

**Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin**

**(Department) Tübingen**

**Abteilung I**

**(Schwerpunkte: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie/Onkologie)**

**Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger**

**Immuntherapie der kindlichen ALL:  
Einfluss eines bispezifischen CD19\* $\text{NKp46}$ -Antikörpers  
auf die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen gegenüber  
CD19<sup>+</sup> ALL-Blasten pädiatrischer Patienten**

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

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

**vorgelegt von**

**Markus Bolzhauser**

**aus Bietigheim-Bissingen**

**2010**

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. P. Lang

2. Berichterstatter:

Professor Dr. H.-G. Rammensee



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>4</b>
1.1	AKUTE LYMPHATISCHE LEUKÄMIEN IM KINDESALTER .....	4
1.2	MINIMALE RESTKRANKHEIT – MINIMAL RESIDUAL DISEASE .....	7
1.3	KONZEPT DER STAMMZELLTRANSPLANTATION .....	8
1.4	NK-ZELLEN.....	10
1.4.1	<i>Allgemeiner Hintergrund .....</i>	10
1.4.2	<i>Mechanismen der NK-vermittelten Zytolyse .....</i>	13
1.4.3	<i>ADCC (Antibody dependant cell – cytotoxicity).....</i>	15
1.4.4	<i>Inhibitorische NK – Rezeptoren .....</i>	15
1.4.5	<i>Aktivierende Rezeptoren.....</i>	18
1.4.6	<i>Adhäsionsmoleküle.....</i>	21
1.4.7	<i>NK-Zellen bei Stammzelltransplantation .....</i>	22
1.5	ANTIKÖRPER UND IMMUNTHERAPIE .....	23
1.6	FRAGESTELLUNG.....	24
<b>2</b>	<b>MATERIAL.....</b>	<b>26</b>
2.1	ALLGEMEINE MATERIALIEN .....	26
2.1.1	<i>technische Geräte, Glas und Plastikmaterialien .....</i>	26
2.1.2	<i>Stammlösungen/Kulturmedien.....</i>	27
2.2	MATERIAL FÜR DIE ISOLIERUNG DER MONONUKLEÄREN ZELLEN (PMNCs) .	28
2.3	MATERIAL FÜR DIE ZELLANREICHERUNG .....	28
2.4	MATERIAL FÜR ZELLZÄHLUNG UND MIKROSKOPIE .....	29
2.5	MATERIAL FÜR DEN ZYTOTOXIZITÄTSTEST .....	29
2.6	MATERIAL FÜR DIE DURCHFLUSSZYTOMETRIE .....	30
<b>3</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>32</b>
3.1	P815 ZELLKULTUR .....	32
3.2	GEWINNUNG UND ISOLIERUNG PERIPHERER MONONUKLEÄRER ZELLEN MIT FICOLL-HYPAQUE .....	32
3.2.1	<i>Hintergrundinformation .....</i>	32

3.2.2	<i>Durchführung</i> .....	33
3.3	ZELLANREICHERUNG MIT DEM MACS – SYSTEM .....	33
3.3.1	<i>Hintergrundinformationen</i> .....	33
3.3.2	<i>Durchführung</i> .....	35
3.4	ZYTOTOXIZITÄTSTEST .....	36
3.4.1	<i>Hintergrundinformationen</i> .....	36
3.4.2	<i>Durchführung</i> .....	38
3.5	DURCHFLUSSZYTOMETRIE .....	41
3.5.1	<i>Hintergrundinformationen</i> .....	41
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>46</b>
4.1	ANREICHERUNG DER NK-ZELLEN .....	46
4.1.1	<i>Anreicherung der CD56+ Zellen mit dem MACS System</i> .....	46
4.2	BINDUNG DER VERSCHIEDENEN NKP-ANTIKÖRPER AN P815 .....	48
4.3	EXPRESSION DER NCRs AUF NK-ZELLEN IN ABHÄNGIGKEIT VON IHREM STIMULATIONSGRAD .....	49
4.4	EINFLUSS VERSCHIEDENER ANTIKÖRPER AUF DIE ZYTOTOXISCHE AKTI- VITÄT VON NK-ZELLEN GEGENÜBER DER P815 ZELLINIE .....	51
4.4.1	<i>Auswirkungen der NKp-Rezeptor Antikörper NKp30, 44 und 46 auf die Zytotoxizität der NK-Zellen</i> .....	52
4.4.2	<i>Auswirkungen von CD16 und NKG2D Antikörpern auf die NK- Zell Zytotoxizität, im Vergleich zu NKp46</i> .....	56
4.4.3	<i>Auswirkungen des kombinierten Einsatzes von NKp46 mit ver- schiedenen weiteren Antikörpern</i> .....	59
4.4.4	<i>Auswirkungen von CD158a, CD158b und CD158e-Antikörpern auf die NK-Zytotoxizität gegen P815</i> .....	63
4.4.5	<i>Auswirkungen des bispezifischen CD19*NKp46-Antikörpers auf die NK-Zell vermittelte Lyse B-Zell leukämischer Blasten im Vergleich zu einem chimären CD19-Antikörper</i> .....	67
4.4.6	<i>Effekt des bispezifischen CD19*NKp46 Antikörpers auf die Zytotoxizität von NK-Zellen transplantiert Spender gegen B- Zell leukämische Blasten</i> .....	72

---

<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>76</b>
5.1	METHODENKRITIK .....	77
5.1.1	<i>Zellanreicherung mit MACS und Dynabeads.....</i>	<i>77</i>
5.1.2	<i>Durchflusszytometrie .....</i>	<i>78</i>
5.1.3	<i>Zytotoxizitätstest .....</i>	<i>78</i>
5.2	ANREICHERUNG DER NK-ZELLEN.....	79
5.3	EINFLUSS VON GEGEN NKP46, NKP44 UND NKP30 GERICHTETEN MONOKLONALEN ANTIKÖRPERN AUF DIE NK-ZYTOTOXIZITÄT .....	80
5.4	EINFLUSS EINES BISPEZIFISCHEN NKP46*CD19 ANTIKÖRPERS AUF DIE ZYTOTOXIZITÄT VON NK-ZELLEN .....	83
5.5	EINFLUSS VON CD158A, CD158B UND CD158E ANTIKÖRPER AUF DIE ZYTOTOXIZITÄT VON NK-ZELLEN .....	90
5.6	SCHLUSSFOLGERUNGEN FÜR DIE KLINISCHE ANWENDUNG .....	92
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>95</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>97</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Akute lymphatische Leukämien im Kindesalter

Bis heute stellen Malignome bei Kindern unter 15 Jahren die zweithäufigste Todesursache dar. In nahezu ein Drittel der Fälle handelt es sich bei diesen malignen Erkrankungen um Leukämien, wobei ca. 80% davon akute lymphatische Leukämien sind. Die ALL ist damit die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter. Etwa 85% lassen sich dabei der B-lymphozytären Reihe, 15% der prognostisch ungünstigeren T-lymphozytären Reihe zuordnen.

Noch vor 30 Jahren führte die ALL bei einem Großteil der Erkrankten innerhalb weniger Wochen zum Tode. Remissionen wurden meist gar nicht erreicht, und wenn doch, so verstarben die Patienten nach relativ kurzer Zeit am fast immer auftretenden ZNS Rezidiv. Erst durch Fortschritte in der Entwicklung neuer Therapiekonzepte, wie den „Meilensteinen“ der intensivierten Chemotherapie und präventiven ZNS Bestrahlung, konnten erstmals viele Kinder langfristig geheilt werden. Weitere intensive Forschung hat seitdem dazu geführt, dass einer immer größeren Zahl von Patienten auch auf lange Zeit geholfen werden kann. Um optimale Therapieergebnisse zu erzielen, werden heutzutage in Deutschland nahezu alle Patienten im Rahmen multizentrischer, kooperativer Studiengruppen wie etwa der BFM (Berlin-Frankfurt-Münster) behandelt. Die Behandlung besteht dabei aus mehreren Phasen: Induktions-, Konsolidierungs-, Reinduktions- und Dauertherapiephase. Erstes Ziel der Induktionsphase, einer 5-wöchigen Polychemotherapie (Prednison, Vincristin, Daunorubicin, L-Asparaginase), ist das Erreichen einer kompletten Remission (definitionsgemäß eine Reduktion des Blastenanteils im Knochenmark auf unter 5%, also keinesfalls eine Zerstörung aller maligner Zellen), was mit diesem Schema derzeit in 98% der Fälle gelingt. Anschließend gilt es mit den weiteren Therapiephasen (Dauertherapiephase bis zu 2 Jahre) alle restlichen Blasten

vollends zu zerstören, diese Remission dann zu stabilisieren und vor allem langfristig aufrecht zu erhalten. Essentieller Bestandteil der Therapie ist dabei in allen Phasen eine präventive Behandlung des ZNS, da nur hierdurch später eventuell auftretende ZNS Rezidive verhindert werden können. Dabei findet die klassische ZNS Bestrahlung aufgrund der Langzeitnebenwirkungen nur noch in besonderen, mit einer hohen Rezidivwahrscheinlichkeit einhergehenden Fällen Anwendung. Ansonsten lassen sich mit systemisch sowie intrathekal verabreichtem Methotrexat gute Ergebnisse bei deutlich geringeren Nebenwirkungen erzielen.

Für eine Reihe von Patienten, die von vorneherein ein hohes Rückfallrisiko besitzen, die schlecht auf die konventionelle Therapie ansprechen oder die bereits ein Rezidiv erlitten haben, bietet als zusätzliche Therapieoption eine allogene Stammzelltransplantation die besten Chancen auf eine Heilung. Je nach Vorhandensein eines Spenders wird dann zumeist eine „matched family donor“-SZT oder eine „matched unrelated donor“-SZT angestrebt. Bei sehr schlechter Prognose, oder im häufigen Fall des Fehlens eines passenden Spenders, kommt mittlerweile jedoch auch immer häufiger eine haploidente SZT zum Einsatz. Eine Zusammenfassung über die Indikationen zur SZT bei kindlicher ALL in erster kompletter Remission (CR1) laut derzeit aktuellem BFM Protokoll liefert Tabelle 1.1. Befindet sich der Patient bereits in CR2 empfiehlt sich eine Transplantation schon bei frühen isolierten Knochenmarksrezidiven, handelt es sich um eine CR3 sollten alle Patienten transplantiert werden (nach Klingebiel et al.) [1].

**Tab. 1.1: Indikationen für die Stammzelltransplantation in der ALL-BFM 2000 Studie. NRd33 = Non response an Tag 33; PPR = Prednisone poor response; PGR = Prednisone good response**

<b>Indikationen</b>		<b>MFD/MUD</b>	<b>MMFD</b>
MRD-Niveau	An Tag 1 von Protokoll M = $10^{-3}$	+	



	An Tag 1 Protokoll M > Tag 33 Protokoll I <b>und</b> Tag 1 Protokoll M $\geq 10^{-3}$	+	+
	An Tag 1 Protokoll M > $10^{-3}$	+	+
NRd33		+	+
PPR	+ T-ALL	+	
	+ pro-B-ALL	+	
	+ WBC $\geq 100.000$	+	
	+ t(9;22)	+	+
	+ t(4;11)	+	+
PGR	+ t(9;22)	+	
	+ t(4;11)	+	
HR	+ M3-Mark an Tag 15	+	

Bei einer ALL in erster Remission besteht also nur in seltenen Fällen eine Indikation zur allogenen SZT, da mit den derzeitigen Therapieprotokollen ca. 75% der erkrankten Kinder nach einmaliger Behandlung langfristig geheilt werden können. Unbefriedigender sind die Ergebnisse für Kinder die ein Rezidiv der ALL erleiden. Von ihnen kann nur ca. ein Drittel durch die derzeitigen Rezidiv-Therapieschemata langfristig geheilt werden. Wenn man bedenkt, dass die Inzidenz allein dieser Rezidive noch immer größer ist als die Inzidenz der meisten anderen kindlichen Malignome, wie z.B. Nephroblastom oder Rhabdomyosarkom, wird deutlich wie wichtig eine Verbesserung der Rezidivtherapie ist. Um dies zu erreichen, wird versucht mehr und mehr dieser Rezidivpatienten einer allogenen SZT zuzuführen.

## 1.2 Minimale Restkrankheit – minimal residual disease

Die Therapie der ALL ist also nicht einfach ein starres Therapieregime, sondern richtet sich vielmehr spezifisch nach dem jeweiligen Risiko bzw. dem jeweiligen Subtyp der Erkrankung. Die Zuordnung zu den verschiedenen Risikogruppen erfolgt dabei anhand von immunologischen, morphologischen sowie molekulargenetischen Faktoren, jedoch sind auch Klinik und entsprechendes Ansprechen auf die Induktionstherapie wichtige Prognosekriterien.

Als einen besonderen Risikofaktor hat sich in den letzten Jahren darüber hinaus die so genannte Minimale Resterkrankung (MRD = minimal residual disease) herausgestellt. Als MRD bezeichnet man dabei den Anteil der Leukämiezellen im Blut nach Therapie. Eine MRD von  $10^{-5}$  entspricht dann also einer Leukämiezelle unter 100000 gesunden Blutzellen. Diese genauen Messungen bedienen sich der PCR, mit der klonale Veränderungen im Leukämie-Zellklon nachgewiesen werden können. Eine zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführte MRD-Untersuchung kann somit direkte Rückschlüsse auf den Grad des Therapieansprechens sowie auf die weitere Prognose des Verlaufs nach Therapie liefern, weshalb die MRD mittlerweile als der wichtigste Risikofaktor bei der Behandlung akuter Leukämien angesehen wird. Verschiedene Studien haben beispielsweise gezeigt, dass das Ausmaß der MRD am Ende der Induktionsphase deutlich mit dem Risiko des Auftretens eines Rezidivs korreliert [2], [3]. Andere Studien haben weiter ergeben, dass wenn es nicht gelingt die MRD unter einen Level von  $10^{-4}$  zu senken, ein Rezidiv die wahrscheinliche Folge ist, während Level unter  $10^{-4}$  praktisch nie zu einem Rezidiv führen [4], [5]. Auch bezüglich des Verlaufs einer Stammzelltransplantation lassen sich durch die MRD-Diagnostik wichtige prognostische Aussagen treffen. In einer Studie wurden 41 Patienten vor allogener SZT mittels PCR auf eine MRD hin untersucht und in drei Gruppen als „high-level“-positiv, „low-level“-positiv oder negativ eingeteilt. Das 5-jährige ereignisfreie Überleben betrug in den drei Gruppen 23%, 48% und 78% [6]. In einer neueren Studie wurden 25 Patienten beobachtet, von diesen erlitten 7 Patienten ein Rezidiv, wobei 6 von ihnen vor Transplantation eine MRD

aufwiesen, während bei den 17 MRD negativen Patienten nur 1 Rezidiv auftrat ( $p < 0.0001$ ) [7]. Doch nicht nur eine nachweisbare MRD vor Transplantation, auch eine neu auftretende MRD nach Transplantation geht mit einem sehr hohen Rezidivrisiko einher [8]. In allen Studien besteht ein starker Zusammenhang zwischen nachweisbarer MRD und schlechterem Outcome/Relaps der Patienten nach Transplantation. Da die Möglichkeiten eine nachgewiesene MRD nach Transplantation erfolgreich zu behandeln begrenzt sind, werden weitere Therapiealternativen benötigt. Neben intensivierten Konditionierungsschemata werden dabei vor allem auch neuere immuntherapeutische Strategien in Betracht gezogen.

### 1.3 Konzept der Stammzelltransplantation

Erste Versuche einer Knochenmarkverpflanzung beim Menschen wurden erstmals Mitte der 50er Jahre durchgeführt, allerdings endeten anfangs alle diese Versuche fast ausnahmslos mit dem Tod des Patienten. Selbst Ende der 70er Jahre hatten solche Transplantationen noch immer zumeist letale Komplikationen zur Folge, doch das zunehmende Auftreten von mit Hilfe der Transplantation langfristig geheilten Leukämiepatienten deutete zunehmend das große Potential dieses Verfahrens an.

Intensive Forschungen sowohl in medizinischer als auch in technischer Hinsicht haben seitdem dafür gesorgt, dass die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen heute ein Standardverfahren in der Therapie verschiedener maligner sowie nicht-maligner hämatologisch/onkologischer Erkrankungen ist. Darüber hinaus stellt eine allogene Transplantation für eine Reihe dieser Erkrankungen die einzig wirklich kurative Therapieoption dar. Dabei macht man sich zwei verschiedene Effekte der SZT zunutze: Zum einen ermöglicht die hämatopoetische SZT durch eine Regeneration der körpereigenen Hämatopoese erst die Durchführung einer eventuell notwendigen hochdosierten (und damit myeloablativen) Chemotherapie, zum anderen bewirkt das allogene

Transplantat selbst einen so genannten „Graft versus Leukämie“-Effekt, d.h. aus dem Transplantat stammende, immunkompetente Zellen üben selbst eine antineoplastische Wirkung aus.

Jedoch war die Existenz eines HLA Gewebsantigen passenden Stammzell-Spenders („matched donor“) in der Vergangenheit eine unabdingbare Voraussetzung zur Therapie, und viele Patienten konnten in Ermangelung eines solchen keiner Therapie zugeführt werden. Erst in den letzten Jahren ist man deshalb dazu übergegangen auch auf haploidente Familienspender zurückzugreifen. Ein solches HLA Transplantations-mismatch war allerdings mit einer sehr hohen Mortalität verknüpft, welche vor allem im Auftreten schwerer GvH-Reaktionen, sowie aufgrund von Komplikationen der notwendigen Immunsuppression (Infektionen, Rezidiv) begründet war.

Es hat sich gezeigt, dass die Spender T-Lymphozyten hauptverantwortlich für die Auslösung einer GvH sind, und eine vor der Spende durchgeführte T-Zell Depletion des Transplantates den einzigen Weg, zuverlässig eine GvH zu verhindern, darstellt [9], [10]. Dadurch kommt es selbst bei haploidenten Transplantationen ohne GvH Prophylaxe zu keiner signifikanten GvH Reaktion [11]. Allerdings bringt eine solche T-Zell Depletion auch einige Nachteile mit sich, schlechteres Engraftment [12], erhöhtes Infektionsrisiko aufgrund der verzögerten Immunrekonstruktion [13], das Auftreten von EBV assoziierten lymphoproliferativen Syndromen und ein erhöhtes Rezidivrisiko bestimmter Malignome [14] sind die Folge. Ein optimales Setting wäre daher eine Transplantation, die einerseits die Vorteile der T-Zell Depletion nutzt, dies jedoch unter Aussparung der damit einhergehenden Nachteile.

Zu diesem Zweck werden heutzutage an der Uni-Kinderklinik Tübingen mittels CliniMACS-System [15], T- und B-Zell depletierte Zellpräparate eingesetzt. Im Vergleich zu direkt hochangereicherten CD34<sup>+</sup> Stammzellpräparaten enthalten diese Transplantate eine Vielzahl an CD34<sup>-</sup> Zellen, wie etwa Engraftment verbessernde NK-Zellen, Monozyten und dendritische Zellen [16]. Zusätzlich

wird der T-Zell-Antikörper OKT-3 als Abstoßungsprophylaxe eingesetzt. Eine anschließende Immunsuppression ist aufgrund der direkten T-Zell Depletion nicht nötig. Somit sorgt die Gabe des depletierten Transplantates, und dem damit einhergehenden Verzicht auf Immunsuppression, zu einer schnelleren Immunrekonstitution, während durch den Einsatz des OKT-3 eine mögliche Abstoßungsreaktion unterdrückt wird.

Trotz allem ist ein Wiederauftreten der malignen Grunderkrankung weiterhin die größte und meist gefürchtete Therapiekomplikation und stellt bis heute die Haupttodesursache nach Transplantation dar. Diese Rezidive gehen oft mit einer sehr schlechten Prognose einher und sind im Allgemeinen nur schlecht mit einer konventionellen Therapie behandelbar. Durch frühzeitige Gabe sogenannter Spenderlymphozyten (DLI) kann bei einem Teil dieser Patienten ein drohendes Rezidiv, das molekularbiologisch erkannt wird, abgewandt werden. Allerdings hat sich gezeigt, dass durch solche T-Zell DLI's zwar bei der CML regelmäßig Remissionen erzielt werden können, bei der ALL jedoch ein sehr viel geringeres Ansprechen auf die T-Zellen besteht [17],[18]. Da die Gabe von T-Zellen als DLI's bei diesen Patienten zudem mit hoher Wahrscheinlichkeit eine GvH-Disease auslösen würde, stellen andere Lymphozytenklassen, wie z.B. NK-Zellen, eine bedeutende Alternative als Einsatz zur Verbesserung der Prognose nach haploidenter SZT, insbesondere bei ALL, dar.

## **1.4 NK-Zellen**

### **1.4.1 Allgemeiner Hintergrund**

Der Begriff der „natürlichen Killerzelle“ tauchte erstmals in medizinischen Arbeiten Mitte der 70er Jahre auf als Forschungsgruppen neben den bis dahin bekannten B- und T- Lymphozyten eine neue, eigenständige Lymphozytenpopulation erkannten: die NK-Zellen [19], [20].

Mikroskopisch betrachtet imponieren diese durch viele im Zytoplasma liegende azurophile Granula, weshalb sie auch unter den Begriff der „Large Granular Lymphocytes“ (LGL) fallen. NK-Zellen machen durchschnittlich 5-15% der gesamten im peripheren Blut zirkulierenden Lymphozyten aus [21]. Die Zahl der NK-Zellen unterliegt dabei einer ausgeprägten Tagesrhythmik [22] und wird durch weitere Faktoren wie Stress, hormonelle Einflüsse oder Entzündungsreaktionen zusätzlich beeinflusst. Außer im peripheren Blut finden sich NK-Zellen auch in sehr unterschiedlicher Zahl in nahezu jedem soliden Gewebe des Körpers, wie z.B. in Leber (50% der residenten Lymphozyten sind NK-Zellen) [23], Lunge, Milz [24] oder Lymphknoten. Phänotypisch sind NK-Zellen als CD 3<sup>-</sup>, CD 16<sup>+</sup> und CD 56<sup>+</sup> Zellen definiert. Mit Hilfe des Durchflusszytometers lassen sie sich des Weiteren in verschiedene Subpopulationen einteilen, die sich im Hinblick auf NK-Rezeptordichte, Zytotoxizität oder Zytokinproduktion z.T. erheblich voneinander unterscheiden [25], [26]. Vergleicht man NK- mit T-Zellen so fällt auf, dass beide eine Vielzahl von gemeinsamen Oberflächenantigenen exprimieren [27], [28]. Dies ist durchaus verständlich, gehen doch beide Zellarten aus einer gemeinsamen prätymischen Vorläuferzelle hervor [29], [30]. Auch hinsichtlich ihrer Funktion besitzen NK und T-Zellen einige Gemeinsamkeiten, so sind beide in der Lage bestimmte Zellen wie Tumorzellen, Fremdzellen oder viral/bakteriell infizierte Zellen zu zerstören. Dies geschieht bei NK- und T-Zellen im Grunde über dieselben zytotoxischen Wirkmechanismen.

Was ist nun der entscheidende Unterschied zwischen den beiden Zellen? Wie man weiß unterliegen T-Zellen einer strengen MHC-Restriktion, sie können entsprechende Zellen also nur dann attackieren, wenn deren Antigene ihnen mittels MHC-Molekülen präsentiert werden. Folglich können pathologisch veränderte Zellen, denen es gelingt die Präsentation von MHC(I)-Molekülen auf ihrer Oberfläche zu unterdrücken, einer Zerstörung durch T-Lymphozyten entgehen. Anders die NK-Zellen, Sie unterliegen keiner solchen Restriktion und benötigen daher keine Präsentation von an MHC gekoppeltem Fremdantigen um aktiviert zu werden. Dadurch können sie ihre Zielzellen spontan und, im Gegensatz zu den anderen Lymphozyten, ohne vorherige Sensibilisierung

angreifen. Zur Identifizierung ihrer potentiellen Ziele bedienen sich die NK-Zellen dabei einer speziellen Methode. Man fand heraus, dass Zellen, die keine autologen MHC(I)-Komplexe aufweisen, von NK-Zellen angegriffen und zerstört werden. Diese Entdeckung führte zur Hypothese des sogenannten „missing self“ [31], [32]. Demnach besteht die Aufgabe der NK-Zellen darin, Zellen anhand ihres MHC(I) als körpereigen/körperfremd zu erkennen und diejenigen, die ihr MHC(I) z.B. im Rahmen von Infektion oder Transformation verändert oder verloren haben, zu zerstören. Dazu besitzen NK-Zellen spezielle Oberflächenrezeptoren die spezifisch MHC(I)-Moleküle erkennen und bei korrekter MHC(I)-Expression die NK-Aktivität unterdrücken [33]. Dieses Erkennungssystem wird durch den Einfluss sogenannter Signalpeptide innerhalb des MHC-Komplexes noch empfindlicher. Nur wenn korrekte Eigenpeptide in den MHC(I) integriert werden, wird die Zelle von den NK-Rezeptoren sicher als autolog erkannt, während ein an sich korrektes MHC-Molekül mit eingebauten Fremdpeptiden (virale, tumoröse) zu keiner Unterdrückung der NK Aktivität führt [34]. In den letzten Jahren wurden neben diesen inhibitorischen Rezeptoren auch eine Reihe weiterer, aktivierender Rezeptoren entdeckt, was zu der heute allgemein akzeptierten Theorie geführt hat, dass die NK-Zell Aktivität durch das Zusammenspiel sowohl aktivierend als auch inhibitorisch wirkender Rezeptoren reguliert wird [35]. Dabei überwiegt unter physiologischen Bedingungen die inhibitorische Komponente, um eine sonst eventuell auftretende autoimmune Aktivität zu unterdrücken.

Neben dieser spontanen Zytotoxizität sind die NK-Zellen des Weiteren zur Antikörper-abhängigen Zytotoxizität (ADCC) befähigt. Sie sind damit die einzigen Lymphozyten, die beide Arten der Zytotoxizität ausüben können. Über diese Fähigkeit, sowie durch ihre Interaktionen mit dendritischen Zellen (s.u.), sind die NK-Zellen also auch in die adaptive Immunantwort mit eingebunden.

Aufgrund dieser speziellen Eigenschaften lassen sich für NK-Zellen folgende wichtige Funktionen im Immunsystem formulieren:

- Durch ihre frühzeitige Aktivität gegenüber infizierten Zellen spielen sie eine wichtige Rolle in der frühen Abwehrphase viraler, aber auch bakterieller Infektionen, solange die T-Lymphozyten für eine effektive Immunreaktion noch nicht hinreichend adaptiert sind.
- Sie sorgen für eine kontinuierliche Überwachung des Körpers auf aberante Zellen, die ihre MHC(I) Expression aufgeben oder verändern. Bestätigt wird dies durch die Tatsache, dass eine geringe oder gar fehlende NK-Aktivität in Studien sowohl beim Tier als auch beim Menschen mit gehäuftem Auftreten bzw. schnellerem Wachstum von Tumoren assoziiert war [36].
- Sie nehmen eine wichtige Stellung als Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunantwort ein. Neben der Produktion einer Vielzahl von B- und T-Zell regulierender Zytokine, geschieht dies vor allem über wechselseitige Interaktionen mit dendritischen Zellen [37], [38].

#### 1.4.2 Mechanismen der NK-vermittelten Zytolyse

Die zytotoxische Kapazität der NK-Zellen basiert, ebenso wie die der CTLs, vor allem auf 2 Mechanismen. Einerseits auf der Ausschüttung der zytolytischen Mediatoren Perforin und Granzym [39], andererseits auf der Bindung mittels Rezeptoren an entsprechende Membranliganden (FasL) [40]. Nach erfolgreicher zytolytischer Attacke gehen die Zielzellen dann durch Nekrose oder Apoptose zugrunde.

##### 1.4.2.1 Perforin – Granzym System

In Studien konnte gezeigt werden, dass dieses System den Großteil der NK-Zell Zytotoxizität ausmacht [41]. Nach Bindung an die Targetzelle kommt es an der Zell-Kontaktstelle zunächst zur Konzentration zytoplasmatischer Granula sowie zu starkem Calcium Einstrom. Daraufhin fusionieren die Granula mit der Zellmembran und setzen die ihnen innewohnenden Zytotoxine, v.a. Perforin frei. Dieses Protein formt in Anwesenheit von Calcium zylinderförmige Polymere und



bildet damit Poren in der Membran der Zielzelle. Darüber kommt es dann zu Ladungs- und H<sub>2</sub>O-Ausgleich, woraus die Zerstörung der Targetzelle resultiert. Optimiert wird dieses System durch weitere granuläre Toxine, den Granzymen. Sie dringen über die vom Perforin gebildeten Poren in die Zielzelle ein und induzieren dort einen kontrollierten Zelltod (Apoptose).

#### 1.4.2.2 TNF-Familien Liganden

NK-Zellen exprimieren darüber hinaus mindestens 3 TNF-Familien Liganden: FasL, TNF, TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). Diese Liganden sind alle dazu in der Lage bei geeigneten Zielzellen Apoptose zu induzieren [42]. Unter diesen Liganden nimmt der Fas/FasL Mechanismus die bedeutendste Stellung ein. Targetzellen, die Fas (APO-1) auf ihrer Oberfläche aufweisen, werden dabei über den speziellen Fas Liganden (FasL), der von NK-Zellen nach Aktivierung des zytotoxischen Prozesses exprimiert wird, gebunden. Dieser induziert dann über eine Reihe von Caspasen in der Zielzelle die Apoptose [43]. Erstaunlicherweise können NK-Zellen sogar teilweise eine Fas Expression in Fas-negativen Tumoren bewirken, um sie dann Fas abhängig lysieren zu können. Auch zytotoxische Zellen selbst, wie NK-Zellen oder CTLs, werden nach erfolgter Abwehr über diesen Fas/FasL Mechanismus eliminiert, was eine überschießende Immunantwort verhindert. Auch für TRAIL und TNF konnte eine direkte zytolytische Funktion bei NK-Zellen nachgewiesen werden [44], [45].

#### 1.4.2.3 Zytokinproduktion

Neben diesen zytotoxischen Hauptmechanismen setzen NK-Zellen eine Vielzahl von Zytokinen und Chemokinen frei, die ebenfalls eine bedeutende Rolle in der weiteren Immunantwort einnehmen. So ist von NK-Zellen abgegebenes Interferon- $\gamma$  ein wichtiger Faktor in Abwehr und Unterdrückung sowohl von verschiedenen viralen oder bakteriellen Infektionen [46] als auch

von Tumorwachstum [47]. Abgegebenes TNF- $\alpha$  kann direkt die Apoptose geeigneter Zellen induzieren. Durch Zytokine nimmt die NK-Zelle des Weiteren Einfluss auf andere Abwehrzellen wie T-Zellen, Granulozyten und Monozyten und optimiert so die weitere Immunantwort. Natürlich werden auch NK-Zellen selbst stark von Zytokinen wie Interleukinen, Interferonen oder TGF- $\beta$  beeinflusst [48], [49], [50].

