

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

***In vitro* Untersuchung der Alloreaktivität von  
NK-Einzelzellklonen gegenüber  
Neuroblastomzelllinien unter Berücksichtigung des  
KIR-Rezeptor-Ligand Modells**

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

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

**vorgelegt von  
Matela, Marie**

**2019**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

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

2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Neumann

Tag der Disputation: 28.06.2019

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Neuroblastom</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Multimodales Therapieregime</b> .....	<b>2</b>
	1.2.1 Haploidente Stammzelltransplantation .....	3
	1.2.2 GD2 Antikörpertherapie .....	4
<b>1.3</b>	<b>Natürliche Killerzellen</b> .....	<b>6</b>
	1.3.1 Maturation und Differenzierung .....	8
	1.3.2 Rezeptorimmunologie und Zytokine .....	10
<b>1.4</b>	<b>NK-Alloreaktivitätsmodelle</b> .....	<b>13</b>
<b>1.5</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>Allgemeine Materialien und Programme</b> .....	<b>19</b>
	2.1.1 Geräte.....	19
	2.1.2 Verbrauchsmaterialien, Glas- und Plastikwaren .....	19
	2.1.3 Stammlösungen.....	20
	2.1.4 Angesetzte Puffer und Lösungen.....	21
	2.1.5 Allgemeine Software.....	22
<b>2.2</b>	<b>Verwendetes Zellmaterial</b> .....	<b>22</b>
	2.2.1 Gesunde Spender zur Expansion von NK-Klonen und Subpopulationen.....	22
	2.2.2 Neuroblastomzelllinien.....	22
	2.2.3 Erythroleukämische Zelllinie K562.....	23
	2.2.4 Feederzelllinie K562-mb15-41BBL .....	23
<b>2.3</b>	<b>MTS Proliferationsassay</b> .....	<b>24</b>
<b>2.4</b>	<b>Kultivierung der Zelllinien</b> .....	<b>25</b>
	2.4.1 Kultivierung der Suspensionszelllinien.....	26
	2.4.2 Kultivierung der adhärennten Zelllinien.....	26
<b>2.5</b>	<b>Kryokonservierung und Auftauen der Zelllinien</b> .....	<b>27</b>
<b>2.6</b>	<b>Verwendeter chimärer therapeutischer Antikörper</b> .....	<b>27</b>
<b>2.7</b>	<b>Isolierung von peripheren mononukleären Zellen</b> .....	<b>28</b>

<b>2.8</b>	<b>Zellzahlbestimmung .....</b>	<b>29</b>
<b>2.9</b>	<b>Zellanreicherung mittels MACS-System .....</b>	<b>30</b>
<b>2.10</b>	<b>T-Zell Depletion mit Dynabeads.....</b>	<b>31</b>
<b>2.11</b>	<b>Durchflusszytometrische Zellsortierung .....</b>	<b>32</b>
<b>2.12</b>	<b>Durchflusszytometrische Immunphänotypisierung .....</b>	<b>34</b>
<b>2.13</b>	<b>Klonierung und Expansion von Natürlichen Killerzellen .....</b>	<b>38</b>
<b>2.14</b>	<b>BATDA Release Assay .....</b>	<b>40</b>
<b>2.15</b>	<b>CD107a und IFN-<math>\gamma</math> Assay.....</b>	<b>44</b>
<b>2.16</b>	<b>xCELLigence .....</b>	<b>46</b>
<b>2.17</b>	<b>Luciferase-Assay .....</b>	<b>48</b>
<b>2.18</b>	<b>Quantitative Durchflusszytometrie QIFIKIT .....</b>	<b>52</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>55</b>
<b>3.1</b>	<b>Auswahl der Neuroblastomzelllinien und NK-Zell Spender .....</b>	<b>55</b>
<b>3.2</b>	<b>Spenderspezifisches KIR-Repertoire der NK-Zellen vor und nach Expansion .....</b>	<b>59</b>
<b>3.3</b>	<b>Generierung definierter NK-Klone.....</b>	<b>63</b>
	3.3.1 Reinheit des Zellprodukts nach durchflusszytometrischen Zellsortierung.....	63
	3.3.2 Darstellung eines Zellprodukts vor und nach Expansion .....	64
	3.3.3 Reinheit der NK-Klone nach Expansion.....	65
	3.3.4 Wachstum und Immunphänotyp der NK-Klone.....	66
<b>3.4</b>	<b>Immunphänotypisierung der Zelllinien .....</b>	<b>71</b>
	3.4.1 Quantitative HLA-Klasse I Expression der Zelllinien.....	71
	3.4.2 Semiquantitative HLA-Klasse I Expression.....	72
	3.4.3 Expression der Adhäsionsmoleküle, NKG2D und DNAM-1 Liganden auf LAN-1, LS und K562 .....	74
	3.4.4 GD2-Expression der Zelllinien LAN-1 und LS.....	81
<b>3.5</b>	<b>NK-Zell vermittelte Lyse der Zelllinien LAN-1, LS und K562.....</b>	<b>82</b>
	3.5.1 NK-Zellaktivität unter Berücksichtigung der GD2-Expression der Zelllinien LAN-1 und LS .....	84
	3.5.2 Zytotoxische Aktivität unter Berücksichtigung der HLA I Typisierung und KIR-Genotypisierung der Spender .....	86

3.5.3	Zytotoxische Aktivität nach dem LL Modell.....	88
3.5.4	Zytotoxische Aktivität nach dem Memphis R/L Modell.....	91
3.5.5	Zytotoxische Aktivität nach dem Licensing Modell.....	93
3.5.6	Zytotoxische Aktivität nach dem KIR-Genotyping Modell ....	96
3.5.7	Echtzeitmessung der zytotoxischen Aktivität expandierter NK-Populationen .....	96
3.5.8	CD107a-Assay- Indirekte Messung der zytotoxischen Aktivität expandierter NK-Zellen .....	104
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>107</b>
<b>4.1</b>	<b>NK-Zell Suszeptibilität solider Tumore/ Antitumoraktivität von NK-Zellen.....</b>	<b>107</b>
<b>4.2</b>	<b>Expansion und Charaktersistierung des Zellprodukts .....</b>	<b>108</b>
<b>4.3</b>	<b>Mediatoren der NK-Zell vermittelten Lyse .....</b>	<b>110</b>
4.3.1	HLA Klasse I Expression .....	110
4.3.2	GD2 Expression und ADCC .....	111
4.3.3	Adhäsionsmoleküle.....	113
4.3.4	NKG2D Liganden.....	114
4.3.5	DNAM-1 Liganden .....	116
<b>4.4</b>	<b>Einfluss der NK-Alloreaktivitätsmodelle auf die Lysierbarkeit der Neuroblastomzelllinien LAN-1 und LS .....</b>	<b>117</b>
4.4.1	Anwendung des Ligand-Ligand Modells.....	117
4.4.2	Anwendung des Rezeptor-Ligand Modells .....	119
4.4.3	Anwendung des KIR-Genotyping Modells .....	120
4.4.4	Anwendung des Licensing Modells.....	122
<b>4.5</b>	<b>Klinischer Einfluss der Alloreaktivitätsmodelle und Implikation zur Spenderauswahl bei alloHSCT .....</b>	<b>123</b>
4.5.1	Klinischer Einfluss des Ligand-Ligand Modells.....	124
4.5.2	Klinischer Einfluss des Rezeptor-Ligand Modells .....	126
4.5.3	Klinischer Einfluss des Homozygotie-Alloreaktivitäts- modells .....	127
4.5.4	Klinischer Einfluss des KIR Genotyping Modell .....	129
4.5.5	Klinischer Einfluss des Licensing Modells .....	131

<b>4.6</b>	<b>Zusammenfassung der Alloreaktivitätsmodelle im klinischen und präklinischen Setting .....</b>	<b>132</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>135</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>138</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>I</b>
<b>8</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>XIV</b>
<b>9</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>XVI</b>
<b>10</b>	<b>ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL .....</b>	<b>XIX</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
ABC	antibody binding capacity
ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity
ADCP	antibody-dependent cellular phagocytosis)
AK	Antikörper
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
B	Beschleunigung
BAE	background antibody equivalent
BATDA	bis (acetoxymethyl) 2,2':6',2"- terpyridine-6,6"-dicarboxylate
BL	Biolumineszenz
c-ALL	common acute lymphoblastic leukemia
CAR	chimeric antigen receptor
CCL2-5	C-C chemokine ligand 2-5
CD	cluster of differentiation
Cen	Centromer
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CML	chronische myeloische Leukämie
CXCL8	C-X-C motif chemokine 8, IL8
DNAM-1L	DNAM-1 Ligand
E:T-Ratio	effector cell to target cell ratio
FACS	fluorescence activated cell sorting
FasL	Fas-Ligand
Fc	fragment, crystallizable
FCS	fetal calf serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
FSC	forward light scatter
g	relative Erdbeschleunigung
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor
GD2	Disialogangliosid

## Abkürzungsverzeichnis | VI

GM-CSF	granulocyte macrophage-colony stimulating factor
GvHD	graft-versus-host disease
GvL	graft-versus-leukemia
Gy	Gray
HAMA	humanen Anti-Maus-Antikörper
HLA	human leukocyte antigen
HSC	hämatopoetische Stammzelle
HSCT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
ICAM	intercellular adhesion molecule
IE	internationale Einheiten
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
Kap.	Kapitel
KIR	killer cell immunoglobulin-like receptor
LAMP-1	lysosomal-associated membrane protein-1
LF	Lysefaktor
LFA	lymphocyte function-associated antigen
LL Modell	Ligand-Ligand Modell
MFI	median fluorescence intensity
MFIR	median fluorescence intensity ratio
MHC	major histocompatibility complex
MIC A/B	MHC class I polypeptide-related sequence A/B
n	Anzahl der Einzelmessungen
NCR	natural cytotoxicity receptor
NKG2DL	NKG2D Ligand
NKT-Zelle	Natürliche Killer T-Zelle
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
PBS	phosphat buffered saline
PBMC	peripheral blood mononuclear cell



PCR	polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PerCp	Peridinin-Chlorophyll Protein
PFA	Paraformaldehyde
PP	Polypropylen
PS	Polystyren PVR poliovirus receptor
PVR	Poliovirus Receptor
R	Bremse
RL Modell	Rezeptor-Ligand Modell
RR Modell	Rezeptor-Rezeptor Modell
RT	Raumtemperatur
SABC	specific antibody binding capacity
SD	standard deviation
SSC	sideward light scatter
SZT	Stammzelltransplantation
Tab.	Tabelle
Tel	Telomer
TGF- $\beta$	transforming growth factor- $\beta$
TNF	Tumor-Nekrose Faktor
ULBP	UL16-binding proteins
XCL1	chemokine (C motif) ligand
vs.	versus



# 1 Einleitung

## 1.1 Neuroblastom

Das Neuroblastom gehört zu der Gruppe der embryonalen neuroektodermalen Tumore [1]. Es handelt sich um den häufigsten soliden extrakraniellen Tumor im Kindesalter mit einer Inzidenz von 1/100 000 bei Kindern unter 15 Jahren. Das mediane Alter bei Diagnosestellung beträgt 18 Monate [2]. Durch seinen Ursprung vom sympathischen Nervengewebe kann es überall dort auftreten, wo sich sympathisches Nervengewebe findet. Häufigste Manifestationsorte sind die Nebennieren, die Ganglien des zervikalen, thorakalen und abdominalen Grenzstrangs und Paraganglien [3]. Tumorassoziierte Symptome sind häufig durch eine hohe Tumorlast, Infiltration umliegender Organe, Nerven und Gefäße oder paraneoplastische Symptome bedingt. Etwa die Hälfte der Patienten weisen bei Diagnosestellung bereits ein metastasiertes Stadium auf, wobei am häufigsten das Knochenmark, die Lymphknoten und die Leber betroffen sind [4].

Das Neuroblastom zeichnet sich durch eine komplexe vielfältige Tumorbilologie aus. Die Prognose der Patienten ist dementsprechend sehr heterogen und reicht vom metastasierten Stadium IVS - welches ohne Therapie eine Spontanremission aufweisen kann, was sehr ungewöhnlich ist für fortgeschrittene Tumore – bis zu aggressiven Tumore, die selbst durch intensive multimodale Therapiekonzepte nicht beherrscht werden können [5].

Infolge dessen erfolgt eine Einteilung der Patienten in eine „low“, „intermediate“ und „high-risk“ Gruppe, abhängig vom klinischen Stadium, Alter bei Diagnosestellung, Tumorphistologie, MYCN Amplifikation und Zytogenetik (Deletion 1p, 11q, Ploidie) [6]. Während das 5-Jahres Überleben der ersten beiden Gruppen über 90% beträgt, überleben von den Hochrisikopatienten nach intensiven multimodalen Therapiekonzepten nur 40% [7, 8]. Insbesondere die Amplifikation des Onkogens MYCN geht mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und schlechter Prognose einher [9, 10].

Die unbefriedigenden Langzeitergebnisse und limitierten Therapieoptionen für Patienten mit metastasiertem Neuroblastom (Stadium IV) rücken die Immuntherapie mit Antikörpern und zellbasierte Therapien als Ergänzung zu multimodalen konservativen Therapien in den Fokus der Forschung. Die GD2-Antikörpertherapie hat zwar bereits Einzug in die Therapieprotokolle der Hochrisikopatienten gehalten und eine deutliche Prognoseverbesserung gebracht [11]. Nichtsdestotrotz steht man bei dieser Patientengruppe hinsichtlich der vorhandenen und wirksamen Therapieoptionen schnell mit dem Rücken zur Wand.

