetzung der Oberflächenmoleküle zustande kommt.

Der Mechanismus der ADCC wurde in vitro schon früh entdeckt und bereits Anfang der siebziger Jahre wurde versucht, die Effektorzelle zu charakterisieren, die für die ADCC der Lymphozyten verantwortlich ist. Sie wurde als nicht-B- und

nicht-T-Zelle beschrieben [79] und als Killer-(K-)Zelle bezeichnet. Verantwortlich für die ADCC ist der Fc-Rezeptor Fc $\gamma$ RIII (CD16) der NK-Zellen, der jedoch eine sehr unterschiedliche Affinität zu verschiedenen Fc-Teilen zeigt. In der Tübinger Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, daß der humanisierte CD19-Antikörper gegenüber verschiedener Mouse-anti-human CD19- und CD20-Antikörpern im Zytotoxizitätstest mit CD19<sup>+</sup>- und CD20<sup>+</sup>- Blasten wesentlich höhere Targetzelllysen ermöglicht.

Der synergistische Effekt von IL2-Inkubation und ADCC wurde auch schon in anderen Arbeiten belegt. Tatake et. al. zeigten in einer Studie die Wirksamkeit eines anti-K562-Antikörpers (Subtyp IgG3) in der ADCC gegenüber CML-Blasten. Sowohl Lymphozyten von gesunden Spendern als auch von CML-Patienten zeigten einen deutlichen Anstieg der Blastenlyse mit ADCC, die durch eine vorherige IL2-Stimulation weiter erhöht werden konnte [80]. Dieser synergistische Effekt konnte auch im Mausmodell *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden [81]. Der humanisierte CD 19 Antikörper ließe sich eventuell für eine Immuntherapie bei Leukämien der B-Zell-Reihe zusammen mit IL2 stimulierten NK-Zellen des Stammzellspenders unmittelbar nach Transplantation einsetzen, um eine MRD zu behandeln und damit das Risiko eines Rezidivs zu verringern. Der Einsatz direkt nach Transplantation würde den negativen Effekt, daß auch normale B-Zellen von dem Antikörper erkannt werden, minimieren, da diese zu diesem Zeitpunkt noch nicht in großem Maße regenerieren. Der humanisierte Antikörper bietet neben der besseren Vermittlung einer ADCC den weiteren Vorteil, daß er ein geringeres immunogenes Potential als ein kompletter Mausantikörper besitzt.

Eine weitere Möglichkeit wäre der gemeinsame Einsatz von NK-Zellen mit einem Fusionsantikörper, an den IL2 genetisch gekoppelt ist. Ein solches Antikörper-Zytokin-Konstrukt zeigte z.B. gegenüber Neuroblastomen im Mausmodell einen guten Effekt *in vitro* und *in vivo*, der ausschließlich von NK-Zellen und nicht von T-Zellen vermittelt wurde [82].

*In vivo* spielen neben der ADCC aber auch noch weitere Mechanismen bei der antikörperinduzierten Tumorzellyse eine Rolle, so z.B. die Komplement

abhängige Zelllyse (CDC). Außerdem können manche Antikörper in den Zielzellen ein intrazelluläres antiproliferatives apoptotisches Signal induzieren. Alle drei Mechanismen kommen zum Beispiel beim Einsatz von Rituximab, einem humanisierten anti-CD20-Antikörper, bei Non-Hodgkin-Lymphomen des B-Zell-Typs zum Tragen. In klinischen Studien konnten gute Ansprechraten auf Rituximab beobachtet werden [83]. Eine weitere Möglichkeit der Antikörperbasierten Therapie besteht in der Kopplung von Chemotherapeutika und hochpotenten Zellgiften, die ihre Wirkung intrazellulär entfalten, an tumorspezifische Antikörper. In Studien wurde dafür z.B. das Pflanzengift Ricin oder von *Pseudomonas* stammendes Exotoxin verwendet. Ein Ricin-gekoppelter CD19-Antikörper wurde z.B. für die Behandlung von B-Zell-NHLs eingesetzt, zeigte jedoch starke Nebenwirkungen [84]. Gute Ergebnisse konnten mit dem Einsatz eines CD22-Antikörpers, an den ein *Pseudomonas*-Exotoxin gekoppelt wurde, bei Chemotherapie-resistenten Haarzell-Leukämien erzielt werden [85]. Generelle Probleme für die Entwicklung und den erfolgreichen Einsatz monoklonaler Antikörper ergeben sich in folgenden Punkten (nach [86]):

- Identifizierung Tumor-spezifischer Antigene
- Variation in der Expressionsdichte des Antigens auf Tumorzellen
- Reversible Bindung zwischen Antikörper und Antigen
- Internalisierung des Antigen-Antikörper-Komplexes (gewünscht bei Toxin-gekoppelten Antikörpern, Problem für ADCC- und CDC-vermittelte Lyse)
- schlechtes Erreichen hypoxischer, d.h. schlecht durchbluteter Tumoren (v.a. bei soliden Tumoren)
- schnelles Abfangen des Antikörpers durch zirkulierende Tumorzellen
- Reaktion des Immunsystems auf den Antikörper

In vitro Untersuchungen mit Rituximab zeigten, daß manche Zelllinien aufgrund der Expression bestimmter Oberflächenmoleküle (CD55, CD59) resistent gegenüber einer Komplement-vermittelten Lyse sind, während bei allen Zelllinien eine ADCC-abhängige Lyse erzielt werden konnte [87]; in einer anderen

Untersuchung wurde der Einfluß der ADCC-vermittelten Lyse verschiedener Zelllinien mit Rituximab als eher gering bewertet [88].