### 1.4.3 ADCC (Antibody dependant cellular – cytotoxicity)

Die meisten NK-Zellen exprimieren CD16-Moleküle (Fc $\gamma$ RIII) auf ihrer Oberfläche. Dieser niedrig affine IgG-Rezeptor befähigt NK-Zellen zusätzlich zur ADCC. Dabei bindet CD16 an den Fc-Teil geeigneter Antikörper und ermöglicht es den NK-Zellen so eine durch Antikörper opsonierte Zelle zu erkennen und zu lysieren, selbst wenn diese normalerweise durch die Expression korrekter MHC(I)-Moleküle vor der spontanen, natürlichen Zytotoxizität der NK-Zelle geschützt wäre. Obwohl ADCC und natürliche Zytotoxizität in dieselben terminalen Effektor-Mechanismen münden, kann die Effizienz der ADCC die natürliche Zytotoxizität um ein Vielfaches übertreffen [51], [52].

### 1.4.4 Inhibitorische NK – Rezeptoren

Wie bereits erwähnt, werden NK-Zellen von einer Vielzahl aktivierender sowie inhibitorischer Membranrezeptoren reguliert, wobei als spezifische Liganden für die inhibitorischen Rezeptoren die MHC(I)-Moleküle identifiziert werden konnten. Mit ihnen können NK-Zellen die Integrität der einzelnen Zellen kontrollieren und eine Beschädigung von normalem autologem Gewebe wird verhindert. Humane NK-Zellen besitzen dabei zwei verschiedene Arten von Rezeptormolekülen für die spezifische HLA-Erkennung [53], [54]: Zum einen die zu der Immunglobulin-Superfamily gehörenden KIRs („Killing immunoglobulin-

like receptors“), zum anderen die zur C-type lectin superfamily gehörenden CD94/NKG2 Heterodimere.

#### 1.4.4.1 KIRs – Killing immunoglobulin like receptors

Allen KIRs gemein ist der Besitz von jeweils 2 oder 3 extrazellulären Domänen (2D/3D) die eine Immunglobulin-ähnliche Struktur aufweisen, sowie einer unterschiedlich langen zytoplasmatischen Kette (long/short). Sie können mit ihren Ig-ähnlichen Domänen spezifisch Gruppen des HLA-A, -B oder -C Allotyps erkennen und generieren je nach Rezeptortyp vor allem inhibitorische aber auch teilweise aktivierende Signale. Da sowohl die inhibitorischen, als auch die wesentlich selteneren aktivierend wirkenden KIRs dieselben extrazellulären Domänen aufweisen, muss die Art des abgegebenen Signals allein von der Sequenz des intrazellulären Teils der KIRs abhängen [55]. Dabei generieren KIRs mit einer langen zytoplasmatischen Kette ein inhibitorisches, KIRs mit kurzer Kette ein aktivierendes Signal. Nach Bindung von MHC an die inhibitorischen KIR-Rezeptoren erfolgt eine Phosphorylierung sogenannter, in ihren Zytoplasmaketten liegenden ITIMs (Immunoreceptor-tyrosine-based inhibitory motifs), die es ihnen ermöglicht mit den Protein Tyrosin Phosphatasen SHP1 und SHP2 in Kontakt zu treten. Über SHP1, das eine wichtige Funktion für die Weiterleitung negativer Signale im Zytoplasma besitzt, erfolgt dann die Vermittlung eines inhibitorischen Signals [56], [57]. Im Gegensatz dazu besitzen die aktivierenden KIR Rezeptoren in ihren kürzeren Zytoplasmaketten sogenannte ITAMs (activating motifs), welche einen aktivierenden Signalweg triggern [58]. Allgemein besitzen inhibitorische KIRs eine höhere Affinität für MHC(I)- Liganden als Aktivierende [56], [59], weshalb eine gemeinsame Rezeptorbindung im Regelfall zu einem negativen Signal und damit zu keiner Aktivierung des NK-Zell Programms führt.

Erstaunlicherweise wird die Expression der KIR-Gene dabei nicht durch den eigenen HLA Haplo-Typ vorgegeben. Die Anzahl der KIR-Gene variiert dabei zwischen einzelnen Individuen und reicht von mindestens 6 bis hin zu allen 16 existierenden Genen. Trotz aller Variationsmöglichkeiten lassen sich die

Haplotypen in zwei Hauptgruppen einteilen. Während sich die eine Gruppe durch ein mehr begrenztes und eher inhibitorisches KIR-Muster auszeichnet, besitzt die andere Gruppe zwar auch inhibitorische Gene, ist jedoch durch das Vorhandensein zusätzlicher aktivierender KIRs charakterisiert [60]. Es ist des weiteren so, dass vorhandene KIR-Gene jeweils nur von einem Teil der NK-Zellen des Individuums exprimiert werden [61], was zu mehreren NK-Zell Klonen mit unterschiedlichem KIR-Muster führt. Darüber hinaus unterscheiden sich die Individuen, was die einzelnen KIR-Gene angeht, auch noch hinsichtlich der Frequenz und der Anzahl, mit der die entsprechenden Rezeptoren von bzw. auf den NK-Zellen exprimiert werden. Unterschiedliche Allel-Variationen am Genlocus sowie Methylierungen an Promoter Regionen sind dafür maßgeblich mitverantwortlich [62], [63]. Obwohl der eigene HLA-Typ dabei sehr wahrscheinlich einen Einfluss auf die KIR-Expression bei der NK-Zell Reifung im Knochenmark hat, wurde die frühere Vermutung, jede NK-Zelle müsse zumindest einen inhibitorischen Rezeptor gegen selbst MHC besitzen, inzwischen widerlegt. Diese potentiell autoreaktiven Klone sind im Regelfall jedoch noch funktionell eher unreif und besitzen nur eine geringe Zytotoxizität, weshalb keine Autoimmunreaktion auftritt.

Dieses Muster der Rezeptorverteilung erlaubt es dem gesamten NK-Zell Pool den Verlust auch nur eines einzigen HLA-I Allels auf einer körpereigenen Zelle zu entdecken, ein Vorgang der in Tumor-Transformationen sehr häufig auftritt [64]. Die NK-Zellen sind hinsichtlich ihrer KIR-Rezeptoren also eine sehr heterogene Gruppe mit einer Vielzahl verschiedener Klone bezüglich ihrer HLA-Spezifität.

#### 1.4.4.2 C-type lectin like NK – Receptors

C-type lectin like Rezeptoren sind Heterodimere, bei denen CD94 als unveränderlicher Bestandteil mit verschiedenen Proteinen der NKG2-Familie Rezeptorkomplexe bildet. Je nach NKG2-Untereinheit generieren sie ein inhibitorisches (NKG2-A, NKG2-B) oder ein aktivierendes (NKG2-C, -E, -H) Signal. NK-Zellen tragen dabei in der Regel entweder nur die aktivierenden

oder nur die inhibitorischen Rezeptoren [65]. Diese C-type Rezeptoren können im Gegensatz zu den KIRs lediglich an HLA-E Moleküle binden, nicht an die anderen HLA-Typen [66]. Allerdings bindet das HLA-E verschiedene, in den anderen HLA Molekülen enthaltene Hauptpeptide, welche wiederum die Rezeptoraffinität des HLA-E zu CD94/NKG2A verändern können. Dies ermöglicht es dem CD94/NKG2-Rezeptor praktisch auch die Expression der anderen HLA-I Moleküle zu überwachen. Auch hier besitzen die inhibitorischen Rezeptoren (CD94/NKG2A) eine stärkere Affinität zu den Liganden als die Aktivierenden (CD94/NKG2C).

#### 1.4.5 Aktivierende Rezeptoren

Da die Inhibition von NK-Zellen die wichtigste Absicherung gegen eine Attacke auf gesundes körpereigenes Gewebe darstellt, muss ebenso eine Aktivierung der NK-Zelle über Interaktion zwischen sich und potentieller Zielzelle entstehen. Diese Rezeptoren, die für die NK-Zell Aktivierung im Prozess der natürlichen Zytotoxizität verantwortlich sind, blieben lange Zeit unentdeckt und konnten erst Ende der 90er erstmals identifiziert und molekular charakterisiert werden. Dabei zeigte sich, dass drei dieser triggernden Rezeptoren streng spezifisch von allen NK-Zellen exprimiert werden [67], was zu ihrer Bezeichnung als NCRs („natural cytotoxicity receptors“) geführt hat. Als weiterer Trigger-Rezeptor wurde der NKG2D Rezeptor identifiziert, er ist jedoch im Gegensatz zu den NCRs nicht NK-spezifisch.

Die Aktivierung von NK-Zellen erfolgt im Regelfall über ein Zusammenspiel dieser Rezeptoren, wobei NKG2D sowohl synergistisch als auch komplementär zu den NCRs wirken kann. In manchen Fällen kann die Aktivierung jedoch auch nur über NCRs oder nur NKG2D erfolgen [53]. Darüber hinaus wurden noch eine Reihe weiterer Rezeptoren gefunden, die aber eher im Sinne von Co-Rezeptoren fungieren und ebenfalls nicht NK-spezifisch sind.

#### 1.4.5.1 NCRs (Natural cytotoxicity Receptors)

Da ihre Expression auf NK-Zellen beschränkt ist, repräsentieren die NCRs die spezifischsten Oberflächenmarker zur NK-Zell Identifikation. Die Anzahl der auf den NK-Zellen exprimierten NCRs variiert dabei sowohl von Individuum zu Individuum, als auch zwischen den einzelnen NK-Zell Klonen eines Spenders erheblich. Klone gleicher lytischer Potenz die im Zytometer als NCR-bright identifiziert werden, weisen eine deutlich stärkere lytische Aktivität als diejenigen der NCR-dull Gruppe auf [68]. Damit konnte gezeigt werden, dass die Dichte der NCR-Expression auf NK-Zellen direkt mit ihrer lytischen Aktivität korreliert und dieser Effekt allein auf der verschiedenen starken Aktivierung des lytischen NK-Potentials durch die NCRs basiert [69], [68]. Molekulargenetisch gesehen gehören die NCRs ebenfalls zur Immunoglobulin Superfamily, besitzen jedoch sowohl untereinander als auch zu anderen humanen Molekülen kaum Ähnlichkeit. Aufgebaut sind alle NCRs aus einer Ig-like transmembranären Domäne sowie einem zytoplasmatischen Anteil, welcher jedoch im Vergleich zu denen der KIR-Rezeptoren direkt keine tyrosine-based motifs trägt. Stattdessen sind ihre Zytoplasmaketten mit unterschiedlichen Adapterproteinen verbunden, die ihrerseits die für eine Signalweiterleitung nötigen ITAMs enthalten. Den NCRs gemein ist, dass bis heute ihre spezifischen zellulären Liganden nicht entdeckt werden konnten. Arbeitsergebnisse legen jedoch nahe, dass manche dieser Liganden zwar auf gesunden autologen Zellen vorkommen können, jedoch vor allem von „gestressten“, also z.B. tumorös/infektiös veränderten Zellen exprimiert werden. So konnte mittlerweile das viral-hemagglutinin Protein der Influenza als ein (viraler) Ligand für NKp46 identifiziert werden [70]. Nachfolgend eine kurze Übersicht:

→ NKp46: Wird von allen NK-Zellen, unabhängig vom Stadium ihrer Aktivierung exprimiert. Sein zytoplasmatischer Anteil ist mit FcεR1γ und CD3ζ Adapterproteinen verbunden, die ein bzw. drei ITAMs tragen [71], [72]. CD3ζ und FcεR1γ, die untereinander sowohl Heterodimere als auch

Homodimere bilden, werden von Src Tyrosin-Kinasen phosphoryliert und vermitteln ihr Signal mithilfe von Syk und ZAP70 Tyrosin-Kinasen weiter [73], [74], [75].

- NKp30: Wird von allen NK-Zellen exprimiert, ist ebenfalls assoziiert mit CD3 $\zeta$  und Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$ . Die Expressionsdichte von NKp30 steht mit der von NKp46 in Zusammenhang. Des Weiteren spielt NKp30 eine wichtige Rolle in der Interaktion von NK-Zellen mit dendritischen Zellen [76].
- NKp44: Wird nur von stimulierten NK-Zellen exprimiert. Möglicherweise einer der Gründe für die gesteigerte zytotoxische Aktivität stimulierter NK-Zellen im Vergleich zu unstimulierten, sowie der Fähigkeit zusätzliche, zuvor resistente Zellen als Targetzellen erkennen zu können [77]. Ist mit einem KARAP/DAP12 Adapterprotein assoziiert, das ein ITAM besitzt. Expressionsdichte steht ebenfalls mit den beiden anderen NCR's in Zusammenhang.

#### 1.4.5.2 NKG2D – Rezeptor

NKG2D ist ein C-type Rezeptor aus der Gruppe der NKG2 Familie. Jedoch zeigt NKG2D nur wenig Ähnlichkeit zu den anderen NKG2-Molekülen, auch bildet er mit CD94 keine Heterodimere, sondern wird als reiner Homodimer exprimiert. Er ist außer auf NK-Zellen auch auf anderen Zellen, wie z.B. den meisten CD 8<sup>+</sup> T-Zellen zu finden. Seine aktivierenden Signale werden über ein DAP10 Adapterprotein vermittelt, das kein ITAM enthält, sondern über ein sogenanntes YxxM motif an eine PI 3-Kinase bindet. Wenngleich es Hinweise auf die Existenz weiterer Liganden gibt, konnten bislang zwei Moleküle als Liganden für NKG2D auf Zielzellen entschlüsselt werden. MICA und MICB, zwei verwandte Moleküle die im menschlichen MHC kodiert liegen, sind „stress-induzierte“ Moleküle die vor allem von in maligner Veränderung befindlichem epithelialen Gewebe, wie z.B. Lunge, Brust, Ovar, usw. exprimiert werden.

#### 1.4.5.3 Co – Rezeptoren

Co-Rezeptoren können von sich allein aus keine NK-Aktivität induzieren. Sie können ihre Funktion nur in Verbindung mit gleichzeitiger Beteiligung eines aktivierenden Rezeptors ausüben und dienen vermutlich der Verstärkung von aktivierenden Signalen. Neben einer Co-Aktivierung scheinen diese Rezeptoren jedoch auch noch für andere Mechanismen der NK-Zellen eine Rolle zu spielen. Zwei dieser co-aktivierenden Rezeptoren sind 2B4 und DNAM-I. 2B4, als dessen spezifischer Ligand CD48 entdeckt werden konnte, hat sich als entscheidend für die Zytolyse EBV-infizierter Zellen herausgestellt. So ist sein Fehlen mit dem Auftreten der schweren X-linked lymphoproliferative disease (XLP) verbunden [78]. DNAM-I, als dessen spezifische Liganden Nectin2 und PVR (Poliovirus-Rezeptor) identifiziert wurden, ist vermutlich beim Durchtritt von NK-Zellen durch Epithelien von Bedeutung.

#### 1.4.5.4 CD16 - FcγRIII

Ergänzt wird das NK-Zell Rezeptor Reservoir von CD16, durch den die NK-Zellen zur ADCC befähigt werden. Er ist, im Gegensatz zu dem von Granulozyten exprimierten CD16, jedoch ein niedrig affiner Rezeptor. Werfel et al. beschreiben in einer Arbeit diesen Mechanismus der NK-Zell Aktivierung via FcγRIII [79]. Der Signalweg des Rezeptors führt, ähnlich wie bei NKp46, über eine Tyrosin-phosphorylierung von CD3ζ und FcεRIγ zur Aktivierung von Syk und Zap70, über die Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase (PI-3) und die mitogen-activated protein-kinase (MAPK) dann zur Aktivierung des lytischen Programms.

### 1.4.6 Adhäsionsmoleküle

Bei der Interaktion zwischen Lymphozyten und anderen Zellen spielen Adhäsionsmoleküle eine wichtige Rolle. Dazu verfügen NK-Zellen über eine



große Anzahl akzessorischer Oberflächenmoleküle wie ICAMs (Intercellular Adhesions Molecules), LFA1s (Lymphocyte Function Associated 1) oder VLA1s (Very Late Antigen 1). Diese zur Klasse der Integrine (LFA1), der Ig-Superfamily (ICAM's) oder der Selektine gehörenden Moleküle sind bei Zell/Zell-Kontakten, wie z.B. bei der Bindung an Targetzellen, oder bei der NK-Migration mit Eintritt in solide Gewebe notwendig. Sie können somit zu einer effektiveren Zytolyse beitragen.

#### **1.4.7 NK-Zellen bei Stammzelltransplantation**

NK-Zellen spielen eine zunehmend wichtige Rolle im Konzept der allogenen Stammzelltransplantation, vor allem im Rahmen eines haploidenten Settings. Wie eingangs bereits erwähnt, sind es vor allem zwei Hauptkomplikationen, von denen der Erfolg einer allogenen SZT abhängt: Zum einen das Rezidiv der Erkrankung, zum anderen das Auftreten einer GvHD, die durch die notwendige Immunsuppression zu Infektionen und ebenfalls zu einer erhöhten Rezidivrate führt. Dabei steht bei beiden Komplikationen die durch die T-Zellen des Transplantats vermittelte alloreaktive Reaktion im Mittelpunkt, die, wenn zu stark, eine GvHD auslösen, wenn zu schwach, überlebende Leukämiezellen nicht eradizieren und so ein Rezidiv ermöglichen kann. Die maximale Depletion der T-Zellen eines Transplantats, bei einer haploidenten Transplantation ja unabdingbare Voraussetzung, verhindert zwar das Auftreten einer GvHD, geht jedoch mit einer erhöhten Rezidiv- und Abstoßungsrate einher.

Hier haben sich NK-Zellen als eine bedeutende Alternative zu T-Zellen für eine Immuntherapie nach allogener Transplantation herausgestellt. Studien sowohl im Maus-Modell, als auch in humanen „mismatch“-SZT Versuchen haben gezeigt, dass Spender NK-Zellen bei geeignetem HLA-„mismatch“ ebenfalls einen alloreaktiven Effekt ausüben, also residuale Leukämiezellen im Sinne einer GvL-Reaktion bekämpfen [80], [81]. So weiß man, dass bei der Behandlung der AML NK-alloreaktive Transplantate leukämische Rezidive kontrollieren und das krankheitsfreie Überleben verbessern können [82]. Auch

für die kindliche ALL konnte gezeigt werden, dass eine haploidente Transplantation mit dem Potential einer NK-Zell Alloreaktivität die Rezidivrate senkt [83]. Erstaunlicherweise ergaben all diese Studien, dass die Gabe alloreaktiver NK-Zellen keine GvH-Reaktion verursacht, sondern im Gegenteil sogar eine GvHD unterdrückt bzw. für ein sichereres Engraftment sorgt [84]. Da normales Gewebe keine NK-Zell aktivierenden Liganden exprimiert, ist dieses vor einer GvH Reaktion der Killerzellen geschützt. Die antigenpräsentierenden dendritischen Zellen des Empfängers hingegen werden eliminiert und können so keine GvHD mehr initiieren. Weitere Bedeutung erhält der Stellenwert der NK-Zellen durch die Erkenntnis, dass NK-Zellen die dominante Lymphozytenpopulation bei der Immunrekonstruktion nach Transplantation darstellen. So sind in den ersten Monaten bis zu 80% der peripheren Lymphozyten des Empfängers NK-Zellen [85], [86].

Man kann also davon ausgehen, dass der Einsatz von NK-Zellen bei der Behandlung hämatologischer Malignome mittels SZT eine weiter zunehmende, wichtige Rolle spielen wird. Neben ihrer Bedeutung für den GvL-Effekt nach Immunrekonstruktion stellt vor allem die Gabe von NK-Zellen als „donor lymphocyte infusion“ (DLI), zur Bekämpfung einer MRD, eine wichtige Therapieoption dar. Doch selbst wenn es gelingt, NK-Zell Therapien weiter zu optimieren, ist nicht zu erwarten, dass allein dies einen signifikanten Einfluss auf fortgeschrittene maligne Erkrankungen haben wird. Das beste Ziel für eine NK-Zell Therapie ist eine MRD, ein Zustand der mit hohen Effektor : Target-Zellverhältnissen einhergeht, ein Zustand wie er häufig nach SZT oder Chemotherapie erreicht wird.

## 1.5 Antikörper und Immuntherapie

Mehr als 25 Jahre nach ihrer Entdeckung und den ersten Einsätzen an Patienten sind die monoklonalen Antikörper mittlerweile die sich am schnellsten ausbreitenden pharmazeutischen Medikamente in klinischen Studien. Noch

sind erst einige dieser Antikörper für den routinemäßigen Einsatz in der Klinik zugelassen, doch mehrere hundert verschiedenster Antikörper befinden sich derzeit in klinischen Studien zur Behandlung von Krebs, Transplantatabstoßung, Autoimmun- oder Infektionskrankheiten. Diese Zahlen deuten das große Potential an, das man dieser neuen Art von Medikamenten zuordnet. Dabei lassen sich die verschiedenen Antikörper hinsichtlich ihrer Wirkungsweise in zwei Gruppen unterteilen. Während bei konjugierten Antikörpern die Wirkung direkt durch den Antikörper bzw. eine ankonjugierte aktive Einheit (z.B. einem  $\alpha$ -Strahler) erfolgt, ist die Aktivität der unkonjugierten Antikörper zum größten Teil eine Zell-vermittelte [87]. Durch Interaktion mit entsprechenden Rezeptoren geeigneter zytotoxischer Zellen, können Antikörper beispielsweise über ihren Fc-Teil eine ADCC gegenüber den malignen Zellen auslösen. Manche Antikörper, wie etwa Rituximab, können zusätzlich noch eine Komplement-abhängige Zytolyse (CDC) vermitteln [88], [89]. Nach den überaus positiven Ergebnissen, die Immuntherapien mit Antikörpern wie Rituximab in der Behandlung von CD20<sup>+</sup> Lymphomen oder Leukämien gezeigt haben [90], [91], hofft man auch bei anderen hämatologischen Erkrankungen, wie etwa der kindlichen ALL, eine Prognoseverbesserung durch geeignete Antikörper erzielen zu können. Mit der Untersuchung eines solchen Antikörpers zur Immuntherapie bei ALL beschäftigt sich diese Arbeit.

## 1.6 Fragestellung

Im ersten Teil der Arbeit werden verschiedene, gegen aktivierende als auch z.T. gegen inhibitorische Rezeptoren gerichtete Antikörper hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die natürliche Zytotoxizität von NK-Zellen untersucht. Zum Einsatz kommen hierbei gegen NKp30, NKp44, NKp46, NKG2D, CD158a, CD158b, CD158e sowie gegen CD16 gerichtete Antikörper. Besonderes Interesse gilt dabei allerdings den gegen die NCRs gerichteten Antikörpern NKp30, 44 und 46. Dazu werden jeweils mehrere Zytotoxizitätsassays gegen

FcγR-positive P815 Zellen durchgeführt und hinsichtlich der Antikörper-spezifischen Lyseraten ausgewertet.

Von den Testresultaten des ersten Teils der Arbeit ausgehend wird anschließend im zweiten Teil der Arbeit ein neu konstruierter bispezifischer NKp46\*CD19 Antikörper auf seine Effektivität im Hinblick auf die Lyse leukämischer Blasten von ALL-Patienten im Zytotoxizitätstest durch NK-Zellen getestet und untersucht.

## 2 Material

### 2.1 Allgemeine Materialien

#### 2.1.1 technische Geräte, Glas und Plastikmaterialien

sterile Werkbank Hera safe	Heräus
Brutschrank Hera cell	Heräus
Laborzentrifugen: - Rotixa 50 RS - Rotixa RP	Hettich Hettich
Blutanalysegeräte: - Cellcounter Advia 120 - Minos STE	Bayer Roche
Aufheizbares 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, 1ml, 10ml, 20ml, 50ml	Braun
Butterfly 19,21	Abbott
Kanülen Sterican®, 20G, 22G, 24G	Braun
Zellschaber	Costar

### 2.1.2 Stammlösungen/Kulturmedien

<p>Stammlösung A: Medium für pMNC's</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: Medium für die P815 Zelllinie</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 500 ml IMDM (+L-Glut, +25mM HEPES)</li> <li>▪ 5 ml Penicillin(10000U)/Streptomycin(10mg/ml)</li> <li>▪ 50 ml fetales Kälberserum (FCS)</li> </ul>	<p>Gibco</p> <p>Biochrom</p> <p>PAA Laboratories</p>
<p>Stammlösung C: 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/Württ.</p>

Stammlösung D: FACS – Puffer	
<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 der mononukleären Zellen (pMNCs)

Peripheres Vollblut	freiwillige Spender
Heparin: <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Liquemin®</li> </ul>	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	Miltenyi Biotec
Stammlösung C	
Polyglobin 5%	Bayer
CD56 Microbeads	Miltenyi Biotec

## 2.4 Material für Zellzählung und Mikroskopie

Neubauer Zählkammer	Brandt
Deckglas	Menzel
Tryptanblau (0,4%)	Sigma
Lichtmikroskop	Zeiss
Inversionsmikroskop	Olympus
Advia 120	Bayer

## 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
Rüttler Titramax 100	Heidolph
Mikrotiterplatte, U-Form, F-Form	Greiner
BADTA – Ligand	Wallac
Europium – Lösung	Wallac
Lyse – Puffer	Wallac
rIL2	Universitätsapotheke
rIL15	Universitätsapotheke
Trypsin/EDTA Solution	Biochem



Antikörper	Tabelle, siehe 2.6
------------	--------------------

## 2.6 Material für die Durchflusszytometrie

Geräte, Laborartikel und Reagenzien:

FACSCalibur	Becton Dickinson
Angeschlossene Hardware	Apple
Auswertungsprogramm CellQuest	Becton Dickinson
Quifikit	Dako
Stammlösung D	
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 IgG2a	FITC PE	Becton Dickinson
CD 3	IgG2a	FITC	Becton Dickinson
CD 3		PE	Becton Dickinson
CD 56	IgG1	PE	Becton Dickinson
CD 56		FITC	Becton Dickinson
NKP 30	IgG1	PE	Beckman Coulter
NKP 44	IgG1	PE	Beckman Coulter

NKP 46	IgG1	PE	Beckman Coulter
NKG2-D	IgG	PE	Santa Cruz Biotechnologie
CD 158a	IgG1	PE	Immunotech
CD 158b	IgG1	PE	Immunotech
NKB1/DX9	IgG1	PE	Becton Dickinson
CD 16	IgG1	PE	Becton Dickinson
Bispezifischer NKp46*CD19 Ak			Prof. Jung, interfakult.
Bispezifischer CD19*CD16 Ak			Prof. Fey, Erlangen
Humanisierter chim. CD19 Ak			Prof. Fey, Erlangen

## **3 Methoden**

### **3.1 P815 Zellkultur**

Die FcγR-positive Maus-Mastozytom-Zelllinie wurde in Stammlösung B als Kultur geführt. Alle 2 - 3 Tage wurden die Zellen umgesetzt (Mediumwechsel, wenn nötig Vorbehandlung mit Trypsin bzw. Einsatz des Zellschabers zur Ablösung der adhärenen Zellen von der Wand). Einen Tag vor jedem Zytotoxizitätstest wurde ein zusätzlicher Mediumwechsel mit Extraktion der vorhandenen toten Zellen der Kultur durchgeführt, um bei dem Test eine möglichst niedrige Spontanlyse zu erhalten.

### **3.2 Gewinnung und Isolierung peripherer mononukleärer Zellen mit Ficoll-Hypaque**

#### **3.2.1 Hintergrundinformation**

Zur Gewinnung der peripheren mononukleären Zellen (pMNC) nutzt man das Verfahren der Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Hypaque. Das Verfahren beruht, wie der Name schon sagt, auf den Dichteunterschieden der einzelnen Zellarten und ermöglicht so eine Trennung der pMNCs von den anderen Blutzellen. Da pMNCs und Thrombozyten eine geringere Dichte als das Ficoll-Hypaque besitzen, sammeln sie sich oberhalb der Ficollschicht an, wohingegen die übrigen Zellen, wie z.B. Erythrozyten, Granulozyten oder auch tote Zellen durch ihre höhere Dichte unter der Ficollschicht zum Liegen kommen. Als Material wurde heparinisieretes Vollblut freiwilliger Spender verwendet.

### 3.2.2 Durchführung

- 1) Mischen des heparinisierten Vollblutes mit PBS im Verhältnis 1:1.
- 2) Aufschichten von 30 – 35 ml dieser Mischung auf 15 – 20 ml vorgelegtes Ficoll-Hypaque in einem sterilen 50 ml Röhrchen.
- 3) Zentrifugation der Röhrchen: 30 min; Raumtemperatur; mit 400g; 100s Anlaufzeit; Bremse 0.
- 4) Entfernen der obersten Schicht (enthält das Plasma und unerwünschte Thrombozyten) mit einer sterilen Pipette.
- 5) Danach wird mit einer neuen sterilen Pipette sorgfältig die Schicht mit den pMNCs abgesaugt und in ein steriles 50 ml Röhrchen gegeben.
- 6) Waschen der pMNCs:
  - Röhrchen mit PBS auffüllen und bei 300g 10 min zentrifugieren
  - Überstand absaugen und Zellpellet resuspendieren
  - 1 x Wiederholen

Am Ende resuspendieren des Pellets in Medium oder PBS – je nach Verwendungszweck.

## 3.3 Zellanreicherung mit dem MACS – System

### 3.3.1 Hintergrundinformationen

MACS, „Magnetic-activated cell sorting“, ist ein Verfahren zur Anreicherung bzw. zur Depletion bestimmter Zellen. Das Verfahren macht sich dabei die

Eigenschaften immunomagnetischer und paramagnetischer Substanzen zunutze. Die anzureichernden Zellen werden zuerst mit einem monoklonalen Antikörper, der an charakteristische Epitope dieser Zellsorte bindet (z.B. CD3 für T-Zellen, CD56 für NK-Zellen), markiert. Diese Antikörper sind dabei mit kleinen magnetischen Metallpartikeln (Eisenoxid) konjugiert. Wird das Zellgemisch nun durch eine mit einer paramagnetischen Eisenmatrix gefüllte Trennsäule laufen gelassen, die sich zugleich innerhalb eines starken magnetischen Feldes befindet, so werden die magnetisch markierten Zellen in der Säule zurückgehalten. Die unmarkierte Negativfraktion wird hingegen einfach ausgewaschen. Nimmt man nun die beladene Säule aus dem äußeren Magnetfeld, so verliert die paramagnetische Matrix ihre magnetischen Eigenschaften und die zuvor markierten Zellen können als Positivfraktion aus der Säule eluiert werden. Eine einfache Zell-Depletion funktioniert prinzipiell genauso, nur verhält es sich mit Positiv- bzw. Negativfraktion entsprechend umgekehrt.

Zur Anreicherung von NK-Zellen werden vor allem gegen CD56 (NCAM „neural cell adhesion molecule“) gerichtete Antikörper angewendet, ein von allen NK-Zellen exprimiertes Adhäsionsmolekül. Da CD56 jedoch nicht ausschließlich von NK-Zellen, sondern auch von einigen T-Zell Untergruppen exprimiert wird, ist alleine mit CD56-Antikörpern eine absolut reine NK-Zell Anreicherung nicht möglich. Durch die Verwendung verschieden starker magnetischer Antikörper, sowie verschieden starker Magnetfelder wird es möglich, mit einer Zellgruppe zuerst eine Anreicherung und direkt anschließend eine Depletion nach bestimmten Oberflächenmolekülen durchzuführen. So lassen sich durch eine, nach CD56-Anreicherung, durchgeführte CD3-Depletion beispielsweise noch vorhandene T-Zellen von den NK-Zellen effektiv abscheiden.