## 1.2 Multimodales Therapieregime

Die Säulen der klassischen Neuroblastomtherapie sind die Chemotherapie, Strahlentherapie und operative Therapie. Die Anwendung der Therapieoptionen alleine oder in Kombination ist maßgeblich von der Risikostratifizierung, Lokalisation und dem Tumorstadium abhängig. Insbesondere bei der Behandlung von Hochrisikoneuroblastomen wird ein multimodales Therapieregime gewählt, welches noch durch myeloablative Chemotherapien mit autologer Stammzelltransplantation (SZT) und GD2-Antikörpertherapie mit GM-CSF und IL2 sowie Therapie mit Retinoiden ergänzt wird [12, 13] (siehe **Tab. 1.1**).

Die Therapie von Hochrisikoneuroblastomen gliedert sich im Allgemeinen in vier Phasen: die Induktion, lokale Tumorkontrolle, Konsolidierung und Erhaltungstherapie [5]. Trotz des sehr aggressiven Therapieregimes zeigen viele Hochrisikopatienten ein schlechtes Therapieansprechen und eine hohe Rezidivneigung. Diese Patienten weisen im Median ein sehr schlechtes Überleben von 27,9 Monaten in der therapierefraktären Gruppe und 11 Monaten in der Rezidivgruppe auf [14].

Aus diesem Grund ist die Erforschung der Tumorbilogie zur Evaluation weiterer Therapieoptionen von übergeordneter Bedeutung. So stehen unterschiedliche mögliche Zielstrukturen wie beispielsweise MYCN, PVR, DNAM-1, B7-H3 im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses [15, 16].

Neue Behandlungsstrategien wie die allogene SZT oder CAR-T-Zell-Therapie werden derzeit im Rahmen klinischer und präklinischer Studien getestet und stellen vielversprechende Therapieoptionen, insbesondere bei der Behandlung von Hochrisikoneuroblastomen dar, welche ein schlechtes Ansprechen auf die bewährten Therapieoptionen haben [17, 18].

Tab. 1.1 Therapieregime abhängig von der Risikogruppe (modifiziert aus Cheung et al. 2013 [12])

Risiko- gruppe	MYCN Amplifikation	Stadium bei Diagnose- stellung	Alter bei Diagnose- stellung	Therapie
<b>Niedriges Risiko</b>	Nein	4s	<12 Monate	Supportive Therapie
	Nein	lokoregionär	<12 Jahre	Operative Therapie ± Chemotherapie
<b>Inter- mediäres Risiko</b>	Nein	4	<18 Monate	Operative Therapie + Chemotherapie
<b>Hohes Risiko</b>	Ja	lokoregionär	< 12 Jahre	Intensive Chemo- therapie + Strahlentherapie + Operative Therapie + Retinoide + Myeloablative Therapie mit autologer SZT + Immuntherapie
	Ja	4	<18 Monate	
	Nein	4	>18 Monate <12 Jahre	
	Nein	4	>12 Jahre	

### 1.2.1 Haploidente Stammzelltransplantation

Trotz multimodaler Therapie mit myeloablativer Chemotherapie und autologer SZT haben Patienten mit fortgeschrittenem Hochrisikoneuroblastom häufig ein unzureichendes Therapieansprechen, um eine langanhaltende Remission zu

erreichen, d.h. die meisten Patienten entwickeln im mittelfristigen Verlauf ein Rezidiv. Die haploidente SZT stellt eine weitere Therapieintensivierung bei Stadium IV rezidierten Neuroblastomen dar. Der bereits im Rahmen von hämatologischen Erkrankungen beobachtete Graft versus Leukemia Effekt, spielt möglicherweise auch bei der Behandlung solider Tumore als Graft versus Tumor Effekt eine Rolle [19, 20]. Neben einzelnen Fallberichten gibt es jedoch bislang nur wenige klinische Daten.

In der kürzlich veröffentlichten Arbeit von Illhardt et al. werden die Daten zweier vergleichbarer Phase I/II Studien mit insgesamt 26 Neuroblastom Hochrisikopatienten dargestellt. Neben einem guten Engraftment und einer recht guten Therapieverträglichkeit konnte keine Überlegenheit der haploidenten SZT gegenüber der autologen SZT gezeigt werden. Dies könnte jedoch auch durch die relativ hohe Tumorlast im Patientenkollektiv bedingt gewesen sein [18]. Nichtsdestotrotz stellt die haploidente SZT aufgrund der einfachen Spenderverfügbarkeit und Möglichkeit adoptiver Zelltherapien eine interessante Therapieplattform dar. Insbesondere Patienten, deren Knochenmark durch vorhergehende intensive Therapie zu stark geschädigt wurde für eine neuerliche autologe SZT, könnten von der Möglichkeit einer haploidenten SZT profitieren. Überdies werden beim Austausch des Immunsystems zwei weitere Aspekte berücksichtigt. Erstens im Transplantat finden sich in keinem Fall mehr Neuroblastomzellen und das neue, gesunde Immunsystem könnte effektiver den Tumor erkennen und zu einer immunologischen Langzeitkontrolle führen [18, 20, 21].

### **1.2.2 GD2 Antikörpertherapie**

Das Gangliosid GD2 ist eine bedeutende Zielstruktur in der Immuntherapie des Neuroblastoms. GD2 ist eine Glykolipid, welches auf der Zelloberfläche von Zellen neuroektodermalen Ursprungs exprimiert wird. Dessen genaue Funktion ist nach wie vor nicht vollständig verstanden, allerdings wird ihm eine bedeutende Rolle bei der Adhäsion von Tumorzellen an extrazelluläre Matrixproteine zugeschrieben [22]. GD2 wird zum einen von nahezu allen Neuroblastomen unabhängig vom Erkrankungsstadium hoch exprimiert, während die

Expressionsdichte auf gesundem Gewebe wie Neuronen, peripheren sensorischen Fasern und Melanozyten sehr niedrig ist [23]. Zum anderen unterliegt GD2, entgegen anderer immunologischer Zielstrukturen wie beispielsweise Rezeptoren, keinem Internalisierungsprozess unter Antikörpertherapie und weist somit eine stabile Oberflächenexpression auf, wodurch das Risiko für einen Escapemechanismus verringert wird [24].

Seit den 1980ern wurden zahlreiche GD2-Antikörper entwickelt und klinisch erprobt. Bei der ersten Generation von GD2-Antikörpern handelte es sich um murine Antikörper wie m3F8 und 14.G2a mit vielversprechender *in vitro* und *in vivo* Aktivität. Die antitumorale Aktivität begründet sich auf zwei Wirkungsmechanismen. Zum einen der Komplement vermittelten Zytotoxizität (CDC: complement-dependent cytotoxicity) und der für diese Arbeit relevanten Antikörper-abhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC: antibody-dependent cellular cytotoxicity), welche durch Fc-Rezeptor exprimierende Zellen wie NK-Zellen, Monozyten und neutrophile Granulozyten vermittelt wird. Der an die Tumorzelle gebundene Antikörper vermittelt über den konstanten Anteil des Antikörpers die biologische Aktivität, indem der Fc-Teil des Antikörpers von Fc-Rezeptoren gebunden wird. Es kommt zur Bildung einer zytolytischen Synapse, in der Granzyme und Perforine freigesetzt werden, die zur Tumorzelllyse führen und bei phagozytierenden Zellen eine Fc-abhängige Tumorzellphagozytose vermitteln [25]. Diesen Mechanismus nennt man Antikörper vermittelte Phagozytose (ADCP: antibody-dependent cellular phagocytosis) [26].

Neben häufigen Nebenwirkungen der murinen Antikörper wie Schmerzen, Fieber und Blutdruckschwankungen, kommt es regelhaft zur Induktion von humanen Anti-Maus-Antikörpern (HAMA: human anti-mouse antibodies), welche die therapeutischen Antikörper durch Bildung neutralisierender Antikörper-Antikörperkomplexe inaktivieren. Um sowohl die Toxizität als auch die Bildung von HAMAs zu reduzieren, konzentrierte sich die Forschung auf die Entwicklung weniger immunogener GD2-Antikörper [27]. Hierzu wurden durch gentechnische Methoden murine Anteile des Antikörpers durch humane Anteile ersetzt. Dies erfolgte ebenfalls bei dem in dieser Arbeit verwendeten chimären GD2-Antikörper

Dinutuximab beta (ch14.18/CHO). Er setzt sich zusammen aus der variablen Region des murinen anti-GD2-Antikörpers 14.G2a und der konstanten Region des humanen Immunglobulins IgG1k [28]. Dieser chimäre Antikörper beeindruckt durch eine 50-100fach stärkere ADCC Aktivität, verglichen mit dem murinen Wildtyp-Antikörper 14.G2a [29]. Durch Reduktion der murinen Anteile konnte die Bildung von HAMAs gegen ch14.18 deutlich reduziert werden. Der ch14.18 Antikörper, der in Tübingen im Rahmen einer klinischen Studie eingesetzt wurde (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02258815) führt zu schweren neuropathischen Schmerzen und kann von einer leichten Zytokinfreisetzung bis hin zum schweren Zytokinfreisetzungssyndrom mit Kapillarleck führen. Der regelhaft auftretende neuropathische Schmerz ist eine dosislimitierende Nebenwirkung der ch14.18 Antikörpertherapie [30].

Zur Verminderung der Allodynie wurde der Antikörper humanisiert hu14.18K332A. Durch eine Punktmutation im Bereich des Fc-Teils ist die Komplementfixierung vermindert. Hierdurch wird die CDC zwar reduziert, die gute antitumorale Aktivität bleibt jedoch aufgrund der ADCC erhalten [30, 31].

Komplementvermittelte Lyse wird induziert durch die Bindung der Serinprotease C1 an den Fc-Teil von GD2 gebundenem Antikörper. Die klassische Komplementkaskade führt zur Bildung des Membranangriffskomplexes und Lyse der Targetzelle [32].

### **1.3 Natürliche Killerzellen**

NK-Zellen stellen eine eigenständige Lymphozytenpopulation dar und sind von übergeordneter Bedeutung für die regelrechte Funktion des angeborenen Immunsystems. Sie finden sich insbesondere im lymphatischen und extralymphatischen Gewebe wie dem Knochenmark, der Milz, den Lymphknoten und im peripheren Blut [33]. Ihre immunologischen Eigenschaften bestehen nicht nur in der Produktion proinflammatorischer und immunregulatorischer Zytokine wie TNF und IFN- $\gamma$  sowie Chemokinen, sondern auch in direkten zytotoxischen Eigenschaften [33, 34]. Die NK-zellvermittelte Zytotoxizität lässt sich im Wesentlichen in sekretorische und nicht sekretorische Mechanismen