Welchen Einfluß die ADCC in vivo spielt und inwieweit sich die Ergebnisse der bisher durchgeführten Studien auf den Einsatz einer Antikörper-basierten Therapie bei akuten lymphatischen Leukämien übertragen lassen, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt schwer zu beantworten und sollte in weitergehenden Studien untersucht werden.

## 5.8 Schlußfolgerungen für die klinische Anwendung

Nach einer haploidenten Stammzelltransplantation bei akuten lymphatischen Leukämien im Kindesalter stellt das Auftreten eines Rezidivs eine Haupttodesursache da. Deshalb ist es erstrebenswert, nach Transplantation eine zusätzliche Immuntherapie zur Behandlung einer MRD durchzuführen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß durch die Kombination einer Positivanreicherung der NK-Zellen mit einer anschließenden T-Zell-Depletion ein hoher Reinheitsgrad von NK-Zellen mit einem hohen Grad der T-Zell-Depletion unter Erhalt der funktionellen Eigenschaften der NK-Zellen erzielt werden kann. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, daß eine Anreicherung analog zu der hier durchgeführten Methode im klinischen Maßstab unter Reinraumbedingungen und mit entsprechendem Material auch unter GMP-Bedingungen möglich ist [62].

Diese so angereicherten NK-Zellen könnten als Immuntherapie zu einem frühen Zeitpunkt nach einer Stammzelltransplantation zur Behandlung einer MRD mit einem minimalen Risiko einer GvHD bei Leukämien mit niedriger HLA-Klasse-I-Expression eingesetzt werden. Ebenso könnten sie auch schon am Tag 0 der Transplantation infundiert werden, um ein Engraftment der Stammzellen zu verbessern, wie es im Mausmodell beschrieben wurde [89], [63].



Gegenüber ALL-Blasten mit hoher HLA-Klasse-I-Expression zeigten die NK-Zellen nur eine schwache zytotoxische Aktivität, jedoch konnten durch Stimulation mit IL2 und den Einsatz eines humanisierten CD19-Antikörpers unter Ausnutzung der ADCC hohe Lyseraten in vitro auch bei solchen Blasten erzielt werden. Für diese Leukämien müßte also auch in vivo eine Kombination aus NK-Zell-Gabe, IL2-Stimulation und Gabe eines geeigneten Antikörpers gewählt werden. Als Alternative dazu ließen sich auch nicht-alloreaktive T-Zellen einsetzen, jedoch scheint dieser Ansatz zur Zeit noch entfernt von der klinischen Anwendung zu sein.

## 6 Zusammenfassung

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde eine Methode zur Anreicherung von NK-Zellen untersucht im Hinblick auf die Reinheit und Funktionalität der NK-Zellen und effektive Depletion der T-Zellen. Dabei wurde an eine Positivanreicherung der NK-Zellen mit CD56-MACS-Beads eine T-Zell-Depletion mit CD3-Dynabeads angeschlossen. Durchflußzytometrisch ergab sich nach beiden Schritten der Anreicherung eine Reinheit der CD56<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> Zellen von 96,84 ± 3,34%, während der Anteil der T-Zellen 0,39 ± 0,29 % betrug. Damit lag die Reinheit der NK-Zellen im bzw. deutlich über dem Bereich, der in anderen Studien beschrieben wurde, die Ausbeute lag mit 71,4 ± 15,79% trotz des zweiten Schrittes über den in der Literatur bisher veröffentlichten Werten. Die Effektivität der T-Zell-Depletion wurde zudem funktionell in Proliferationsassays untersucht und zeigte eine deutliche Reduktion des alloreaktiven Proliferationspotentials der angereicherten Zellen. Die zytotoxische Funktionalität der angereicherten NK-Zellen wurde gegenüber der Zelllinie K562 getestet und zeigte einen starken Anstieg nach den einzelnen Anreicherungsschritten gemäß dem höheren Anteil der NK-Zellen in der Effektor-Zell-Fraktion. Maximale Werte konnten dabei durch zusätzliche Stimulation über Nacht mit Interleukin 2 erzielt werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die zytotoxische Aktivität der so angereicherten NK-Zellen gegenüber den Blasten pädiatrischer Patienten mit einer akuten lymphatischen Leukämie und deren Abhängigkeit von der Expression von HLA-Klasse-I- und Adhäsionsmolekülen auf den leukämischen Blasten untersucht. Gegenüber leukämischen Blasten zeigten die angereicherten NK-Zellen durchschnittlich nur eine geringe Spontanaktivität, da die NK-Zellen über eine Interaktion ihrer KIR-Rezeptoren mit den HLA-Molekülen der Blasten in ihrer Aktivität gehemmt wurden. Es zeigte sich allerdings eine sehr unterschiedliche Expressionsrate der HLA-Klasse-I-Moleküle, so differierten bei Leukämien der B-Zell-Reihe die Werte um den Faktor 33,6 zwischen 13149 und

441962 HLA-Moleküle/Zelle. Blasten mit geringer HLA-Expression ließen sich auch von unstimulierten NK-Zellen lysieren, während sich Blasten mit hoher HLA-Expression selbst den mit Interleukin 2 stimulierten NK-Zellen gegenüber resistent erwiesen. Für alle Blasten konnte jedoch gezeigt werden, daß sich durch die Blockade der HLA-Moleküle mit einem Antikörper die Lyse bis in den Bereich der Kontrollen mit K562 steigern lassen.