### 3.3.2 Durchführung

1) Isolierung von pMNCs aus heparinisierem Vollblut wie in 3.2.2 beschrieben, wobei das Zellpellet am Ende in Puffer (Stammlösung C) resuspendiert, und auf eine Dichte von 100 Mio Zellen/ml Puffer eingestellt wird.

- Alle nun folgenden Schritte werden auf Eis, bei ca 4 °C, durchgeführt -

2) Das Gemisch wird für 10 min mit 50µl Polyglobulin/ml inkubiert, um eventuelle unspezifische Bindungsstellen abzusättigen.

3) Inkubation des Gemisches für 30 min mit CD 56 MACS-Beads wobei pro 10 Mio Zellen 20 µl Beads eingesetzt werden.

4) Waschen der Zellen in entgastem Puffer: 300g ; 10 min.

5) Resuspension des Zellpellets in 7ml entgastem Puffer.

6) Einsetzen einer Trennsäule(VS) ins Vario MACS und Vorspülen der Säule mit 10 ml entgastem Puffer.

7) Zellsuspension langsam auf die Säule geben und vollständig durch die Säule laufen lassen. Vorsicht: Säule nie trocken laufen lassen.

8) 5-maliges Spülen der Säule mit jeweils 2 ml entgastem Puffer (in der Säule befindliche unmarkierte Zellen werden ausgewaschen).

9) Danach die Säule aus dem Magneten nehmen und mit 7 ml Puffer auffüllen. Mit einem Stempel den Puffer schnell und kräftig durch die Säule

drücken, um die darin befindlichen Zellen auszuspülen und in einem 15 ml Röhrchen auffangen.

- 10) Waschen der Zellen wie in 4).
- 11) Resuspension der Zellen in Puffer und anschließendes Zählen der Zellen (Neubauer-Zählkammer oder Zählgerät).
- 12) Je nach weiterem Verwendungszweck Zellen in Medium bzw PBS aufnehmen.
- 13) Überprüfung der Qualität der Anreicherung mit Hilfe des FACS-Gerätes.

## 3.4 Zytotoxizitätstest

### 3.4.1 Hintergrundinformationen

Als Methode diente hier ein BADTA-release assay, ein im Gegensatz zum klassischen <sup>51</sup>Chromfreisetzungstest nicht-radioaktiver Zytotoxizitätstest. Der Vorteil soll im Vergleich zum radioaktiven Test vor allem in der schnelleren Ausführbarkeit und in der zeitverzögert messbaren Fluoreszenz liegen. Der Test wurde weitgehend so ausgeführt wie er in der Veröffentlichung von K. Blomberg et al. [92] beschrieben wird und soll das Ausmaß der Zytotoxizität von Lymphozyten (hier: NK-Zellen, pMNCs) gegenüber verschiedenen Targetzellen (hier: P815 Zellen, Blasten) messen.

Zu Beginn des Tests werden zuerst die Targetzellen mit dem BADTA inkubiert, welches aufgrund seiner Hydrophobität die Membran der Zellen leicht passieren kann und sich somit im Innern der Zellen anreichert. Im Zellinneren vorhandene Esterasen hydrolysieren dort den BADTA-Liganden, woraufhin aus dem

hydrophoben BADTA das hydrophile TDA entsteht, welches somit nicht mehr in der Lage ist die Zellmembran zu durchdringen und sozusagen in der Zelle gefangen ist. Nun kann man die so markierten Targetzellen mit den sogenannten Effektorzellen (hier: NK-Zellen) in dem jeweils gewünschten Verhältnis inkubieren. Wird jetzt eine markierte Targetzelle von den zytotoxischen Effektorzellen angegriffen und lysiert, so tritt das hydrophile TDA wieder in den Überstand über und zwar umso mehr, je mehr Zellen lysiert wurden. Um die Menge des freigesetzten TDAs zu bestimmen bedient man sich seiner fluoreszenzverstärkenden Eigenschaften in Verbindung mit Europium. Nach Zugabe von Europium in den Überstand bildet das TDA mit dem Europium stabile und zeitverzögert stark fluoreszierende Chelatkomplexe, das EuTDA, deren Fluoreszenz mit einem Fluorometer messbar ist. Um die spezifische Zytotoxizität, also den von den Effektoren lysierten prozentualen Anteil der Gesamt-Targets daraus ableiten zu können, benötigt man noch zusätzliche Werte: Zum einen das Ergebnis bei der maximal möglichen Anzahl lysierter Zellen (also theoretisch aller eingesetzten Targetzellen) - dazu muss das absolute Ergebnis in Bezug gesetzt werden - und zum anderen den Wert, den die markierten Targetzellen auch ganz ohne Effektorzellen liefern würden. Gelangt doch auch immer etwas TDA durch z.B. defekte Zellen in den Überstand.

Diese beiden Werte bezeichnen wir als Maximallyse bzw. als Spontanlyse.

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

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

(3.1)



### 3.4.2 Durchführung

#### A Markierung der Targetzellen

- 1) Targetzellen in einem 15ml Röhrchen auf 1 Mio Zellen/ml Medium einstellen.
- 2) BADTA-Ligand hinzugeben: 2,5  $\mu$ l / ml Zellsuspension P815, werden Blasten verwendet, 4 $\mu$ l Ligand / ml Zellsuspension.
- 3) P815 Zellen 30 min im Brutschrank bei 37°C inkubieren lassen, Blasten 60 min.
- 4) 5x Waschen: Röhrchen jeweils mit auf 37°C erwärmtem Medium auffüllen und bei P815 Zellen 5 min mit 200g zentrifugieren, bei Blasten 7 min mit 300g.
- 5) Nach letztem Waschen Pellet in 6ml Medium resuspendieren, dann Zellen in Neubauerzählkammer auszählen und auf 200000/ ml Medium einstellen.
- 6) Ca 2-3 ml dieses Gemisches in ein neues Röhrchen geben („Backgroundr hrchen“) und erneut zentrifugieren, der Überstand wird später zur Backgroundbestimmung(s.u.) benötigt.

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

- 1) Effektorzellen (NK-Zellen) werden am Vortag mittels der unter 3.2 und 3.3 beschriebenen Methoden isoliert und zu gleicher Menge in 2 Röhrchen in einer Konzentration von 1Mio Zellen / ml Medium (Stammlösung A) gegeben. Zu den Zellen im 2. Röhrchen wird r-IL 2 dazu pipettiert, und zwar

40 IE / ml, danach werden die Röhren über Nacht in den Brutschrank gestellt.

- 2) Am Nächsten Tag wird für beide Röhren getrennt eine 1:2 Verdünnungsreihe über 4 Stufen hergestellt. Somit besitzt man die Konzentrationen 1Mio/ml, 0,5 Mio/ml, 0,25Mio/ml und 0,125Mio/ml. Dies ergibt bei einer Anzahl von jeweils 5000 Targetzellen per Well ein Effektor/Target – Verhältnis von 20:1, 10:1, 5:1, 2,5:1.

Durch die verschiedenen Verdünnungsstufen lässt sich verdeutlichen, wie die gemessene Zellyse mit den zugegebenen Effektorzellen zusammenhängt.

### C Testansatz

- 1) Der Test wird in einer Mikrotiterplatte (U-Form, 96 Kavitäten) angesetzt, wobei zur Bestimmung von Background, Spontanlyse und Maximallyse jeweils 4 Wells, zur Bestimmung der anderen Werte jeweils 3 Wells verwendet werden.
- 2) Zur Backgroundbestimmung werden 25µl des Überstandes aus dem Backgroundröhren (s.o.) mit 175 µl Medium per Well angesetzt.
- 3) Zur Spontanlysebestimmung werden 25µl Targetzellen mit 175 µl Medium angesetzt per Well angesetzt.

Zur Bestimmung der Maximallyse werden 2 verschiedene Ansätze vorgelegt, die normalerweise einen ähnlichen Wert ergeben sollten:

- 25µl Targetzellen, 20µl Lysepuffer und 155µl Medium
- 25µl Ultraschall-zertrümmerter Targetzellen und 175 µl Medium

- 4) Die restlichen benötigten Wells werden dann mit der vorgegebenen Menge an Targetzellen beladen (auch 25µl).
- 5) Möchte man den Test als ADCC ausführen (antibody dependent cellular cytotoxicity) müssen nun in die jeweiligen Wells die Antikörper zu den Targets dazu pipettiert und die Platte 30 min inkubiert werden. Die verschiedenen Antikörper wurden dabei in folgenden Konzentrationen eingesetzt: NKp30,44,46: ca. 1 µg/ml, CD 158a,b: ca. 1 µg/ml, NKB1: ca. 1 µg/ml, NKG2D: ca. 1 µg/ml, CD16 ca. 1µg/ml. Um eine Lyse durch Komplement oder durch Effekte des Antikörpers selbst auszuschließen, muss man für die ADCC noch eine zusätzliche Kontrolle aus 25µl Targets, Antikörpern und 175 µl Medium ansetzen.
- 6) In die Wells mit den Targetzellen werden nun jeweils 100µl der entsprechend verdünnten Effektorzellen sowie anschließend 75µl des Mediums pipettiert und die Platte anzentrifugiert (100g; 2min; Bremse3). Dann wird die Platte 2 h im Brutschrank inkubiert.
- 7) 30 min vor Ende der Inkubationszeit werden jeweils 200 µl Europiumlösung in die entsprechende Anzahl benötigter Wells in eine Flachbodenplatte gegeben. Die Platten mit dem Europium sind bis zum Ende der Inkubation vor Licht zu schützen.
- 8) Da für die Messung des freigesetzten Liganden nur der Überstand benötigt wird, wird die Platte nach den 2 Stunden nochmals zentrifugiert (200g; 5min; Bremse3).
- 9) Nun werden jeweils 20 µl Überstand aus dem jeweiligen Well der Testansatzplatte in das entsprechende Well der Flachbodenplatte gegeben und diese für 20 min mit Alufolie bedeckt und auf einen Rüttler gestellt.

10) Danach kann man im Multilabel-Counter die Fluoreszenzen der einzelnen Wells messen.

11) Durch die oben genannte Formel (3.1) kann man nun die gemessenen Counts in Prozentzahlen umrechnen und aus den jeweiligen 3- bzw. 4-fach Bestimmungen Mittelwerte bilden.

Als ein Gütekriterium eines solchen Tests wird die Spontanlyse des Assays herangezogen, welche sich wie folgt berechnen lässt:

$$\text{Spontanlyse des Assays in \%} = \frac{\text{Spontanlyse} - \text{Background}}{\text{Maximallyse} - \text{Background}} \times 100$$

(3.2)

Sie sollte unter 30 % liegen.

## 3.5 Durchflusszytometrie

### 3.5.1 Hintergrundinformationen

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur simultanen Analyse von Einzelzellen in Suspension hinsichtlich ihrer physikalischen als auch ihrer chemischen Eigenschaften. Sie basiert dabei auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Da die Zellen zur Analyse einzeln vorliegen müssen, bedient sich die Methode der hydrodynamischen Fokussierung: Dabei wird die Zellsuspension durch Überdruck in eine Messküvette eingeführt. Treten die Zellen nun in die Messkammer ein, so werden sie so stark beschleunigt, dass sich Aggregate auftrennen und die Zellen einzeln aneinandergereiht nacheinander den Laserstrahl am Analysepunkt passieren. Dort werden dann gleichzeitig die Lichtstreuung an der

Zelle sowie die Fluoreszenz eventuell verwendeter fluoreszierender Antikörper gemessen. Die Lichtstreuung hängt dabei von der Zellgröße, der Struktur der Zellmembran sowie den intrazellulären Bestandteilen ab, dadurch lassen sich durch die Streuungseffekte folgende Aussagen machen: Der Großteil des Lichtes, auch als Vorwärtsstreulicht (forward light scatter, FSC) bezeichnet, wird dabei in Vorwärtsrichtung gestreut und ist vor allem ein Maß für die Zellgröße (große Zelle → große Streuung). Dahingegen hängt das im rechten Winkel gestreute Licht (side scatter, SSC) hauptsächlich von der intrazellulären Granularität ab (viele Granula → viel Streuung). So ergibt sich z.B. für eine Vollblut-Probe schon allein aufgrund der Streuungseffekte im Vergleich Side Scatter gegen Forward Scatter eine ganz charakteristische Aufteilung der Zellen, in Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten. Die Messung der Fluoreszenz hingegen dient zur immunologischen Typisierung der eingesetzten Zellen. Dazu muss die Zelle vorher mit geeigneten, also gegen das auf der Zelle zu markierende Antigen gerichteten, monoklonalen Antikörpern inkubiert werden, die mit fluoreszierenden Farbstoffen gekoppelt sind. Möchte man gleichzeitig mehrere verschiedene Antigene auf einer Zelle nachweisen, so müssen die dazu verwendeten Antikörper mit unterschiedlichen Farbstoffen gekoppelt sein. Da die einzelnen Fluoreszenzen dabei zur gleichen Zeit gemessen werden, müssen diese Farbstoffe bestimmte Bedingungen erfüllen: Einerseits müssen sie alle zusammen bei einer bestimmten Wellenlänge (hier also der des Messlasers) anregbar sein, andererseits müssen die Gipfel der einzelnen Emissionsmaxima soweit auseinander liegen, dass die Emissionen mit geeigneten Detektoren simultan gemessen werden können. Um die Palette der einsetzbaren Farbstoffe zu erweitern, besitzen moderne FACS Geräte mehrere Laser mit unterschiedlicher Wellenlänge. Häufig verwendete Stoffe, die die eben genannten Eigenschaften besitzen, sind z.B. Fluorescein-isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), PerCP oder Allophycocyanin (APC). Das in dieser Doktorarbeit zur Anwendung gekommene FACS Gerät besitzt zwei Laser unterschiedlicher Wellenlänge, kann damit also bis zu 4 Farbstoffe gleichzeitig messen.

Was bei dem Auswerteprinzip der Immunfluoreszenzmessungen allerdings beachtet werden muss, ist die Problematik der Autofluoreszenz: So zeigen die meisten Zellen auch ohne vorherige Anfärbung eine gewisse Eigen(Auto-) Fluoreszenz und könnten dadurch als „falsch-positiv“ erkannt werden. Zusätzlich könnten auf den Zellen vorhandene freie Fc-Rezeptoren einen Teil der Antikörper unspezifisch binden und somit ebenfalls ein zu starkes Signal liefern. Deshalb muss immer mittels einer Kontrollgruppe (Inkubation der Probe mit einem „negativen“ Kontrollantikörper) der Bereich bestimmt werden, ab der die Fluoreszenzintensität der Zelle als positiv gilt, d.h. ab wann die Fluoreszenz nur auf den, spezifisch gebundenen, markierten Antikörper zurückzuführen ist.

### 3.5.2 Durchführung

#### A Immunfluoreszenzfärbung

- 1) Die zu untersuchenden Zellen, z.B. isolierte PMNCs, leukämische Blasten, werden auf 1 Mio/ml eingestellt.
- 2) Die fluoreszierenden monoklonalen Antikörper werden in den gewünschten Kombinationen in Röhrchen vorgelegt (je 10 $\mu$ l).
- 3) Darauf jeweils 100 $\mu$ l der Zellsuspension pipettieren und anschließend kurz vortexen.
- 4) Proben für 30 min im Kühlschrank unter Lichtabschluss inkubieren.
- 5) Danach Röhrchen mit Stammlösung D auffüllen, abzentrifugieren (400g; 10 min; 10 °C) und abschütten.

- 6) Das Pellet mit den gefärbten Zellen resuspendieren und im dunklen Kühlschrank bis zur Messung aufbewahren (max. 1 Tag).

### B Messung und Auswertung der Fluoreszenz am FACS Gerät

Die Messungen wurden mit dem Durchflusszytometer FACSCalibur durchgeführt, die Auswertung mit der dazu gehörenden Software CellQuest. Von den Routineeinstellungen ausgehend wurden die genauen Messeinstellungen jeweils mit Hilfe der Kontrollgruppen (Prinzip s.o.) durchgeführt.

- 1) In der Darstellung SSC gegen FSC (SSC: y-Achse, FSC: x-Achse) die Verstärkerspannungen so einstellen, dass eine gewohnte Zellverteilung entsteht. Die genauer zu untersuchende Zellpopulation (hier z.B. die Lymphozyten) kann in ein so genanntes Gate („Lymphozytengate“) gesetzt werden, was ermöglicht, dass diese Zellen separat in einem weiteren Diagramm dargestellt und hinsichtlich ihrer Fluoreszenz untersucht werden können.
- 2) Einstellen der genauen Messeinstellungen: Die Verstärkerspannungen werden so gewählt dass die Zellen der Kontrollfärbung im jeweiligen Kanal zwischen  $10^0$  und  $10^1$  (im „Negativ-Bereich“) der Fluoreszenzskala zum Liegen kommen.
- 3) Danach werden die Proben gemessen.

Auswertung: Die Zellen des zuvor eingestellten Lymphozytengates werden in weiteren Diagrammen hinsichtlich ihrer Fluoreszenz dargestellt, wobei in jedem Diagramm jeweils 2 Kanäle gegeneinander dargestellt werden (z.B. FITC gegen PE, FITC gg. APC, usw.). Setzt man in diese Diagramme nun ein Achsenkreuz, dessen Ursprung genau an dem Übergang von negativ- zu positiv-Bereich der beiden Skalenachsen liegt, so lassen sich die Zellen anhand des Quadranten in

dem sie zur Darstellung kommen als doppelt positiv, doppelt negativ, positiv-negativ bzw. negativ-positiv definieren. Dabei lassen sich die absoluten und relativen Häufigkeiten von der Software automatisch berechnen.

## **3.6 Statistische Analysen**

Für die statistischen Analysen wurde die Graph Pad Prism 4.01 Biostatistik Software verwendet.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Anreicherung der NK-Zellen

Um die Auswirkungen des Einsatzes der verschiedenen Antikörper auf die lytische Aktivität der NK-Zellen möglichst genau zu erfassen, war es zunächst notwendig, NK-Zellen in möglichst hoher Anzahl und Konzentration zu isolieren. Dadurch wurde einerseits eine gute zytotoxische Aktivität für die Zytotoxizitätstests erreicht, andererseits ein eventueller Einfluss von T- und anderen Zellen auf das Testergebnis minimiert.

Zu diesem Zweck wurden zunächst pMNCs aus dem Vollblut freiwilliger Spender über eine Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert und daraus dann anschließend CD56<sup>+</sup> Zellen mit Hilfe des MACS-Systems angereichert. Da sich durch die mit der Anreicherung einhergehende indirekte T-Zell Depletion bereits eine ausreichende Reinheit der NK-Zellen erzielen ließ, wurde auf eine anschließende direkte CD3-Depletion verzichtet. Per FACS-Analyse konnten Anteil und Reinheit der NK-Zellen sowohl vor als auch nach erfolgter Anreicherung bestimmt werden.

#### 4.1.1 Anreicherung der CD56<sup>+</sup> Zellen mit dem MACS System

Wie oben erwähnt, dienten als Ausgangszellen für die Anreicherung pMNCs freiwilliger Spender. Durchschnittlich betrug der NK-Zell Anteil unter diesen pMNC Ausgangszellen vor MACS-Anreicherung  $16,96 \pm 5,32$  %. Der Anteil der T-Zellen lag durchschnittlich bei  $63,83 \pm 7,48$  %. (siehe auch Tabelle 4.1)

Tab. 4.1: Zusammensetzung der Lymphozyten vor MACS-Anreicherung

Versuch	Anteil der CD56+,CD3-	Anteil der CD3+
1	14,53	72,47
2	24,16	54,87
3	13,18	66,54
4	20,97	61,45
5	11,96	74,32
<b>Mittelwert</b>	16,96	65,93
<b>Standardabweichung</b>	5,32	8,00

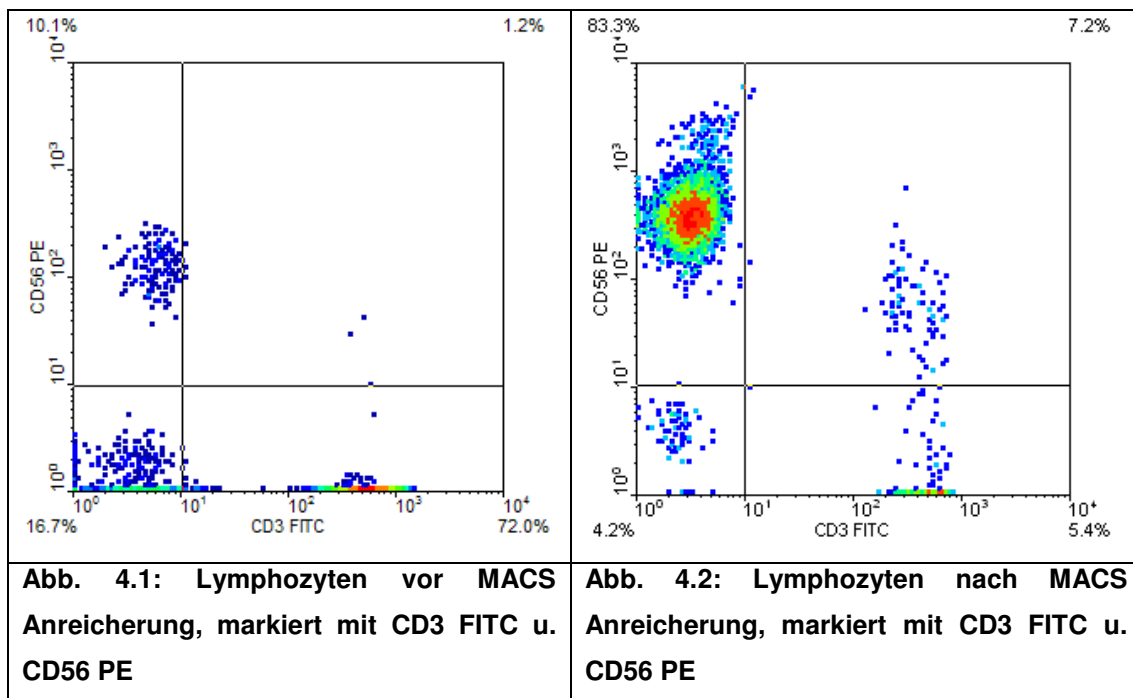
Durch die einfache CD56 MACS-Anreicherung ließ sich ein NK-Zellanteil von durchschnittlich  $80,72 \pm 3,76$  % erzielen, der Anteil der T-Zellen, also der  $CD3^+/CD56^-$  Zellen, konnte dabei auf  $11,51 \pm 2,98$  % gesenkt werden. (siehe Tabelle 4.2)

Tab. 4.2: Zusammensetzung der Lymphozyten nach MACS-Anreicherung

Versuch	Anteil der CD56+,CD3- In %	Anteil der CD3+ In %
1	76,47	16,66
2	86,34	9,81
3	78,64	11,53
4	82,15	9,78
5	80,01	9,77
<b>Mittelwert</b>	80,72	11,51
<b>Standardabweichung</b>	3,76	2,98

Durch diesen Anreicherungsprozess konnte also der prozentuale Anteil der  $CD56^+/CD3^-$  Zellen im Vergleich zu den Ausgangszellen im Mittel um den Faktor 4,76 gesteigert werden, während der Anteil der T-Zellen im Mittel um den Faktor 5,72 gesenkt werden konnte.

Die folgenden Abbildungen zeigen je ein typisches Ergebnis einer FACS-Analyse vor als auch nach der MACS-Anreicherung. Da im Scatterbild zuvor ein Gate auf die Lymphozyten gesetzt wurde, kommen auch nur die Lymphozyten im Density Plot zur Darstellung.

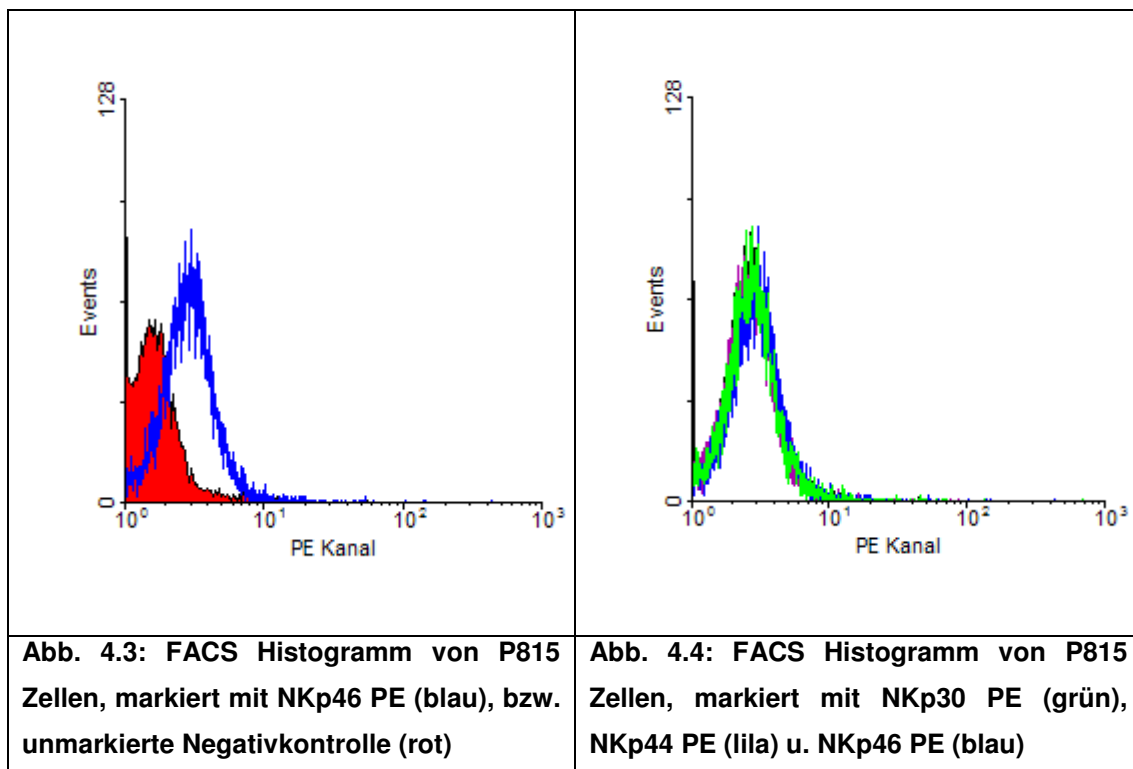


## 4.2 Bindung der verschiedenen NKp-Antikörper an P815

Als weiterer Schritt war es außerdem notwendig, dass Bindungsverhalten der verschiedenen Antikörper mit ihren Fc-Teilen an die P815-Zellen zu vergleichen. Nur so konnte ausgeschlossen werden, dass ein von Antikörper zu Antikörper unterschiedlicher Einfluss auf die zytotoxische Aktivität der NK-

Zellen nicht durch eine eventuell unterschiedlich starke Affinität zum Fc $\gamma$ -Rezeptor der P815 Zelle verursacht wird.

Abbildung 4.3 und 4.4 zeigen mit NKp30, 44 u. 46 PE-Antikörpern angefärbte P815 Zellen in der FACS Analyse. Es ist deutlich erkennbar, dass sich die einzelnen Antikörper in ihrem Bindungsverhalten zur P815-Zelle nicht signifikant unterscheiden.

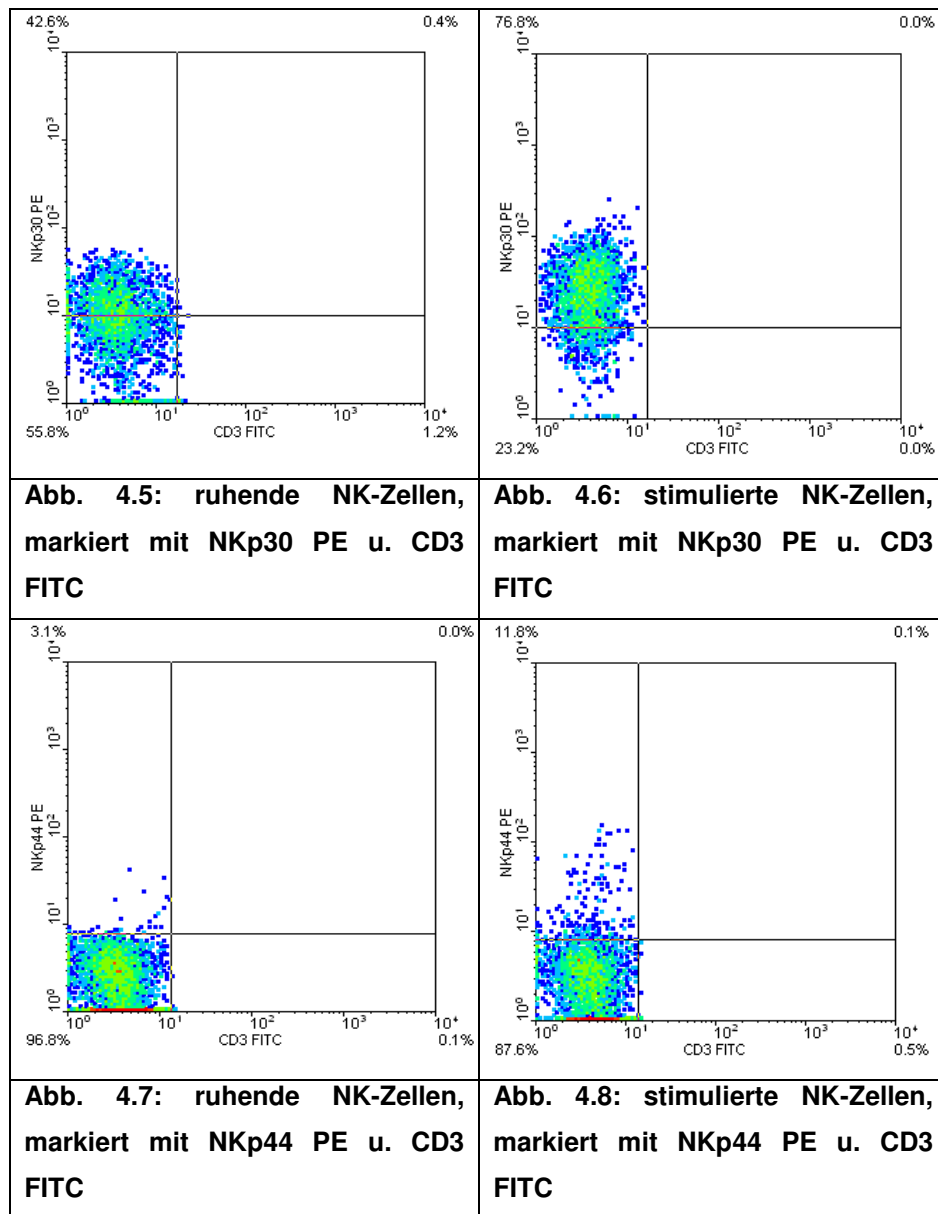


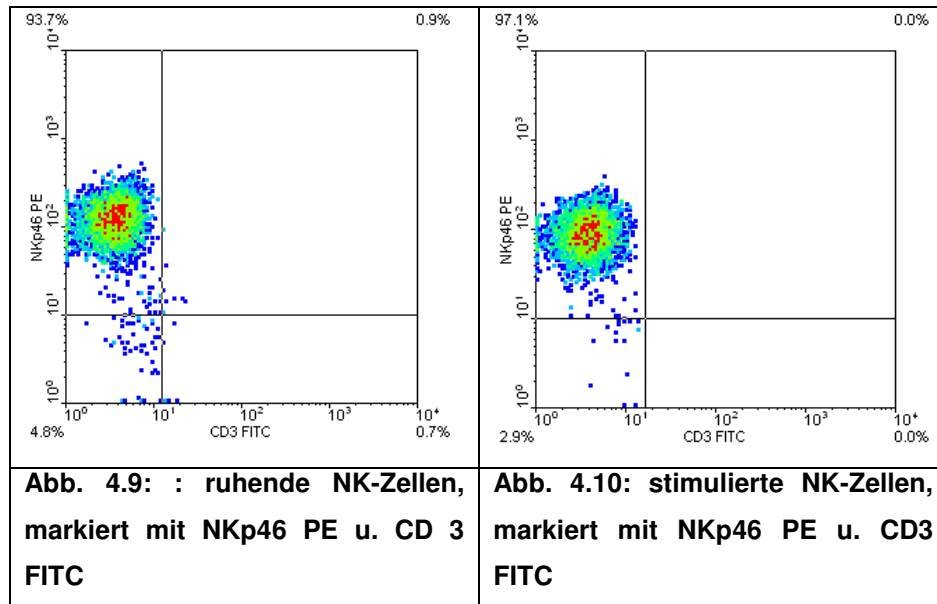
### 4.3 Expression der NCR's auf NK-Zellen in Abhängigkeit von ihrem Stimulationsgrad

Neben dem Bindungsverhalten der NKp-Antikörper an den P815 Zellen, wurde mit Hilfe dieser Antikörper des Weiteren die Expression der drei aktivierenden NK-Rezeptoren auf den NK-Zellen, in Abhängigkeit von ihrem Stimulationsgrad, untersucht. Dazu wurden wiederum ruhende sowie stimulierte NK-Zellen mit

dem jeweiligen Antikörper inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

In den Abbildungen 4.5 bis 4.10 werden die Ergebnisse der FACS Analyse dargestellt, wobei die Gates so gewählt sind, dass nur die NK-Zellen im Density Plot zur Darstellung kommen.