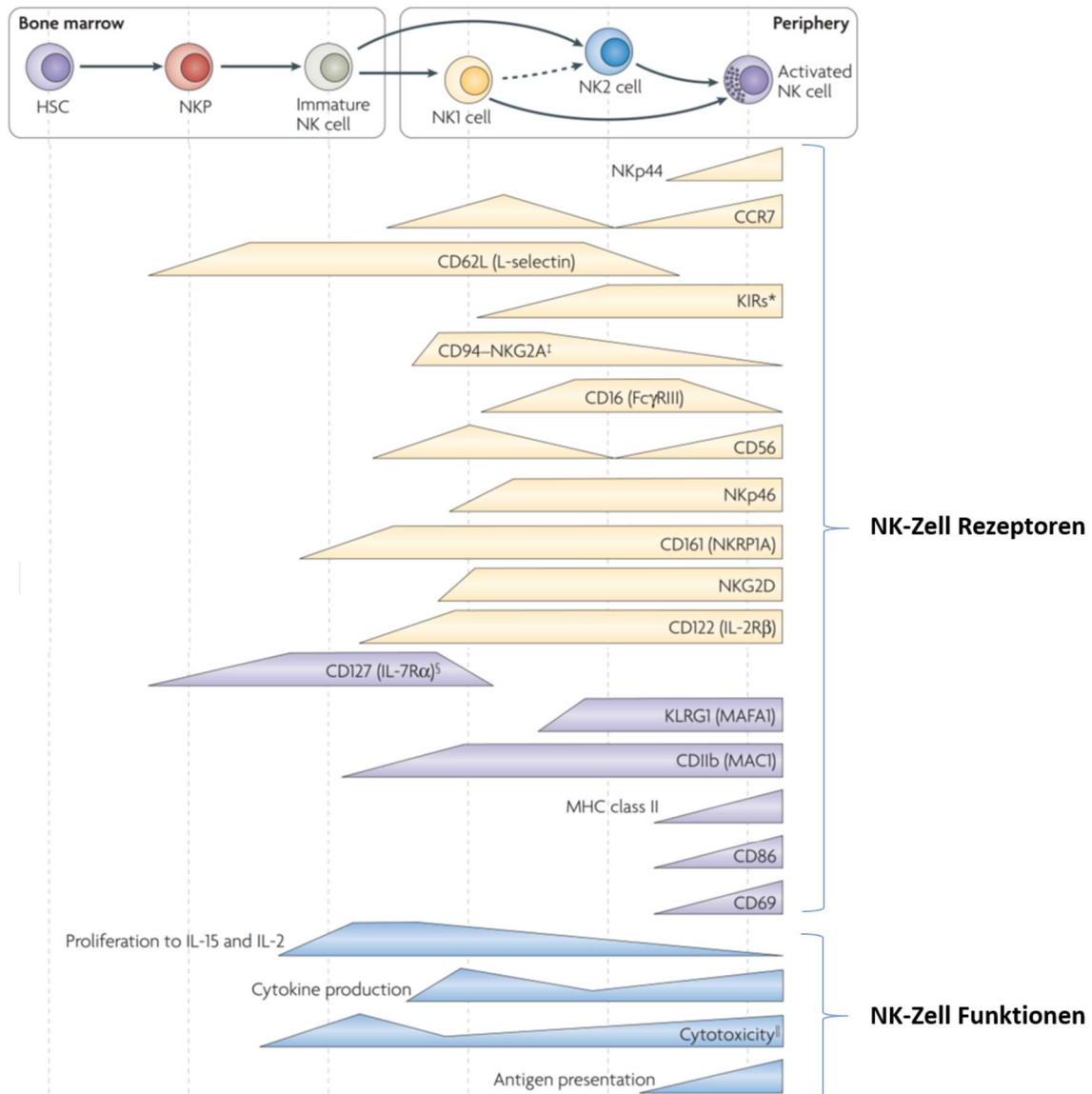


unterscheiden. Sekretorisch setzen NK-Zellen Perforin und Granzyme frei und vermitteln so die Lyse der Zielzelle. Nicht sekretorisch sind NK-Zellen in der Lage durch das Fas/FasL System und TRAIL-System die Apoptose einer Zielzelle zu induzieren [35, 36]. Darüber hinaus kann ihr zytotoxisches Potential durch CD16, den FcγIIIa Rezeptor, welcher an Zielzellen gebundene Antikörper erkennt, gesteigert werden (ADCC). Die immunologische Aktivität von NK-Zellen basiert auf der unmittelbaren Erkennung veränderter Zellen durch „missing self“ und/oder „induced self“ [37, 38]. Hierunter versteht man die Fähigkeit der NK-Zellen zwischen Eigen und Fremd zu unterscheiden. Maligne entartete und virusinfizierte Zellen zeichnen sich häufig durch eine verminderte oder fehlende MHC-Klasse I Expression („missing self“) und/oder als Zeichen des Zellstresses gesteigerte Expression aktivierender Oberflächenantigene wie beispielsweise MICA/B, ULBP1-6 und DNAM-1 Liganden aus („induced self“). Dies wird durch NK-Zell Rezeptoren erkannt und führt zur Aktivierung der NK-Zelle mit Lyse der Zielzelle [15, 39-41]. Im Gegensatz zu T- und B-Zellen durchlaufen NK-Zellen kein MHC-restringiertes Priming und fungieren daher Peptid-unabhängig. Sie haben hierdurch eine weniger spezifische, jedoch breitere Funktion. Durch ihre Interaktion mit dendritischen Zellen, Monozyten und T-Zellen stellen sie ein wichtiges Bindeglied zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem dar [42, 43]. Überdies scheinen NK-Zellen Gedächtniseigenschaften (memory NK cells) zu besitzen, die einst nur dem erworbenen Immunsystem zugeschrieben wurden [44]. So wurde gezeigt, dass bestimmte NK-Zellen nach Interleukinstimulation mit IL12 und IL18 nach spezifischer Restimulation eine gesteigerte IFN-γ Produktion aufwiesen. Diese Eigenschaft - die gesteigerte Funktionalität auf einen spezifischen Stimulus - kann auch bei NK Zellen auf Tochterzellen übertragen werden. Dies ist insofern spektakulär, als dass die Bildung von Gedächtniszellen bis dato nur dem erworbenen Immunsystem zugeschrieben wurde und eine Neubewertung der NK-Zellrolle nach sich zieht [45].

### 1.3.1 Maturation und Differenzierung

Die Maturation und Differenzierung von NK-Zellen unterliegt einem komplexen, noch nicht vollständig verstandenem System. Reife NK-Zellen zeichnen sich durch den Immunphänotyp  $CD56^+CD3^-$  aus [33]. In zahlreichen Studien wird eine weiterführende Unterteilung in Subpopulationen mit unterschiedlichen immunologischen Eigenschaften wie „Helfer-“ NK-Zellen, regulatorische NK-Zellen, zytotoxische NK-Zellen und antigenpräsentierende NK-Zellen vorgenommen [46-48]. Eine Einteilung der NK-Zellen in zwei Hauptgruppen entsprechend ihres Immunphänotyps  $CD56^{high}CD16^-$  /  $CD56^{dim}CD16^+$  und damit einhergehenden immunologischen Aufgaben erscheint sinnvoll. Während die immunregulatorischen  $CD56^{high}CD16^-$  NK-Zellen eine hohe Zytokinproduktion, jedoch geringe zytotoxische Aktivität aufweisen, zeichnen sich die  $CD56^{dim}CD16^+$  durch eine hohe zytotoxische Aktivität bei gleichzeitig geringerer Zytokinproduktion aus. Auch die Verteilung der NK-Zellen auf unterschiedliche Gewebe spiegelt ihre differente Rollenverteilung wider. So bilden die zytotoxischen  $CD56^{dim}CD16^+$  NK-Zellen mit etwa 80% den Großteil der im peripheren Blut zirkulierenden NK-Zellen, während die immunregulatorischen  $CD56^{high}CD16^-$  vor allem in Lymphknoten prozentual den Hauptanteil darstellen [49, 50].

Neben der klassischen Theorie, dass sich diese NK-Subpopulationen unidirektional aus  $CD34^+$  hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks entwickeln, wird derzeit kontrovers diskutiert, ob NK-Subpopulationen ineinander übergehen können, die Differenzierung durch eine feste Programmierung der NK-Zelle in der frühen Entwicklung bereits vorbestimmt ist oder die unterschiedlichen NK Zell-Subpopulationen aus verschiedenen Vorläuferzellen hervorgehen [51-54].



**Abb. 1.1 NK-Zell Reifung und Expression funktionaler Rezeptoren**

Dargestellt ist die Entwicklung von hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks (HSC) über NK-Vorläuferzellen (NKPs) zu reifen NK-Zellen. Das Diagramm beschreibt Expressionsmuster molekularer Marker während der unterschiedlichen Stadien der NK-Zellreifung. Die von unreifen NK-Zellen exprimierte Marker und Rezeptoren dienen in erster Linie der Proliferation und dem Überleben. Vermutlich beginnt auch die Edukation via körpereigener MHC Klasse I Moleküle bereits im unreifen NK-Zellstadium. Reife NK-Zellen werden im Wesentlichen in regulatorische NK1 ( $CD56^{high}CD16^{-}$ ) und zytotoxische NK2 ( $CD56^{low}CD16^{+}$ ) eingeteilt.

Überarbeitete Graphik aus Huntington et al. 2007, Nature Reviews Immunology [33]

### 1.3.2 Rezeptorimmunologie und Zytokine

NK-Zellen zeichnen sich durch die Expression zahlreicher inhibierender, aktivierender und costimulatorischer Rezeptoren aus. Das komplexe Zusammenspiel der durch diese Rezeptoren vermittelten Signale bestimmt die Aktivität der NK-Zelle. Die Expressionsdichte der Rezeptoren ist nicht statisch, sondern unterliegt zahlreichen Einflüssen wie beispielsweise Milieufaktoren, Reifegrad der NK-Zellen und der Interaktion mit anderen Immunzellen oder Targetzellen [55]. NK-Zellen produzieren proinflammatorische (bspw. IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , G-CSF, GM-CSF, IL3), antiinflammatorische (bspw. IL5, IL10, IL13) und costimulatorische Zytokine (TGF- $\beta$ ), welche sowohl autokrin als auch parakrin wirken und neben der Beeinflussung der NK-Zellfunktion eine konzentrierte Immunantwort durch Rekrutierung anderer Immunzellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems ermöglichen [56, 57]. Die durch NK-Zellen sezernierten Chemokine wie CCL2-5, XCL1, CXCL8 bewirken eine gezielte Migration der relevanten Immunzellen an den Wirkort [56].

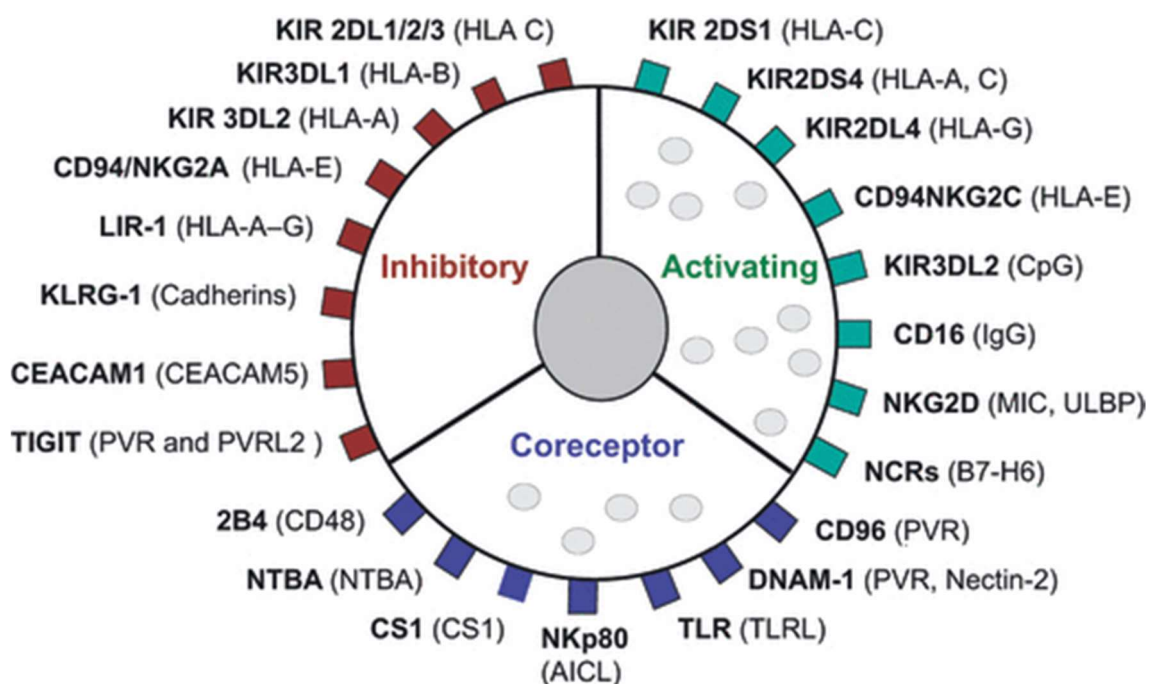


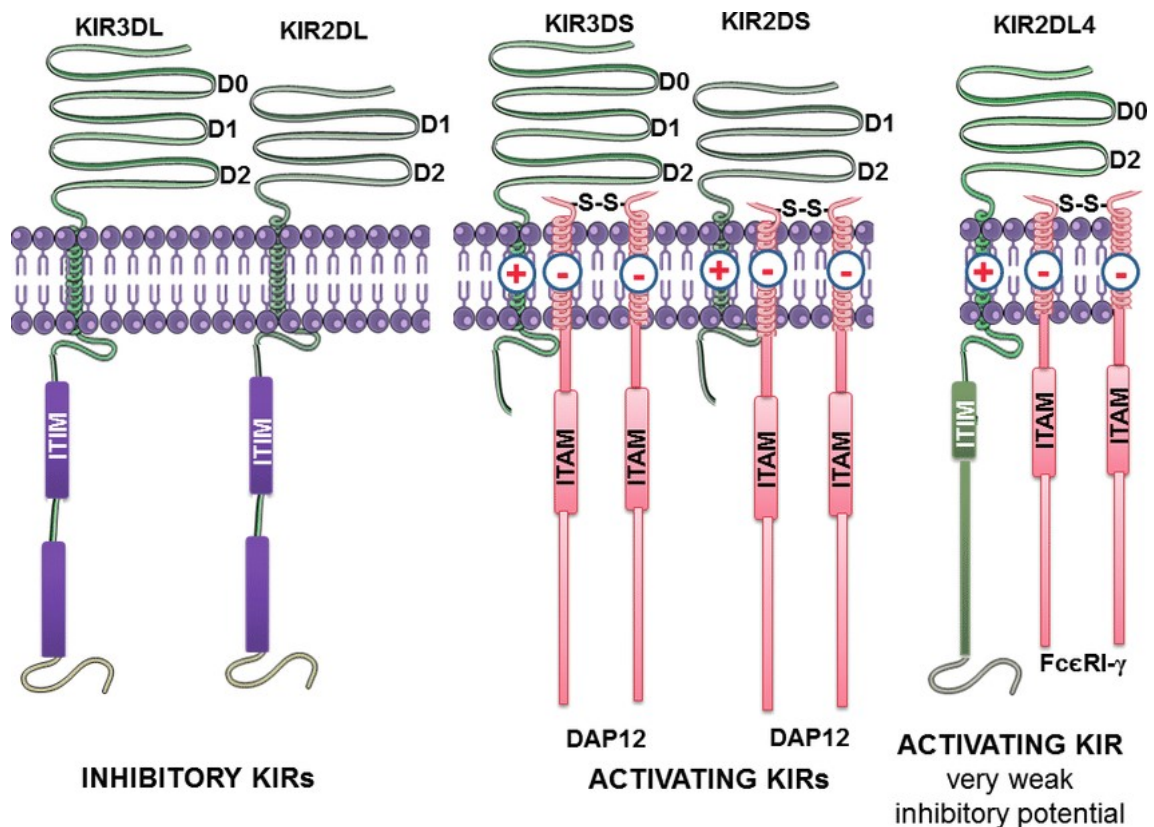
Abb. 1.2 NK-Zell Rezeptoren und deren Liganden

NK-Zellen exprimieren aktivierende, inhibierende und costimulatorische Rezeptoren, deren Zusammenspiel die Aktivität der NK-Zelle bestimmen. Auf eine Darstellung von Zytokin- und

Chemokinrezeptoren sowie inhibitorische Corezeptoren wurde in der Abbildung verzichtet.  
**Graphik aus Leung et al. 2011, British Journal of Haematology [56]**

### Inhibierende und aktivierende Rezeptoren und ihre Liganden

Die im Fokus dieser Arbeit stehenden KIR-Rezeptoren unterteilen sich in inhibierende und aktivierende Rezeptoren wie in **Abb. 1.3** dargestellt ist.