Es fand sich außerdem eine Korrelation zwischen dem Grad der HLA-Klasse-I-Expression und der Lysierbarkeit der Blasten, die belegt, daß nicht nur alloreaktive NK-Zellen in der Lage sind, ALL-Blasten zu lysieren. Für die einzelnen untersuchten Adhäsionsmoleküle konnte kein signifikanter Zusammenhang gefunden werden.

Außerdem konnte gezeigt werden, daß sich das inhibierende Signal der HLA-Klasse-I-Moleküle durch den Einsatz der ADCC überwinden läßt. Dazu wurden CD19<sup>+</sup>-Blasten im Zytotoxizitätstest vor Zugabe der NK-Zellen mit einem humanisierten CD19-Antikörper inkubiert. Die spezifische Lyse lag dann im Bereich der Lyse mit der HLA-Klasse-I-Blockade.

Die hochangereicherten NK-Zellen könnten also nach einer allogenen Transplantation zur Behandlung einer MRD eingesetzt werden, v.a. im Falle einer haploidenten Transplantation, da nur ein minimales Risiko einer GvHD besteht. Bei Leukämien mit hoher HLA-Expression führten die Stimulation der NK-Zellen mit IL-2 und die Ausnutzung der ADCC in vitro zu guten Lyseraten und sollten für die Behandlung einer MRD in vivo eventuell ebenfalls kombiniert werden.

## 7 Literatur

1. Handgretinger R, Klingebiel T, Lang P, Schumm M, Neu S, Geiselhart A, Bader P, Schlegel PG, Greil J, Stachel D, Herzog RJ, Niethammer D: Megadose transplantation of purified peripheral blood CD34(+)progenitor cells from HLA-mismatched parental donors in children. *Bone Marrow Transplant* 27:777-783, 2001.
2. Kernan NA, Flomenberg N, Dupont B, O'Reilly RJ: Graft rejection in recipients of T-cell-depleted HLA-nonidentical marrow transplants for leukemia. Identification of host-derived antidonor alloreactive T lymphocytes. *Transplantation* 43:842-847, 1987.
3. Ljungman P. Immune reconstitution and viral infections after stem cell transplantation. *BMT* 21 (Suppl.2), S72-74. 2001. *BMT*. Ref Type: Generic
4. Sehn LH, Alyea EP, Weller E, Canning C, Lee S, Ritz J, Antin JH, Soiffer RJ: Comparative outcomes of T-cell-depleted and non-T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia: impact of donor lymphocyte infusion. *J Clin Oncol* 17:561-568, 1999.
5. Handgretinger R, Lang P, Schumm M, Pfeiffer M, Gottschling S, Demirdelen B, Bader P, Kuci S, Klingebiel T, Niethammer D: Immunological aspects of haploidentical stem cell transplantation in children. *Ann N Y Acad Sci* 938:340-357, 2001.
6. Aversa F, Tabilio A, Velardi A, Cunningham I, Terenzi A, Falzetti F, Ruggeri L, Barbabietola G, Aristei C, Latini P, Reisner Y, Martelli MF: Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *N Engl J Med* 339:1186-1193, 1998.
7. Lang P, Schumm M, Taylor G, Klingebiel T, Neu S, Geiselhart A, Kuci S, Niethammer D, Handgretinger R: Clinical scale isolation of highly purified peripheral CD34+progenitors for autologous and allogeneic transplantation in children. *Bone Marrow Transplant* 24:583-589, 1999.
8. Schumm M, Lang P, Taylor G, Kuci S, Klingebiel T, Bühring HJ, Geiselhart A, Niethammer D, Handgretinger R: Isolation of highly purified autologous and allogeneic peripheral CD34+ cells using the CliniMACS device. *J Hematother* 8:209-218, 1999.

9. Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Boyett JM, Behm FG, Raimondi SC, Sandlund JT, Rivera GK, Rubnitz JE, Ribeiro RC, Pui CH, Campana D: Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 96:2691-2696, 2000.
10. Biondi A, Valsecchi MG, Seriu T, D'Aniello E, Willemse MJ, Fasching K, Pannunzio A, Gadner H, Schrappe M, Kamps WA, Bartram CR, van Dongen JJ, Panzer-Grumayer ER: Molecular detection of minimal residual disease is a strong predictive factor of relapse in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia with medium risk features. A case control study of the International BFM study group. *Leukemia* 14:1939-1943, 2000.
11. Levett D, Middleton P, Cole M, Reid MM: A demographic study of the clinical significance of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol* 36:365-371, 2001.
12. Knechtli CJ, Goulden NJ, Hancock JP, Grandage VL, Harris EL, Garland RJ, Jones CG, Rowbottom AW, Hunt LP, Green AF, Clarke E, Lankester AW, Cornish JM, Pamphilon DH, Steward CG, Oakhill A: Minimal residual disease status before allogeneic bone marrow transplantation is an important determinant of successful outcome for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 92:4072-4079, 1998.
13. Knechtli CJ, Goulden NJ, Hancock JP, Harris EL, Garland RJ, Jones CG, Grandage VL, Rowbottom AW, Green AF, Clarke E, Lankester AW, Potter MN, Cornish JM, Pamphilon DH, Steward CG, Oakhill A: Minimal residual disease status as a predictor of relapse after allogeneic bone marrow transplantation for children with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 102:860-871, 1998.
14. Heberman R, Nunn M, Lavrin D. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterisation of effector cells. 16, 230. 1975. *Int J Cancer*.  
Ref Type: Generic
15. Bourin P, Mansour I, Doinel C, Roue R, Rouger P, Levi F: Circadian rhythms of circulating NK cells in healthy and human immunodeficiency virus-infected men. *Chronobiol Int* 10:298-305, 1993.
16. Carlyle JR, Michie AM, Cho SK, Zuniga-Pflucker JC: Natural killer cell development and function precede alpha beta T cell differentiation in mouse fetal thymic ontogeny. *J Immunol* 160:744-753, 1998.
17. Ljunggren HG, Karre K: In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 11:237-244, 1990.