Man erkennt deutliche Unterschiede in der Expression der verschiedenen NCRs auf den NK-Zellen. So wird bereits auf ruhenden NK-Zellen der NKp46 Rezeptor sehr stark, der NKp30 Rezeptor im Vergleich dazu weniger stark exprimiert. Dahingegen wird der NKp44 Rezeptor von ruhenden NK-Zellen praktisch gar nicht exprimiert. Erst nach Stimulation der Zellen mit IL2 lassen sich auf der Zelloberfläche auch NKp44 Rezeptoren nachweisen. Weiteren Einfluss hat die NK-Zell Stimulation auf den NKp30 Rezeptor, der verstärkt exprimiert wird, während sich der Expressionsgrad des NKp46 Rezeptors dadurch kaum verändert.

#### 4.4 Einfluss verschiedener Antikörper auf die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen gegenüber der P815 Zelllinie

Die Auswirkungen des Einsatzes der verschiedenen Antikörper auf die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen gegenüber der FcγR<sup>+</sup> P815 Zelllinie wurden anhand von Zytotoxizitätsassays ermittelt. Zu beachten ist, dass die Antikörper hierbei nicht etwa über einen FcγRIII vermittelten Effekt die ADCC-

Zytotoxizität der NK-Zellen, sondern über ihre spezifischen Rezeptoren die natürliche NK-Zell Zytotoxizität beeinflussen.

Um zusätzlich die Stimulierbarkeit der NK-Zellen durch IL2 zu testen, sowie den Effekt der Antikörper auf ruhende als auch auf stimulierte NK-Zellen vergleichen zu können, wurden die Zellen vor den Tests über Nacht inkubiert und ein Teil der Zellen mit 40 U/ml IL2 stimuliert.

Die zytotoxische Aktivität der Zellen wurde dann am nächsten Tag im Zytotoxizitätstest gegenüber der P815 Zelllinie getestet.

#### 4.4.1 Auswirkungen der NKp-Rezeptor Antikörper NKp30, 44 und 46 auf die Zytotoxizität der NK-Zellen

In der ersten Testreihe sollte zunächst der Einfluss der drei verschiedenen NKp-Antikörper auf die NK-Zell vermittelte Lyse der P815 Zellen ermittelt werden. Dazu wurden 5 Tests durchgeführt, wobei in jedem Test NKp46, NKp44 und NKp30 eingesetzt wurden. Die Ergebnisse für ruhende sowie für stimulierte NK-Zellen sind in den Abbildungen 4.11 und 4.12 dargestellt.

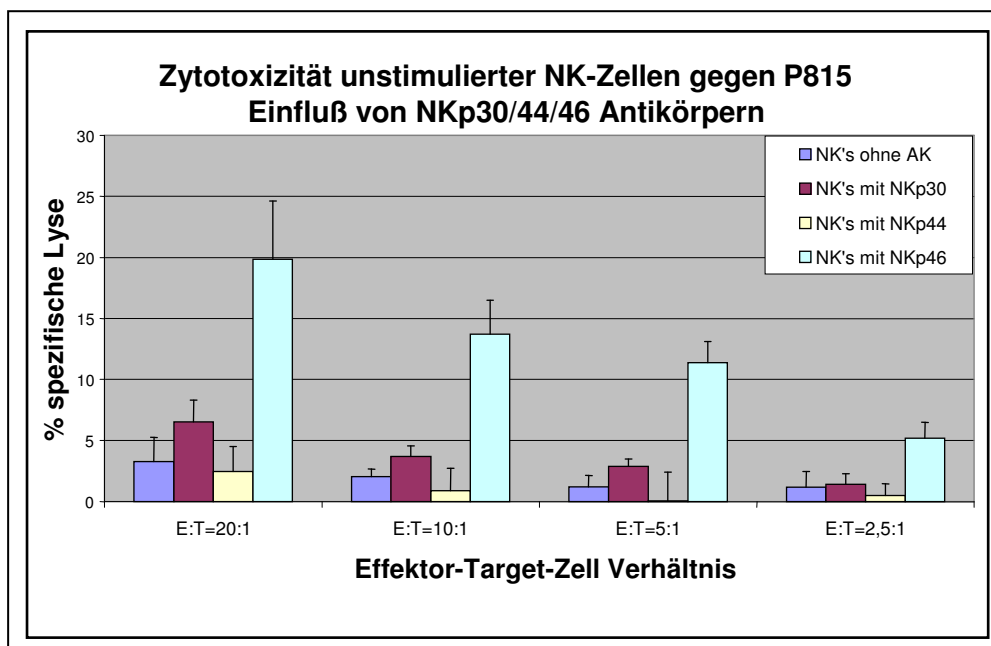
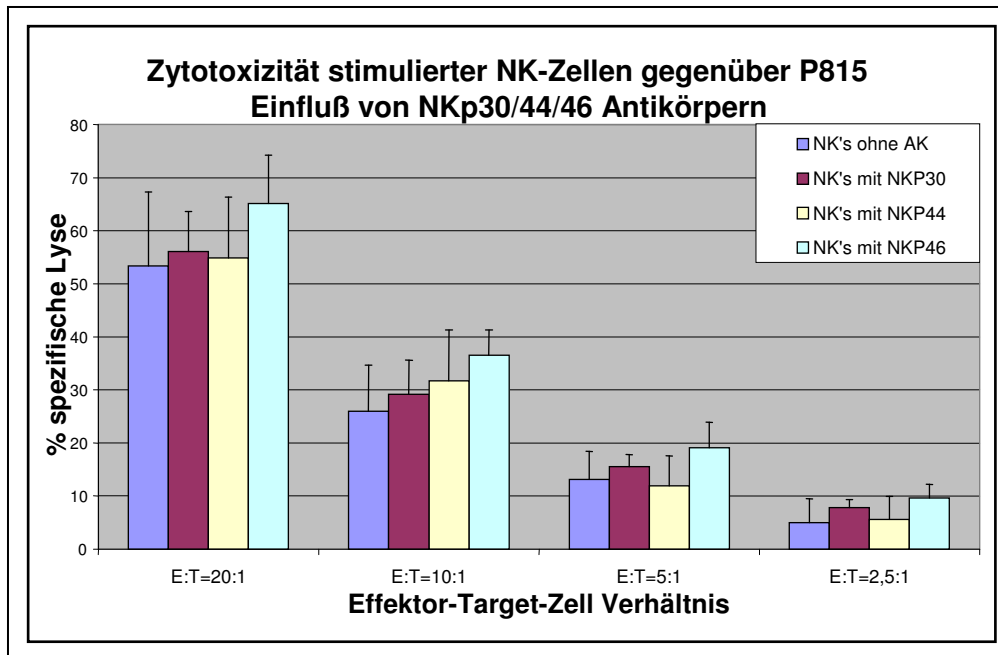


Abb. 4.11: Einfluss von NKp30, 44 u. 46 auf ruhende NK-Zellen



**Abb. 4.12: Einfluss von NKp30, 44 u. 46 auf stimulierte NK-Zellen**

Bei nicht stimulierten NK-Zellen zeigt sich eine deutliche Zunahme der Zytotoxizität durch die vorherige Inkubation der Targetzellen mit den Antikörpern NKp46 und NKp30 bei allen vier Verdünnungsstufen. Eine Inkubation mit NKp44 führte hingegen zu keiner Steigerung der Zytotoxizität.

Bei stimulierten NK-Zellen hingegen führte nur die Inkubation mit NKp46 zu einer signifikanten Zunahme der Zytotoxizität, während NKp30 und NKp44 zu keiner signifikanten Steigerung der Lyseraten führten.

Unabhängig von den eingesetzten Antikörpern zeigte sich bei allen Versuchen eine deutliche Erhöhung der lytischen Aktivität durch die vorherige Stimulation der NK-Zellen mit IL2.

Tabelle 4.3 zeigt die durchschnittliche Steigerung der Zytotoxizität durch NKp30 bei einem E:T Verhältnis von 20:1, 10:1 und 5:1. Man sieht, dass der Antikörper nur bei unstimulierten NK-Zellen zu einer Steigerung der Lyseraten führt.



Tab. 4.3: Durchschnittliche Lyse von P815 durch NK-Zellen mit NKp30

Spezifische Lyse der unstimulierten Zellen				Spezifische Lyse der stimulierten Zellen			
Ohne AK	Mit NKp30	x-fache Steigerung	p	Ohne AK	Mit NKp30	x-fache Steigerung	p
3	7	2,33	0.0390	53	56	1,06*	0.5408
2	4	2,0	0.0063	26	29	1,11*	0.2844
1	3	3,0	0.0063	13	16	1,23*	0.4349

\* = Ergebnis nicht unterhalb des Signifikanzniveaus

Da die Ergebnisse belegen, dass von den drei aktivierenden NKp-Rezeptoren NKp46 den größten Einfluss auf die Zytotoxizität der NK-Zelle zu haben scheint, wurden weitere Zytotox-Versuche mit NKp46-Antikörpern durchgeführt. Diese größere Anzahl an Versuchen wurde benötigt, um das Ausmaß des aktivierenden Effekts durch NKp46 möglichst genau zu erfassen.

Abbildung 4.13 zeigt die zusammengefassten Ergebnisse aller Tests in denen NKp46-Antikörper eingesetzt wurden (n=9), sowohl für ruhende als auch für stimulierte NK-Zellen. In Tabelle 4.4 sind anschließend die durchschnittlichen Steigerungen der Zytotoxizität durch NKp46 bei einem E:T Verhältnis von 20:1, 10:1 und 5:1 nochmals zusammengefasst.

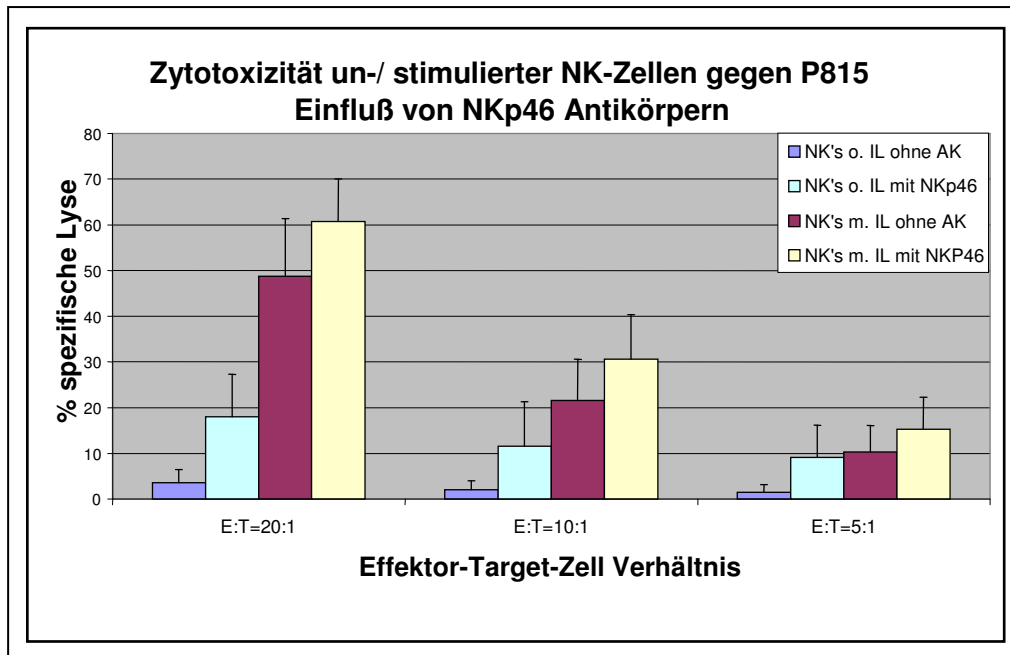


Abb. 4.13: Einfluss von NKp46 Antikörper auf die NK-Zell Zytotoxizität

Tab. 4.4: Durchschnittliche Lysen von P815 mit NKp46 Antikörper

Spezifische Lyse der unstimulierten Zellen				Spezifische Lyse der stimulierten Zellen			
o. AK	Mit NKp46	x-fache Steigerung	p	o. AK	Mit NKp46	x-fache Steigerung	p
4	18	4,5	<0.0001	49	61	1,25	0.0002
2	12	6,0	<0.0001	22	31	1,41	0.0042
1,5	9	6,0	<0.0001	10	15	1,5	0.0159

Es konnte also gezeigt werden, dass sich durch Aktivierung der verschiedenen, aktivierenden NCR-Rezeptoren mittels entsprechender Antikörper die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen gegenüber P815 unterschiedlich stark steigern lässt. Die Aktivierung des NKp46 Rezeptors vermittelte dabei, sowohl bei unstimulierten als auch bei stimulierten NK-Zellen, den stärksten Effekt. Alle Ergebnisse zeigen dabei eine starke Signifikanz. Eine NKp30 Aktivierung führte nur bei den unstimulierten NK-Zellen zu einer signifikanten Steigerung der Zytotoxizität, wohingegen die NKp44 Aktivierung keinen nennenswerten

Einfluss auf den lytischen Effekt der NK-Zellen, unabhängig von ihrem Aktivitätsgrad, hatte.

#### 4.4.2 Auswirkungen von CD16 und NKG2D Antikörpern auf die NK-Zell Zytotoxizität, im Vergleich zu NKp46

Um die durch den NKp46-Antikörper vermittelte natürliche Zytotoxizität der NK-Zellen mit der ADCC der NK-Zellen zu vergleichen, wurde in einer nächsten Versuchsreihe parallel der Effekt von CD16- sowie NKp46-Antikörpern auf die lytische Potenz der NK-Zellen gemessen. Dazu wurde wiederum eine Reihe von Zytotoxizitätsassays gegen P815 durchgeführt und die Ergebnisse hinterher zusammengefasst.

Zusätzlich wurde in dieser Testreihe auch parallel ein NKG2D-Antikörper eingesetzt und dessen Einfluss auf die NK-Zellen ebenfalls untersucht.

Die Abbildungen 4.14 und 4.15 zeigen die gemittelten Ergebnisse der 4 durchgeführten Tests.

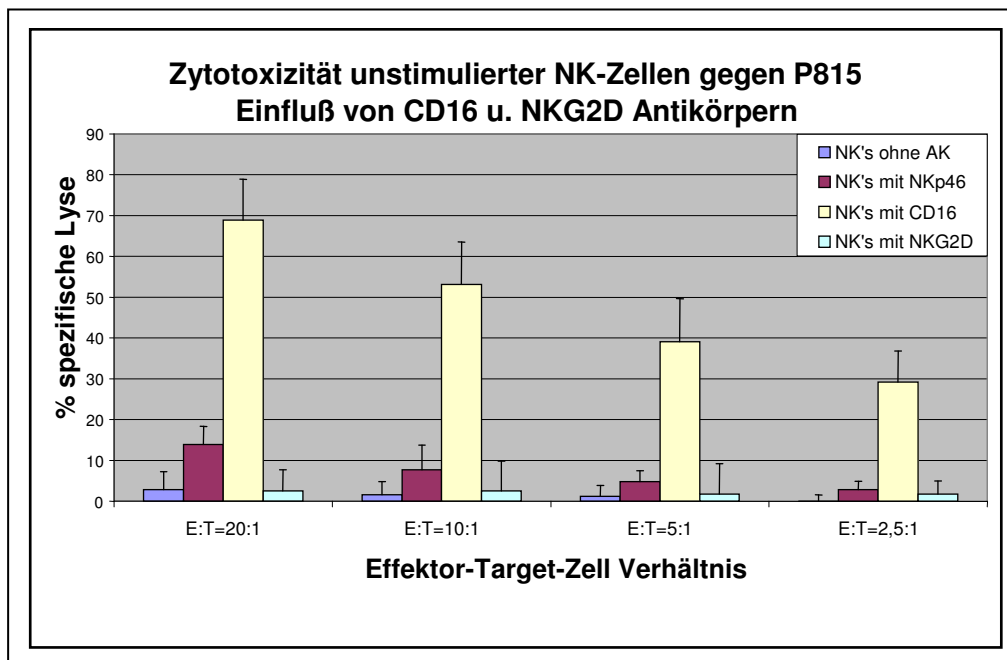
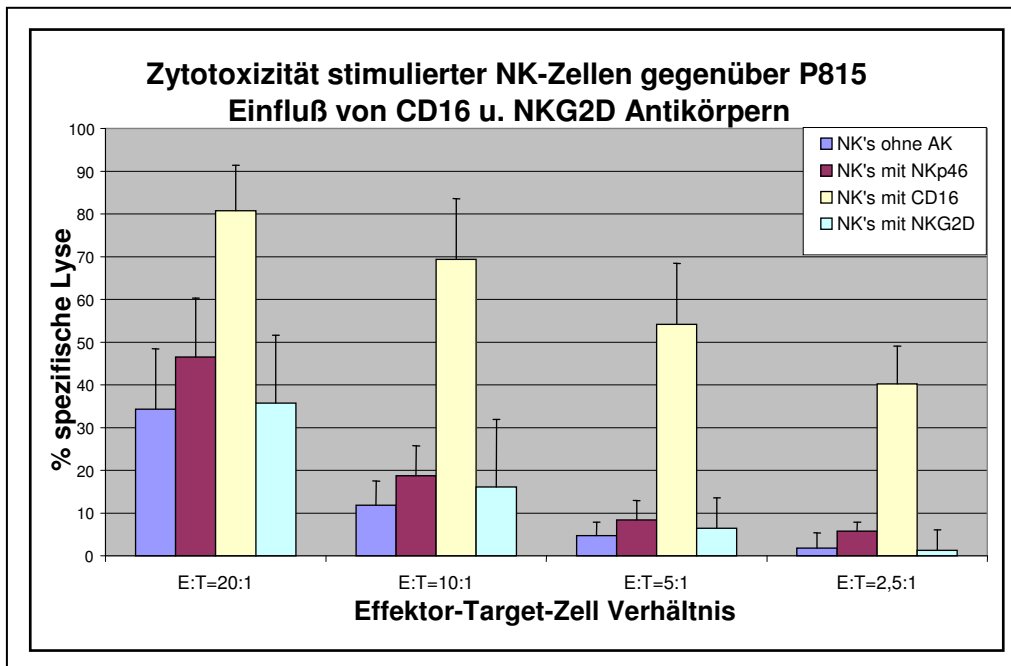


Abb. 4.14: Einfluss von CD16 u. NKG2D auf ruhende NK-Zellen



**Abb. 4.15: Einfluss von CD16 u. NKG2D auf stimulierte NK-Zellen**

Wie bereits in der 1. Versuchsreihe, zeigt sich eine deutliche Steigerung der Zelllyse durch den NKp46-Antikörper. Allerdings bewirkt der Einsatz des CD16-Antikörpers eine noch bedeutend stärker ausgeprägte NK-Zell Aktivität gegen die eingesetzten Targetzellen und dies bei allen Verdünnungsstufen und unabhängig von einer eventuellen vorherigen Stimulierung der NK-Zellen. Der durch CD16 vermittelte Effekt ist dabei so stark, dass er selbst bei unstimulierten Zellen zu höheren Lysewerten als die durch NKp46 vermittelte natürliche Zytotoxizität bei stimulierten NK-Zellen führt. So sorgte beispielsweise bei einem E:T Verhältnis von 20:1 der CD16-Antikörper, im Vergleich zu NKp46, bei stimulierten NK-Zellen zu einer 1,7-fach höheren, bei unstimulierten Zellen sogar zu einer fast 5-fachen Zelllyse.

In Tabelle 4.5 sowie 4.6 werden die Ergebnisse mit CD16 und NKp46 aus diesen 4 Tests im direkten Vergleich dargestellt.

Tab. 4.5: spezifische Lyse von P815 durch ruhende NK-Zellen mit NKp46 u.CD16

E:T	Spez.Lyse ohne Ak	Einsatz von NKp46- Antikörper			Einsatz von CD16- Antikörper		
		Spez. Lyse	x-fache Steigerung	p	Spez. Lyse	x-fache Steigerung	p
20:1	3	14	4,67	0.0067	69	23	<0.0001
10:1	2	8	4	0.0324	53	26,5	<0.0001
5:1	1	5	5	0.0400	39	39	0.0005

Tab. 4.6: spezifische Lyse von P815 durch stimulierte NK-Zellen mit NKp46 u.CD16

E:T	Spez.Lyse ohne Ak	Einsatz von NKp46- Antikörper			Einsatz von CD16- Antikörper		
		Spez. Lyse	x-fache Steigerung	p	Spez. Lyse	x-fache Steigerung	p
20:1	34	47	1,38	0.0023	81	2,38	0.0003
10:1	12	19	1,58	0.0457	69	5,75	0.0019
5:1	5	8	1,6*	0.0596	54	10,8	0.0046

\* = Ergebnis nicht unterhalb des Signifikanzniveaus

Die Ergebnisse zeigen also, dass obwohl der Einsatz des NKp46-Aks zu einer deutlichen Erhöhung der NK-Zell Zytotoxizität und damit der spezifischen Targetzell-Lyse führt, eine Aktivierung der NK-Zellen über FcγRIII noch immer zu deutlich höheren Lyseraten führt.

Im Gegensatz zu diesen beiden Antikörpern zeigte der Einsatz des NKG2D-Antikörpers keinerlei signifikanten Auswirkungen auf die Zytotoxizität der NK-Zellen gegenüber den P815 Zellen, weder bei unstimulierten noch bei stimulierten Zellen.

#### 4.4.3 Auswirkungen des kombinierten Einsatzes von NKp46 mit verschiedenen weiteren Antikörpern

Nachdem die Auswirkungen der einzelnen Antikörper auf die NK-Zellen ermittelt worden sind, sollte als nächstes der Effekt von verschiedenen Antikörper-Kombinationen auf die NK-Zytotoxizität untersucht werden. Besonderes Interesse galt hierbei der Kombination von NKp46 mit weiteren Antikörpern. So sollte durch den kombinierten Einsatz der drei NKp-Antikörper, sowie durch die Kombination mit NKG2D-Ak getestet werden, ob die natürliche Zytotoxizität der Zellen durch die simultane Aktivierung mit den verschiedenen Antikörpern weiter positiv beeinflusst wird. Durch die Kombination von NKp46- mit CD16-Aks sollte darüber hinaus untersucht werden, inwieweit sich natürliche NK-Zytotoxizität sowie ADCC-Effekt gegenseitig beeinflussen.

Die Abbildungen 4.16 und 4.17 zeigen zunächst die Ergebnisse der vier durchgeführten Tests, beim Einsatz der aktivierenden Rezeptor-Antikörper.

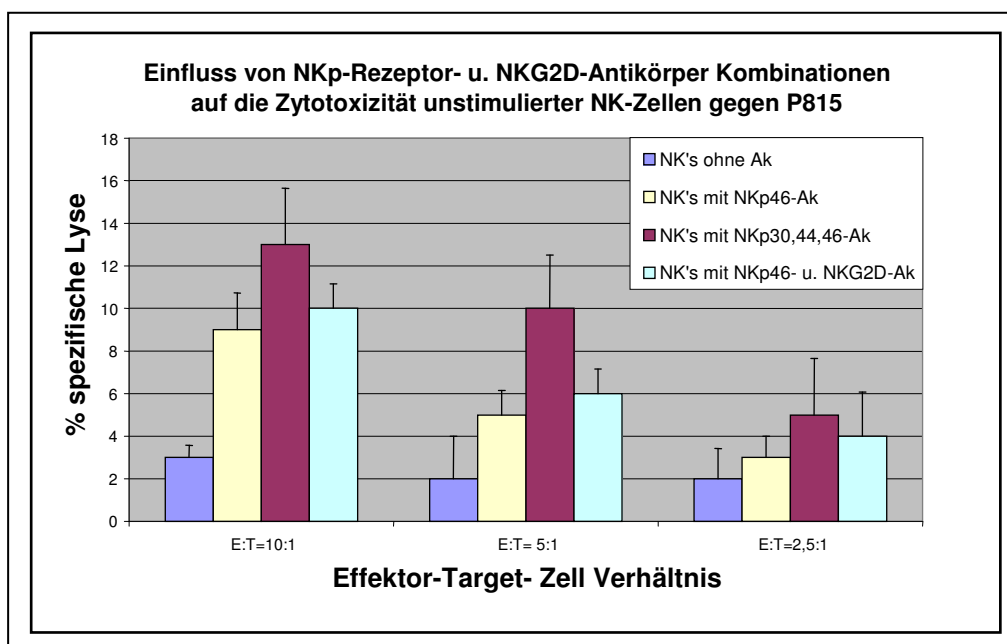
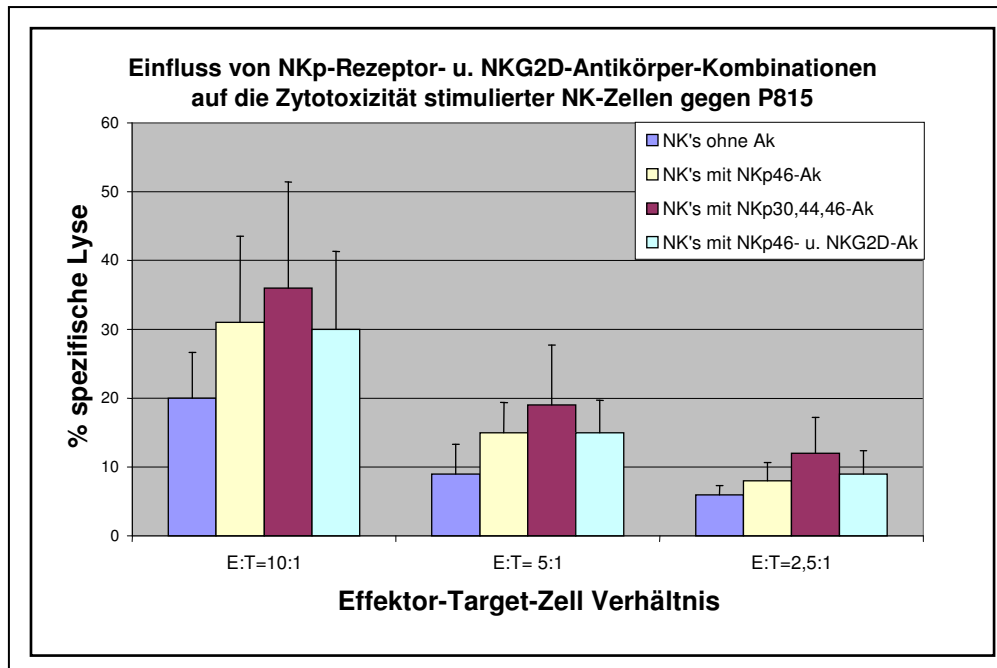


Abb. 4.16: Einfluss von Antikörper-Kombinationen auf ruhende NK-Zellen



**Abb. 4.17: Einfluss von Antikörper-Kombinationen auf stimulierte NK-Zellen**

Nach Auswertung der Testergebnisse kommt man zu dem Schluss, dass sich durch die Kombination der verschiedenen aktivierenden Antikörper NKp46, 44 und 30 im Vergleich zum Einsatz von NKp46 allein, die lytische Aktivität der NK-Zellen wohl noch weiter steigern lässt. Jedoch bleiben die Steigerungsraten dieses Effekts bei den verschiedenen Verdünnungsstufen meist jeweils knapp unterhalb des Signifikanzniveaus. (Allerdings war die Zahl der durchgeführten Tests mit  $n=3$  für unstimulierte und  $n=4$  für stimulierte Zellen auch gering gewählt.)

Die natürliche Zytotoxizität einer NK-Zelle lässt sich also durch eine simultane Aktivierung der verschiedenen aktivierenden Rezeptoren vermutlich noch weiter leicht erhöhen.

Eine genauere Betrachtung der Ergebnisse beim Einsatz der Antikörper-Kombinationen liefert Tabelle 4.7.

Tab. 4.7: spez. Lyse von P815 durch NK-Zellen mit NKp30,44 u. 46 Ak-Kombination

E:T	Spez. Lyse der unstimulierten Zellen				Spez. Lyse der stimulierten Zellen			
	Mit NKp 46	m. NK p46,44 u. 30	x-fache Steigerung	p	Mit NKp 46	m. NK p46, 44 u. 30	x-fache Steigerung	p
10:1	9	13	1,45*	0.1628	31	36	1,16*	0.0590
5:1	5	12	2,4*	0.0628	15	20	1,33*	0.1228
2,5:1	3	6	2,0*	0.1217	8	12	1,56	0.0138

\* = Ergebnis nicht unterhalb des Signifikanzniveaus

Allerdings bleiben auch hier, trotz kombinierten Einsatzes der aktivierenden Antikörper und damit weiter gesteigerter natürlicher Zytotoxizität, die spezifischen Lyseraten noch weit unter denen der durch CD16 vermittelten Lyseraten. Siehe auch Tabelle 4.8.