**Abb. 1.3** Aktivierende und inhibierende KIR-Rezeptoren

Dargestellt ist der strukturelle Aufbau inhibierender und aktivierender KIR-Rezeptoren. Die Nomenklatur der KIR-Gene setzt sich zusammen aus der Anzahl der externen Ig-Domänen 3D und 2D und der Gegenwart eines langen (L = long) oder kurzen (S = short) zyttoplasmatischen Anteils des Rezeptors. Während sich die extrazelluläre Domäne der Rezeptoren KIR3DL/KIR2DL und KIR3DS/KIR2DS im Wesentlichen bis auf einzelne Aminosäuren im strukturellen Aufbau gleichen, unterscheiden sich die Rezeptoren durch ihre intrazelluläre Signaldomäne. Inhibitorische KIR Rezeptoren zeichnen sich durch eine lange zyttoplasmatische Domäne (L) mit „Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif“ (ITIM) aus, während aktivierende KIR-Rezeptoren eine kurze zyttoplasmatische Domäne (S) mit „Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif“ (ITAM) tragen.

**Graphik adaptiert aus Arbi 2017, Natural Killer Cells, IntechOpen [58]**

Im Folgenden werden die für diese Arbeit relevanten inhibierenden und aktivierenden NK-Zell Rezeptoren und ihre Liganden tabellarisch dargestellt (**Tab. 1.2**).

**Tab. 1.2** Inhibierende und aktivierende Rezeptoren mit den zugehörigen Liganden

Rezeptor	Ligand	
<b>Inhibierende Killer Cell Immunoglobuline-like Receptors (KIRs) [59]</b>		
KIR2DL1 (CD158a)	HLA-C2 Gruppe	Cw2,4,5,6,15,17
KIR2DL2/3 (CD158b)	HLA-C1 Gruppe	Cw1,3,7,8,12,13,14
KIR3DL1 (CD158e)	HLA-Bw4 Gruppe	Bw4-80I: B*51,*52,*53,*57,*58, A*24
KIR3DL2 (CD158k)	HLA-A3, A1	
<b>Aktivierende Killer Cell Immunoglobuline-like Receptors (KIRs) [59]</b>		
KIR2DS1	HLA-C2 Gruppe	Cw2,4,5,6,15,17
KIR2DS2	HLA-C1 Gruppe	Cw1,3,7,8,12,13,14
KIR3DS1	HLA-Bw4 Gruppe	Bw4-80I: B*51,*52,*53,*57,*58, A*24 Bw4-80T: B*13,*27,*37,*44
<b>Andere aktivierende Rezeptoren</b>		
NKG2D	MICA/B, ULBP1/2/3/4	Stressinduzierte Expression, Herunterregulierung des Rezeptor bei chronischer Bindung der Liganden [39]
CD226 (DNAM-1)	CD112, CD155	Adhäsionsmolekül und gleichzeitig aktivierender Rezeptor, Lysesteigerung [60]
CD16	Fc-Teil von IgG- Antikörpern	ADCC, Lysesteigerung aktivierter NK-Zellen und Rekrutierung ruhender NK-Zellen [61]

### Adhäsionsmoleküle

Adhäsionsmoleküle spielen eine bedeutende Rolle für den Zell-Zell Kontakt. Darüber hinaus wurde für CD54, CD58 und CD155 gezeigt, dass sie als Liganden aktivierender Co-Rezeptoren auf NK-Zellen fungieren und dadurch unter anderem die Suszeptibilität von Tumorzellen gegenüber NK-Zellen beeinflussen [15, 62-64]. Im Folgenden sind die „Lymphocyte Function Associated Antigens“ (LFA) und „Intercellular Adhesion Molecules“ (ICAM), welche bei der Charakterisierung der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien berücksichtigt wurden, aufgelistet (**Tab. 1.3**).

Tab. 1.3 Adhäsionsmoleküle

Rezeptor [65, 66]	Ligand [65, 66]
CD11a (LFA-1)	CD50 (ICAM-3), CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2)
CD50 (ICAM-3)	CD11a (LFA-1)
CD54 (ICAM-1)	CD11a (LFA-1), Mac-1a
CD58 (LFA-3)	CD2 (LFA-2)
CD226 (DNAM-1)	CD112 (Nectin-2), CD155 (PVR)

#### 1.4 NK-Alloreaktivitätsmodelle

Die im Folgenden beschriebenen Alloreaktivitätsmodelle basieren alle auf der Grundlage, dass inhibierende KIR-Rezeptoren an HLA-Klasse I Moleküle der Gruppe HLA-A, -B und -C binden. Die weitere Einteilung der HLA-Klasse I Antigene erfolgt in Untergruppen, welche vom gleichen KIR-Rezeptor gebunden werden. Alloreaktive NK-Zellen können beispielsweise bei der haploidenten SZT durch Transfer von Spender NK-Zellen in eine HLA-differente Umgebung entstehen [67]. Bleibt die Stimulation des prädominanten KIR-Rezeptors durch Abwesenheit des korrespondierenden HLA-Klasse I Liganden aus, verschiebt sich der Aktivitätsstatus (Summenpotential der komplexen Interaktion aktivierender, inhibierender und costimulierender NK Rezeptoren, siehe **Abb. 1.3**) und führt aufgrund der dominanten Rolle der inhibitorischen KIR-Rezeptoren in der Regulation der NK Zellen indirekt zu einer Aktivierung, d.h. die fehlende Inhibition lässt eine Aktivierung der NK-Zelle durch andere weniger dominante Rezeptoren zu [56].

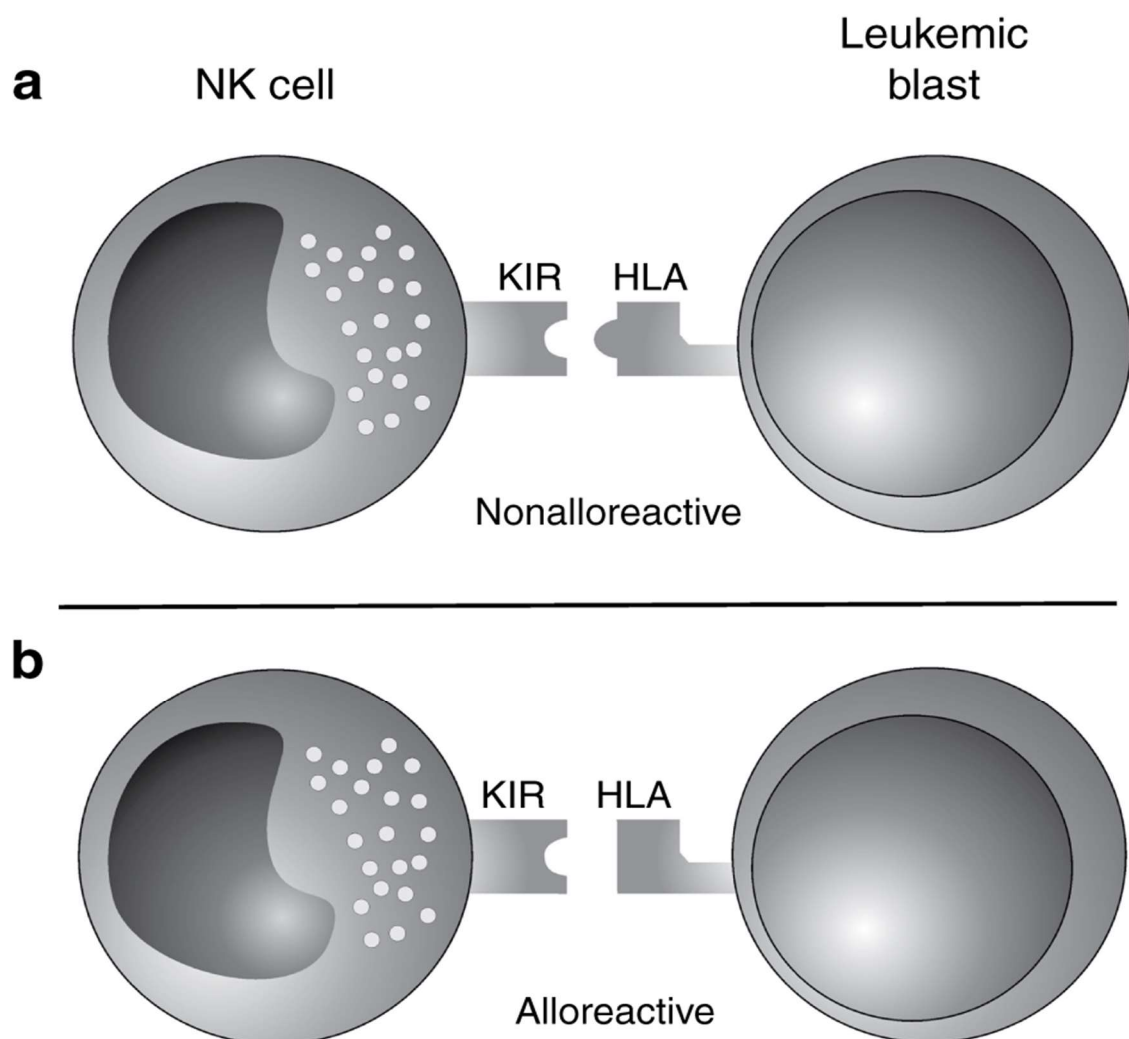
##### Ligand-Ligand Modell

Das „Ligand-Ligand“ Modell (LL) wurde zunächst in Perugia von Andrea Velardi zur Vorhersage der Alloreaktivität von Spender NK-Zellen im Rahmen von haploidenten SZT definiert [67]. Von der HLA-Typisierung des Spenders ausgehend, wird bei diesem Modell auf das KIR-Rezeptor Repertoire der Spender NK-Zellen geschlossen. Unterscheiden sich die KIR-Liganden des Spenders von denen des Empfängers, liegt ein LL Mismatch vor. Eine Vorhersage nach dem LL Modell ist nicht immer zutreffend, da die Vererbung der

HLA Klasse I Liganden und die des KIR-Genotyps unabhängig voneinander erfolgt. Der KIR-Genotyp ist auf Chromosom 19, die KIR-Liganden sind auf Chromosom 6 lokalisiert, somit besteht die Möglichkeit, dass ein Spender trotz vorhandenem HLA-Klasse I Ligand den dazu gehörigen KIR-Rezeptor nicht exprimiert und umgekehrt [56].

### Rezeptor-Ligand Modell

Das LL Modell wurde am St. Jude Hospital in Memphis als „Rezeptor-Ligand“ Modell (RL) weiterentwickelt. Dabei ermöglicht eine direkte Untersuchung der KIR-Expression der Spender NK-Zellen zusammen mit der HLA-Typisierung des Empfängers eine Aussage, ob ein Mismatch zwischen KIR-Rezeptoren der Spender NK-Zellen und KIR-Liganden des Empfängers vorliegt [68].





**Abb. 1.4 Rezeptor-Ligand Modell**

In der Abbildung ist das Rezeptor-Ligand Modell schematisch dargestellt. a) Bindet der KIR-Rezeptor der NK-Zelle an den korrespondierenden HLA-Liganden der Tumorzelle, kommt es zu einer Inhibition der NK-Zelle. b) Liegt ein Rezeptor-Ligand Mismatch vor, bleibt eine Stimulation des exprimierten KIR-Rezeptors durch die Abwesenheit des korrespondierenden HLA-Klasse I Liganden aus und die NK-Zelle gilt als alloreaktiv.

**Graphik aus Oevermann et al. 2012, Pediatric Research [69]**

**KIR Genotyping Modell**

Beim „Rezeptor-Rezeptor“ Modell (RR), auch „Nantes Modell“ genannt, besteht ein Mismatch bei Inkompatibilität zwischen den KIR-Rezeptoren des Spenders und denen des Empfängers [70]. Das Nantes Modell kann als Vorläufermodell des „KIR Haplotyp“ Modells, das in Stanford begründet wurde, betrachtet werden. Es wurde festgestellt, dass bei nahezu allen mit KIR-Mismatch assoziierten GvHD Fällen, die Spender zwei aktivierende Haplotyp B Gene aufwiesen [56, 71]. Die Stanford Gruppe zeigte darüber hinaus, dass das Auftreten einer GvHD bei Patienten mit dem Haplotyp A nach allogener SZT mit HLA identen Geschwisterspendern des Haplotyps B erhöht ist [71]. Das „KIR Genotyping“ Modell beschreibt, dass die potenzielle NK-Zell Alloreaktivität mit der Anzahl aktivierender KIR Rezeptoren des Spenders steigt. KIR Haplotyp A besitzt als einziges aktivierendes Gen KIR2DS4, während KIR Haplotyp B noch zusätzlich KIR2DS1 und KIR2DS2 trägt. AML-Patienten nach hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSCT) nicht verwandter Spender des Haplotyps B zeigten ein besseres Gesamtüberleben als Patienten nach HSCT nicht verwandter Spender des Haplotyp A [72]. Auch die molekulargenetische Anlage der Zentromer- (Cen) und Telomerregion (Tel) scheint im Outcome von AML-Patienten eine Rolle zu spielen. AML-Patienten mit homozygoten Cen-B zeigten in einer groß angelegten Studie mit 1086 Patienten eine geringere Rezidivrate als Patienten mit homozygotem Cen-A [73]. Ursächlich hierfür könnte der unterschiedliche KIR-Content der Cen- und Tel- Regionen sein. So kodiert die Cen-B Region für die Rezeptoren KIR2DS2 und KIR2DL2, die Cen-A Region für KIR2DL3 (vgl. **Tab. 1.4**). Ein möglicher Vorteil für KIR2DL2 gegenüber KIR2DL3 ist dessen höhere Avidität für HLA-C1 und -C2 Epitope, welche ein

effektiveres Licensing und dadurch eine stärkere NK-Zellantwort zur Folge hat [74-76].