18. Kärre K. Role of target histocompatibility antigens in regulation of natural killer activity: a reevaluation and a hypothesis. 81-92. 1985. in Heberman RB, Callewaert DM (eds.): *Mechansims of cytotoxicity by NK cells*, Orlando, Academic Press 1985.
19. Karre K: Express yourself or die: peptides, MHC molecules, and NK cells. *Science* 267:978-979, 1995.
20. Lanier LL: NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* 16:359-393, 1998.
21. Lanier LL, Phillips JH: Inhibitory MHC class I receptors on NK cells and T cells. *Immunol Today* 17:86-91, 1996.
22. Peruzzi M, Parker KC, Long EO, Malnati MS: Peptide sequence requirements for the recognition of HLA-B\*2705 by specific natural killer cells. *J Immunol* 157:3350-3356, 1996.
23. Campbell KS, Dessing M, Lopez-Botet M, Cella M, Colonna M: Tyrosine phosphorylation of a human killer inhibitory receptor recruits protein tyrosine phosphatase 1C. *J Exp Med* 184:93-100, 1996.
24. Fry AM, Lanier LL, Weiss A: Phosphotyrosines in the killer cell inhibitory receptor motif of NKB1 are required for negative signaling and for association with protein tyrosine phosphatase 1C. *J Exp Med* 184:295-300, 1996.
25. Imboden JB, Koretsky GA: Intracellular signalling. Switching off signals. *Curr Biol* 5:727-729, 1995.
26. Moretta A, Tambussi G, Bottino C, Tripodi G, Merli A, Ciccone E, Pantaleo G, Moretta L: A novel surface antigen expressed by a subset of human CD3-CD16+ natural killer cells. Role in cell activation and regulation of cytolytic function. *J Exp Med* 171:695-714, 1990.
27. Moretta A, Bottino C, Pende D, Tripodi G, Tambussi G, Viale O, Orengo A, Barbaresi M, Merli A, Ciccone E, .: Identification of four subsets of human CD3-CD16+ natural killer (NK) cells by the expression of clonally distributed functional surface molecules: correlation between subset assignment of NK clones and ability to mediate specific alloantigen recognition. *J Exp Med* 172:1589-1598, 1990.
28. Bottino C, Vitale M, Pende D, Biassoni R, Moretta A: Receptors for HLA class I molecules in human NK cells. *Semin Immunol* 7:67-73, 1995.

29. Litwin V, Gumperz J, Parham P, Phillips JH, Lanier LL: NKB1: a natural killer cell receptor involved in the recognition of polymorphic HLA-B molecules. *J Exp Med* 180:537-543, 1994.
30. Vitale M, Sivori S, Pende D, Augugliaro R, di Donato C, Amoroso A, Malnati M, Bottino C, Moretta L, Moretta A: Physical and functional independency of p70 and p58 natural killer (NK) cell receptors for HLA class I: their role in the definition of different groups of alloreactive NK cell clones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:1453-1457, 1996.
31. Gumperz JE, Litwin V, Phillips JH, Lanier LL, Parham P: The Bw4 public epitope of HLA-B molecules confers reactivity with natural killer cell clones that express NKB1, a putative HLA receptor. *J Exp Med* 181:1133-1144, 1995.
32. Pende D, Biassoni R, Cantoni C, Verdiani S, Falco M, di Donato C, Accame L, Bottino C, Moretta A, Moretta L: The natural killer cell receptor specific for HLA-A allotypes: a novel member of the p58/p70 family of inhibitory receptors that is characterized by three immunoglobulin-like domains and is expressed as a 140-kD disulphide-linked dimer. *J Exp Med* 184:505-518, 1996.
33. Moretta A, Biassoni R, Bottino C, Pende D, Vitale M, Poggi A, Mingari MC, Moretta L: Major histocompatibility complex class I-specific receptors on human natural killer and T lymphocytes. *Immunol Rev* 155:105-117, 1997.
34. Lazetic S, Chang C, Houchins JP, Lanier LL, Phillips JH: Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *J Immunol* 157:4741-4745, 1996.
35. Moretta A, Vitale M, Sivori S, Bottino C, Morelli L, Augugliaro R, Barbaresi M, Pende D, Ciccone E, Lopez-Botet M, .: Human natural killer cell receptors for HLA-class I molecules. Evidence that the Kp43 (CD94) molecule functions as receptor for HLA-B alleles. *J Exp Med* 180:545-555, 1994.
36. Sivori S, Vitale M, Bottino C, Marcenaro E, Sanseverino L, Parolini S, Moretta L, Moretta A: CD94 functions as a natural killer cell inhibitory receptor for different HLA class I alleles: identification of the inhibitory form of CD94 by the use of novel monoclonal antibodies. *Eur J Immunol* 26:2487-2492, 1996.
37. Brooks AG, Borrego F, Posch PE, Patamawenu A, Scorzelli CJ, Ulbrecht M, Weiss EH, Coligan JE: Specific recognition of HLA-E, but not classical,