Daneben zeigte sich, dass die Kombination von NKp46- mit NKG2D-Antikörpern, im Vergleich zum Einsatz von NKp46 alleine, keinen Einfluss auf die NK-Zelle hat. Dies lässt sich gut mit der Erkenntnis aus der vorherigen Testreihe vereinbaren, in der die alleinige Inkubation der Targetzellen mit NKG2D auch keinen Einfluss auf die NK-Aktivität zeigte.

Die Testergebnisse der 4 Tests mit CD16-Inkubation sind aufgrund der besseren Übersicht in separaten Schaubildern dargestellt. Siehe Abbildung 4.18 und 4.19.



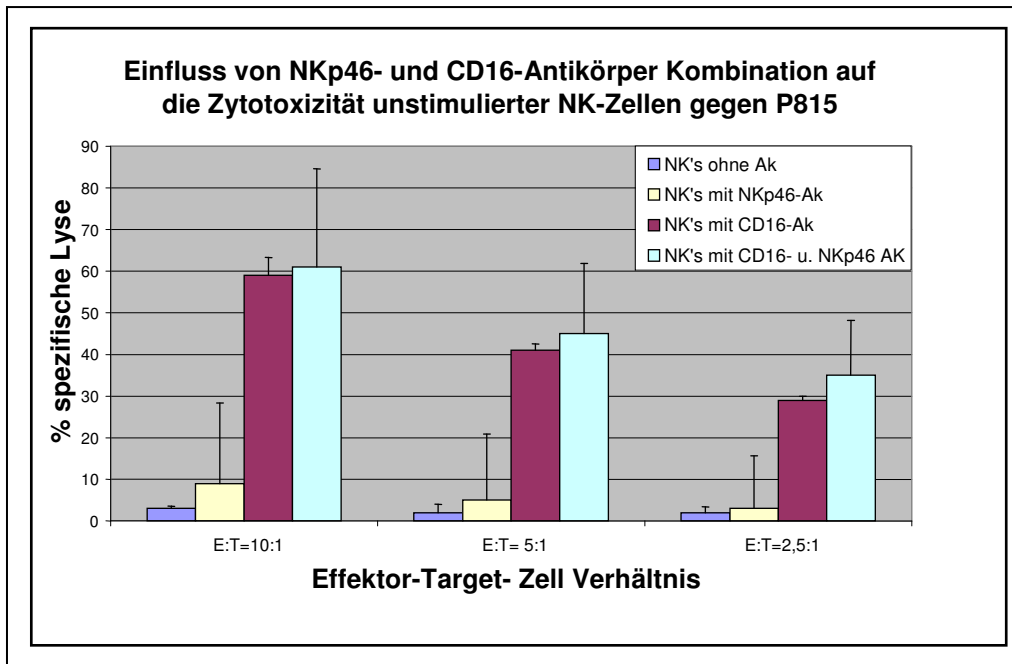


Abb. 4.18: Einfluss von NKp46 u. CD16 Ak-Kombination auf ruhende NK-Zellen

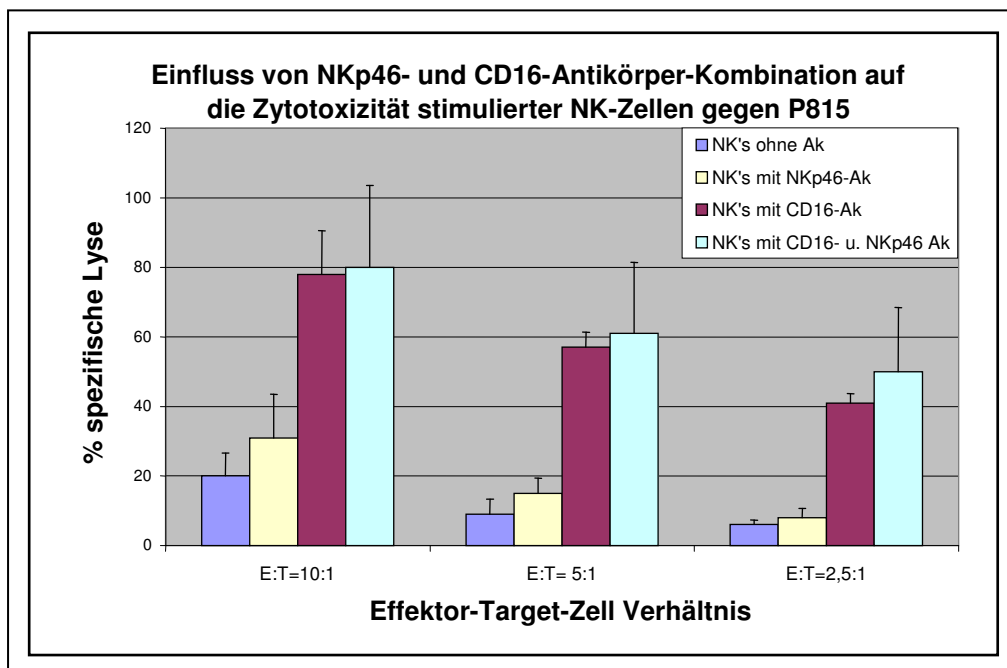


Abb. 4.19: Einfluss von NKp46 u. CD16 Ak-Kombination auf stimul. NK-Zellen

Man erkennt, dass wie schon in der Testreihe zuvor, der durch den CD16-Antikörper vermittelte zytotoxische Effekt zu den stärksten Lyseraten führt. Erstaunlicherweise führt eine Kombination von CD16- mit NKp46-Antikörpern zu keiner weiteren nennenswerten Steigerung der Zelllyse im Vergleich zum

Einsatz von CD16 allein. So ergibt sich in keiner Verdünnungsstufe ein signifikanter Unterschied zwischen den zwei Gruppen (bei allen gilt,  $p > 0,5687$ ). Die Effekte der ADCC, sowie der natürlichen Zytotoxizität einer NK-Zelle scheinen sich also nicht weiter gegenseitig zu verstärken. Vielmehr scheint die lytische Kapazität eine zur ADCC aktivierten NK-Zelle bereits soweit gesteigert zu sein, dass eine gleichzeitige Beeinflussung der natürlichen Zytotoxizität der Zelle keine Rolle spielt.

Einzig durch eine allgemeine Stimulierung der NK-Zelle, hier durch Inkubation mit IL2 erfolgt, ließ sich eine weitere Steigerung der ADCC erzielen. (Siehe Tabelle 4.8)

**Tab. 4.8: Steigerung der spez. Lysen mit CD16 durch IL2**

E:T	Spez. Lyse mit CD16 ohne IL2	Spez. Lyse mit CD16 und IL2	x-fache Steigerung	p
10:1	59	78	1,32	0.0063
5:1	41	57	1,39	0.0091
2,5:1	29	41	1,41	0.0441

#### **4.4.4 Auswirkungen von CD158a, CD158b und CD158e-Antikörpern auf die NK-Zytotoxizität gegen P815**

Neben den Auswirkungen der aktivierenden Antikörper sollte auch der Einsatz von gegen inhibitorische Rezeptoren gerichteter Antikörper untersucht werden. Dazu wurden die KIR-Antikörper CD158a, CD158b und CD158e (NKB1) ebenfalls im Zytotoxizitätstest gegen die P815 Zelllinie untersucht.

Die Abbildung 4.20 stellt die Auswirkungen der CD158a und CD158e Antikörper auf die Zytotoxizität der NK-Zellen in 3 Tests gegen P815 dar.

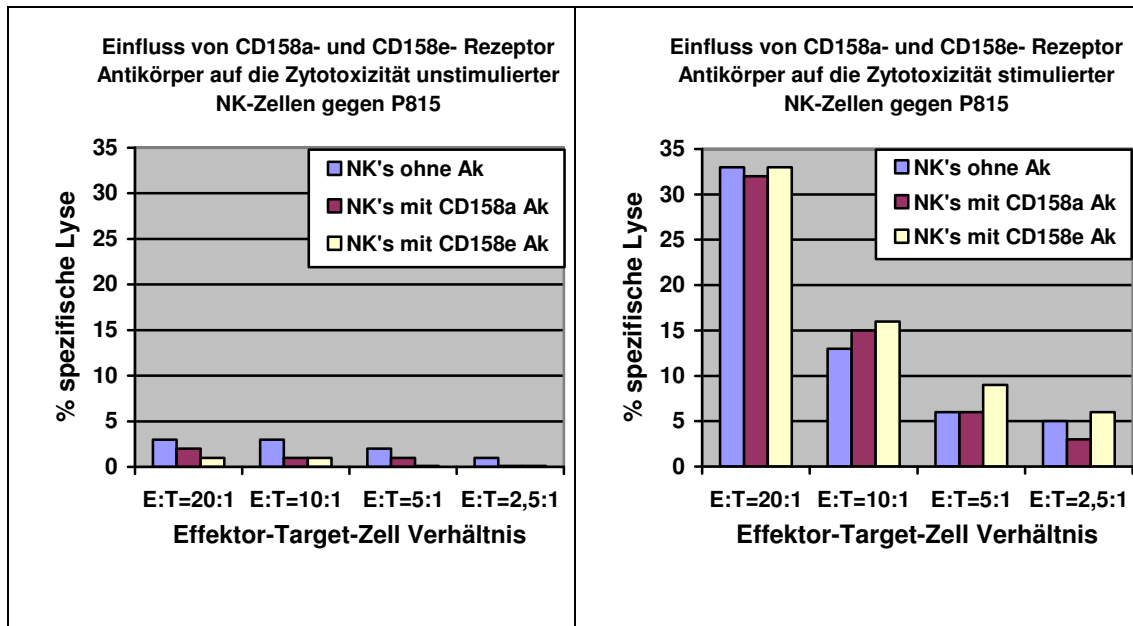


Abb. 4.20: Einfluss von CD158a und CD158e Antikörpern auf NK-Zellen

Es zeigt sich, dass die vorherige Inkubation der Targetzellen mit CD158a, wie auch mit CD158e, zu einer Verminderung des lytischen Potentials der unstimulierten NK-Zellen führt. Allerdings ist diese Aussage kritisch zu betrachten, da die spezifischen Lyseraten insgesamt sehr gering und die Anzahl der Versuche mit  $n=3$  niedrig gewählt sind, weshalb schon geringe absolute Lyse-Änderungen große relative Änderungen bedingen. Gegen stimulierte NK-Zellen zeigen die beiden Antikörper des Weiteren keinen inhibierenden Effekt. Daraus kann man folgern, dass der vermittelte inhibitorische Effekt entweder nur ausreicht die Aktivität einer unstimulierten NK-Zelle zu vermindern, bzw. so gering ausgeprägt ist, dass er nur bei diesen überhaupt ins Gewicht fällt.

Wie bereits erwähnt, wurde mit dem CD158b Antikörper ein weiterer inhibierender Rezeptor-Antikörper untersucht. Dabei wurden insgesamt 6 Tests durchgeführt, deren Ergebnisse in Abbildung 4.21 dargestellt sind.

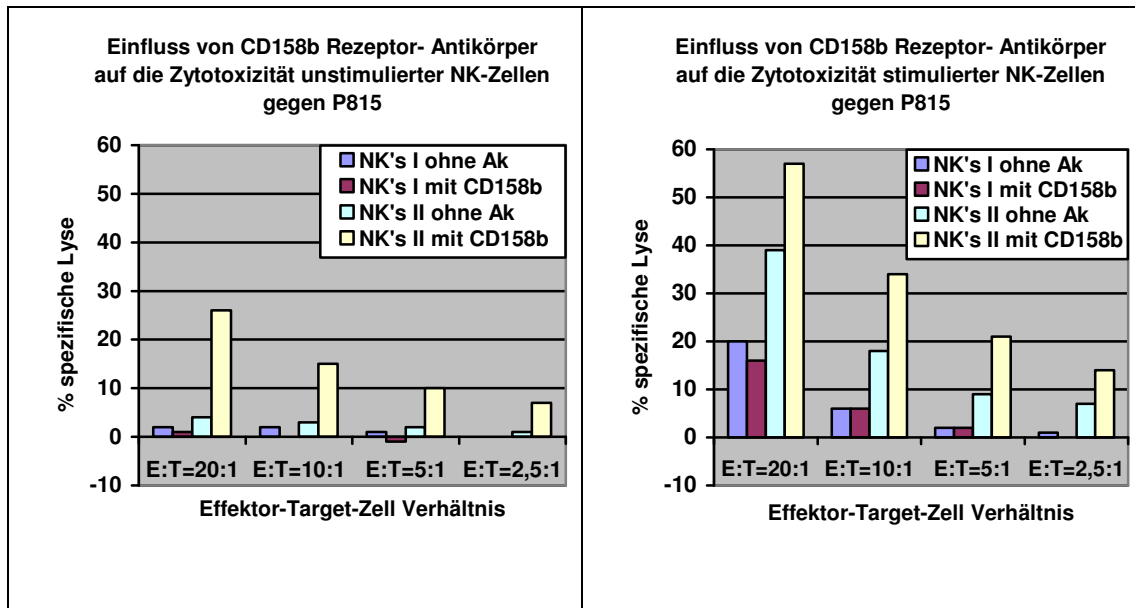


Abb. 4.21: Einfluss von CD158b Antikörper auf NK-Zellen

Erstaunlicherweise zeigte sich bei der Auswertung der Testergebnisse, dass der Einsatz des CD158b Antikörpers nur bei der Hälfte der durchgeführten Tests zu der erwarteten Minderung der Zytotoxizität führte. Wobei auch hier der inhibitorische Effekt des CD158b Aks eigentlich nur bei den unstimulierten NK-Zellen vorhanden war, jedoch erreichten die Ergebnisse auch hier keine Signifikanz. Tabelle 4.9 stellt die Resultate dieser Gruppe dar.

Tab. 4.9: spezifische Lyse von P815 durch NK-Zellen mit CD158b Antikörper, I

E:T	Spez. Lyse, unstimulierte Zellen				Spez. Lyse, stimulierte Zellen			
	Ohne Ak	Mit CD 158b	x-fache Senkung	p	Ohne Ak	Mit CD 158b	x-fache Senkung	p
20:1	2	1	0,5*	0.3823	20	16	0,80*	0.6281
10:1	2	0,1	0,05*	0.0742	6	6	1*	0.9480
5:1	1	-1	-*	0.6213	2	2	1*	0.8820

\* = Ergebnis nicht unterhalb des Signifikanzniveaus

Bei der anderen Hälfte der Tests führte der Antikörper stattdessen überraschend zu einer deutlichen Erhöhung der Lyseraten, sowohl bei den

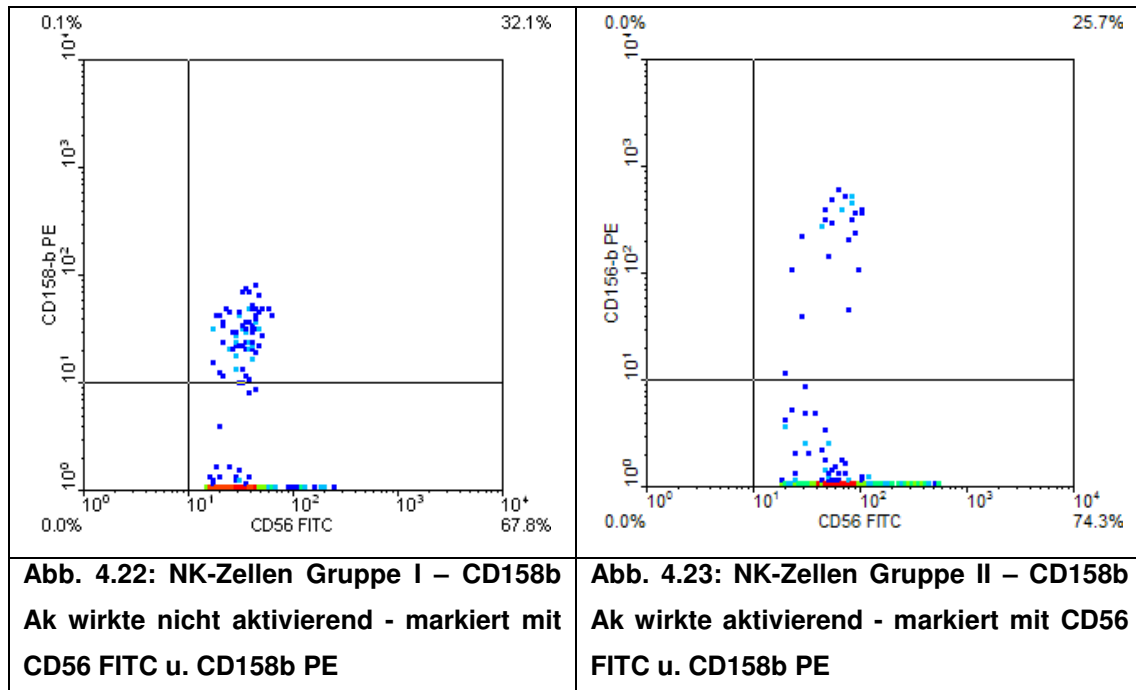
unstimulierten wie auch bei den stimulierten Zellen. Die NK-Zellen dieser Spender schienen durch den CD158b Antikörper also aktiviert zu werden. Tabelle 4.10 zeigt die Ergebnisse bei dieser Gruppe an.

**Tab. 4.10: spezifische Lyse von P815 durch NK-Zellen mit CD158b Antikörper, II**

E:T	Spez. Lyse, unstimulierte Zellen				Spez. Lyse, stimulierte Zellen			
	Ohne Ak	Mit CD 158b	x-fache Steigerung	p	Ohne Ak	Mit CD 158b	x-fache Steigerung	p
20:1	4	26	6,5	0.0110	39	57	1,46	0.0315
10:1	3	15	5,0	0.0494	18	34	1,89	0.0310
5:1	2	10	5,0	0.074*	9	21	2,33	0.0285

\* = Ergebnis nicht unterhalb des Signifikanzniveaus

Um dieses Phänomen genauer zu analysieren, wurden NK-Zell Proben der jeweiligen Spender mittels FACS-Analyse auf eventuelle Unterschiede in der Expression ihrer CD158b Rezeptoren hin untersucht. Die Abbildungen 4.22 und 4.23 zeigen je ein Beispiel typischer FACS-Analysen der beiden Gruppen.



Die Auswertung der FACS-Analysen erbrachte keinen nennenswerten Unterschied bezüglich der CD158b Rezeptor Expression zwischen den beiden NK-Zell Gruppen. Zwar zeigte sich bei den NK-Zellen eines Spenders der Gruppe I eine verstärkte CD158b Rezeptor Expression (59,9%), jedoch war die Rezeptor Expression auf den Zellen der übrigen Spender der beiden Gruppen ansonsten nicht nennenswert unterschiedlich (zwischen 18,1% u. 32,1%).

Somit konnte ein eventueller Zusammenhang zwischen der unterschiedlichen Wirkung des CD158b Antikörpers auf die NK-Zellen sowie einem entsprechenden Unterschied in der Expression des Rezeptors auf den verschiedenen NK-Zellen nicht hergestellt werden.

#### **4.4.5 Auswirkungen des bispezifischen CD19\**NKp46*-Antikörpers auf die NK-Zell vermittelte Lyse B-Zell leukämischer Blasten im Vergleich zu einem chimären CD19-Antikörper**

Nachdem sich mit Hilfe des *NKp46* Antikörpers eine deutliche Steigerung der NK-Zell Zytotoxizität erzielen ließ, war der nächste Schritt den Effekt eines neu konstruierten, bispezifischen CD19\**NKp46*-Antikörpers auf die lytische Aktivität der NK-Zellen im Zytotoxizitätstest gegen CD19<sup>+</sup> leukämische Blasten zu untersuchen. Als Targetzellen dienten in diesem Fall eingefrorene Proben von Leukämieblasten ehemaliger B-Zell Leukämiepatienten. NK-Zellen wurden wiederum aus dem Blut freiwilliger, gesunder Spender isoliert. Aufgrund neuer klinischer Erfahrungen wurden die NK-Zellen zudem statt mit IL2 mit IL15 stimuliert. Um eine bessere Vergleichbarkeit zu erhalten, wurden in den Tests auch jeweils Testreihen mit einem chimären CD19-Antikörper durchgeführt, der bekanntermaßen zu außergewöhnlich guten Lyseraten mittels ADCC führt. In den Abbildungen 4.24 und 4.25 sind die Ergebnisse der 8 durchgeführten Tests grafisch zusammengefasst, die jeweiligen Auswertungen sind in den anschließenden Tabellen dargestellt.

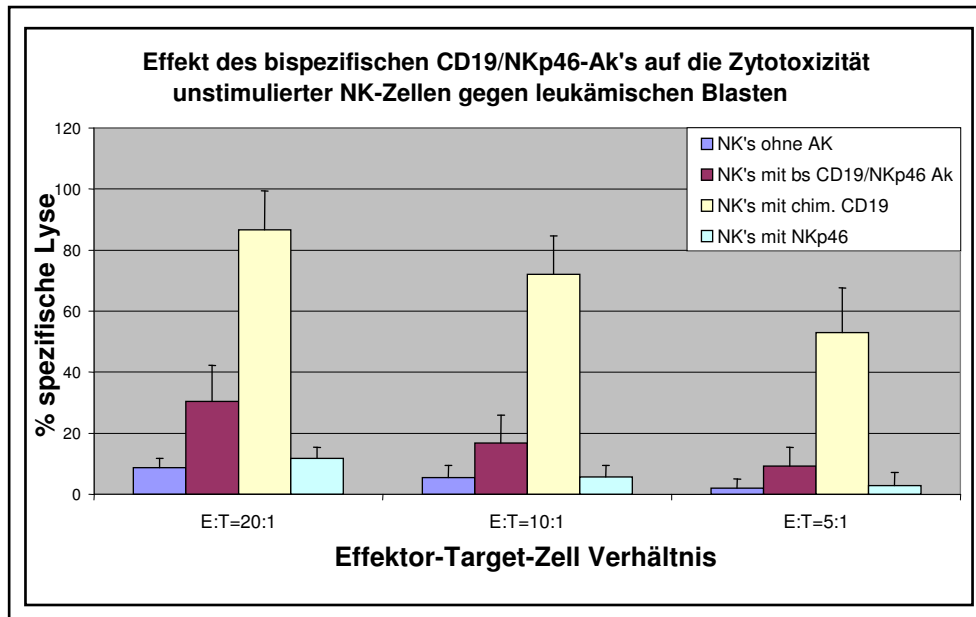
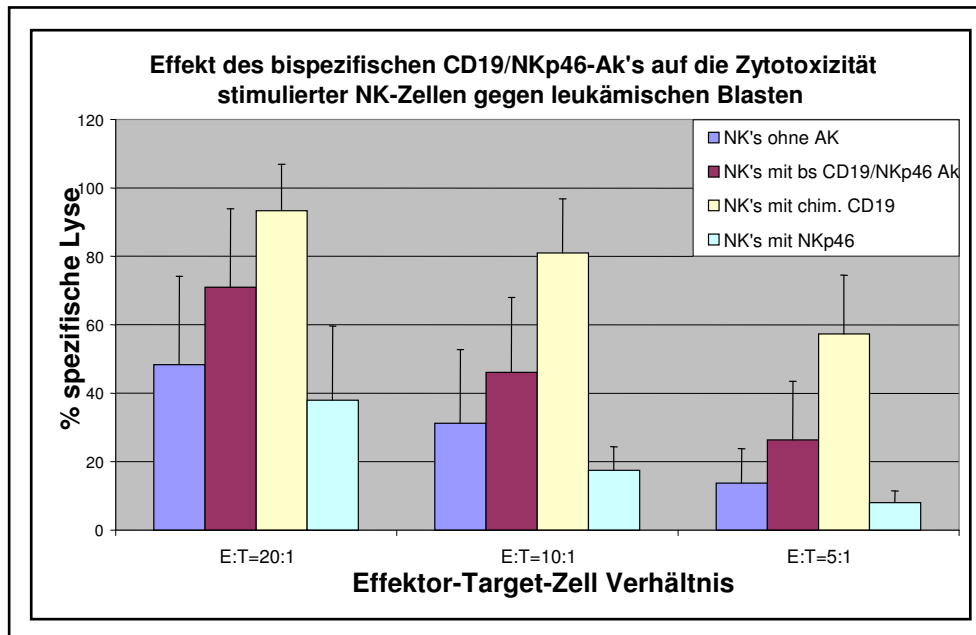


Abb. 4.24: Einfluss des NKp46\*CD19 Antikörpers auf die Lyse leukämischer Blasten durch ruhende NK-Zellen

Tab. 4.11: spez. Lyse leukäm. Blasten durch ruhende NK-Zellen mit CD19\*NKp46 Ak

E:T	Spez. Lyse ohne Ak	Einsatz v. CD19*NKp46 Ak			Einsatz von chim. CD19 Ak		
		Spez. Lyse	x-fache Steigerung	p	Spez. Lyse	x-fache Steigerung	p
20:1	9	30	3,33	0.0002	87	9,67	<0.0001
10:1	6	17	2,83	0.0020	72	12,0	<0.0001
5:1	2	9	4,5	0.0065	53	26,5	<0.0001



**Abb. 4.25:** Einfluss des NKp46\*CD19 Antikörpers auf die Lyse leukämischer Blasten durch stimulierte NK-Zellen

**Tab. 4.12:** spez. Lyse leukäm. Blasten durch stimul. NK-Zellen mit CD19\*NKp46-Ak

E:T	Spez. Lyse o. Ak	Einsatz von CD19*NKp46 Ak			Einsatz von chim. CD19 Ak		
		Spez. Lyse	x-fache Steigerung	p	Spez. Lyse	x-fache Steigerung	p
20:1	48	71	1,48	0.0008	93	1,94	<0.0001
10:1	31	46	1,48	0.0112	81	2,61	0.0005
5:1	14	26	1,86	0.0030	57	4,07	0.0023

Es zeigt sich, dass der bispezifische CD19\*NKp46-Antikörper in allen Versuchen, sowohl bei unstimulierten als auch bei stimulierten NK-Zellen, zu einer deutlichen Steigerung der Lyseraten führt. Dieser Effekt ist bei allen Verdünnungsstufen hoch signifikant. Allerdings führt der ebenfalls eingesetzte chimäre CD19-Antikörper zu einer noch stärkeren Lyseerhöhung, dies wiederum ADCC vermittelt.



Im Gegensatz dazu führt der von uns zur Kontrolle der Wirkung des bispezifischen Antikörpers eingesetzte NKp46-Antikörper wie erwartet zu keiner Steigerung der NK-Zell Zytotoxizität. So zeigt NKp46 bei den unstimulierten NK-Zellen fast gar keinen Effekt, bei den stimulierten NK-Zellen scheint der freie NKp46-Antikörper, durch seine Rezeptor-blockierende Wirkung, vielmehr zu einer Senkung der Zelllyse zu führen. Allerdings zeigen die Ergebnisse hier nur teilweise eine Signifikanz. Siehe dazu auch Tabelle 4.13.

**Tab. 4.13: spezifische Lyse leukämischer Blasten durch NK-Zellen mit NKp46 Ak**

Spezifische Lyse der unstimulierten Zellen				Spezifische Lyse der stimulierten Zellen			
Ohne Ak	Mit NKp46	x-fache Steigerung	p	Ohne Ak	Mit NKp46	x-fache Minderung	p
9	12	1,33*	0.1064	48	38	0,1292*	0.1202
6	6	1,0*	0.9387	31	18	0,58*	0.0802
2	3	1,50*	0.6790	14	8	0,57	0.0464

\* = Ergebnisse nicht unterhalb des Signifikanzniveaus

In drei der Tests wurde zudem noch ein bispezifischer CD19\*CD16 Antikörper, dessen Effekt bereits in einer anderen Arbeit untersucht wurde, eingesetzt. Wie in dieser Arbeit beschrieben, führte dieser bispezifische Antikörper auch hier zu stark gesteigerten Lyseraten.

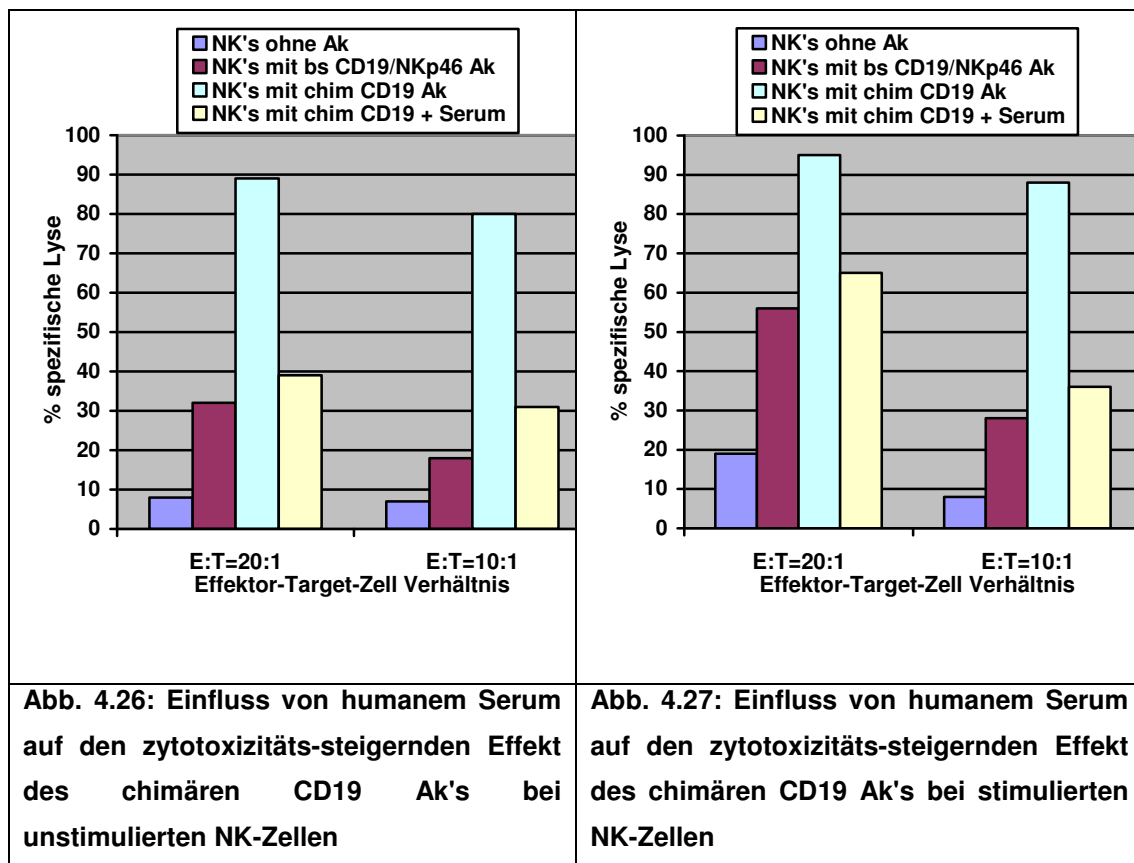
Tabelle 4.14 gibt diese durchschnittlich erzielten Lyseraten, sowie als Vergleich die spezifischen Lysen bei Einsatz des chimären CD19 Antikörpers, an.