Das Perugia LL Modell [67], das Memphis RL Modell [68] und das Stanford KIR Haplotyp Modell [71] dienen als Basismodelle der Vorhersage von NK-Zell Alloreaktivität und werden mittlerweile im Rahmen einer HSCT bei der Spenderauswahl zur Optimierung der NK-Zell Effekte berücksichtigt.

**Tab. 1.4 KIR-Gene der Zentromer- und Telomerregion und der daraus ermittelte B-Content Score**  
 Tabellarisch dargestellt sind die aktivierenden und inhibierenden KIR-Gene der Zentromer- und Telomerregion. Haplotyp A Gene sind rot dargestellt, Haplotyp B Gene grün. Der B-Content Score wird durch die Summe der B-Motive des Genotyps bestimmt.

**Tabelle modifiziert aus Cooley et al. 2010, Blood Journal [73]**

<b>Zentromerregion (Cen-): KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL1</b>			
Cen-A/A	KIR2DL3 und KIR2DL1		
Cen-A/B	KIR 2DL3 und KIR2DL1 mit KIR2DS2 und/oder KIR2DL2		
Cen-B/B	KIR2DS2 und/oder KIR2DL2, KIR2DL1		
<b>Telomerregion (Tel-): KIR3DL1, KIR3DS1, KIR2DS1, KIR2DS4</b>			
Tel-A/A	KIR3DL1 und KIR2DS4		
Tel-A/B	KIR3DL1 und KIR2DS4 mit KIR3DS1 und/oder KIR2DS1		
Tel-B/B	KIR3DS1 und KIR2DS1		
Spender KIR Genotyp	B Content Score	Cen-	Tel-
<b>A/A</b>	<b>0</b>	A/A	A/A
<b>B/x</b>	<b>1</b>	A/A	A/B
		A/B	A/A
	<b>2</b>	A/A	B/B
		A/B	A/B
		A/A	B/B
	<b>3</b>	A/B	B/B
		B/B	A/B
		B/B	B/B
<b>4</b>	B/B	B/B	

## Licensing Modell

Neben den beschriebenen Modellen ist die Alloreaktivität reifer NK-Zellen maßgeblich von wechselnden Milieufaktoren *in vivo* abhängig. Dabei beeinflussen sowohl inflammatorische Zytokine als auch bei Zellstress exprimierte Liganden wie MICA/B, ULBPs, PVR und Nectin-2 die NK-Zell Aktivität [77]. Auch beim „Licensing“ scheinen diese Milieufaktoren eine maßgebliche Rolle zu spielen. Im Licensing Modell werden NK-Zellen, deren KIR Rezeptoren während ihrer Reifung *in vivo* Kontakt zu ihrem korrespondierenden HLA-Liganden hatten, als „educated“ oder „licensed“ bezeichnet, während bei „unlicensed“ bzw. „uneducated“ NK-Zellen dieser Kontakt ausblieb. Vergleicht man die Lysefähigkeit von licensed und unlicensed NK-Zellen ist diese wesentlich von Milieufaktoren abhängig. Während sich licensed NK-Zellen im Steady State/Normalzustand durch eine bessere Lysefähigkeit auszeichnen, kann sich die zytolytische Aktivität unter inflammatorischen Bedingungen umkehren [78]. Sind NK-Zellen starken proaktivierenden Signalen wie beispielsweise bei der ADCC oder im hochinflammatorischen Setting ausgesetzt, zeigen unlicensed NK-Zellen durch unzureichende Stimulation ihrer inhibierenden Rezeptoren eine bessere Infektionskontrolle als licensed NK-Zellen, die durch den Reifungsprozess (NK education) stärker durch die Stimulation ihrer inhibierenden Rezeptoren gehemmt werden [79].

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Diese Arbeit dient der Untersuchung des Einflusses des KIR-Rezeptor-Ligand Mismatches auf die NK-Zell vermittelte Lyse der Neuroblastomzelllinien LAN-1 und LS. Zu diesem Zweck werden definierte single KIR positive und KIR negative NK-Zellklone mittels durchflusszytometrischer Zellsortierung generiert und anschließend mit Hilfe bestrahlter Feederzellen K562-mb15-41BBL und IL-2 expandiert und charakterisiert. Bei der funktionellen Testung werden die single KIR positiven NK-Zellklone KIR2DL1 (CD158a), KIR2DL2/3 (CD158b) und KIR3DL1 (CD158e) hinsichtlich ihrer Lysefähigkeit mit und ohne Zugabe des therapeutischen Antikörpers ch14.18 untersucht.

Die Auswahl der Neuroblastomzelllinien erfolgt nach dem RL Modell und dem Vorliegen von RL Match und Mismatch Konstellationen. Als Kontrolle dient die erythroleukämische Zelllinie K562, für welche aufgrund der fehlenden HLA I Expression kein Einfluss der HLA I Interaktion auf die NK-Zell vermittelte Lyse angenommen wird. Das Studiendesign legt den Fokus auf die Untersuchung des RL Modells. Darüber hinaus erfolgt die Anwendung des LL Modells, Licensing Modells und KIR-Genotyping Modells soweit anwendbar und sinnvoll.

Neben der Fragestellung, ob ein RL Mismatch die Lyse der Neuroblastomzelllinien erhöht, werden auch andere mögliche Einflussfaktoren auf die NK-Zell vermittelte Lyse wie die quantitative HLA I Expression sowie die Expression wichtiger Adhäsionsmoleküle und aktivierender NKG2D und DNAM-1 Liganden auf den Tumorzelllinien untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Allgemeine Materialien und Programme

#### 2.1.1 Geräte

Sterile Werkbank Hera safe	Heräus
Brutschrank HERAcell®	Heräus
Standzentrifugen: ROTANTA 46 RSC ROTIXA 50 RS Tischzentrifuge: ROTINA 420 R	Hettich
Eismaschine	Scotsman
Gefrierschrank	Liebherr
Kühlschrank	Liebherr, Bosch
Wasserbad, beheizbar	Memmert, Köttermann
Schüttler Titramax 100	Heidolph
Test-tube-rotator 34528, Überkopfschüttler	Snijders
Vortexer: MS1 Minishaker Reax Top	IKA Works Heidolph
Pipettierhelfer Pipetboy acu	Integra Bioscience
Discovery Comfort Mehrkanalpipette Transferpipette 20-200µl	HTL
Pipetten, verstellbar Research 2,5µl Pipetman 10µl, 20µl, 200µl, 1000µl	Eppendorf Gilson
Mikroskopkamera EOS 50D DIGITAL Speichermedium 4GB	Canon Kingston Technology

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien, Glas- und Plastikwaren

Falconröhrchen, Polypropylen (PP), steril: 15ml, 50ml	Greiner
Kryoröhrchen, PP, steril, 2ml	Greiner
Reaktionsgefäße mit Deckel, PP, steril 0,5ml; 1,5ml	Sarstedt; Eppendorf
FACS Analyseröhrchen Rundboden, Polystyren (PS),	BD™Biosciences; Sarstedt

5ml, 1ml	
Zellkulturflaschen CELLSTAR®, steril: 50ml, 250ml, 550ml	Greiner
Mikrotiterplatten Rundboden 96 Well	Costar
Mikrotiterplatten Flachboden 96 Well	Costar
Mehrfachkulturplatten mit Deckel, steril: 6 Well, 24 Well, 48 Well, 96 Well	Costar
Einmalpipetten, Plastik, steril: 2ml, 5ml, 10ml, 25ml, 50ml	Costar
Pipettenspitzen: 20µl 200µl, 1000µl	Ratiolab Sarstedt
Spritzen, steril: 5ml, 10ml, 20ml 1ml, 50ml	Braun BD™ Diagnostics
Kanülen, Microlance, 19G, steril	BD™ Diagnostics
Butterfly, Safety-Multifly-Set, steril	Sarstedt
Desinfektionsspray Haut	Braun
Flächendesinfektionsmittel Descosept AF	Dr. Schumacher GmbH
Einmalhandschuhe	Hartmann
Verschlussfolie Parafilm "M"	Bemis
Zellsieb, 40µm	BD™ Diagnostics
Becherglas 250ml, 600ml	Schott
Röhrchenständer	PPT

### 2.1.3 Stammlösungen

#### **Stammlösung A: Medium für die Zelllinienkultivierung und die Zytotoxizitätstestung**

- 500 ml RPMI 1640 Medium Biochrom
- 50 ml fetales Kälberserum Biochrom
- 5 ml L-Glutamin (200 mM) Biochrom
- 5 ml Penicillin (10 000 U/ml)/  
Streptomycin (10 000 µg/ml) Biochrom

#### **Stammlösung B: Medium für die Expansion von NK-Zellen**

- Stammlösung A

- Interleukin-2 (IL-2) Proleukin  
2x10<sup>6</sup> IE/ml

Universitäts-  
apotheke

#### 2.1.4 Angesetzte Puffer und Lösungen

##### FACS-Puffer

- 500 ml Phosphat buffered saline (PBS)
- 5 ml fetales Kälberserum (FCS)

PAA Laboratories  
Biochrom

##### PBSE

- 500 ml Phosphat buffered saline (PBS)
- 2ml EDTA (0,5 M)

PAA Laboratories  
Sigma

##### Permwash

- 500 ml Phosphat buffered saline (PBS)
- 0,1% Saponin (S-7900)
- 0,5% BSA
- 0,02% Natriumazid

PAA Laboratories  
Sigma  
Sigma  
Merck

##### PFA Fixierungspuffer

- FACS-Puffer
- 1% Formaldehyd

PanReac  
AppliChem

##### MACS Puffer

- PBS
- 2,5% Humanalbumin Albiomin (200g/l)
- 2mM EDTA

Biotest

##### Einfriermedium

- fetales Kälberserum (FCS)
- 10% DMSO

Sigma

### 2.1.5 Allgemeine Software

Word 2007/2010	Microsoft
Excel 2007/2010	Microsoft
PowerPoint 2007/2010	Microsoft
FCS Express 5.0 Plus Research Edition	De Novo Software
GraphPad Prism 5	Statcon
EndNote	Thomson Reuters
RTCA Software 1.2.1	ACEA Biosciences

## 2.2 Verwendetes Zellmaterial

NK-Zellen aus peripherem Vollblut	Gesunde freiwillige Spender
Transfizierte erythroleukämische Zelllinie K562-mb15-41BBL	Dario Campana, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, USA
Zelllinien: <ul style="list-style-type: none"> <li>– Erythroleukämische Zelllinie K562</li> <li>– Neuroblastom Zelllinie LAN-1</li> <li>– Neuroblastom Zelllinie LS</li> <li>– cALL Zelllinie MHH CALL4</li> </ul>	Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig

### 2.2.1 Gesunde Spender zur Expansion von NK-Klonen und Subpopulationen

Die gesunden und freiwilligen Spender für die Expansion von NK-Klonen und -Subpopulationen wurden nach der qualitativen Expression von Allelen der HLA-Cw3, HLA-Cw4 und HLA-Bw4 Gruppe ausgewählt. Alle Spender wiesen ein Fehlen einer dieser HLA-Gruppen auf. Ziel war die Expansion und Testung CD158a, CD158b, CD158e einfach positiver und KIR<sup>-</sup> NK-Klone und Subpopulationen. Neben der gesonderten Expansion von NK-Zellen dieser Immunphänotypen wurden auch „Bulk NK-Zellen“ expandiert. Unter „Bulk NK-Zellen“ versteht man in dieser Arbeit die Gesamtheit aller NK-Zellen eines Spenders ohne künstliche Auftrennung nach Subpopulationen.

### 2.2.2 Neuroblastomzelllinien

Die Neuroblastomzelllinien wurden auch im Hinblick auf ihre qualitative Expression von Allelen der HLA-Cw3, HLA-Cw4 und HLA-Bw4 Gruppe



ausgewählt. Es wurde dabei die Zelllinie LS gewählt, die HLA-Allele aller 3 Gruppen aufweist und die Zelllinie LAN-1, die nur zwei der drei HLA-Gruppen exprimiert. Die Typisierung erfolgte durch das Zentrum der klinischen Transfusionsmedizin Tübingen. Die semiadhärente Zelllinie LAN-1 wurde aus Knochenmetastasen eines zweijährigen Jungen mit Neuroblastom im Stadium IV isoliert [80]. Die adhärente Zelllinie LS entstammt einem abdominalen Tumor eines 16 Monate alten Mädchens mit Neuroblastom im Stadium III [81]

Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch fortlaufende Passagierung der Zellen zu vermeiden, wurde zu Beginn der Studie ein Zellstock mit kryokonservierten Zellen angelegt, auf den für die Dauer der gesamten Studie zurückgegriffen werden konnte (**Kap. 2.5**). Die Zellen wurden standardisiert nach 10 Passagen verworfen und durch neue aus dem Zellstock ersetzt.

### **2.2.3 Erythroleukämische Zelllinie K562**

Die Erythroleukämische Zelllinie K562 wurde aus einem Pleuraerguss einer an CML erkrankten Frau isoliert [82]. Die Zelllinie zeichnet sich durch eine fehlende MHC-Klasse I Expression aus, wodurch sie ein weit verbreitetes Standard-NK-Zelltarget darstellt, da NK Zellen zuverlässig in der Lage sind K562 zu lysieren [83]. K562 diente in der Studie als Kontrollzelllinie bei der funktionellen Testung der NK-Klone und NK-Subpopulationen, um HLA I unabhängige Unterschiede der zytolytischen NK Aktivität verschiedener NK-Immunphänotypen zu evaluieren.