- HLA class I molecules by soluble CD94/NKG2A and NK cells. *J Immunol* 162:305-313, 1999.
38. Maier S, Grzeschik M, Weiss EH, Ulbrecht M: Implications of HLA-E allele expression and different HLA-E ligand diversity for the regulation of NK cells. *Hum Immunol* 61:1059-1065, 2000.
  39. Houchins JP, Lanier LL, Niemi EC, Phillips JH, Ryan JC: Natural killer cell cytolytic activity is inhibited by NKG2-A and activated by NKG2-C. *J Immunol* 158:3603-3609, 1997.
  40. Lanier LL, Yu G, Phillips JH: Analysis of Fc gamma RIII (CD16) membrane expression and association with CD3 zeta and Fc epsilon RI-gamma by site-directed mutation. *J Immunol* 146:1571-1576, 1991.
  41. Wu J, Cherwinski H, Spies T, Phillips JH, Lanier LL: DAP10 and DAP12 form distinct, but functionally cooperative, receptor complexes in natural killer cells. *J Exp Med* 192:1059-1068, 2000.
  42. Sivori S, Vitale M, Morelli L, Sanseverino L, Augugliaro R, Bottino C, Moretta L, Moretta A: p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *J Exp Med* 186:1129-1136, 1997.
  43. Sivori S, Pende D, Bottino C, Marcenaro E, Pessino A, Biassoni R, Moretta L, Moretta A: NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. *Eur J Immunol* 29:1656-1666, 1999.
  44. Pende D, Parolini S, Pessino A, Sivori S, Augugliaro R, Morelli L, Marcenaro E, Accame L, Malaspina A, Biassoni R, Bottino C, Moretta L, Moretta A: Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med* 190:1505-1516, 1999.
  45. Vitale M, Bottino C, Sivori S, Sanseverino L, Castriconi R, Marcenaro E, Augugliaro R, Moretta L, Moretta A: NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J Exp Med* 187:2065-2072, 1998.
  46. Cantoni C, Bottino C, Vitale M, Pessino A, Augugliaro R, Malaspina A, Parolini S, Moretta L, Moretta A, Biassoni R: NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. *J Exp Med* 189:787-796, 1999.



47. Vales-Gomez M, Reyburn HT, Erskine RA, Lopez-Botet M, Strominger JL: Kinetics and peptide dependency of the binding of the inhibitory NK receptor CD94/NKG2-A and the activating receptor CD94/NKG2-C to HLA-E. *EMBO J* 18:4250-4260, 1999.
48. Houchins JP, Yabe T, McSherry C, Bach FH: DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J Exp Med* 173:1017-1020, 1991.
49. Songyang Z, Shoelson SE, Chaudhuri M, Gish G, Pawson T, Haser WG, King F, Roberts T, Ratnofsky S, Lechleider RJ, .: SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 72:767-778, 1993.
50. Simpson D, Phillips G, Thomas T, et.al.: Ex vivo depletion of T-lymphocytes by immunomagnetic beads to decrease graft-versus-host disease after unrelated donor marrow transplantation. *Blood* 88 (suppl 1):420a, 1996.
51. Zeis M, Uharek L, Glass B, Steinmann J, Dreger P, Gassmann W, Schmitz N: Allogeneic MHC-mismatched activated natural killer cells administered after bone marrow transplantation provide a strong graft-versus-leukaemia effect in mice. *Br J Haematol* 96:757-761, 1997.
52. Jiang YZ, Barrett AJ, Goldman JM, Mavroudis DA: Association of natural killer cell immune recovery with a graft-versus-leukemia effect independent of graft-versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation. *Ann Hematol* 74:1-6, 1997.
53. Blomberg K, Hautala R, Lovgren J, Mikkala VM, Lindqvist C, Akerman K: Time-resolved fluorometric assay for natural killer activity using target cells labelled with a fluorescence enhancing ligand. *J Immunol Methods* 193:199-206, 1996.
54. Geiselhart A, Neu S, Buchholz F, Lang P, Niethammer D, Handgretinger R: Positive selection of CD56+ lymphocytes by magnetic cell sorting. *Nat Immun* 15:227-233, 1996.
55. Miltenyi S, Müller W, Weichel W, Radbruch A: High Gradient Magnetic Cell Separation With MACS. *Cytometry* 231-238, 1990.
56. Serke S, van Lessen A, Huhn D: Quantitative Fluorescence Flow Cytometry: A Comparison of the Three Techniques for Direct and Indirect Immunofluorescence. *Cytometry* 33:179-187, 1998.
57. Smith KB, Ellis SA: Standardisation of a procedure for quantifying surface antigens by indirect immunofluorescence. *J Immunol Methods* 228:29-36, 1999.