**Tab. 4.14: Vergleich bispezifischer CD19\*CD16 Ak mit chim. CD19 Ak**

E:T	ohne IL15, mit CD19*CD16	ohne IL15, mit chim. CD19	mit IL15, mit CD19*CD16	mit IL15, mit chim. CD19
20:1	89	92	99	96
10:1	70	73	83	83
5:1	42	49	62	64

Die Ergebnisse zeigen, dass in den hier durchgeführten Tests gegen die leukämischen Blasten der chimäre CD19-Antikörper, wie auch der bispezifische CD19\*CD16-Antikörper zu nahezu identischen Lyseraten führen.

Um einen möglichen hemmenden Einfluss durch konkurrierende, endogene Immunglobuline auf den Effekt des CD19-Antikörpers zu untersuchen, wurde in drei der Tests jeweils eine zusätzliche CD19 Testreihe unter Zugabe von humanem Serum inkubiert. Die Ergebnisse dieser Testreihen sind in der folgenden Abbildung zusammengefasst.



Es zeigte sich in allen Testreihen eine deutliche Reduzierung der mittels des CD19-Antikörpers erzielten Lyseraten nach Serumzugabe. Doch selbst nach dieser Wirkungsabschwächung liegen die erzielten Lyseraten noch immer über denen des bispezifischen CD19\*NKp46-Antikörpers.

#### 4.4.6 Effekt des bispezifischen CD19\**NKp46* Antikörpers auf die Zytotoxizität von *NK*-Zellen transplantiertter Spender gegen *B*-Zell leukämische Blasten

Um den nachgewiesenen Effekt des bispezifischen CD19\**NKp46* Antikörpers auch auf die *NK*-Zellen von Patienten nach Stammzelltransplantation übertragen zu können, war es notwendig, in einer Reihe weiterer Tests *NK*-Zellen von Patienten, die zuvor eine „mismatch“ Stammzelltransplantation erhalten hatten, einzusetzen. Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von *NK*-Zellen/Lymphozyten im peripheren Blut nach Transplantation, wurden statt angereicherten *NK*-Zellen *pMNC*s der Patienten als Effektorzellen eingesetzt. Auch von diesen Zellen wurde die Hälfte jeweils zuvor mit IL15 inkubiert und stimuliert.

Die Ergebnisse drei dieser Tests sind in Abbildung 4.28 und 4.29 dargestellt, wobei eine E:T = 5:1 Reihe nur bei 2 Tests angelegt wurde.

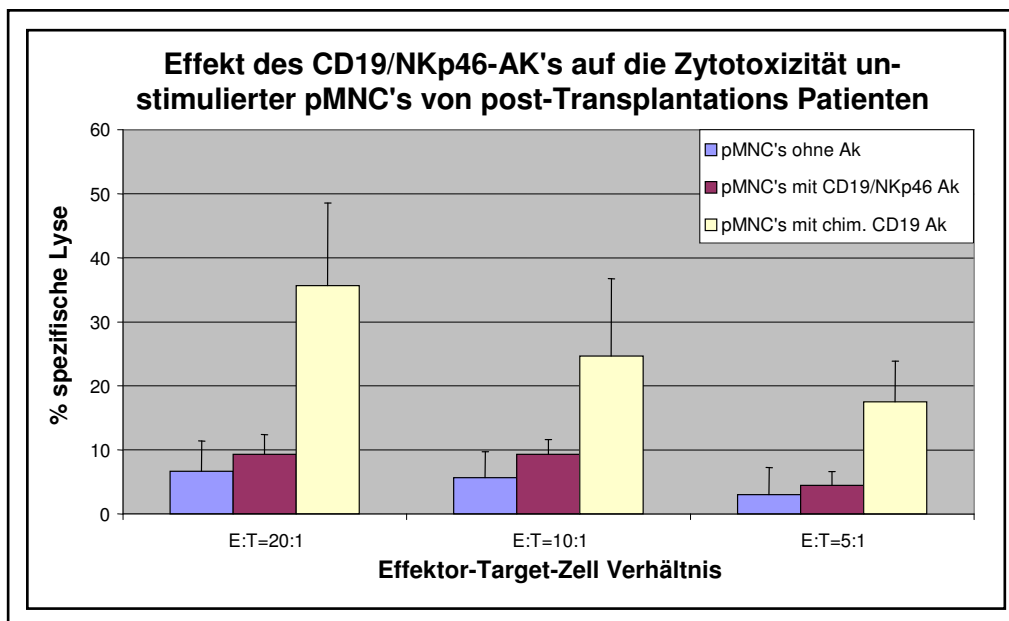
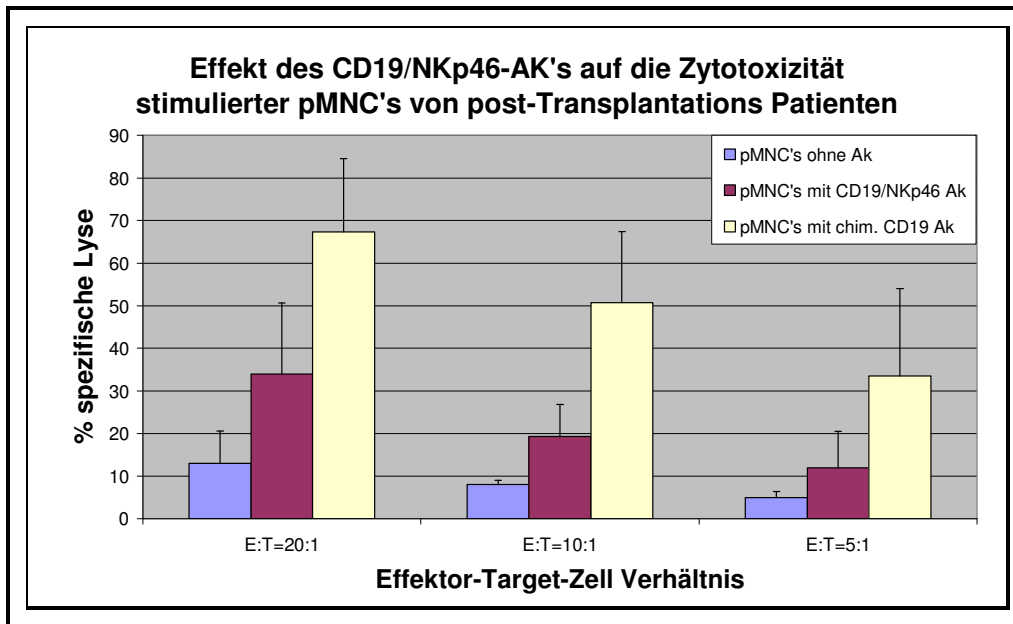


Abb. 4.28: Einfluss des *NKp46*\*CD19 Antikörpers auf die Lyse leukämischer Blasten durch unstimulierte *pMNC*s transplantiertter Patienten



**Abb. 4.29: Einfluss des NKp46\*CD19 Antikörpers auf die Lyse leukämischer Blasten durch stimulierte pMNCs transplantierter Patienten**

Die Testergebnisse zeigen, dass bei der Verwendung der frisch regenerierten Zellen von Patienten nach Transplantation, der bispezifische CD19\*NKp46 Antikörper nur bei zuvor stimulierten pMNCs einen deutlich steigernden Effekt auf die Blasten-Lyse vermittelt. Bei den drei durchgeführten Tests bleibt dieser Effekt jedoch knapp unter dem Signifikanzniveau. Eine Steigerung der Lyseraten bei unstimulierten pMNCs ist dagegen jeweils nur gering ausgeprägt und keinesfalls signifikant (siehe Tabelle 4.15).

**Tab. 4.15: Steigerung der spez. Lyseraten durch den Einsatz des CD19\*NKp46 Aks**

E:T	Steigerung der spez. Lysen bei unstimulierten Zellen		Steigerung der spez. Lysen bei stimulierten Zellen	
	x-fache Steigerung	p	x-fache Steigerung	p
20:1	1,29	0.3468*	2,62	0.0752*
10:1	1,50	0.0927*	2,38	0.0605*

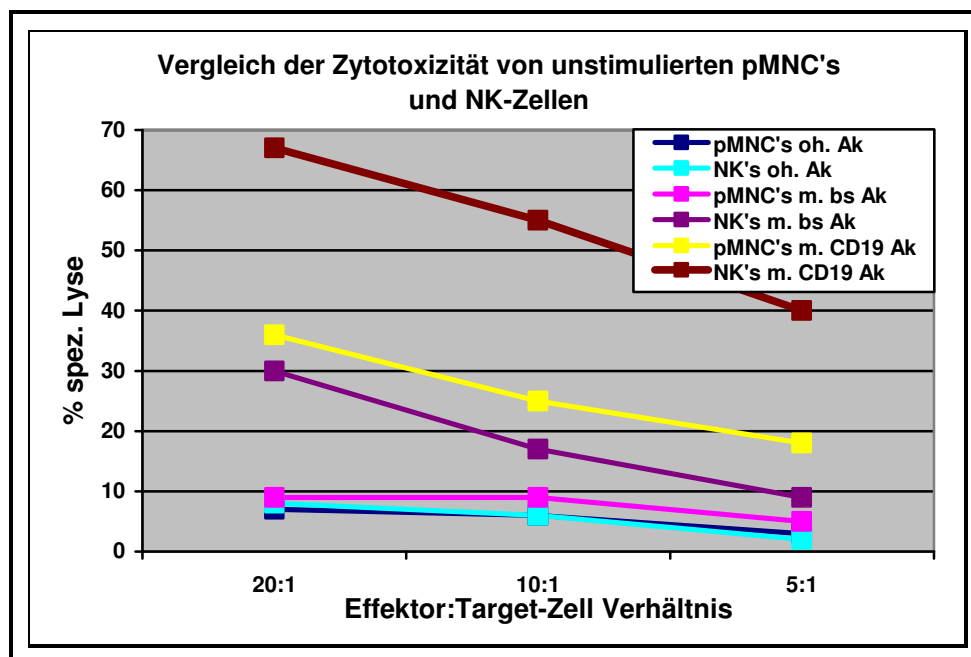
\* = Ergebnisse nicht unterhalb des Signifikanzniveaus

Im Vergleich dazu führt der Einsatz des chimären CD19-Antikörpers sowohl bei den stimulierten, wie auch bei den ruhenden Zellen zu einer signifikanten, und im Vergleich zu NKp46, deutlich stärkeren Steigerung der Zytotoxizität.

**Tab. 4.16: Steigerung der spez. Lyseraten durch Einsatz des chimären CD19 Ak**

E:T	Steigerung der spez. Lysen bei unstimulierten Zellen		Steigerung der spez. Lysen bei stimulierten Zellen	
	x-fache Steigerung	p	x-fache Steigerung	p
20:1	5,14	0.0216	5,15	0.0075
10:1	4,17	0.0483	6,38	0.0117

Es lässt sich des Weiteren festhalten, dass die Zytotoxizität der Patienten pMNCs, im Vergleich zu der Zytotoxizität der isolierten NK-Zellen gesunder Spender, allgemein geringer ausgeprägt scheint. So sind die durch die Patientenzellen erreichten Lyseraten, sowohl vor als auch nach Stimulation, ob mit oder ohne Einsatz der Antikörper, durchweg niedriger als die der entsprechenden Vergleichsreihe der gesunden Spender (Abb. 4.30 u. 4.31).



**Abb. 4.30: Vergleich der Zytotoxizität unstimulierter pMNCs und NK-Zellen**

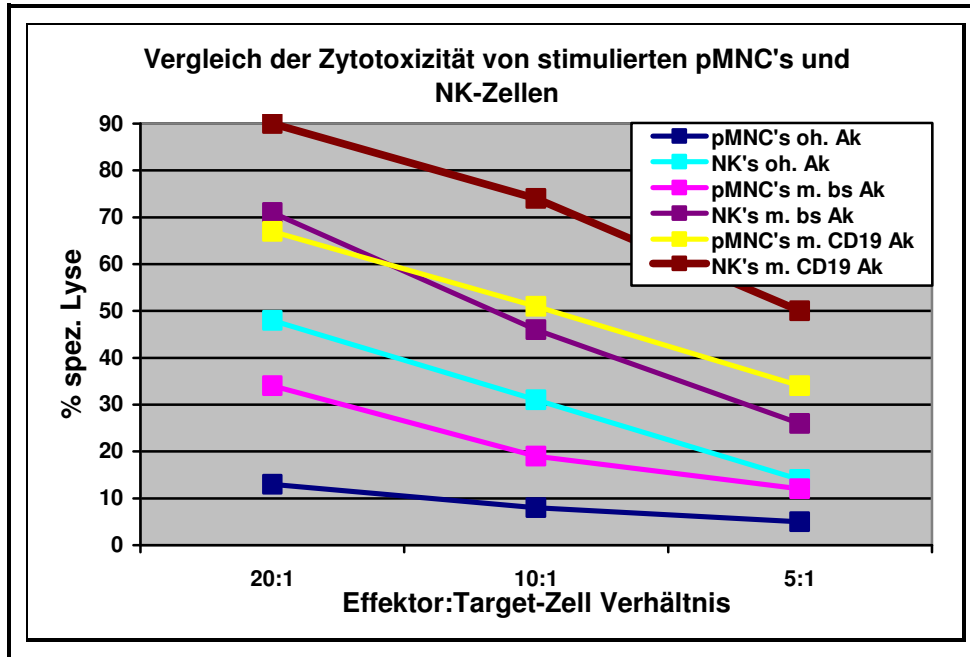


Abb. 4.31: Vergleich der Zytotoxizität stimulierter pMNCs und NK-Zellen

## 5 Diskussion

Obwohl die kindliche ALL mittlerweile in über 80% der Fälle geheilt werden kann, gibt es nach wie vor keine entscheidenden Fortschritte bezüglich des Langzeitüberlebens von kindlichen Patienten mit einer high-risk ALL. Aktuelle Studien konnten bislang nicht zeigen, dass sich durch eine hämatopoetische Stammzelltransplantation die Prognose dieser Patienten wesentlich verbessern lässt [93], [94]. Neuere Therapieansätze, wie etwa der einer zellulären Immuntherapie nach SZT, stellen viel versprechende Versuche dar, die hohe Rezidivrate nach Transplantationen zu senken. Gerade nach nicht HLA-identischen Transplantationen kommt dabei den NK-Zellen eine wichtige Bedeutung zu, da in diesen Fällen eine T-Zell Gabe mit hoher Wahrscheinlichkeit eine GvH-Reaktion auslösen würde. Bedauerlicherweise zeigen gerade akute lymphatische Leukämien oft ein hohes Maß an Resistenz gegenüber alloreaktiven NK-Zellen. Eine zusätzliche humorale Immuntherapie mit entsprechenden monoklonalen Antikörpern könnte dort zu einer Verstärkung des GvL-Effekts nach Transplantation und NK-Zell Gabe führen, und damit das Therapieansprechen dieser Leukämien möglicherweise entscheidend verbessern.

Im ersten Teil der Arbeit wurden verschiedene monoklonale Antikörper hinsichtlich ihres Einflusses auf die Zytotoxizität der NK-Zellen gegenüber der P815 Zelllinie getestet. Besonderes Interesse galt hierbei den gegen die aktivierenden NCRs gerichteten Antikörpern NKp30, NKp44 und NKp46.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einsatz eines neu entwickelten, sowohl gegen CD19 als auch Nkp46 gerichteten bispezifischen Antikörpers zur Steigerung der NK-Zell vermittelten Lyse leukämischer Blasten untersucht. Hierzu wurden verschiedene Zytotoxizitätsassays sowohl mit NK-Zellen gesunder Spender als auch mit Zellen transplantierte Patienten als

Effektorzellen durchgeführt. Um die Effektivität des CD19\* $\text{NKp46}$ -Antikörpers noch genauer beurteilen zu können, wurde er im Vergleich zu einem chimären CD19-, bzw. einem bispezifischen CD16\*CD19 Antikörper, die beide zu bekanntermaßen hohen in vitro Lyseraten führen, untersucht.

## 5.1 Methodenkritik

### 5.1.1 Zellanreicherung mit MACS und Dynabeads

Eine MACS-Anreicherung bestimmter Zellen mittels magnetisch markierter Antikörper hat mittlerweile als etablierte Methode in vielen Bereichen Verbreitung und Anwendung gefunden. Mit ihr kann eine Reinheit von bis zu 99% an gewünschten Zellen erreicht werden [95], ohne dabei Vitalität und Wachstumsverhalten der Zellen negativ zu beeinflussen [96]. Bei der NK-Zell Anreicherung mittels CD56 ergibt sich das Problem, dass ein einfacher Anreicherungsschritt für eine reine NK-Zell Anreicherung nicht ausreicht, da auch CD56<sup>+</sup> T-Zellen mit angereichert werden. Um die T-Zell Population zu eliminieren und damit die Reinheit der Anreicherung insgesamt zu verbessern, kann im Anschluss eine T-Zell Depletion mittels CD3<sup>+</sup> Dynabeads durchgeführt werden. Dies sind Antikörper die mit einem wesentlich stärkeren magnetischen Anteil versehen sind. Die so markierten Zellen können dann in einem schwachen Magnetfeld, welches die mit den MACS-Beads markierten Zellen nicht beeinflusst, separiert werden. Leider geht der dadurch erzielte, verbesserte Reinheitsgrad unweigerlich mit einem erhöhten Verlust von NK-Zellen durch die zusätzlich notwendigen Waschvorgänge einher. Ein theoretisch vorstellbarer negativer Einfluss der markierten Antikörper auf die Funktionsfähigkeit der NK-Zellen wurde in mehreren Studien untersucht und ausgeschlossen [95] [97].



### 5.1.2 Durchflusszytometrie

Mittels der Durchflusszytometrie ist es möglich, eine große Anzahl von Zellen in relativ kurzer Zeit auf die Expression von verschiedenen Oberflächenantigenen hin zu untersuchen. Dabei kann im Regelfall anhand der immer vorhandenen Positiv- bzw. Negativkontrolle eine Zuordnung der Zellen hinsichtlich positiver oder negativer Antigenexpression getroffen werden. Je nach unterschiedlich starkem Expressionsgrad können die Zellen dabei als negativ oder als schwach/stark positiv eingeteilt werden. Möchte man den Expressionsgrad eines Antigens auf verschiedenen Zellen genauer miteinander vergleichen, so muss eine quantitative Durchflusszytometrie durchgeführt werden. Darauf konnte jedoch in dieser Arbeit verzichtet werden. Eine Limitation der Durchflusszytometrie ergibt sich jedoch aus der Gebundenheit/ Abhängigkeit von dem Vorhandensein entsprechender, gegen das gewünschte Antigen spezifisch gerichteter Antikörper. So können Zellen natürlich nur auf Antigene oder Rezeptoren hin untersucht werden, zu denen bereits passende, spezifische Antikörper entwickelt wurden. In unserer Arbeit führte dies dazu, dass wir NK-Zellen nicht vollständig bezüglich ihrer genauen Expression von KIR2DS2, KIR2DL2 und KIR2DL3 einteilen konnten, da derzeit lediglich zwei Antikörper existieren, die entweder spezifisch KIR2DL3 oder unspezifisch alle drei Antigene erkennen.

### 5.1.3 Zytotoxizitätstest

Es wurde alternativ zu dem weit verbreiteten <sup>51</sup>Chromfreisetzungstest der mittlerweile etablierte, nicht-radioaktive BADTA-release-assay verwendet, wie er von Blomberg et al. ausführlich beschrieben wurde [92]. Mit Hilfe dieser Assays, sowie entsprechender Antikörper, ist es möglich bestimmte NK-Rezeptoren hinsichtlich ihrer Funktion weiter zu charakterisieren. Eine mögliche Limitation des Tests besteht jedoch darin, dass durch Aktivierung und Vernetzung der NK-Rezeptoren mittels Antikörper womöglich wichtige

Parameter der Rezeptor/Liganden-Interaktion während des Zellkontaktes, wie z.B. Dichte, Topologie oder spezifische Membranlokalisation der Rezeptoren, nicht berücksichtigt werden können. Als ein Problem der Tests zeigte sich, dass bei einer Reihe von Assays die Unterschiede zwischen Maximal- und Spontanlyse der eingesetzten Targetzellen zu gering ausfielen um ein auswertbares Ergebnis zu erhalten. Durch Wiederholung dieser Tests konnte aber zumeist noch ein verwertbares Ergebnis erreicht werden. Ein weiteres, mehr praktisches Problem der Zytotoxizitätstests besteht in der schlechten Vergleichbarkeit von ADCC-Ergebnissen, die bei Einsatz von verschiedenen, jedoch gegen dasselbe Antigen gerichteten Antikörpern erzielt werden. So können Antikörper, die beide das gleiche Antigen erkennen, allein aufgrund von unterschiedlicher Strukturzusammensetzung zu teilweise vollkommen unterschiedlichen Lyse-Ergebnissen führen. Barbin et al. beschreiben beispielsweise welchen Einfluss eine variable Glykosylierung von CD19 Antikörpern auf deren zytolytisches Potential hat [98]. Und auch bei der Untersuchung von NKp46 in unserer Arbeit führte der Einsatz von Antikörpern verschiedener Firmen (Becton; Arcris) zu leicht unterschiedlichen Lyse-Ergebnissen.

## 5.2 Anreicherung der NK-Zellen

Da NK-Zellen nur etwa 10% der im Blut zirkulierenden Lymphozyten ausmachen, besitzen NK-Separation und NK-Anreicherung einen wichtigen Stellenwert im Hinblick auf deren klinischen Einsatz. Speziell bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation, und bei Patienten die allogene NK-Zell Infusionen als zelluläre Immuntherapie erhalten sollen, sind diese Verfahren von besonderer Bedeutung. Könnten doch in solchen Fällen kontaminierende T-Zellen sehr wahrscheinlich eine GvH-Reaktion auslösen.

In dieser Arbeit wurde zur Isolierung der NK-Zellen eine einfache MACS-Anreicherung der CD56<sup>+</sup> Zellen durchgeführt. Nach dieser einfachen

Positivanreicherung ergab sich ein durchschnittlicher NK-Zell Anteil von  $80,72 \pm 3,76$  %. Dieses Ergebnis deckt sich in etwa mit dem Ergebnis einer früheren Studie zur NK-Zell Anreicherung unserer Arbeitsgruppe, dort betrug die durchschnittliche Reinheit nach dem ersten Anreicherungs-schritt ca. 83% [99]. In der genannten Studie konnte weiter gezeigt werden, dass sich durch eine anschließende T-Zell Depletion die Reinheit der NK-Zellen bis auf ca. 97% steigern lässt. Durch diesen Schritt ließen sich die Lyseraten im Zytotoxizitätstest noch etwas weiter steigern. In unserer Arbeit wurde eine einfache NK-Zell Anreicherung jedoch als ausreichend angesehen, weshalb auf eine, sich an die CD56-Anreicherung anschließende, CD3-Depletion verzichtet wurde.

### **5.3 Einfluss von gegen NKp46, NKp44 und NKp30 gerichteten monoklonalen Antikörpern auf die NK-Zytotoxizität**

Mehrere Studien haben gezeigt, dass die aktivierenden NK-Rezeptoren NKp30, NKp44 und NKp46 eine bedeutende Rolle in der NK-Zell vermittelten Zytotoxizität gegenüber verschiedensten Tumor-Zelllinien einnehmen. Dabei korreliert in einem Großteil der Fälle das Ausmaß der NCR Expression auf den NK-Zellen direkt mit deren Fähigkeit zur Tumorzelllyse [68]. Da diese NK-Zell aktivierenden NCRs darüber hinaus rein spezifisch von NK-Zellen exprimiert werden, stellen sie eine interessante Option als Zielrezeptoren für Antikörper bei einer humoralen Immuntherapie nach allogener SZT dar. Wir untersuchten in unserer Arbeit deshalb zunächst den Einfluss monoklonaler, gegen die einzelnen NCRs gerichteter Antikörper auf die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen gegenüber der P815 Zelllinie.

Unsere Tests ergaben, dass von den verschiedenen NCRs NKp46 den stärksten Einfluss auf die Zytotoxizität der NK-Zellen besitzt. So führten entsprechende Antikörper sowohl bei stimulierten, wie auch bei ruhenden NK-Zellen zu einer deutlichen Steigerung der P815-Lyseraten. Eine neuere Arbeit

von Bryceson et al. zeigt ähnlich gute Ergebnisse für den Einsatz von NKp46-Antikörpern bei Interleukin-stimulierten NK-Zellen [100]. Mit durchschnittlich 50% liegt dort die mittlere spezifische Lyserate bei einem E:T Verhältnis von 10:1 sogar noch über der von uns erreichten spezifischen Lyse von 31%. Dabei gilt es jedoch zu beachten, dass sich die Arbeiten sowohl in der Reinheit der eingesetzten NK-Zellen (97% vs. 81%), der Konzentration an monoklonalem Antikörper (0,5µg/ml vs. 1µg/ml) als auch in der Menge des zugesetzten IL2 (100U/ml rIL2 + 10% hIL2 vs. 40U/ml rIL2) deutlich unterscheiden. Auch Westgaard et al. belegen in einer Studie mit aus Ratten isolierten NK-Zellen den positiven Effekt von NKp46 hinsichtlich der NK-Zytotoxizität. Die dort erreichten Lyseraten lagen bei E:T=12,5:1 mit ca. 47%, ebenfalls über der von uns bei ähnlichem Verhältnis erreichten Zellyse, auch dort lag jedoch die Reinheit der NK-Zellen bei 98%, während über IL2, bzw. Ak-Konzentration keine Angaben gemacht wurden [101].

Wie beschrieben ist die Studienlage hinsichtlich des positiven Effekts von NKp46-Antikörpern auf die Zytotoxizität Interleukin-stimulierter NK-Zellen ziemlich einheitlich. Anders verhält sich dies jedoch bezüglich des Einflusses auf ruhende NK-Zellen, hier lieferten verschiedene Studien teilweise sehr unterschiedliche Ergebnisse. So beschreiben Sivori et al. in ihrer ursprünglichen Arbeit zu NKp46 eine signifikante Steigerung der Zytotoxizität ruhender NK-Zellen, gegenüber den FcγR<sup>+</sup> Zelllinien P815 und K562 durch gegen NKp46 gerichtete Antikörper [102]. Dabei hatten die Antikörper teilweise einen ausgesprochen starken Effekt auf die ruhenden NK-Zellen und führten zu deutlich stärkeren als etwa den in unseren Ergebnissen erreichten Lyseraten. Es ließen sich bei Sivori mit den NKp46-Antikörpern sogar nahezu gleichwertige Lysewerte wie durch die CD16-Antikörper erzielen, während in unserer und einigen anderen Studien CD16 eine durchweg stärkere Effektivität als NKp46 aufwies [100], [103]. Im Gegensatz zu unserer Arbeit wurden dort allerdings statt isolierter Spender-NK-Zellen klonale NK-Zellreihen verwendet, wobei sich die NK-Zellreihen die zu besonders guten Lyseergebnissen führten, durch eine hohe NKp46 Expressionsdichte auszeichneten. Dies könnte eine Erklärung für die zum Teil unterschiedlichen Ergebnisse darstellen.

Dagegen beschreiben Bryceson et al. in ihrer Arbeit, dass NKp46-Antikörper nur einen sehr geringen Einfluss auf ruhende NK-Zellen zeigen. Da die ruhenden NK-Zellen dort jedoch erst mehrere Tage nach Isolation und Kultivierung im Nährmedium, ohne Zusatz von Interleukinen, verwendet wurden, könnte dies eventuell ein mangelndes/geringeres Ansprechen bzw. eine erschwerte Aktivierbarkeit der NK-Zellen, etwa im Vergleich zu denen unserer Arbeit, erklären. Darüber hinaus konnten auch Studien die NCR blockierende Antikörper einsetzen die aktivierende Wirkung von NKp46 belegen. So zeigte die Arbeitsgruppe von Moretta et al., dass eine Blockade der NKp46-Rezeptoren durch entsprechende Antikörper zu einer deutlichen Minderung des lytischen NK-Potentials führte [104],[105]. Dies konnten wir durch unsere Ergebnisse noch einmal bestätigen.

Auch für den Einsatz von NKp30- bzw. NKp44-Antikörpern konnten Arbeiten eine Steigerung der NK-Zytotoxizität belegen. Während Vitale et al. in ihrer Arbeit zeigen, dass NKp44 Antikörper einen stark aktivitätssteigernden Effekt auf stimulierte NK-Zellen ausüben [106], beschreiben Pende et al. für NKp30-Antikörper einen stark aktivierenden Effekt sowohl auf stimulierte, als auch auf ruhenden NK-Zellen [103]. Wir hingegen konnten in unseren Tests nur auf ruhende NK-Zellen einen stimulierenden Effekt durch NKp30 nachweisen, wohingegen NKp44 allgemein keinen wesentlichen Effekt vermittelte. Dabei fällt jedoch auf, dass in unseren Tests die stimulierten NK-Zellen, ohne zugefügte Antikörper, eine deutlich höhere lytische Aktivität gegen P815 zeigten als in den beiden genannten Arbeiten. Möglicherweise verschleierten die durch diese höhere Grundaktivität erreichten Lyseraten dabei einen sonst nachweisbaren Effekt dieser Antikörper. Trotz nicht immer einheitlicher Studienergebnisse gilt es jedoch als allgemein gesichert, dass NKp46 der wichtigste der aktivierenden NCRs auf NK-Zellen ist, und eine deutliche Steigerung des lytischen Potentials bewirken kann [68] [107]. Auch die Ergebnisse aus unseren Versuchen bestätigen diese Aussage. Unsere Ergebnisse bestätigen allerdings ebenfalls, dass über FcγRIII, wie in unserer Arbeit mittels CD16-Antikörpern erfolgt, eine noch wesentlich stärkere Aktivierung der NK-Zellen vermittelt werden kann.

Nach wie vor nicht genau geklärt ist bislang auch die Frage, warum die Zytotoxizität der ruhenden NK-Zellen trotz Rezeptor-vermittelter Aktivierung soviel geringer ist als die der stimulierten Zellen. Man könnte vermuten, dass ruhende NK-Zellen an sich ein geringeres lytisches Potential besitzen. Allerdings erreichen sie gegen bestimmte Zielzellen (z.B. K562) nahezu die gleichen Lyseraten wie Interleukin-stimulierte NK-Zellen, sind also bei entsprechender Aktivierung voll Lyse-fähig [100], was dieser Vermutung somit widerspricht. Wie unsere und andere FACS-Untersuchungen zeigen konnten, exprimieren auch ruhende NK-Zellen die verschiedenen aktivierenden Rezeptoren, mit Ausnahme von NKp44, in entsprechender Menge [100], [108]. Da zudem gezeigt werden konnte, dass bei entsprechender Stimulation über CD16 sowohl NKp46<sup>dull</sup> als auch NKp46<sup>bright</sup> Klone vergleichbare Lyseraten erzielen [68], ist es eher unwahrscheinlich, dass allein die etwas höhere Expressionsdichte dieser Rezeptoren auf stimulierten Zellen oder etwa nur die zusätzliche NKp44 Expression die hohen Zytotoxizitäts-Unterschiede ausmachen. Durchaus denkbar erscheint, dass ruhende NK Zellen zur Aktivierung wesentlich stärkere Signale als stimulierte Zellen benötigen und dass manche aktivierende Rezeptoren in ruhenden NK-Zellen praktisch abgeschaltet sind und erst durch zusätzliche Signale eine volle Aktivierung ausgelöst werden kann.