### **2.2.4 Feederzelllinie K562-mb15-41BBL**

Die erythroleukämische Zelllinie K562 wurde von Dr. Dario Campana (St. Jude Children's Research Hospital Memphis, USA) stabil transduziert, sodass sowohl eine membrangebundene Form von IL15 als auch der stimulierende NK-Zell Ligand 41BBL auf der Oberfläche kontinuierlich exprimiert wird. Bei Zusatz bestrahlter K562-mb15-41BBL zu frischen PBMCs führt 41BBL, unterstützt durch die stimulierende Wirkung des membrangebundenen IL15, zu einer gesteigerten Proliferation und Expansion von NK-Zellen in der Cokultur. Die Feederzellen

müssen bestrahlt werden, da sie sonst teilungsfähig wären und die NK Zellen überwachsen würden [84].

### 2.3 MTS Proliferationsassay

CellTiter 96 <sup>®</sup> AQueous One Solution	Promega
ELISA Plattenleser, Milenia <sup>™</sup> Kinetic Analyzer	DPC Diagnostic Products Corporation
SoftMax <sup>®</sup> Pro, Software	Molecular Devices Corporation

#### Hintergrund

Der MTS Proliferationsassay ist ein kolorimetrisches Verfahren zur Untersuchung der Viabilität und Proliferation von Zellen in Zellkultur. MTS wird von lebenden stoffwechselaktiven Zellen zum kolorimetrisch nachweisbaren Formazan reduziert, dessen Absorption bei 490nm mit einem ELISA Plattenleser gemessen wird. Mit Ausnahme von adhärent wachsenden Zellen, die bei hoher Zelldichte einer Kontaktinhibition unterliegen, ist die Quantität des entstandenen Formazans direkt proportional zur Zellzahl [85].

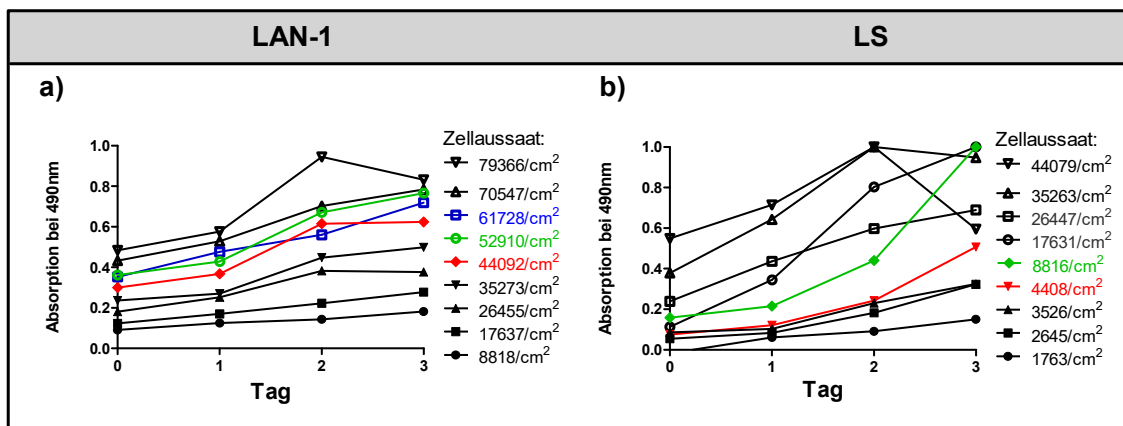
#### Durchführung

Zur Optimierung der Zellaussaat der Neuroblastomzelllinien LAN-1 und LS wurde ein zeitabhängiger MTS Proliferationsassay mit Vierfachbestimmung unterschiedlicher Aussaatkonzentrationen durchgeführt. Die Zellaussaat orientierte sich an vorherigen Aussaatversuchen in Zellkulturflaschen. Es wurden je Zelllinie vier 96-Well-Flachbodenplatte mit identischen Zellkonzentrationen ausgesät. die Messung der ersten Platte erfolgte unmittelbar nach Aussaat, darauffolgend wurde alle 24h eine Platte gemessen, um zeitabhängige Wachstumskurven zu erstellen.

- 1) Nach Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen auf die gewünschten Zellkonzentrationen mit Stammlösung A eingestellt und 100 µl pro Well ausgesät. Als Kontrolle wurden pro Platte 4 Wells mit 100 µl Stammlösung A befüllt.
- 2) Am jeweiligen Messtag wurden 20 µl CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution pro Well zugegeben und die Platte 4 h im Brutschrank inkubiert.

3) Messung der Absorption bei 490 nm im ELISA Plattenleser.

In der **Abb. 2.1** ist die Testung von Zellkonzentrationen über einen Zeitraum von drei Tagen dargestellt. Um die optimale Aussaatzellzahl/cm<sup>2</sup> für die Kultivierung in Zellkulturflaschen zu ermitteln, wurden basierend auf den Ergebnissen des MTS Proliferationsassays definierte Zellkonzentrationen im Bereich der farbig hinterlegten Kurven (**Abb. 2.1**) ausgetestet. Eine optimale polarisationsmikroskopisch bestimmte Konfluenz von 75% nach 3 Tagen erreichte LAN-1 bei einer Aussaatzellzahl von 44090/cm<sup>2</sup> und LS bei 5870/cm<sup>2</sup>. Die Proliferationsrate dieser Zellkonzentration in Zellkulturflaschen betrug für LAN-1 3,23±1,09 (n=69) und für LS 12,38±4,35 (n=81) innerhalb von 72h.



**Abb. 2.1 MTS Proliferationsassay der Zelllinien LAN-1 und LS**

Nach Aussaat unterschiedlicher Zellkonzentrationen wurde nach Zusatz von MTS die Absorption bei 490nm im ELISA Mikroplattenleser gemessen. Die Höhe der Absorption korreliert mit der Vitalität und Zellzahl der expandierten Zellen. Bei den dargestellten Kurven ist je nach Ausgangszellzahl ein anfänglich langsamer Anstieg (Anwachsphase), gefolgt von einem steilen Anstieg (Proliferationsphase) bis zum Erreichen eines Steady States (Plateau) bzw. sogar einer Abnahme der gemessenen Absorption zu verzeichnen. Ausgehend von der Zellphysiologie der Tumorzellen ist die Vitalität in der Proliferationsphase am Höchsten. Aus diesem Grund wurden die farbig dargestellten Zellkonzentrationen zur weiteren Austestung in der Zellkulturflasche ausgewählt.

**2.4 Kultivierung der Zelllinien**

Trypsin/ EDTA Solution	Biochrom
Dulbecco's Phosphat buffered saline (PBS)	PAA Laboratories

Die Zelllinien wurden in Stammlösung A bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt im Brutschrank in Zellkulturflaschen kultiviert werden. Die Zelldichte kann mit dem Inversionsmikroskop, die Vitalität und Morphologie der Zellen nach Anfärben der Zellen mit Trypanplau unter dem Lichtmikroskop beurteilt werden.

#### **2.4.1 Kultivierung der Suspensionszelllinien**

Bei den Zelllinien K562 und K562-mb15-41BBL handelt es sich um Suspensionszelllinien. Neben einer hohen Zelldichte ist eine pH-Wert Änderung des Mediums, die sich durch einen Farbumschlag des Mediums von Rot nach Gelb-Orange bemerkbar macht, ein Indikator zum Splitten der Zellen [86]. Alle 2-3 Tage wurde ein Teil der Zellsuspension verworfen und durch frische Stammlösung A ersetzt, sodass die Zellkonzentration  $0,5 \times 10^6/\text{ml}$  betrug.

#### **2.4.2 Kultivierung der adhärennten Zelllinien**

Um die Validität der funktionellen Testung zu erhöhen, erfolgte auf Grundlage eines MTS Proliferationsassays (**Kap. 2.3**) die standardisierte Aussaat und Expansion der Zelllinien LAN-1 und LS. Dies diente einerseits dem Zweck, die Tumorzellen zu einem standardisierten Zeitpunkt in ihrem Proliferationszyklus zu testen und andererseits die Spontanlyse während des BATDA Release Assays durch eine gute Vitalität gering zu halten.

Nach einer Expansionsdauer von 3 Tagen wurden die Zellen geerntet und frisch ausgesät.

#### **Durchführung**

- 4) Das Medium wurde vollständig aus den Zellkulturflaschen entfernt und der Flaschenboden anschließend mit PBS gespült um Mediumreste zu entfernen. Bei LS wurde sowohl das Medium als auch das PBS verworfen. Bei der semiadhärennten Zelllinie LAN-1 wurde das Medium zur Vermeidung einer Selektion der rein adhärennten Zellen jedoch nicht verworfen, sondern auch in ein Falcon überführt und zusammen mit den trypsinisierten Zellen abzentrifugiert.

- 5) Zum Lösen der Zellen vom Flaschenboden wurde je nach Flaschengröße 1-4ml Trypsin zugegeben und die Zellkulturflasche für 2 min zurück in den Brutschrank gelegt.
- 6) Die gelösten Zellen wurden in Medium resuspendiert, in ein Falcon überführt und bei RT mit 300g B9 R9 für 5 min abzentrifugiert.
- 7) Aufnahme der Zellen in frische Stammlösung A. Manuelle Zellzählung in der Neubauer Zählkammer (**Kap. 2.8**) und anschließende Aussaat von 5800 Zellen/cm<sup>2</sup> Flaschenboden von LS bzw. 44 000 Zellen/cm<sup>2</sup> Flaschenboden von LAN-1 in je nach Flaschengröße 5/15/35 ml der Stammlösung A.

## 2.5 Kryokonservierung und Auftauen der Zelllinien

Mr. Frosty, Gefrierbehälter	Nalgene
-86 Freezer Model 917, Ultratiefkühlschrank	Forma Scientific

Kryokonservierung: Vor Studienbeginn wurde ein Zellstock der Zelllinien LAN-1 und LS angelegt. Hierfür wurden die Zellen nach dem in **Kap. 2.4.2** beschriebenen Verfahren kultiviert und geerntet. Nach der Zellzählung wurden sie bei RT mit 300 g für 5 min, B9 und R7 abzentrifugiert, in Einfriemedium (**Kap. 2.1.4**) aufgenommen und ca.  $2-4 \times 10^6$  Zellen pro Gefrierrohrchen in einem bei 4°C vorgekühlten Gefrierbehälter (Mr. Frosty, Nalgene) bei -80°C eingefroren [87].

Auftauen: Die Zellen wurden im Gefrierrohrchen durch Zugabe von vorgewärmter Stammlösung A aufgetaut, in 15 ml Falconrohrchen überführt und zweimal bei 37°C mit 300g für 7 min, B7 und R5 in 10 ml Stammlösung A gewaschen. Anschließend wurden sie in 5 ml Stammlösung A aufgenommen und in 50 ml Zellkulturflaschen ausgesät. Nach der ersten Zellernte nach ca. 2 Tagen wurden die Zelllinien standardisiert kultiviert (**Kap. 2.4.2**).

## 2.6 Verwendeter chimärer therapeutischer Antikörper

ch14.18 (4,5 mg/ml) lot. T900310-A	Polymun
------------------------------------	---------

In dieser Studie wurde der chimäre monoklonale Anti-GD2-Antikörper ch14.18 verwendet, der insbesondere zur Therapie des Neuroblastoms eingesetzt wird. Der Antikörper wird in Tübingen im Rahmen einer Studie zur Therapie des

Neuroblastoms IV Rezidivs (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02258815) verwendet.

## 2.7 Isolierung von peripheren mononukleären Zellen

Peripheres Vollblut	Gesunder Spender
Heparin-Natrium-25 000-ratiopharm®	Ratiopharm
Biocoll Separating Solution	Biochrom
Dulbecco's Phosphat buffered saline	PAA Laboratories

### Hintergrund

Zur Isolierung peripherer mononukleärer Zellen aus heparinisierem Vollblut freiwilliger Spender wurde die nach Böyum beschriebene Methode der Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Hypaque verwendet [88]. Hierbei macht man sich zur Auftrennung der zellulären Blutbestandteile deren Dichteunterschiede zunutze. Ficoll-Hypaque nimmt als verzweigtes Copolymer mit einer Dichte von  $\rho=1,077\text{g/ml}$  eine Art Siebfunktion ein und ermöglicht Zellen mit höherer Dichte durch Zentrifugation die Ficoll-Trennschicht zu passieren und verhindert dies bei Zellen geringerer Dichte. Somit setzen sich Erythrozyten, Granulozyten und polymorphkernige Leukozyten unter der Ficoll-Trennschicht ab und können genauso wie die Thrombozyten, die sich in der Plasmaphase über der Ficoll-Trennschicht befinden, verworfen werden. Mononukleäre Zellen (PBMCs) wie Monozyten und Leukozyten lagern sich in der Interphase direkt auf der Ficoll-Trennschicht ab und können durch Abnahme des Lymphozytenring isoliert werden.

### Durchführung

- 1) Heparinisieretes Vollblut wird im Verhältnis 1:1 mit PBS gemischt. In einem 50 ml Falconröhrchen werden vorsichtig 30 ml der Zellsuspension auf 20 ml Ficoll-Hypaque geschichtet, sodass zwei getrennte Phasen entstehen.
- 2) Nach 30 min Dichtegradientenzentrifugation mit 400g bei Raumtemperatur (RT), Beschleunigung 4 (B4) und Bremse 1 (R1) wird die Plasmaphase mit einer sterilen Pipette bis 1 cm über dem Lymphozytenring abgenommen und verworfen.

- 3) Der trübe Ring aus PBMCs wird mit einer weiteren sterilen Pipette vorsichtig abgenommen und in ein 50 ml Falconröhrchen überführt. Dieses wird mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und 10 min mit 400g bei RT, B7 und R5 gewaschen.
- 4) Der Überstand wird vorsichtig abgekippt. Die Zellen werden in 50 ml PBS resuspendiert und erneut mit den gleichen Einstellungen gewaschen.
- 5) Anschließend werden die PBMCs je nach weiterer Verwendung in Medium oder FACS-Puffer aufgenommen und entweder manuell oder maschinell gezählt.