58. Lenkei R, Gratama JW, Rothe G, Schmitz G, et.al.: Performance of Calibration Standards for Antigen Quantitation With Flow Cytometry. *Cytometry* 33:188-196, 1998.
59. Gratama JW, D'hautcourt J-L, Mandy F, Rothe G, Barnett D, Janossy G, Papa S, Schmitz G, Lenkei R: Flow Cytometric Quantitation of Immunofluorescence Intensity: Problems and Perspectives. *Cytometry* 33:166-178, 1998.
60. Schwartz A, Marti GE, Poon R, Gratama JW, Fernandez-Repollet E: Standardizing Flow Cytometry: A Classification System of Fluorescence Standards Used for Flow Cytometry. *Cytometry* 33:106-114, 1998.
61. Pflueger E, Mueller EA, Anderer FA: Preservation of cytotoxic function during multi-cycle immunomagnetic cell separations of human NK cells using a new type of magnetic bead. *J Immunol Methods* 165-173, 1990.
62. Lang P, Pfeiffer M, Handgretinger R, Schumm M, Demirdelen B, Stanojevic S, Klingebiel T, Köhl U, Kuci S, Niethammer D: Clinical scale isolation of T cell-depleted CD56+ donor lymphocytes in children. *Bone Marrow Transplant* 29:497-502, 2002.
63. Murphy WJ, Longo DL: The potential role of NK cells in the separation of graft-versus-tumor effects from graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Immunol Rev* 157:167-176, 1997.
64. Festenstein H, Schmidt W: Variation in MHC antigenic profiles of tumor cells and its biological effects. *Immunol Rev* 60:85, 1981.
65. Algarra I, Cabrera T, Garrido F: The HLA Crossroad in Tumor Immunology. *Hum Immunol* 61:65-73, 2000.
66. Carosella ED, Khalil-Daher I, Dausset J, Rouas-Freiss N: HLA-G Mediates Protection From Natural Killer Cytolysis: Implications in Immune Tolerance. *Transplantation Proceedings* 31:1192-1193, 1999.
67. Real L-M, Cabrera T, Collado A, Jimenez P, Garcia A, Ruiz-Cabello F, Garrido F: Expression of HLA-G in human tumors is not a frequent event. *Int J Cancer* 81:512, 1999.
68. Komatsu F, Kajiwara M: Relation of Natural Killer Cell Line NK-92-Mediated Cytolysis With the Surface Markers of Major Histocompatibility Complex Class I Antigens, Adhesion Molecules. and Fas of Target Cells. *Oncology Research* 10:483-489, 1998.

69. Gwin JL, Gercel-Taylor C, Taylor DD, Eisenberg B: Role of LFA-3, ICAM-1, and MHC Class I on the Sensitivity of Human Tumor Cells to LAK Cells. *Journal of Surgical Research* 60:129-136, 1996.
70. Maki G, Krystal G, Dougherty G, Takei F, Klingemann HG: Induction of sensitivity to NK-mediated cytotoxicity by TNF-alpha treatment: possible role of ICAM-3 and CD44. *Leukemia* 12:1565-1572, 1998.
71. Chaperot L, Jakob M, Le Vacon F, Giroux C, Molens J, Sotto J, Bensa J, Plumas J: Relationships Between Susceptibility to LAK Cell-Mediated Lysis, Conjugate Formation and Expression of Adhesion Molecules in B-Cell Derived Non-Hodgkin's Lymphomas. *Leukemia and Lymphoma* 28:133-143, 1996.
72. Quillet-Mary A, Cavarec L, Kermarrec N, Marchiol-Fournigault C, Gil ML, Conjeaud H, Fradelizi D: Target lysis by human LAK cells is critically dependent upon target binding properties, but LFA-1, LFA-3 and ICAM-1 are not the major adhesion ligands on targets. *Int J Cancer* 47:473-479, 1991.
73. Akella R, Hall RE: Expression of the adhesion molecules ICAM-1 and ICAM-2 on tumor cell lines does not correlate with their susceptibility to natural killer cell-mediated cytotoxicity: evidence for additional ligands for effector cell beta integrins. *Eur J Immunol* 22:1069-1074, 1992.
74. Palucka AK, Porwit A, Reizenstein P: Resistance of leukemic blasts to lymphokine activated killer (LAK)- mediated cytotoxicity is not related to their adhesion properties. *Eur J Haematol* 47:123-127, 1991.
75. Shimizu Y, DeMars R: Demonstration by class I gene transfer that reduced susceptibility of human cells to natural killer cell-mediated lysis is inversely correlated with HLA class I antigen expression. *Eur J Immunol* 19:447-451, 1989.
76. Koh CY, Blazar BR, George T, Welniak LA, Capitini CM, Raziuddin A, Murphy WJ, Bennet M: Augmentation of antitumor effects by NK cell inhibitory receptor blockade in vitro and in vivo. *Blood* 97:3132-3137, 2001.
77. Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, Volpi I, Tosti A, Peruccio K, Urbani E, Negrin R, Martelli MF, Velardi A: Role of Natural Killer Cell Alloreactivity in HLA-Mismatched Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Blood* 94:333-339, 1999.
78. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Peruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, Posati S, Rogaia D, Frassoni F, Aversa F, Martelli MF, Velardi A: Effectiveness of Donor Natural Killer Cell Alloreactivity in Mismatched Hematopoietic Transplants. *Science* 295:2097-2100, 2002.