#### **5.4 Einfluss eines bispezifischen NKp46\*CD19 Antikörpers auf die Zytotoxizität von NK-Zellen**

Seit der erstmaligen Verwendung von Antikörpern in der Therapie maligner Erkrankungen haben sie sich als zunehmend effektive Therapiemaßnahme bei einer immer größeren Zahl verschiedener Erkrankungen herausgestellt. Dabei kommen bei der Behandlung mit immunologischen Antikörpern mittlerweile verschiedenste Möglichkeiten und Konzepte zur Anwendung.

So hat der Einsatz von unkonjugierten monoklonalen Antikörpern längst einen festen Platz in klinischen Routine-Therapieverfahren erlangt. Als Beispiel sei

hier der Einsatz von CD20-Antikörpern (Rituximab®) bei der Behandlung von B-Zell Lymphomen genannt [109], [110]. Doch auch konjugierte Antikörper finden breite Verwendung: Radioimmunkonjugate [111] werden sowohl zur Bildgebung als auch zu Therapiezwecken eingesetzt, Immunotoxin- [112], bzw. Immunochemokonjugate [113] zeigen Anti-Tumor-Aktivität und befinden sich in Einsatz oder weiterer Entwicklung. Vor dem klinischen Einsatz solcher Antikörper müssen dabei allerdings einige wesentliche Komponenten berücksichtigt werden, die für den erfolgreichen Therapieeffekt in vivo eine entscheidende Rolle spielen:

- Identifizierung eines geeigneten Zielantigens. Sollte möglichst tumorspezifisch sein um selektiv die unerwünschten Zellen zu schädigen
- Eigenschaften des Antikörpers wie Stabilität „in vivo“, Serum-HWZ, Molekulargewicht, molekulare Strukturzusammensetzung
- Verträglichkeit des Antikörpers, möglichst kein Auslösen unerwünschter, toxischer Nebenwirkungen
- Effekt des Antikörpers auf das Immunsystem (Auslösen einer ADCC, eventuell einer Komplement-abhängigen Zytolyse (CDC))
- Art der malignen Erkrankung, z.B. solider Tumor, hämatologische Neoplasie, große/kleine Tumorzellmasse.

Auch die kindliche ALL, v.a. im Falle einer high-risk ALL und nach Transplantation, scheint ein geeignetes Ziel für den Einsatz monoklonaler Antikörper zu sein. Weiß man doch gerade von akuten lymphatischen Leukämien, dass sie relativ schlecht auf den GvL-Effekt alloreaktiver NK-Zellen ansprechen [81] und damit von einer zusätzlichen Antikörpertherapie profitieren könnten. Zwar konnte für die ALL im Kindesalter – vermutlich vor allem durch das stark unterschiedliche Expressionsmuster der Adhäsionsmoleküle begründet – gezeigt werden, dass sie im Gegensatz zur ALL des Erwachsenen auf einen alloreaktiven GvL-Effekt ansprechen kann, dies allerdings nur bei entsprechendem KIR-Mismatch und hauptsächlich in den ersten Monaten nach Transplantation [83], [114]. Aufgrund dessen prüft man derzeit vermehrt den

Einsatz geeigneter Antikörper auch bei der kindlichen ALL. So zeigt eine aktuelle Studie, dass Rituximab in Verbindung mit NK-Zellen transplantierter Kinder eine starke antileukämische Aktivität *in vitro* vermittelt [115]. Demzufolge wird der Einsatz von Rituximab bei Behandlung pädiatrischer Patienten mit einer CD20<sup>+</sup>-ALL derzeit klinisch evaluiert und durchgeführt. Laut Erfahrungen der Arbeitsgruppe Lang trifft eine Expression von CD20 leider nur auf ca. 12% der kindlichen B-Linien ALLs zu, weshalb nur eine sehr geringe Anzahl an Patienten davon profitieren würde [116]. Dagegen wird CD19 konsequent zu 100% von diesen malignen Zellen exprimiert [117], und stellt daher ein vermutlich deutlich geeigneteres Zielantigen für eine Antikörpertherapie der ALL dar. Die Ergebnisse von Lang et al. bekräftigen das Potential von CD19 als Zielantigen noch weiter. Ihre Versuche ergaben, dass der Einsatz eines chimärisierten CD19 Antikörpers, zusammen mit Effektorzellen von T-Zell depletiert transplantierten Patienten, zu einer starken zytotoxischen Aktivität gegen die leukämischen Blasten führte [116]. Des Weiteren beschreibt der Autor in dieser Arbeit zusätzliche Vorteile einer Antikörpertherapie in der Situation nach SZT. Erstens seien die leukämischen Zellen nach Transplantation auf ein Minimum reduziert, weshalb bei einer früh einsetzenden Immuntherapie, auf Grundlage der schnell regenerierenden NK-Zellen, gegenüber den restlichen MRD-Zellen mit einem hohen E:T-Verhältnis, und damit einer hohen Effektivität gerechnet werden könne. Zweitens fiele der Nachteil, dass der CD19 Antikörper auch zu einem Defizit an gesunden B-Zellen führt weniger ins Gewicht, da dieser Mangel durch zusätzliche Stammzellgaben nach der Immuntherapie kompensiert werden könne.

Leider gilt für einen Grossteil der in der Krebstherapie eingesetzten Antikörper, dass sich ihre Effektivität *in vivo* meist als deutlich geringer herausstellt, als anhand der guten *in vitro* ADCC-Raten eigentlich zu erwarten wäre. So weisen konventionelle Antikörper einige Limitationen auf, die eine schlechtere Wirksamkeit *in vivo* erklären könnten. Bei der Behandlung mit Rituximab beispielsweise, zeigten verschiedene Patienten ein unterschiedlich gutes Ansprechen auf die Therapie. Dies wurde durch Polymorphismen im humanen FcγRIII der einzelnen Individuen mit daraus resultierender unterschiedlich



starker Fc-Affinität erklärt [118]. Durch Entwicklung von Antikörpern mit erhöhter Rezeptoraffinität an FcγRIII, und damit einhergehender stärkerer ADCC Induktion, kann somit die Antikörperfunktion weiter optimiert werden. Dabei hat sich gezeigt, dass sich insbesondere durch unterschiedliche Glykosylierung der Aminosäure Asn297 der IgG1 Fc-Region diese Antikörpereigenschaften verbessern lassen [119], [98]. Auch die Expression von Fc-Rezeptoren auf nicht-zytotoxischen Zellen, beziehungsweise die Expression nicht-aktivierender oder inhibierender Rezeptor-Isoformen auf Granulozyten und Monozyten, kann durch Konkurrenz um den Fc-Teil der Antikörper zu einem verminderten zytotoxischen Effekt führen [120], [87]. Doch nicht nur die Konkurrenz durch Fc-Rezeptoren um die eingesetzten Antikörper, auch die Konkurrenz um die Fc-Rezeptoren der NK-Zellen durch endogene Immunglobuline scheint einen optimalen Wirkeffekt zu verhindern. So beschreiben Preithner et al. in einer Arbeit einen stark hemmenden Effekt auf durch Trastuzumab oder Adecatumumab vermittelte ADCCs durch Zugabe von endogenem IgG [121]. Und auch in unseren Tests konnten wir, durch die Zugabe von IgG-haltigem Serum, einen hemmenden Einfluss auf die mit dem chimärisierten CD19 Antikörper erzielten Lyseraten nachweisen. Dabei könnte dieser Effekt vor allem bei transplantierten Patienten eine große Rolle spielen, da diese zur Infektionsprophylaxe regelmäßig große Mengen an humanem IgG infundiert bekommen und damit die freien Bindungsstellen für die Antikörper auf den NK-Zellen reduzieren.

Hier stellt nun der Einsatz von bispezifischen Antikörpern eine neue und interessante Therapieoption dar. Ihre speziellen Eigenschaften ermöglichen es ihnen, im Gegensatz zu konventionellen Antikörpern, einige der genannten Limitationen zu überwinden. Durch die Konstruktion bispezifischer single-chain Fragment Antikörper, ohne enthaltenen Fc-Teil sowie erniedrigter Immunogenität, konnte zudem das Vorkommen unerwünschter Nebenwirkungen, die in klinischen Studien oft einen limitierenden Faktor darstellten, reduziert werden [122]. Derzeit befinden sich mehrere solcher bispezifischer Antikörper in klinischer (z.B. CD3\*CD19, Her-2/neu\*CD16),

beziehungsweise präklinischer Erprobung (CD16\*CD19), mit teilweise ermutigenden Ergebnissen [123], [120], [124]. Dabei ist die Arbeit von Bruenke et al. von besonderem Interesse. Sie vergleicht den Effekt des chimärisierten CD19-Antikörpers [116] mit dem eines neu konstruierten, stabilisierten bispezifischen CD16\*CD19-Antikörpers gegenüber kindlichen ALL-Blasten. Dabei zeigte sich, dass der bispezifische Antikörper zu effizienteren Lyseraten der ALL-Blasten, durch nach Transplantation vom Spender stammende pMNCs als der chimäre CD19-Antikörper führte. Der Autor führte diese bessere Wirkung darauf zurück, dass der CD16-spezifische Antikörperteil außerhalb der Fc-Bindungsstelle an FcγRIII bindet und damit keiner Konkurrenz durch endogenes IgG1 unterliegt. Als weiteren Vorteil des bispezifischen Antikörpers wird seine, im Vergleich zum chimären CD19-Antikörper kleinere Größe mit damit verbundener besserer Gewebspenetration aufgeführt. Diese viel versprechenden Daten gilt es nun in klinischen Studien weiter zu untersuchen, um einen positiven Effekt auf die Kontrolle der MRD nach Transplantation auch in vivo zu belegen.

Das Potential von CD16 bzw. FcγRIII als Triggermolekül für die Aktivierung der NK-Zell Zytotoxizität durch bispezifische Antikörper wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben und aufgezeigt [125], [126], [127]. Obwohl bereits einige klinische Phase I/II Studien mit an CD16 bindenden bispezifischen Antikörpern erfolgreich durchgeführt wurden, besitzt CD16 durchaus Eigenschaften, die seine Funktion als Triggermolekül beeinträchtigen könnten. So ist der Antikörper beispielsweise nicht in der Lage, zwischen den verschiedenen FcγRIII Isoformen zu unterscheiden. Er bindet folglich neben dem FcγRIIIa Rezeptor auf NK-Zellen auch an die FcγRIIIb Isoform der Granulozyten, die keine ADCC auslösen können. Zudem befindet sich im menschlichen Plasma ein bemerkenswerter Anteil an freiem, ungebundenem FcγRIII gelöst, das somit zusätzlich um die Antikörper konkurrieren könnte [128]. Auch speziell im Einsatz nach Stammzelltransplantation könnte die Effektivität dieser Antikörper deutlich reduziert werden, denn im Gegensatz zu gesunden Personen, bei denen nur etwa 2% aller peripheren NK-Zellen CD16<sup>-</sup>

sind, sind bei Patienten in den ersten Monaten nach Transplantation von den sich regenerierenden NK-Zellen bis zu 70% CD16<sup>-</sup> [129], [130]. Folglich können sie auch nicht durch den CD16-Antikörper aktiviert werden. Darüber hinaus konnten Ferlazzo et al. zeigen, dass die NK-Zellen der sekundären lymphatischen Organe (z.B. Lymphknoten), die vermutlich den grössten Teil der gesamten NK-Zellen im Körper ausmachen, hauptsächlich ebenfalls kein CD16 exprimieren [131]. Man muss jedoch anmerken, dass in all diesen Studien gezeigt wurde, dass nahezu alle diese Zellen unter IL2-Stimulation einen CD16<sup>+</sup> Phänotyp entwickeln. Im Gegensatz dazu weist NKp46 eigentlich keine dieser Limitationen auf, die seine Funktion als Triggermolekül in vivo negativ beeinflussen könnten. Dies führte uns zu der Überlegung, den NKp46-Rezeptor als Triggermolekül für einen bispezifischen Antikörper einzusetzen und auf seine Effektivität hin zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde für unsere Arbeitsgruppe ein bispezifischer CD19\*NKp46 single-chain Antikörper konstruiert und dessen Einfluss auf die NK-Zell vermittelte Lyse leukämischer Blasten, im Vergleich zu dem chimären CD19-Antikörper, untersucht. Leider führte der Einsatz des CD19\*NKp46 Antikörpers in unseren Tests nicht in dem von uns erhofften Ausmaß zu einer Steigerung der Lyseraten. Zwar vermittelte unser Antikörper in den Zytotoxizitätsassays mit angereicherten NK-Zellen gesunder Spender gegenüber kryopreservierten ALL-Blasten sowohl bei ruhenden, wie auch bei stimulierten NK-Zellen eine signifikante Steigerung der spezifischen Lyseraten, allerdings war dieser Effekt bei Verwendung des chimären CD19-Antikörpers in jedem Fall, selbst nach Abschwächung des Effekts durch Zugabe von Immunglobulin-haltigem Serum, noch deutlich stärker ausgeprägt. Bei Einsatz der von transplantierten Patienten stammenden pMNCs zeigte unser Antikörper sogar nur auf zuvor stimulierte Zellen einen wesentlichen Effekt, während auf ruhende Zellen keine Wirkung festgestellt werden konnte. Dagegen führte der chimäre Antikörper auch hier, sowohl bei unstimulierten wie auch bei stimulierten Zellen, zu einer starken Verbesserung der Zytotoxizität. Diese schlechtere Wirksamkeit des bispezifischen Antikörpers liegt offensichtlich an der im Vergleich zu FcγRIII, deutlich schwächer ausgeprägten Aktivierung der NK-Zellen durch das Triggermolekül NKp46.

Zusätzlich gestützt wird diese Erklärung durch die Ergebnisse des ersten Teils unserer Arbeit, in dem der monoklonale NKp46-Antikörper zu einer ebenfalls deutlich geringeren zytolytischen Aktivität gegenüber P815 als der CD16 Antikörper führte.

Insgesamt lagen die durch die pMNCs erzielten Lyseraten, unabhängig der eingesetzten Antikörper, jeweils merklich unter den entsprechenden, durch die NK-Zellen gesunder Spender erreichten Lyseraten. Wie bereits erwähnt könnten die schlechteren Lyseraten des CD19-Antikörpers bei Verwendung der Patientenzellen zum einen auf die geringere Anzahl freier FcγRIII Rezeptoren infolge vorheriger Infusionen von Immunglobulinen, zum anderen auf den erhöhten Anteil CD16<sup>-</sup> NK-Zellen zurückgeführt werden. Allerdings ließe sich der ebenfalls geringere Effekt des NKp46\*CD19-Antikörpers auf die pMNCs der Patienten dadurch nicht erklären. Als Ursache für die schlechteren Lysewerte ist daher eher anzunehmen, dass die sich in der Frühphase nach Transplantation befindlichen, regenerierenden NK-Zellen hinsichtlich Rezeptorexpression und zytotoxischer Aktivität noch wesentlich beeinträchtigt waren. Laut einer Studie von Vitale et al. besteht eine solche Beeinträchtigung bis zu 30 Tagen nach Transplantation, erst danach sei in den meisten Fällen eine normale zytolytische Aktivität der Zellen wieder erreicht [132].

Interessanterweise lagen die durch den chimären CD19-, sowie den bispezifischen CD16\*CD19-Antikörper in unseren Versuchen erreichten Lyseraten sogar noch über den von Lang und Bruenke in ihren Studien erzielten [116], [124]. Im Unterschied zu diesen Arbeiten stimulierten wir unsere Effektorzellen mit IL15 statt mit IL2, da sich IL15 im Vergleich zu IL2 im klinischen Einsatz positiver auf das Proliferationsverhalten der NK-Zellen auswirken soll. Allerdings wurde gezeigt, dass sowohl IL2 als auch IL15 zu einer vergleichbaren Steigerung der NK-Zytotoxizität führen [133]. Da die Antikörper zudem auch bei den nicht zuvor stimulierten Zellen zu höheren Lyseraten führten, ist als wahrscheinlichste Ursache für die höheren Lyseraten eine höhere Empfindlichkeit der bei uns verwandten Blasten gegenüber einer

NK-Zell Lyse, im Vergleich zu den in den anderen Arbeiten eingesetzten Blasten, anzunehmen.

### **5.5 Einfluss von CD158a, CD158b und CD158e Antikörper auf die Zytotoxizität von NK-Zellen**

Die Vermittlung einer Toleranz gegen die eigenen hämatopoetischen Zellen ist eine Hauptfunktion der inhibitorischen KIR-Rezeptoren. Diese Zellen sind normalerweise empfindlich gegenüber einer NK-Zell Lyse und werden nur anhand des Erkennens ihrer MHC-I Komplexe durch die inhibitorischen NK-Rezeptoren verschont [134],[135],[136]. Dabei treten die Rezeptoren nach erfolgter MHC-Bindung über die in ihren langen Zytoplasmaketten liegenden Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs (ITIMs) mit den Protein-Tyrosin Phosphatasen SHP1 und SHP2 in Kontakt, die Hauptkomponenten negativer Signalwege im Zytoplasma sind [137], [138]. Über anschließende Dephosphorylierungen der in aktivierenden Signalwegen eingeschalteten Moleküle wird dann ein inhibitorisches Signal vermittelt [56], [57] und die NK-Aktivität somit unterdrückt. Im Vergleich dazu besitzen die aktivierenden KIR-Rezeptoren in ihren kurzen Zytoplasmaketten so genannte ITAMs (activating motifs), welche einen aktivierenden Signalweg triggern und somit zu einer NK-Aktivierung führen [58].

Wie unsere Versuche gezeigt haben, führte die Inkubation der Targetzellen mit gegen die inhibitorischen KIR-Rezeptoren CD158a beziehungsweise CD158e gerichteten Antikörpern jedoch zu keinem wesentlichen hemmenden Einfluss auf die Zytotoxizität der NK-Zellen gegenüber P815. Eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben des erwarteten inhibitorischen Effekts liefert eine frühere Arbeit von Bléry et. al. von 1997. Demnach können KIR Rezeptoren nur dann eine NK-Inhibition auslösen, wenn dabei zugleich in unmittelbarer Umgebung ein aktivierendes Signal über ITAM-abhängige Co-Rezeptoren an die NK-Zelle vermittelt wird [139], [140]. Eine solche zusammenhängende Aktivierung von

aktivierenden und inhibierenden NK-Rezeptoren war in unserem Test durch die P815 Zellen offensichtlich nicht gegeben. Folglich ist das Ausbleiben einer inhibitorischen Wirkung durch die KIR-Antikörper auf die NK-Zelle sehr wahrscheinlich durch das Fehlen einer benötigten Mitbeteiligung ITAM-abhängiger, aktivierender Co-Rezeptoren zu erklären. Als weitere Ursache für das Ausbleiben dieses Effektes muss man jedoch auch die Möglichkeit in Betracht ziehen, dass die Antikörper zwar an die KIR-Rezeptoren binden, jedoch an diesen keine triggernde Wirkung auslösen.

Dagegen führte die Inkubation der Targetzellen mit gegen den ebenfalls inhibitorischen CD158b Rezeptor gerichteten Antikörpern überraschend zu unterschiedlichen Auswirkungen auf die NK-Zell Zytotoxizität. So zeigte der CD158b Antikörper bei einer Gruppe von NK-Zell Spendern, analog zu den Ergebnissen mit den CD158a und CD158e Antikörpern, keinen nennenswerten Effekt auf die NK-Zytotoxizität. Fehlt doch auch hier wiederum die für eine KIR-vermittelte NK-Zell Inhibition nötige Mitbeteiligung einer ITAM-abhängigen Stimulation der NK-Zelle, wie sie z.B. durch eine gleichzeitige NKp46 oder CD16 Aktivierung gegeben wäre. Bei einem Teil der NK-Spender führte der Antikörper jedoch zu einer deutlichen Steigerung der Zytotoxizität und der Lyseraten. Dieses Phänomen wurde bereits in zwei anderen Arbeiten, die sich mit KIR-Rezeptoren und deren spezifischen Antikörpern beschäftigt haben, in ähnlicher Weise beschrieben. Dabei ist es wichtig zu wissen, dass es sich bei CD158b nicht nur um einen einzelnen Rezeptor handelt, sondern um die drei verschiedenen KIR-Rezeptoren 2DS2, 2DL2 und 2DL3, die kollektiv als CD158b bezeichnet werden und von dem von uns verwendeten CD158b-Antikörper nicht unterschieden werden können. Warren et. al. zeigten mit Hilfe von humanen NK-Zelllinien, die sie anhand einer RT-PCR auf ihre KIR-Expression hin unterteilten, dass bei Co-Expression des aktivierenden KIR2DS2 sowie der inhibitorischen 2DL2,3 Rezeptoren der Einsatz des CD158b Antikörpers zu einer Inhibition der aktivierten Zellen führte. Dagegen führte der Antikörpereinsatz bei Zellen die nur KIR2DS2 alleine exprimierten, zu einer Stimulation der NK-Zellen [141]. Diese Ergebnisse konnten in einer

neueren Studie durch Einsatz eines neuen Antikörpers, der spezifisch an KIR2DL3 bindet, weiter bestätigt werden [142]. Dies legt die Vermutung nahe, dass die NK-Zellen der Spender, bei denen der CD158b Antikörper eine deutliche Stimulation bewirkte, eine geringere Expressionsdichte an 2DL2 und 2DL3 Rezeptoren, stattdessen jedoch eine wesentlich höhere Expressionsdichte an aktivierenden 2DS2-Rezeptoren aufwiesen. Eine genauere Untersuchung dieser NK-Zellen mittels RT-PCR hinsichtlich der Expression dieser Rezeptoren könnte diese Vermutung weiter bestätigen, wurde allerdings nicht durchgeführt. Nach wie vor gibt es nicht zu jedem KIR-Subtyp spezifisch passende monoklonale Antikörper, weshalb zum Teil weiterhin Unklarheiten über die genauen Wirkungen und Interaktionen der Rezeptoren untereinander bestehen. So wäre es durchaus denkbar, spezifisch an aktivierende KIR-Rezeptoren bindende Axs hinsichtlich eines möglichen Einsatzes zur Verbesserung eines NK-Zell vermittelten GvL-Effektes hin zu untersuchen.

Ihren wichtigsten Stellenwert besitzen die KIR-Rezeptoren jedoch zweifelsohne bei der haploidenten hämatopoetischen Stammzelltransplantation. Anhand der HLA-Typisierung von Spender und Empfänger, sowie der genauen KIR-Genotypisierung und Bestimmung des NK-Repertoires des Spenders, lassen sich die Spender identifizieren, die das Potential zu einer NK-Zell Alloreaktivität zeigen. Vor allem bei myeloischen Leukämien führt dies zu einem verbesserten Engraftment, verstärktem GvL-Effekt und zu einer Senkung des Rezidivrisikos ohne erhöhte GvHD Inzidenz [81]. Und auch für die kindliche ALL konnte, im Gegensatz zur ALL des Erwachsenen, in neuesten Studien ein positiver Effekt durch ein solches Rezeptor-Liganden mismatch gezeigt werden [143], [83].

## 5.6 Schlussfolgerungen für die klinische Anwendung

Obwohl heute, dank der Möglichkeiten der haploidenten Stammzelltransplantation, nahezu jeder an einer Hochrisiko-ALL erkrankte kindliche

Patient einer SZT zugeführt werden kann, ist es dadurch bislang nicht gelungen das Langzeitüberleben der Betroffenen wesentlich zu verbessern [93], [144]. Durch Einsatz von zusätzlichen Therapieverfahren, wie etwa der einer kombinierten zellulären und humoralen Immuntherapie, wird deshalb versucht eine MRD nach Transplantation wirkungsvoll zu behandeln, um so die Wahrscheinlichkeit eines ALL-Rezidivs – nach wie vor die häufigste Todesursache dieser Patienten – zu verringern.

In der von uns durchgeführten Arbeit konnte gezeigt werden, dass therapeutische Antikörper die über den NKp46-Rezeptor eine NK-Zell Aktivierung vermitteln zu einer offensichtlich deutlich schwächeren Steigerung der NK-Zytotoxizität führen als solche, die über CD16 die NK-Zellen aktivieren. NKp46-bindende Antikörper, wie etwa der von uns untersuchte NKp46\*CD19-Antikörper, scheinen daher für einen klinischen Einsatz eher wenig geeignet. Dagegen zeigen sowohl der chimäre CD19-Antikörper als auch der bispezifische CD16\*CD19-Antikörper wie von Lang bzw. Bruenke et al. bereits beschrieben, auch in unseren Tests sehr gute Lyseergebnisse gegenüber CD19<sup>+</sup> ALL-Blasten in vitro [116], [124]. Durch vorherige Stimulation der NK-Zellen mit IL15 ließ sich deren zytolytische Aktivität in allen Fällen, unabhängig des eingesetzten Antikörpers, noch deutlich steigern.

Wir konnten des Weiteren zeigen, dass die Zugabe von Immunglobulin-haltigem Serum zu einer Abschwächung der Wirkung des chimären CD19-Antikörpers auf die NK-Zellen führte. Zwar konnte die Untersuchung von CD16\*CD19 hinsichtlich dieses Effekts nicht durchgeführt werden, jedoch ist laut Bruenke et al. ein hemmender Einfluss des IgGs auf den bispezifischen Antikörper eher unwahrscheinlich [124].

Daher stellt aus unserer Sicht der kombinierte Einsatz von NK-Zell Gabe, IL15-Stimulation und zusätzlicher Gabe des CD16\*CD19-Antikörpers eine interessante Option für einen klinischen Einsatz zur Behandlung einer MRD nach Transplantation bei akuter lymphatischer Leukämie dar.





## 6 Zusammenfassung

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden verschiedene monoklonale Antikörper hinsichtlich ihres Einflusses auf die Zytotoxizität von NK-Zellen untersucht. Besonderes Interesse galt dabei den gegen die aktivierenden NCR's NKp30, NKp44 und NKp46 gerichteten Antikörpern. Es zeigte sich, dass von diesen drei Antikörpern NKp46 den stärksten Effekt bezüglich einer Steigerung der zytotoxischen Aktivität der NK-Zelle besitzt. So führte sein Einsatz sowohl bei ruhenden, als auch bei IL-2 stimulierten NK-Zellen im BADTA-Zytotoxizitätstest zu signifikant erhöhten Lyseraten gegenüber der FcγR<sup>+</sup> P815-Zelllinie. Dagegen zeigten der NKp30- sowie der NKp44-Antikörper wesentlich geringere Auswirkungen auf die NK-Zytotoxizität. Während NKp30 lediglich bei ruhenden, nicht jedoch bei stimulierten NK-Zellen zu einer signifikanten, jedoch deutlich schwächer als bei NKp46 ausgeprägten Zunahme der lytischen Aktivität führte, zeigte NKp44 überhaupt keinen nennenswerten Einfluss auf die Zytotoxizität. Die effektivsten Lyseraten in unseren Versuchen ließen sich allerdings mittels des Einsatzes von CD16-Antikörpern erzielen. Dabei lagen die dadurch erreichten spezifischen Lysewerte der P815-Zellen noch jeweils deutlich über den durch NKp46 erreichten Werten. Diese Ergebnisse belegen, dass über FcγRIII eine deutlich stärkere Aktivierung der NK-Zellen als über die verschiedenen NCRs vermittelt werden kann.

Es konnte weiter gezeigt werden, dass eine simultane Aktivierung der verschiedenen NCRs, im Vergleich zur einfachen Aktivierung über NKp46, scheinbar zu einer zusätzlichen Zunahme der NK-Zell Aktivität führt. Im Gegensatz dazu führte der kombinierte Einsatz von CD16- und NKp46-Antikörpern zu keiner weiteren Aktivitätszunahme verglichen mit dem Einsatz von CD16 alleine. Während sich die einzelnen NCRs in ihrer Wirkung also vermutlich gegenseitig ergänzen, scheinen sich FcγRIII-vermittelte ADCC und NCR-vermittelte natürliche Zytotoxizität der NK-Zellen nicht gegenseitig zu verstärken.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein neu entwickelter, bispezifischer CD19\**NKp46*-Antikörper auf seine Effektivität hinsichtlich der Lysesteigerung von CD19<sup>+</sup> ALL-Blasten im Zytotoxizitätstest durch NK-Zellen getestet und untersucht. Neben diesem neuen Antikörper wurden zusätzlich zwei weitere Antikörper eingesetzt, ein chimärer CD19- sowie ein bispezifischer CD19\**CD16*-Antikörper, die beide bereits in zwei anderen Studien untersucht wurden und dort zu sehr effektiven Lyseraten geführt hatten. Bei Verwendung von isolierten NK-Zellen gesunder Spender als Effektorzellen ergab sich durch den Einsatz des bispezifischen CD19\**NKp46*-Antikörpers eine deutlich gesteigerte Empfindlichkeit der Blasten, einhergehend mit signifikant erhöhten Lyseraten. Allerdings führte sowohl der chimäre CD19-Antikörper als auch der bispezifische CD19\**CD16*-Antikörper zu einer im Vergleich dazu noch deutlich effektiveren Lyse der leukämischen Blasten. Bei Verwendung isolierter pMNCs frisch transplanteder Patienten als Effektoren zeigten sich die Effekte des CD19\**NKp46*-, bzw. des chimären CD19-Antikörpers jedoch wesentlich schwächer ausgeprägt. Dies lag vermutlich in einer noch vorhandenen, Transplantations-bedingten Funktionsbeeinträchtigung der regenerierten Spender NK-Zellen begründet.