## 2.8 Zellzahlbestimmung

ABX Micros CRP 100	Horiba
ADVIA 120	Siemens
Lichtmikroskop CX10LF200	Olympus
Neubauer Zählkammern (25mm <sup>2</sup> , Tiefe 0,1mm)	Assistent
Deckglas	Menzel
Trypanblau (0,4%)	Sigma
Handzähler	Ivo
ABL800 Flex, Blutgasanalysegerät	FlexQ

Zur Gewährleistung standardisierter Bedingungen bei der Durchführung der Experimente wurde die vollautomatische maschinelle Zellzahlbestimmung durch die Blutanalysegeräte ABX Micros CRP 100 von Horiba und Cellcounter ADVIA 120 der manuellen Zellzählung in der Neubauer Zählkammer weitgehend vorgezogen. Mittels Impedanzmessverfahren (ABX Micros CRP 100) von 8 µl bzw. durchflusszytometrischer Analyse (ADVIA) von 175 µl Zellsuspension kann vom Untersucher unabhängig die Bestimmung der Zellzahl sowie Differenzierung von Blutzellen und kultivierter Zelllinien erfolgen. Die Zellzahl der adhären Ten Tumorzelllinien LAN-1 und LS wurde jedoch ausschließlich manuell in der Neubauer Zählkammer bestimmt, da die Bildung kleiner Zellcluster die maschinelle Zählung verfälschte und zu ungenauen Messungen führte. Hierfür erfolgte eine 1:1 Färbung mit 0,4% Trypanblau und Auszählung der vitalen Zellen in drei Großquadranten der Neubauer Zählkammer (25mm<sup>2</sup>, Tiefe 0,1mm) unter dem Lichtmikroskop. Auch die Beurteilung der Zellvitalität erfolgte

in der Zählkammer, dabei erscheinen tote oder defekte Zellen unter dem Lichtmikroskop als dunkelblaue Flecken, da die Barrierefunktion ihrer Zellmembran gestört ist und daher Trypanblau in die Zellen dringt. Formel zur Berechnung der Zellkonzentration nach manueller Zählung in der Neubauer Zählkammer:

$$c = \frac{n}{3} \cdot k \cdot 10\,000/ml$$

c= Zellkonzentration der Suspension

n= Zellzahl der ausgezählten Quadranten

k= Verdünnungsfaktor

## 2.9 Zellanreicherung mittels MACS-System

CD56 Micro Beads human IgG1	Miltenyi Biotec
MiniMACS (Magnet)	Miltenyi Biotec
Separationssäule Typ LS	Miltenyi Biotec

### Hintergrund

Das MACS (Magnetic-Activated Cell Sorting)-System wird zur Anreicherung oder Depletion bestimmter Zellpopulationen verwendet. Die Grundlage bilden mit kleinen Metallpartikeln aus Eisenoxid markierte monoklonale Antikörper, die spezifisch an ein für die Zellpopulation typisches Epitop binden (z.B. CD3 für T-Zellen, CD56 für NK-Zellen) [89]. Die Zellsuspension aus markierten und unmarkierten Zellen wird auf eine mit paramagnetischer Eisenmatrix beschichtete Trennsäule gegeben, die sich in einem starken Magnetfeld befindet. Während die magnetisch markierten Zellen als Positivfraktion in der Säule verbleiben, fließen die unmarkierten Zellen durch die Säule und können als Negativfraktion aufgefangen werden. Durch Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld, kann die Positivfraktion aus der Säule eluiert werden. CD56 ist ein Adhäsionsmolekül, welches hauptsächlich von NK-Zellen und von NKT-Zellen exprimiert wird. Bei der Anreicherung von NK-Zellen werden gegen CD56 gerichtete MicroBeads eingesetzt. Zur Entfernung der NKT-Zellen wird mit der gewonnenen Positivfraktion eine CD3-Depletion durchgeführt [90].



## Durchführung

- 1) Isolierung von PBMCs nach der in **Kap. 2.7** beschriebenen Methode. Die Zellen werden in MACS Puffer aufgenommen und auf eine Konzentration von  $100 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Die folgenden Arbeitsschritte werden auf Eis durchgeführt.
- 2) Inkubation mit  $20 \mu\text{l}$  CD56 MicroBeads/ $10^7$  Zellen für 15min bei  $4^\circ\text{C}$ .
- 3) Waschen der Zellen mit 2ml MACS Puffer/  $10^7$  Zellen, 10 min 300g bei  $4^\circ\text{C}$ , B9 und R9. Entfernung des Überstands und Aufnahme der Zellen in 5 ml MACS Puffer.
- 4) Platzierung der Trennsäule im magnetischen Feld des VarioMACS und spülen der Säule mit 5 ml MACS-Puffer. Anschließend Auftragen der Zellsuspension auf die Trennsäule und Durchlauf abwarten. Die Negativfraktion kann mit einem 15 ml Falcon aufgefangen werden.
- 5) Zur weiteren Entfernung von unmarkierten Zellen aus der Säule wird diese zwei Mal mit je 5 ml MACS-Puffer gespült.
- 6) Die Säule wird dem Magnetfeld entnommen auf ein 15 ml Falcon gesetzt. Zur Extraktion der Positivfraktion wird die Säule mit 5 ml Puffer gefüllt und der Stempel schnell und kräftig nach unten gedrückt.
- 7) Maschinelle Zellzählung, Waschen der Zellen, 10 min 300g bei  $4^\circ\text{C}$ , B9 und R9, Entfernung des Überstands und Aufnahme der Zellen in MACS-Puffer in der gewünschten Konzentration zur T-Zell Depletion.

### 2.10 T-Zell Depletion mit Dynabeads

Dynabeads® CD3	Invitrogen
MPC-1, Handmagnet	Dynal

#### Hintergrund

Zur Depletion der verbliebenen T-Zellen in der Positivfraktion nach MACS-Anreicherung werden CD3 Dynabeads (Invitrogen) verwendet. CD3 spezifische monoklonale Antikörper sind an magnetisierbare Polystyrenpartikel gebunden, welche mit einem Durchmesser von  $4,5 \mu\text{m}$  wesentlich größer sind als die bei der MACS-Anreicherung verwendeten  $150 \text{ nm}$  großen MicroBeads. Ähnlich dem

MACS-System lassen sich die markierten von den unmarkierten Zellen durch Anlegen eines externen Magnetfelds trennen. Durch den größeren Durchmesser der Dynabeads reicht jedoch ein wesentlich schwächeres Magnetfeld als bei der MACS-Anreicherung aus und die noch mit CD56 MicroBeads markierten Zellen bleiben unbeeinflusst [91].

### Durchführung

- 8) Einstellung der durch MACS-Anreicherung gewonnenen CD56<sup>+</sup> Zellen auf eine Konzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml in MACS-Puffer. Pro ml Zellsuspension werden 50  $\mu$ l CD3 Dynabeads eingesetzt.
- 9) Die benötigte Menge Dynabeads muss vor Verwendung gewaschen werden, da die Lagerungslösung giftiges Natriumazid enthält. Hierfür werden die Dynabeads in 1 ml Puffer in einem 15 ml Falcon resuspendiert. Platzierung des Falcons im Magnetfeld, nach 1 min vorsichtiges abpipettieren des Überstands. Wiederholung dieses Vorgangs und anschließend Aufnahme der Beads im Ausgangsvolumen MACS-Puffer.
- 10) Hinzufügen der Beads zu der Zellsuspension und 30 min Inkubation bei 4°C im Überkopfschüttler.
- 11) Auffüllen des Falcons mit gekühltem Puffer auf ein Gesamtvolumen von 7 ml. Platzierung des Falcons im Magnet, nach 1 min Überstand mit den CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> Zellen vorsichtig mit einer sterilen Pipette abnehmen und in ein frisches Falcon überführen.
- 12) Einmaliges Wiederholen von Schritt 4 um die Zellausbeute zu erhöhen.
- 13) Maschinelle Zellzählung, Waschen der Zellen, 10 min 300g bei 4°C, B9 und R9, Entfernung des Überstands und Aufnahme der Zellen entweder in Stammlösung B zur weiteren NK-Expansion oder in Stammlösung A.

### 2.11 Durchflusszytometrische Zellsortierung

BD™ FACS Aria Cell Sorter	BD™ Biosciences
Angeschlossene Hardware, PC	Hewlett-Packard
Software BD FACSDiva™	BD™ Biosciences
FACS Accudrop Beads, 6 $\mu$ m Partikel	BD™ Biosciences

## Hintergrund

Die durchflusszytometrische Zellsortierung bedient sich weitgehend der Technik der klassischen Durchflusszytometrie (**Kap. 2.12**). Neben der Charakterisierung der Zellen anhand ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften ermöglicht sie gleichzeitig auch die gezielte Isolierung bestimmter Zellpopulationen, welche zur weiteren Verwendung in unterschiedliche Analyseröhrchen eingeordnet werden. Zur Differenzierung der unterschiedlichen Zellpopulationen werden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern gefärbt, welche spezifisch an Oberflächenmoleküle der Zielpopulationen binden. Nach der hydrodynamischen Fokussierung und Messung, können die Zellpopulationen von Interesse mit der angeschlossenen Analysesoftware BD FACSDiva durch das Setzen von Gates definiert werden. Die Zellen gelangen nach der Messung zu einem Abrisspunkt, wo der Flüssigkeitsstrahl durch einen piezoelektrischen Schwingungsgeber (Nozzle) stabilisiert und dann in Einzeltropfen abgebrochen wird. Jeder Einzeltropfen enthält dabei eine Zelle. Entsprechend ihrer Zugehörigkeit zu den vorher definierten Zielpopulationen werden die Zellen vor Abreißen des Strahls mit einer bestimmten elektrischen Ladung versehen. Anschließend passieren sie ein elektrisches Feld, welches von zwei unterschiedlich geladenen Metallplatten erzeugt wird. Die Zellen werden entsprechend ihrer elektrischen Ladung in Richtung ihres jeweiligen Auffangröhrchens abgelenkt. Der verwendete FACSAria Cell Sorter ermöglicht die Analyse von bis zu 8 Farben und Isolierung von vier unterschiedlichen Zellpopulationen innerhalb eines Sortvorgangs.

## Durchführung

Es sollten bestimmte NK-Zellpopulationen im Hinblick auf ihre Expression der prädominanten KIR-Rezeptoren CD158a, CD158b und CD158e aus frischen PBMCs isoliert werden. Zur Unterscheidung der NK-Zellen von den restlichen PBMCs erfolgte eine Antikörperfärbung mit CD56, CD3 und CD16. Um eine weitere Auftrennung der NK-Zellen in die unterschiedlichen NK-Zellpopulationen zu ermöglichen, wurde zudem eine Antikörperfärbung mit CD158a, CD158b und CD158e nach dem in **Kap. 2.12** beschriebenen Protokoll unter Auslassung der

Vitalitätsfärbung durchgeführt. Es wurden CD158a, CD158b, CD158e einfach positive, mehrfach KIR<sup>+</sup> sowie KIR<sup>-</sup> NK-Zellpopulationen gewonnen, indem die sortierten Zellen in FACS-Analyseröhrchen mit 1 ml vorgelegter Stammlösung A aufgefangen wurden.

## 2.12 Durchflusszytometrische Immunphänotypisierung

BD™ LSR II Flow Cytometer	BD™ Bioscience
Angeschlossene Hardware	Hewlett-Packard
Software DIVA	BD™ Bioscience
Auswertungsprogramm FCS Express 4.0	De Novo Software

Antikörper	Subtyp	Klon	Fluorochrom	Hersteller
<b>Kontrollantikörper</b>				
γ1 Mouse	IgG <sub>1</sub>	X40	FITC	BD™ Bioscience
γ1 Mouse	IgG <sub>1</sub>	X40	PE	
γ1 Mouse	IgG <sub>1</sub>	X40	APC	
γ2a Mouse	IgG <sub>2a</sub>	X39	FITC	
γ2a Mouse	IgG <sub>2a</sub>	X39	PE	
γ2a Mouse	IgG <sub>2a</sub>	X39	PerCp	
<b>Immunphänotypisierung NK-Zellen</b>				
CD16	IgG <sub>1</sub>	3G8	AF700	BioLegend
CD56	IgG <sub>1</sub>	HCD56	PE/Cy7	BioLegend
CD3	IgG <sub>2a</sub> IgG <sub>2a</sub>	HIT3a SK7	PB PerCp	BioLegend
CD158a/h	IgG <sub>1</sub>	11PB6	FITC	Miltenyi Biotec
CD158a	IgM IgG <sub>1</sub>	HP3E4 EB6.B	FITC PE	BD Bioscience Beckman Coulter
CD158b	IgG <sub>2a</sub> IgG <sub>2a</sub>	DX27 DX27	PE APC	Miltenyi Biotec
CD158e	IgG <sub>1</sub> IgG <sub>1</sub> IgG <sub>1</sub>	DX9 DX9 DX9	APC FITC BV421	Miltenyi Biotec Miltenyi Biotec BioLegend
<b>Funktionale Analyse</b>				
IFNγ	IgG <sub>1</sub>	4S.B3	BV711	Biolegend