79. Trinchieri G, Bauman P, De Marchi M, Tokes Z: Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in humans. I. Characterization of the effector cell. *J Immunol* 115:249-255, 1975.
80. Tatake RJ, Maniar HS, Chiplunkar SV, Somasundaram R, Amin MK, Saikia T, Gangal SG: Antibody dependent cellular cytotoxicity and complement mediated cytotoxicity on leukemic cells mediated by anti K562 monoclonal antibodies. *J Clin Lab Immunol* 31:87-91, 1990.
81. Shiloni E, Eisenthal A, Sachs D, Rosenberg SA: Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by murine lymphocytes activated in recombinant interleukin 2. *J Immunol* 138:1992-1998, 1987.
82. Lode HN, Xiang R, Dreier T, Varki NM, Gillies SD, Reisfeld RA: Natural killer cell-mediated eradication of neuroblastoma metastases to bone marrow by targeted interleukin-2 therapy. *Blood* 91:1706-1715, 1998.
83. McLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK, Levy R, Czuczman MS, Williams ME, Heyman MR, Bence-Bruckler I, White CA, Cabanillas F, Jain V, Ho AD, Lister J, Wey K, Shen D, Dallaire BK: Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol* 16:2825-2833, 1998.
84. Grossbard ML, Lambert JM, Goldmacher VS, Spector NL, Kinsella J, Eliseo L, Coral F, Taylor JA, Blattler WA, Epstein CL, .: Anti-B4-blocked ricin: a phase I trial of 7-day continuous infusion in patients with B-cell neoplasms. *J Clin Oncol* 11:726-737, 1993.
85. Kreitman RJ, Wilson WH, Bergeron K, Raggio M, Stetler-Stevenson M, FitzGerald DJ, Pastan I: Efficacy of the anti-CD22 recombinant immunotoxin BL22 in chemotherapy-resistant hairy-cell leukemia. *N Engl J Med* 345:241-247, 2001.
86. Hainsworth JD: Monoclonal antibody therapy in lymphoid malignancies. *Oncologist* 5:376-384, 2000.
87. Golay J, Zaffaroni L, Vaccari T, Lazzari M, Borleri GM, Bernasconi S, Tedesco F, Rambaldi A, Introna M: Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis. *Blood* 95:3900-3908, 2000.
88. Harjunpaa A, Junnikkala S, Meri S: Rituximab (anti-CD20) therapy of B-cell lymphomas: direct complement killing is superior to cellular effector mechanisms. *Scand J Immunol* 51:634-641, 2000.

89. Murphy WJ, Keller JR, Harrison CL, Young HA, Longo DL: Interleukin-2-Activated Natural Killer Cells Can Support Hematopoiesis In Vitro and Promote Marrow Engraftment In Vivo. *Blood* 80:670-677, 1992

## 8 Anhang

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	ADCC	S. 13
Abb. 3.1:	Set-Up-Beads im Scatter	S. 43
Abb. 3.2:	Set-Up-Beads im Histogramm	S. 43
Abb. 3.3:	Calibration-Beads im Scatter	S. 44
Abb. 3.4:	Calibration-Beads im Histogramm	S. 44
Abb. 3.5:	Zu Abb. 3.4 gehörende Histogramm-Statistik	S. 44
Abb. 4.1:	Lymphozyten vor Anreicherung, markiert mit CD 3 FITC und CD 16/56 PE	S. 51
Abb. 4.2:	Lymphozyten nach MACS-Anreicherung, markiert mit CD 3 FITC und CD 16/56 PE	S. 51
Abb. 4.3:	Lymphozyten nach T-Zell-Depletion mit Dynabeads, markiert mit CD 3 FITC und CD 16/56 PE	S. 51
Abb. 4.4:	Durchschnittliche zytotoxische Aktivität der unstimulierten Zellen nach den verschiedenen Anreicherungsschritten	S. 52
Abb. 4.5:	Durchschnittliche zytotoxische Aktivität der stimulierten Zellen nach den verschiedenen Anreicherungsschritten	S. 53
Abb. 4.6:	Reduktion der Alloreaktivität und des Proliferationsverhaltens auf PHA nach den einzelnen Anreicherungsschritten bezogen auf die Werte der Ausgangszellen.	S. 54

- 
- Abb. 4.7: Zytotoxizität der angereicherten NK-Zellen gegenüber K562 aus 13 unabhängigen Versuchen S. 56
- Abb. 4.8: Vergleich der Zytotoxizität der angereicherten NK-Zellen gegenüber leukämischen Blasten (n=27) und den K562-Kontrollen (n=13). S. 57
- Abb. 4.9: Steigerung der NK-Empfindlichkeit durch Maskierung von HLA-Klasse I S. 58
- Abb. 4.10: HLA-Klasse I Expression der B-Zell-Leukämien und Durchschnittswerte für CD19 und CD34 positive Zellen gesunder Spender S. 59
- Abb. 4.11: HLA-Klasse I Expression der T-Zell-Leukämien und Durchschnittswerte für CD3 und CD34 positive Zellen gesunder Spender S. 60
- Abb. 4.12: Patient mit niedriger HLA-Expression auf den leukämischen Blasten (Patient 20 aus Abb. 4.10) S. 63
- Abb. 4.13: Patient mit hoher HLA-Expression auf den leukämischen Blasten (Patient 1 aus Abb. 4.10) S. 64
- Abb. 4.14: Lineare Abhängigkeit der spezifischen Lyse von der HLA-Klasse-I-Expression S. 66
- Abb. 4.15: Lineare Abhängigkeit der spezifischen Lyse von der HLA-Klasse-I-Expression S. 67
- Abb. 4.16: Durchschnittliche spezifische Lyse der Blasten der B-Zell-Reihe in Abhängigkeit der Anzahl der exprimierten S. 68
- Abb. 4.17 Vergleich der spezifischen Lysen zwischen Blasten ohne und mit potentiell alloreaktiven NK-Zellen S. 69
- Abb. 4.18: ADCC bei einem Patienten mit hoher HLA-Klasse-I-Expression S. 70