Außerdem konnten wir in unserer Arbeit zeigen, dass eine Zugabe von humanem Serum zu den NK-Zellen vor der Inkubation zu einer starken Wirkungsabschwächung des effektiven chimären CD19-Antikörpers führt. Dieser Effekt wird vermutlich durch im Serum enthaltene Immunglobuline verursacht. Zwar lagen die dadurch erreichten, reduzierten Lyseraten noch immer über denen des *NKp46*-Antikörpers, jedoch könnte dieser Befund auf eine schwächere Wirkung des CD19-Antikörpers in vivo, im Vergleich zu seiner sehr guten Wirkung in vitro, hindeuten. Da auch der bispezifische CD19\**CD16*-Antikörper zu sehr guten Lyseergebnissen führte und eine solche Wirkungsabschwächung im Vergleich zum chimären CD19-Antikörper eher unwahrscheinlich ist, stellt sein Einsatz eine interessante Option für die Behandlung einer MRD in vivo dar und sollte in entsprechenden klinischen Studien weiter untersucht werden.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Klingebiel, T., et al., *Experiences with haploidentical stem cell transplantation in children with acute lymphoblastic leukemia*. Pathol Biol (Paris), 2005. **53**(3): p. 159-61.
2. Coustan-Smith, E., et al., *Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 2000. **96**(8): p. 2691-6.
3. Biondi, A., et al., *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, 2000. **14**(11): p. 1939-43.
4. Marshall, G.M., et al., *Importance of minimal residual disease testing during the second year of therapy for children with acute lymphoblastic leukemia*. J Clin Oncol, 2003. **21**(4): p. 704-9.
5. Nyvold, C., et al., *Precise quantification of minimal residual disease at day 29 allows identification of children with acute lymphoblastic leukemia and an excellent outcome*. Blood, 2002. **99**(4): p. 1253-8.
6. Bader, P., et al., *Minimal residual disease (MRD) status prior to allogeneic stem cell transplantation is a powerful predictor for post-transplant outcome in children with ALL*. Leukemia, 2002. **16**(9): p. 1668-72.
7. Sramkova, L., et al., *Detectable minimal residual disease before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation predicts extremely poor prognosis in children with acute lymphoblastic leukemia*. Pediatr Blood Cancer, 2007. **48**(1): p. 93-100.
8. Uzunel, M., et al., *Minimal residual disease detection after allogeneic stem cell transplantation is correlated to relapse in patients with acute lymphoblastic leukaemia*. Br J Haematol, 2003. **122**(5): p. 788-94.
9. Vallera, D.A. and B.R. Blazar, *T cell depletion for graft-versus-host-disease prophylaxis. A perspective on engraftment in mice and humans*. Transplantation, 1989. **47**(5): p. 751-60.
10. Tricot, G., *T-cell depletion in unrelated bone marrow transplantation*. Semin Hematol, 1992. **29**(2 Suppl 1): p. 26-31; discussion 31-2.
11. Handgretinger, R., et al., *Immunological aspects of haploidentical stem cell transplantation in children*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **938**: p. 340-57; discussion 357-8.
12. Kernan, N.A., et al., *Graft rejection in recipients of T-cell-depleted HLA-nonidentical marrow transplants for leukemia. Identification of host-derived antidonor allocytotoxic T lymphocytes*. Transplantation, 1987. **43**(6): p. 842-7.
13. Ljungman, P., *Immune reconstitution and viral infections after stem cell transplantation*. Bone Marrow Transplant, 1998. **21 Suppl 2**: p. S72-4.

14. Sehn, L.H., et al., *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, 1999. **17**(2): p. 561-8.
15. Schumm, M., et al., *Isolation of highly purified autologous and allogeneic peripheral CD34+ cells using the CliniMACS device*. J Hematother, 1999. **8**(2): p. 209-18.
16. Lang, P., et al., *A comparison between three graft manipulation methods for haploidentical stem cell transplantation in pediatric patients: preliminary results of a pilot study*. Klin Padiatr, 2005. **217**(6): p. 334-8.
17. Collins, R.H., Jr., et al., *Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation*. J Clin Oncol, 1997. **15**(2): p. 433-44.
18. Collins, R.H., Jr., et al., *Donor leukocyte infusions in acute lymphocytic leukemia*. Bone Marrow Transplant, 2000. **26**(5): p. 511-6.
19. Herberman, R.B., et al., *Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells*. Int J Cancer, 1975. **16**(2): p. 230-9.
20. Kiessling, R., E. Klein, and H. Wigzell, *"Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype*. Eur J Immunol, 1975. **5**(2): p. 112-7.
21. Timonen, T. and E. Saksela, *Isolation of human NK cells by density gradient centrifugation*. J Immunol Methods, 1980. **36**(3-4): p. 285-91.
22. Bourin, P., et al., *Circadian rhythms of circulating NK cells in healthy and human immunodeficiency virus-infected men*. Chronobiol Int, 1993. **10**(4): p. 298-305.
23. Hata, K., et al., *Natural killer activity of human liver-derived lymphocytes in various liver diseases*. Hepatology, 1991. **14**(3): p. 495-503.
24. Whiteside, T.L. and R.B. Herberman, *The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer*. Curr Opin Immunol, 1995. **7**(5): p. 704-10.
25. Robertson, M.J. and J. Ritz, *Biology and clinical relevance of human natural killer cells*. Blood, 1990. **76**(12): p. 2421-38.
26. Lanier, L.L., *NK cell receptors*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 359-93.
27. Ritz, J., et al., *Characterization of functional surface structures on human natural killer cells*. Adv Immunol, 1988. **42**: p. 181-211.
28. Griffin, J.D., et al., *Characterization of an antigen expressed by human natural killer cells*. J Immunol, 1983. **130**(6): p. 2947-51.
29. Carlyle, J.R., et al., *Natural killer cell development and function precede alpha beta T cell differentiation in mouse fetal thymic ontogeny*. J Immunol, 1998. **160**(2): p. 744-53.
30. Douagi, I., et al., *Identification of the earliest prethymic bipotent T/NK progenitor in murine fetal liver*. Blood, 2002. **99**(2): p. 463-71.
31. Ljunggren, H.G. and K. Karre, *In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition*. Immunol Today, 1990. **11**(7): p. 237-44.

32. Kärre, K., *Role of target histocompatibility antigens in regulation of natural killer activity: a reevaluation and a hypothesis.* In "Mechanisms of NK cell mediated cytotoxicity" (Eds: D Callewert and RB Herberman). Academic Press, Orlando, 1985: p. 81-92.
33. Moretta, A., et al., *Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells.* Annu Rev Immunol, 1996. **14**: p. 619-48.
34. Karre, K., *Express yourself or die: peptides, MHC molecules, and NK cells.* Science, 1995. **267**(5200): p. 978-9.
35. Moretta, A., et al., *What is a natural killer cell?* Nat Immunol, 2002. **3**(1): p. 6-8.
36. Pross, H.F. and E. Lotzova, *Role of natural killer cells in cancer.* Nat Immun, 1993. **12**(4-5): p. 279-92.
37. Zitvogel, L., *Dendritic and natural killer cells cooperate in the control/switch of innate immunity.* J Exp Med, 2002. **195**(3): p. F9-14.
38. Piccioli, D., et al., *Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells.* J Exp Med, 2002. **195**(3): p. 335-41.
39. Liu, C.C., C.M. Walsh, and J.D. Young, *Perforin: structure and function.* Immunol Today, 1995. **16**(4): p. 194-201.
40. Golstein, P., *Fas-based T cell-mediated cytotoxicity.* Curr Top Microbiol Immunol, 1995. **198**: p. 25-37.
41. Trapani, J.A., et al., *Proapoptotic functions of cytotoxic lymphocyte granule constituents in vitro and in vivo.* Curr Opin Immunol, 2000. **12**(3): p. 323-9.
42. Ashkenazi, A., *Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily.* Nat Rev Cancer, 2002. **2**(6): p. 420-30.
43. Nagata, S., *Fas ligand and immune evasion.* Nat Med, 1996. **2**(12): p. 1306-7.
44. Takeda, K., et al., *Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells.* Nat Med, 2001. **7**(1): p. 94-100.
45. Baxevasis, C.N., et al., *Compromised anti-tumor responses in tumor necrosis factor-alpha knockout mice.* Eur J Immunol, 2000. **30**(7): p. 1957-66.
46. Biron, C.A., et al., *Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines.* Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 189-220.
47. Street, S.E., E. Cretney, and M.J. Smyth, *Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis.* Blood, 2001. **97**(1): p. 192-7.
48. Carson, W.E., et al., *A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival.* J Clin Invest, 1997. **99**(5): p. 937-43.
49. Fehniger, T.A., M.A. Cooper, and M.A. Caligiuri, *Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer.* Cytokine Growth Factor Rev, 2002. **13**(2): p. 169-83.
50. Cai, G., R.A. Kastelein, and C.A. Hunter, *IL-10 enhances NK cell proliferation, cytotoxicity and production of IFN-gamma when combined with IL-18.* Eur J Immunol, 1999. **29**(9): p. 2658-65.
51. Carpen, O. and E. Saksela, *Directed exocytosis in the NK-cell-mediated cytotoxicity. A review.* Nat Immun Cell Growth Regul, 1988. **7**(1): p. 1-12.

52. Young, J.D. and Z.A. Cohn, *Cellular and humoral mechanisms of cytotoxicity: structural and functional analogies*. Adv Immunol, 1987. **41**: p. 269-332.
53. Moretta, A., et al., *Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 197-223.
54. Long, E.O., *Regulation of immune responses through inhibitory receptors*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 875-904.
55. Vitale, M., et al., *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, 1996. **93**(4): p. 1453-7.
56. Vales-Gomez, M., et al., *Kinetics of interaction of HLA-C ligands with natural killer cell inhibitory receptors*. Immunity, 1998. **9**(3): p. 337-44.
57. Wilson, M.J., M. Torkar, and J. Trowsdale, *Genomic organization of a human killer cell inhibitory receptor gene*. Tissue Antigens, 1997. **49**(6): p. 574-9.
58. Farag, S.S., et al., *Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect*. Blood, 2002. **100**(6): p. 1935-47.
59. Vales-Gomez, M., et al., *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, 1999. **18**(15): p. 4250-60.
60. Uhrberg, M., et al., *Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes*. Immunity, 1997. **7**(6): p. 753-63.
61. Braud, V.M., et al., *HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C*. Nature, 1998. **391**(6669): p. 795-9.
62. Gardiner, C.M., et al., *Different NK cell surface phenotypes defined by the DX9 antibody are due to KIR3DL1 gene polymorphism*. J Immunol, 2001. **166**(5): p. 2992-3001.
63. Uhrberg, M., *Shaping the human NK cell repertoire: an epigenetic glance at KIR gene regulation*. Mol Immunol, 2005. **42**(4): p. 471-5.
64. Garrido, F., et al., *Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours*. Immunol Today, 1997. **18**(2): p. 89-95.
65. Lopez-Botet, M., et al., *The CD94/NKG2 C-type lectin receptor complex*. Curr Top Microbiol Immunol, 1998. **230**: p. 41-52.
66. Lee, N., et al., *HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(9): p. 5199-204.
67. Bottino, C., et al., *The human natural cytotoxicity receptors (NCR) that induce HLA class I-independent NK cell triggering*. Hum Immunol, 2000. **61**(1): p. 1-6.
68. Sivori, S., et al., *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, 1999. **29**(5): p. 1656-66.

69. Sivori, S., et al., *2B4 functions as a co-receptor in human NK cell activation*. Eur J Immunol, 2000. **30**(3): p. 787-93.
70. Arnon, T.I., et al., *The mechanisms controlling the recognition of tumor- and virus-infected cells by NKp46*. Blood, 2004. **103**(2): p. 664-72.
71. Reth, M., *Antigen receptor tail clue*. Nature, 1989. **338**(6214): p. 383-4.
72. Cambier, J.C., *New nomenclature for the Reth motif (or ARH1/TAM/ARAM/YXXL)*. Immunol Today, 1995. **16**(2): p. 110.
73. Brumbaugh, K.M., et al., *Functional role for Syk tyrosine kinase in natural killer cell-mediated natural cytotoxicity*. J Exp Med, 1997. **186**(12): p. 1965-74.
74. Stahls, A., et al., *Triggering of human natural killer cells through CD16 induces tyrosine phosphorylation of the p72syk kinase*. Eur J Immunol, 1994. **24**(10): p. 2491-6.
75. Cone, J.C., et al., *Association of the p56lck protein tyrosine kinase with the Fc gamma RIIIA/CD16 complex in human natural killer cells*. Eur J Immunol, 1993. **23**(10): p. 2488-97.
76. Ferlazzo, G., et al., *Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells*. J Exp Med, 2002. **195**(3): p. 343-51.
77. Ferrini, S., et al., *Phenotypic and functional characterization of recombinant interleukin 2 (rIL 2)-induced activated killer cells: analysis at the population and clonal levels*. J Immunol, 1987. **138**(4): p. 1297-302.
78. Parolini, S., et al., *X-linked lymphoproliferative disease. 2B4 molecules displaying inhibitory rather than activating function are responsible for the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected cells*. J Exp Med, 2000. **192**(3): p. 337-46.
79. Werfel, T., et al., *Activation of cloned human natural killer cells via Fc gamma RIII*. J Immunol, 1989. **142**(4): p. 1102-6.
80. Zeis, M., et al., *Allogeneic MHC-mismatched activated natural killer cells administered after bone marrow transplantation provide a strong graft-versus-leukaemia effect in mice*. Br J Haematol, 1997. **96**(4): p. 757-61.
81. Ruggeri, L., et al., *Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants*. Science, 2002. **295**(5562): p. 2097-100.
82. Caligiuri, M.A., et al., *Immunotherapeutic approaches for hematologic malignancies*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2004: p. 337-53.
83. Leung, W., et al., *Determinants of antileukemia effects of allogeneic NK cells*. J Immunol, 2004. **172**(1): p. 644-50.
84. Ruggeri, L., et al., *Exploitation of alloreactive NK cells in adoptive immunotherapy of cancer*. Curr Opin Immunol, 2005. **17**(2): p. 211-7.
85. Reittie, J.E., et al., *Endogenously generated activated killer cells circulate after autologous and allogeneic marrow transplantation but not after chemotherapy*. Blood, 1989. **73**(5): p. 1351-8.
86. Lowdell, M.W., et al., *The effect of T cell depletion with Campath-1M on immune reconstitution after chemotherapy and allogeneic bone marrow transplant as treatment for leukaemia*. Bone Marrow Transplant, 1998. **21**(7): p. 679-86.



87. Clynes, R.A., et al., *Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets*. Nat Med, 2000. **6**(4): p. 443-6.
88. Bellosillo, B., et al., *Complement-mediated cell death induced by rituximab in B-cell lymphoproliferative disorders is mediated in vitro by a caspase-independent mechanism involving the generation of reactive oxygen species*. Blood, 2001. **98**(9): p. 2771-7.
89. Manches, O., et al., *In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas*. Blood, 2003. **101**(3): p. 949-54.
90. Sacchi, S., et al., *Treatment of B-cell non-Hodgkin's lymphoma with anti CD 20 monoclonal antibody Rituximab*. Crit Rev Oncol Hematol, 2001. **37**(1): p. 13-25.
91. Huhn, D., et al., *Rituximab therapy of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2001. **98**(5): p. 1326-31.
92. Blomberg, K., et al., *Time-resolved fluorometric assay for natural killer activity using target cells labelled with a fluorescence enhancing ligand*. J Immunol Methods, 1996. **193**(2): p. 199-206.
93. Kosaka, Y., et al., *Infant acute lymphoblastic leukemia with MLL gene rearrangements: outcome following intensive chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation*. Blood, 2004. **104**(12): p. 3527-34.
94. Pui, C.H., et al., *Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region*. Lancet, 2002. **359**(9321): p. 1909-15.
95. Geiselhart, A., et al., *Positive selection of CD56+ lymphocytes by magnetic cell sorting*. Nat Immun, 1996. **15**(5): p. 227-33.
96. Miltenyi, S., et al., *High gradient magnetic cell separation with MACS*. Cytometry, 1990. **11**(2): p. 231-8.
97. Pflueger, E., E.A. Mueller, and F.A. Anderer, *Preservation of cytotoxic function during multi-cycle immunomagnetic cell separations of human NK cells using a new type of magnetic bead*. J Immunol Methods, 1990. **129**(2): p. 165-73.
98. Barbin, K., et al., *Influence of variable N-glycosylation on the cytolytic potential of chimeric CD19 antibodies*. J Immunother, 2006. **29**(2): p. 122-33.
99. Lang, P., et al., *Clinical scale isolation of T cell-depleted CD56+ donor lymphocytes in children*. Bone Marrow Transplant, 2002. **29**(6): p. 497-502.
100. Bryceson, Y.T., et al., *Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion*. Blood, 2006. **107**(1): p. 159-66.
101. Westgaard, I.H., et al., *Rat NKp46 activates natural killer cell cytotoxicity and is associated with FcepsilonRIgamma and CD3zeta*. J Leukoc Biol, 2004. **76**(6): p. 1200-6.
102. Sivori, S., et al., *p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation*. J Exp Med, 1997. **186**(7): p. 1129-36.
103. Pende, D., et al., *Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells*. J Exp Med, 1999. **190**(10): p. 1505-16.

104. Pessino, A., et al., *Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity*. J Exp Med, 1998. **188**(5): p. 953-60.
105. Moretta, A., et al., *Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity*. Immunol Today, 2000. **21**(5): p. 228-34.
106. Vitale, M., et al., *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, 1998. **187**(12): p. 2065-72.
107. Mandelboim, O. and A. Porgador, *NKp46*. Int J Biochem Cell Biol, 2001. **33**(12): p. 1147-50.
108. Mavoungou, E., M.K. Bouyou-Akotet, and P.G. Kremsner, *Effects of prolactin and cortisol on natural killer (NK) cell surface expression and function of human natural cytotoxicity receptors (NKp46, NKp44 and NKp30)*. Clin Exp Immunol, 2005. **139**(2): p. 287-96.
109. McLaughlin, P., et al., *Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program*. J Clin Oncol, 1998. **16**(8): p. 2825-33.
110. Coiffier, B., *Rituximab in combination with CHOP improves survival in elderly patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma*. Tumori, 2002. **88**(1 Suppl 1): p. S26-8.
111. Witzig, T.E., *Radioimmunotherapy for patients with relapsed B-cell non-Hodgkin lymphoma*. Cancer Chemother Pharmacol, 2001. **48 Suppl 1**: p. S91-5.
112. Kreitman, R.J., et al., *Efficacy of the anti-CD22 recombinant immunotoxin BL22 in chemotherapy-resistant hairy-cell leukemia*. N Engl J Med, 2001. **345**(4): p. 241-7.
113. Sievers, E.L., et al., *Selective ablation of acute myeloid leukemia using antibody-targeted chemotherapy: a phase I study of an anti-CD33 calicheamicin immunoconjugate*. Blood, 1999. **93**(11): p. 3678-84.
114. Ruggeri, L., et al., *Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation*. Blood, 1999. **94**(1): p. 333-9.
115. Pfeiffer, M., et al., *Rituximab mediates in vitro antileukemic activity in pediatric patients after allogeneic transplantation*. Bone Marrow Transplant, 2005. **36**(2): p. 91-7.
116. Lang, P., et al., *Chimeric CD19 antibody mediates cytotoxic activity against leukemic blasts with effector cells from pediatric patients who received T-cell-depleted allografts*. Blood, 2004. **103**(10): p. 3982-5.
117. Anderson, K.C., et al., *Expression of human B cell-associated antigens on leukemias and lymphomas: a model of human B cell differentiation*. Blood, 1984. **63**(6): p. 1424-33.
118. Cartron, G., et al., *Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcgammaRIIIa gene*. Blood, 2002. **99**(3): p. 754-8.

119. Shields, R.L., et al., *Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fcγ<sub>3</sub>RIII and antibody-dependent cellular toxicity*. J Biol Chem, 2002. **277**(30): p. 26733-40.
120. Peipp, M. and T. Valerius, *Bispecific antibodies targeting cancer cells*. Biochem Soc Trans, 2002. **30**(4): p. 507-11.
121. Preithner, S., et al., *High concentrations of therapeutic IgG1 antibodies are needed to compensate for inhibition of antibody-dependent cellular cytotoxicity by excess endogenous immunoglobulin G*. Mol Immunol, 2006. **43**(8): p. 1183-93.
122. Loffler, A., et al., *A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19 x CD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes*. Blood, 2000. **95**(6): p. 2098-103.
123. Cao, Y. and L. Lam, *Bispecific antibody conjugates in therapeutics*. Adv Drug Deliv Rev, 2003. **55**(2): p. 171-97.
124. Bruenke, J., et al., *Effective lysis of lymphoma cells with a stabilised bispecific single-chain Fv antibody against CD19 and Fcγ<sub>3</sub>RIII (CD16)*. Br J Haematol, 2005. **130**(2): p. 218-28.
125. Gessner, J.E., et al., *The IgG Fc receptor family*. Ann Hematol, 1998. **76**(6): p. 231-48.
126. Weiner, L.M., et al., *Clinical development of 2B1, a bispecific murine monoclonal antibody targeting c-erbB-2 and Fc gamma RIII*. J Hematother, 1995. **4**(5): p. 453-6.
127. Renner, C., F. Hartmann, and M. Pfreundschuh, *Treatment of refractory Hodgkin's disease with an anti-CD16/CD30 bispecific antibody*. Cancer Immunol Immunother, 1997. **45**(3-4): p. 184-6.
128. Koene, H.R., et al., *NA-phenotype-dependent differences in neutrophil Fc gamma RIIIb expression cause differences in plasma levels of soluble Fc gamma RIII*. Br J Haematol, 1996. **93**(1): p. 235-41.
129. Jacobs, R., et al., *CD16- CD56+ natural killer cells after bone marrow transplantation*. Blood, 1992. **79**(12): p. 3239-44.
130. Caligiuri, M.A., et al., *Selective modulation of human natural killer cells in vivo after prolonged infusion of low dose recombinant interleukin 2*. J Clin Invest, 1993. **91**(1): p. 123-32.
131. Ferlazzo, G., et al., *The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic*. J Immunol, 2004. **172**(3): p. 1455-62.
132. Vitale, C., et al., *Analysis of the activating receptors and cytolytic function of human natural killer cells undergoing in vivo differentiation after allogeneic bone marrow transplantation*. Eur J Immunol, 2004. **34**(2): p. 455-60.
133. Sun, R., et al., *Use of interleukin-15 for preparation of adherent NK cells from human peripheral blood: comparison with interleukin-2*. J Immunol Methods, 2003. **279**(1-2): p. 79-90.
134. Ciccone, E., et al., *Self class I molecules protect normal cells from lysis mediated by autologous natural killer cells*. Eur J Immunol, 1994. **24**(4): p. 1003-6.

135. Cambiaggi, A., et al., *Natural killer cell acceptance of H-2 mismatch bone marrow grafts in transgenic mice expressing HLA-Cw3 specific killer cell inhibitory receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(15): p. 8088-92.
136. Valiante, N.M., et al., *Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors*. Immunity, 1997. **7**(6): p. 739-51.
137. Campbell, K.S., et al., *Tyrosine phosphorylation of a human killer inhibitory receptor recruits protein tyrosine phosphatase 1C*. J Exp Med, 1996. **184**(1): p. 93-100.
138. Fry, A.M., L.L. Lanier, and A. Weiss, *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, 1996. **184**(1): p. 295-300.
139. Blery, M., et al., *Reconstituted killer cell inhibitory receptors for major histocompatibility complex class I molecules control mast cell activation induced via immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*. J Biol Chem, 1997. **272**(14): p. 8989-96.
140. Long, E.O., et al., *Inhibition of natural killer cell activation signals by killer cell immunoglobulin-like receptors (CD158)*. Immunol Rev, 2001. **181**: p. 223-33.
141. Warren, H.S., et al., *Biphasic response of NK cells expressing both activating and inhibitory killer Ig-like receptors*. Int Immunol, 2001. **13**(8): p. 1043-52.
142. Vitale, M., et al., *Isolation of a novel KIR2DL3-specific mAb: comparative analysis of the surface distribution and function of KIR2DL2, KIR2DL3 and KIR2DS2*. Int Immunol, 2004. **16**(10): p. 1459-66.
143. Leung, W., et al., *Comparison of killer Ig-like receptor genotyping and phenotyping for selection of allogeneic blood stem cell donors*. J Immunol, 2005. **174**(10): p. 6540-5.
144. Pui, C.H., et al., *Clinical heterogeneity in childhood acute lymphoblastic leukemia with 11q23 rearrangements*. Leukemia, 2003. **17**(4): p. 700-6.

## 8 Anhang

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 4.1: Lymphozyten vor MACS Anreicherung, markiert mit CD3 FITC u. CD56 PE	48
Abb. 4.2: Lymphozyten nach MACS Anreicherung, markiert mit CD3 FITC u. CD56 PE	48
Abb. 4.3: FACS Histogramm von P815 Zellen, markiert mit NKp46 PE (blau), bzw. unmarkierte Negativkontrolle (rot)	49
Abb. 4.4: FACS Histogramm von P815 Zellen, markiert mit NKp30 PE (grün), NKp44 PE (lila) u. NKp46 PE (blau)	49
Abb. 4.5: ruhende NK-Zellen, markiert mit NKp30 PE u. CD3 FITC	50
Abb. 4.6: stimulierte NK-Zellen, markiert mit NKp30 PE u. CD3 FITC	50
Abb. 4.7: ruhende NK-Zellen, markiert mit NKp44 PE u. CD3 FITC	50
Abb. 4.8: stimulierte NK-Zellen, markiert mit NKp44 PE u. CD3 FITC	50
Abb. 4.9: ruhende NK-Zellen, markiert mit NKp46 PE u. CD 3 FITC	51
Abb. 4.10: stimulierte NK-Zellen, markiert mit NKp46 PE u. CD3 FITC	51
Abb. 4.11: Einfluss von NKp30,44 u. 46 auf ruhende NK-Zellen	52

---

Abb. 4.12: Einfluss von NKp30,44 u. 46 auf stimulierte NK-Zellen	53
Abb. 4.13: Einfluss von NKp46 Antikörper auf die NK-Zell Zytotoxizität	55
Abb. 4.14: Einfluss von CD16 u. NKG2D auf ruhende NK-Zellen	56
Abb. 4.15: Einfluss von CD16 u. NKG2D auf stimulierte NK-Zellen	57
Abb. 4.16: Einfluss von Antikörper-Kombinationen auf ruhende NK-Zellen	59
Abb. 4.17: Einfluss von Antikörper-Kombinationen auf stimulierte NK-Zellen	60
Abb. 4.18: Einfluss von NKp46 u. CD16 Ak-Kombination auf ruhende NK-Zellen	62
Abb. 4.19: Einfluss von NKp46 u. CD16 Ak-Kombination auf stimul. NK-Zellen	62
Abb. 4.20: Einfluss von CD158a und CD158e Antikörpern auf NK-Zellen	64
Abb. 4.21: Einfluss von CD158b Antikörper auf NK-Zellen	65
Abb. 4.22: NK-Zellen Gruppe I – CD158b Ak wirkte nicht aktivierend - markiert mit CD56 FITC u. CD158b PE	66
Abb. 4.23: NK-Zellen Gruppe II – CD158b Ak wirkte aktivierend - markiert mit CD56 FITC u. CD158b PE	66
Abb. 4.24: Einfluss des NKp46*CD19 Antikörpers auf die Lyse leukämischer Blasten durch ruhende NK-Zellen	68

- 
- Abb. 4.25: Einfluss des NKp46\*CD19 Antikörpers auf die Lyse leukämischer Blasten durch stimulierte NK-Zellen 69
- Abb. 4.26: Einfluss von humanem Serum auf den zytotoxizitätssteigernden Effekt des chimären CD19 Ak's bei unstimulierten NK-Zellen 71
- Abb. 4.27: Einfluss von humanem Serum auf den zytotoxizitätssteigernden Effekt des chimären CD19 Ak's bei stimulierten NK-Zellen 71
- Abb. 4.28: Einfluss des NKp46\*CD19 Antikörpers auf die Lyse leukämischer Blasten durch unstimulierte pMNC's transplantiertes Patienten 72
- Abb. 4.29: Einfluss des NKp46\*CD19 Antikörpers auf die Lyse leukämischer Blasten durch stimulierte pMNC's transplantiertes Patienten 73
- Abb. 4.30: Vergleich der Zytotoxizität unstimulierter pMNC's und NK-Zellen 74
- Abb. 4.31: Vergleich der Zytotoxizität stimulierter pMNC's und NK-Zellen 75

## 8.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1: Indikationen für die Stammzelltransplantation in der ALL-BFM 2000 Studie. NRd33 = Non response an Tag 33; PPR = Prednisone poor response; PGR = Prednisone good response	5
Tab. 4.1: Zusammensetzung der Lymphozyten vor MACS-Anreicherung	47
Tab. 4.2: Zusammensetzung der Lymphozyten nach MACS-Anreicherung	47
Tab. 4.3: Durchschnittliche Lyse von P815 durch NK-Zellen mit NKp30	54
Tab. 4.4: Durchschnittliche Lysen von P815 mit NKp46 Antikörper	55
Tab. 4.5: spezifische Lyse von P815 durch ruhende NK-Zellen mit NKp46 u.CD16	58
Tab. 4.6: spezifische Lyse von P815 durch stimulierte NK-Zellen mit NKp46 u.CD16	58
Tab. 4.7: spez. Lyse von P815 durch NK-Zellen mit NKp30,44 u. 46 Ak-Kombination	61
Tab. 4.8: Steigerung der spez. Lysen mit CD16 durch IL2	63
Tab. 4.9: spezifische Lyse von P815 durch NK-Zellen mit CD158b Antikörper, I	65
Tab. 4.10: spezifische Lyse von P815 durch NK-Zellen mit CD158b Antikörper, II	66



---

Tab. 4.11: spez. Lyse leukäm. Blasten durch ruhende NK-Zellen mit CD19*NKp46 Ak	68
Tab. 4.12: spez. Lyse leukäm. Blasten durch stimul. NK-Zellen mit CD19*NKp46-Ak	69
Tab. 4.13: spezifische Lyse leukämischer Blasten durch NK-Zellen mit NKp46 Ak	70
Tab. 4.14: Vergleich bispezifischer CD19*CD16 Ak mit chim. CD19 Ak	70
Tab. 4.15: Steigerung der spez. Lyseraten durch den Einsatz des CD19*NKp46 Ak's	73
Tab. 4.16: Steigerung der spez. Lyseraten durch Einsatz des chimären CD19 Ak's	74

**Danksagungen:**

Bei meinem Doktorvater Dr. Peter Lang bedanke ich mich für die Überlassung des Themas. Dr. Matthias Pfeiffer möchte ich für die gute Betreuung und für seine überaus hilfreichen Ratschläge bei der Arbeit im Labor bzw. beim Verfassen dieser Arbeit danken. Bei Dr. Michael Schumm bedanke ich mich für seine Hilfe bei diversen technischen, vor allem Computer-assoziierten Problemen. Danke auch dem ganzen Laborteam, vor allem Annie Babarin-Doerner, für ihre Unterstützung und Rücksichtnahme. Mein Dank geht auch an alle meine freiwilligen Spender, die ebenfalls zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

**Lebenslauf:**

## Persönliche Daten:

Name	Markus Bolzhauser
Geburtsdatum	08.05.1980
Geburtsort	Bietigheim-Bissingen
Eltern	Ilse Bolzhauser und Klaus Bolzhauser

## Ausbildung:

1986-1989	Grundschule Metterzimmern
1989-1990	Hillerschule Bietigheim
1990-1999	Ellental Gymnasium Bietigheim
1999	Abitur, Endnote 2,1
1999-2000	Grundwehrdienstleistender beim Gebirgsjägerbataillon 231 in Bad Reichenhall
2001-2008	Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
2003	Physikum, Endnote 1,66
30.10.2007	2. Staatsexamen (Ärztliche Prüfung)
2007-2008	6-monatige Assistenzarztstelle im Bereich Dermatologie
2008-2009	Assistenzarzt in der Nephrologischen Abteilung im RBK Stuttgart