## 8.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1:	Indikationen für die Stammzelltransplantation in der ALL-BFM 2000 Studie	S. 6
Tab. 1.2:	Rezeptoren für HLA-Klasse I der Ig-Superfamilie auf NK-Zellen	S. 16
Tab. 4.1:	Zusammensetzung der Lymphozyten vor MACS-Anreicherung	S. 48
Tab. 4.2:	Zusammensetzung der Lymphozyten nach MACS-Anreicherung	S. 49
Tab. 4.3:	Zusammensetzung der Lymphozyten nach T-Zell-Depletion	S. 50
Tab. 4.4:	Steigerung der Zytotoxizität durch die Anreicherungsschritte	S. 53
Tab. 4.5:	Charakterisierung der angereicherten NK-Zellen	S. 55
Tab. 4.6:	Ergebnisse der K562 - Kontrollen im Zytotoxizitätstest, Mittelwerte und Standardabweichung aus 13 unabhängigen Versuchen	S.56
Tab. 4.7:	Expression der Adhäsionsmoleküle auf leukämischen Blasten der T-Zell-Reihe	S. 61
Tab. 4.8:	Expression der Adhäsionsmoleküle auf leukämischen Blasten der B-Zell-Reihe	S. 62
Tab. 4.9:	Durchschnittliche Lyse der Blasten der B-Zell-Reihe	S. 64
Tab. 4.10:	Durchschnittliche Lyse der Blasten der T-Zell-Reihe	S. 65
Tab. 4.11:	Ergebnisse der ADCC bei fünf Patienten mit Leukämien der B-Zell-Reihe	S. 69



**Danksagungen:**

Bei Herrn Prof. Dr. D. Niethammer bedanke ich mich herzlich für die Überlassung des Themas. Bei Dr. Peter Lang bedanke ich mich für die gute Betreuung, zahlreiche Hilfestellungen und die rege Diskussionsbereitschaft. Mein Dank gilt ebenfalls Dr. Michael Schumm für wertvolle Ratschläge und geduldige Hilfe bei Problemen mit dem FACSCalibur und verschiedenen Computern. Bei den Mitarbeitern des KMT-Labors, insbesondere Olga Bartulli und Ulrike Junker, bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit, die ausgesprochen freundliche Arbeitsatmosphäre und die zahlreichen gemeinsamen Einsätze an den Stickstoffbänken. Bei Annette Nord bedanke ich mich für die geduldige Unterstützung und steten Zuspruch bei der Ausarbeitung des Manuskriptes.

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht:

- LARGE SCALE ISOLATION OF CD56+ DONOR LYMPHOCYTES FOR CELL THERAPY AFTER ALLOGENEIC TRANSPLANTATION.  
P. Lang, M. Schumm, M. Pfeiffer et al: Eur J Cancer 35;5:S15 (1999), Abstract
- IMMUNOTHERAPEUTICAL STRATEGIES AFTER TRANS-PLANTATION OF ALLOGENEIC; PURIFIED CD34+ STEM CELLS IN LEUKEMIAS: POTENTIAL ROLE OF HLA-CLASS I EXPRESSION.  
Lang, P., Gottschling, S. Pfeiffer, M. et al: Cytotherapy 2000, Supplement, Abstract.
- NK-CELL MEDIATED ANTI-LEUKEMIC ACTIVITY AFTER TRANSPLANTATION WITH HIGHLY PURIFIED CD34+ STEM CELLS. P. Lang, M. Schumm, M. Pfeiffer et al: Poster bei der EBMT working party Istanbul 5/2000
- ALL BLASTS FROM PEDIATRIC PATIENTS SHOW A STRONG DIFFERENCE IN INDIVIDUAL VARIABILITY OF HLA CLASS I EXPRESSION AND SUSCEPTIBILITY AGAINST NK CELL LYSIS IN CHILDREN WITH ACUTE LYMPHATIC LEUKEMIA  
M. Pfeiffer, R. Handgretinger, S. Gottschling et al: Klinische Pädiatrie 2000, 212, S. 243, Abstract
- IMMUNOLOGICAL ASPECTS OF HAPLOIDENTICAL STEM CELL TRANSPLANTATION IN CHILDREN  
Handgretinger R, Lang P, Schumm M, Pfeiffer M et al: Ann N Y Acad Sci 2001 Jun;938:340-57
- CLINICAL SCALE ISOLATION OF T CELL DEPLETED CD56+ DONOR LYMPHOCYTES IN CHILDREN  
Lang P, Pfeiffer M, Handgretinger R et al: Bone Marrow Transplant. 2002 Mar;29(6):497-502

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name	Matthias Manuel Pfeiffer
Geburtsdatum	30.05.1975
Geburtsort	Stuttgart
Eltern	Sigrid Pfeiffer und Martin Pfeiffer

### Ausbildung:

1982-1986	Grundschule in Zell unter Aichelberg
1986-1990	Freihof-Gymnasium Göppingen
1990-1995	Evangelisches Seminar Maulbronn/Blaubeuren
1995	Abitur
1995-1996	Zivildienst als Pflegehelfer an der Chirurgischen Universitätsklinik Tübingen
1996 -2003	Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls- Universität Tübingen
2000-2002	Wissenschaftliche Hilfskraft an der Universitätskinderklinik Tübingen im Sonderforschungsbereich 510
2000-2003	15.05.2003 Drittes Staatsexamen
seit August 2003	AIP an der Universitätsklinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin Tübingen