CD107a	IgG <sub>1</sub>	H4A3	APC	Biolegend
CD45	IgG <sub>1</sub>	HI30	APC-Cy7	Biolegend
<b>Adhäsionsmoleküle</b>				
MIC-A/B	IgG <sub>2a</sub>	6D4	PE	BioLegend
ULBP-1	IgG <sub>2a</sub>	170818	PE	R&D Systems
ULBP-2/5/6	IgG <sub>2a</sub>	165903	PE	R&D Systems
ULBP3	IgG <sub>2a</sub>	166510	PE	R&D Systems
CD112	IgG <sub>1</sub>	TX31	PE	BioLegend
CD155	IgG <sub>1</sub>	SKII.4	PE	BioLegend
CD58	IgG <sub>1</sub>	TS2/9	PE	BioLegend
CD54	IgG <sub>1</sub>	HCD54	APC	BioLegend
CD11a	IgG <sub>2a</sub>	G43-25B	FITC	Becton Dickinson
CD50	IgG <sub>1</sub>	CBR-IC3/1	PE	BioLegend
<b>HLA-Analyse</b>				
QIFIKIT	IgG <sub>2a</sub>	CRIS-1	unmarkiert	Dako
HLA-ABC	IgG <sub>2a</sub>	W6/32	FITC	Biozol
R-Phycoerythrin AffiniPure F(ab') <sub>2</sub> Fragment Goat Anti-Human IgG, Fcy Fragment Specific	IgG	polyklonal	PE	Jackson ImmunoResearch
HLA Bw4	IgG <sub>2a</sub>	FH0007	FITC	One Lambda
HLA Bw6	IgG <sub>3?</sub>	FH0038	FITC	One Lambda
<b>Lebend-Tot Färbung</b>				
Lebend/Tot- Farbstoff			AF350 Aqua	Invitrogen

## Hintergrund

Die Durchflusszytometrie (FACS= fluorescence activated cell sorter) erlaubt die Charakterisierung von Zellen anhand ihrer differierenden physikalischen und chemischen Eigenschaften. Zunächst wird die Zellsuspension durch Überdruck mittels einer Messkapillare in das Gerät aufgenommen. In der Messkammer ermöglicht eine die Zellen umgebende Trägersubstanz eine starke Beschleunigung und Auftrennung dieser, sodass sie als Einzelzellen sequentiell und fokussiert einen Laserstrahl durchwandern. Dieser Vorgang der

hydrodynamischen Fokussierung dient der Messung von zellspezifischen Streuungseffekten und Fluoreszenzen der verwendeten Antikörper auf Einzelzellebene [92].

**Streuungseffekte der Zellen:** Die den Laserstrahl durchwandernden Zellen führen zu einer Lichtbrechung, welche entlang des einfallenden Lichts als Vorwärtstreulicht (FSC= forward light scatter) sowie dazu rechtwinkligem Seitwärtstreulicht (SSC= sideways light scatter) von Photomultipliern aufgenommen und durch einen Analog-Digital-Wandler digitalisiert wird. Während das Vorwärtstreulicht ein Maß für die Zellgröße ist, spiegelt das Seitwärtstreulicht das Ausmaß der intrazellulären Granularität wieder. Anhand dessen können bei der Analyse von Vollblut Monozyten, Lymphozyten und Granulozyten in einem zweidimensionalen Diagramm der FSC (x-Achse) und SSC (y-Achse) voneinander unterschieden werden.

**Fluoreszenzen der Antikörper:** Zur immunologischen Phänotypisierung von Zellen werden fluoreszenzmarkierte monoklonale Antikörper verwendet. Durch diese Methode ist es möglich, mehrere unterschiedliche Antigene auf einer Zelle gleichzeitig nachzuweisen. Voraussetzung hierfür ist, dass sich bei gemeinsamer Anregung verschiedener Farbstoffe durch einen Laser bestimmter Wellenlänge die Emissionsmaxima deutlich voneinander unterscheiden.

Die Lichtenergie des Lasers wird durch die Farbstoffe absorbiert, wodurch Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben werden. Bei Rückgang auf das Ausgangsniveau wird die Energie in Form eines Photons emittiert, dessen Fluoreszenzenergie jedoch geringer ist als die Absorptionsenergie. Die Wellenlänge des emittierten Lichts ist somit größer als die des anregenden Lichts des Lasers. Interferenzfilter ermöglichen die Auftrennung des abgestrahlten Lichts nach Wellenlänge und anschließende Erfassung durch Lichtsensoren. Die Fluoreszenzintensität ist direkt proportional zu der Anzahl der Bindungsstellen, welche mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern besetzt sind. Zellen besitzen von Grund auf eine gewisse Autofluoreszenz, die durch Messung einer ungefärbten Probe bestimmt wird. Diese Vergleichsmessung ist essenziell zur Bestimmung der Grenze ab wann ein Fluoreszenzwert als positiv gilt und somit auf den AK

zurückzuführen ist. Zur Bestimmung der unspezifischen Antikörperbindung wird zusätzlich eine Isotypkontrolle durchgeführt.

### **Durchführung**

Der Versuchsablauf erfolgt auf Eis. Die Zentrifugationsschritte werden bei der Verwendung von FACS-Analyseröhrchen bei 4°C mit 400g für 5 min, B9 und R9 und bei der Verwendung von 96-Well-Rundbodenplatten mit 1800RPM für 2 min, B9 und R9 durchgeführt.

- 1) Die verwendeten Zellen werden mit PBSE in FACS-Analyseröhrchen oder 96-Well Rundbodenplatte gewaschen und anschließend dekantiert, sodass das verbleibende Zellpellet ein möglichst geringes Restvolumen aufweist.
- 2) Um eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen zu ermöglichen, erfolgt eine Färbung mit AF350 oder LifeDead Aqua-Lösung. Der Lebend-Tot-Farbstoff wird zu diesem Zweck mit PBSE im Verhältnis 1:3000 für AF350 und 1:400 für LifeDead Aqua eingestellt. Die Zellen werden mit 50 µl dieser Lösung gut invertiert und 20 min in Dunkeln bei 4°C inkubiert.
- 3) Die Zellen werden anschließend zweimal in FACS-Puffer gewaschen und dekantiert.
- 4) Zur extrazellulären AK-Färbung werden die Antikörper entsprechend ihrer Antikörpertitration eingesetzt. Soll die Färbung aller Proben mit der gleichen Antikörperkombination erfolgen, wird ein Mastermix erstellt. Hierfür wird die für alle Proben benötigte Menge an Antikörpern in ein 15 ml Falcon-Röhrchen gegeben und falls erforderlich noch mit FACS-Puffer verdünnt, sodass sich ein Färbevolumen pro Probe von 50 µl ergibt. Die Zellen werden in der Antikörperlösung sorgfältig resuspendiert und wiederum bei 4°C im Dunkeln für 20 min inkubiert.
- 5) Nach zweimaligem Waschen der Zellen in FACS-Puffer werden die Zellen bis zur Messung bei 4°C im Dunkeln gelagert. Erfolgt die Messung erst am Folgetag werden die Zellen mit 1% Foscarnet (PFA) fixiert.

## Messung und Auswertung

Die Messung erfolgte mit dem BD™ LSR II Flow Cytometer und die Auswertung mit der Software FCS Express 5.0. Zunächst findet vor der Messung der Proben die Einstellung der Verstärkerspannen FSC (x-Achse) und SSC (y-Achse) statt, damit die Darstellung der üblichen Zellverteilung zustande kommt und die Messung der Proben erfolgen kann. Zur weiteren Auswertung können Ausschnitte des Diagramms, in welchen sich Zielpopulationen befinden, als Gates definiert werden. Die sich in einem Gate befindenden Zellen z.B. Lymphozyten können gesondert in einem zusätzlichen Diagramm dargestellt und hinsichtlich ihrer Fluoreszenz ausgewertet werden. Werden zwei Kanäle z.B. FITC und APC gegeneinander dargestellt, kann durch das Setzen eines Quadranten das Schaubild in vier Ausschnitte eingeteilt werden. Die darin befindlichen Populationen werden für die aufgetragenen Fluoreszenzen als doppelt positiv, einfach positiv und doppelt negativ definiert. Die absolute und relative Zellzahl der Quadranten wird automatisch berechnet. Um die Anzahl der einen bestimmten Rezeptor tragenden Zellen zu berechnen, kommt auch das sogenannte Subtraktionsverfahren zur Anwendung. Hierzu berechnet das Programm FCS Express 5.0 die Differenz zwischen der MFI der Probe und der MFI der Isotypkontrolle und gibt den prozentualen Anteil der positiven Zellen an.

### 2.13 Klonierung und Expansion von Na türlichen Killerzellen

Interleukin-2 (IL2) Proleukin 2x10 <sup>6</sup> IE/ml	Universitätsapotheke
Bestrahlungsgerät Gamma Cell 1000 Elite	Nordion

Es wurden zwei Methoden zur Generierung von NK-Klonen getestet; wobei Methode I nur im ersten Expansionszyklus bei Spender 1 angewendet wurde. In darauffolgenden Expansionen wurde ausschließlich Methode II angewendet. Beiden Methoden geht die Isolierung von PBMCs aus 50-120ml heparinisiertem Vollblut dreier gesunder freiwilliger Spender voraus (**Kap. 2.7**).

#### Methode I

Mit den isolierten PBMCs erfolgte sowohl eine MACS- Anreicherung CD56<sup>+</sup> Zellen sowie eine Depletion CD3<sup>+</sup> Zellen nach der in **Kap. 2.9 + 2.10**



beschriebenen Methode. Die CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> Zellen wurden dann in Stammlösung B aufgenommen und maschinell gezählt. Zur Aussaat der NK-Klone in 96-Well Rundbodenplatten wurde die Zellsuspension auf 100 Zellen/ml eingestellt, sodass 100 µl pro Well einer Aussaat von 10 NK-Zellen pro Well entsprachen.

## **Methode II**

Zur Generierung von NK-Klonen mit definiertem Immunphänotyp setzten wir die durchflusszytometrische Zellsortierung ein. Die isolierten PBMCs der Spender wurden nach dem in **Kap. 2.11** beschriebenem Verfahren gefärbt und CD158a, CD158b, CD158e einfach positive, mehrfach KIR<sup>+</sup> sowie KIR<sup>-</sup> NK-Zellpopulationen gesortet. Die so gewonnenen Zellpopulationen wurden bei 4°C mit 400 g, B9 und R9 für 10 min abzentrifugiert, dekantiert und in Stammlösung B aufgenommen. Da die Vitalität der Zellen nach dem Sortvorgang deutlich beeinträchtigt ist, wurden in 96-Well Rundbodenplatte je nach Expansionszyklus und Spender 10-100 Zellen/Well in 100 µl Stammlösung B ausgesät.

Die verwendeten Feederzellen K562mb15-41BBL wurden mit 100 Gy bestrahlt und auf  $2 \times 10^6$ /ml mit Stammlösung B eingestellt. Sowohl nach Methode I als auch nach Methode II wurden der Kultur  $0,05 \times 10^6$  bestrahlte K562-mb15-41BBL zugeführt.

## **Expansion**

Tag1: Die NK-Zellen sammeln sich zusammen mit den K562-mb15-41BBL in der Mitte der Wells und bilden zusammenhängende Zellkonglomerate, sogenannte Zellcluster, die bei der Zellpflege möglichst nicht zerstört werden sollten.

Ab Tag 1: Das Wachstum der NK-Klone wurde täglich nach folgenden Kriterien beurteilt: Im Inversionsmikroskop sichtbare Vergrößerung und Vermehrung der Zellcluster, pH- Umschlag des Mediums, ggf. Beurteilung der Vitalität durch Trypanblaufärbung einer Zellprobe und Betrachtung unter dem Lichtmikroskop (**Kap. 2.8**). Durch vorsichtiges randständiges Abnehmen des verbrauchten Mediums mit einer sterilen Pipette und Zugabe frischer vorgewärmter Stammlösung B, erfolgte je nach Färbung des Mediums und Wachstum der NK-

Klone alle 1-3 Tage ein Mediumwechsel. Bei starkem Wachstum wurden die NK-Klone zunächst auf 2 Wells der Rundbodenplatte gesplittet und später in die nächstgrößere Kulturplatte (48-Well, 24-Well, 6-Well Flachbodenplatte) überführt. Ein Auflösen der Zellcluster ist ein Anzeichen für den Bedarf an frischen bestrahlten Feederzellen. Um eine Wachstumsstimulation der NK-Zellen aufrecht zu erhalten, wurden der Expansion aus diesem Grund wiederholt  $0,05-0,5 \times 10^6$  K562-mb15-41BBL zugeführt. Es wurde jedoch auch darauf geachtet, dass zum Zeitpunkt der Zytotoxizitätstestung kaum mehr Feederzellen in der Expansion enthalten waren.

Tag 24-40: Je nach Wachstum der NK-Klone konnten in diesem Zeitraum die funktionellen Analysen durchgeführt werden. Am Vortag der funktionellen Testung wurden die NK-Klone mit frischer Stammlösung B versorgt, um eine gute Nährstoffversorgung der Zellen im Vorfeld zu gewährleisten.

## 2.14 BATDA Release Assay

Victor 1420 Multilabel Counter	Counter Wallac
Angeschlossene Hardware, PC	Compacq
Software Wallac 1420 Workstation	Wallac
Sonifier Cell Disruptor B-12	Branson Sonic Power
Lysepuffer	Wallac
BATDA Reagent Delfia (8mM)	PerkinElmer
Europium Solution	PerkinElmer

### Hintergrund

Die von Blomberg et al. [93] beschriebene Methode des BATDA Release Assay bietet gegenüber dem radioaktiven Chromfreisetzungstest den Vorteil eines schnelleren und nicht-radioaktiven Verfahrens zur Messung der spezifischen Lyse von Lymphozyten gegenüber markierten Targetzellen. Die Markierung der Targetzellen erfolgt durch Inkubation mit dem fluoreszenzverstärkenden Liganden (BATDA), welches durch seine hydrophobe Eigenschaft leicht die Zellmembran passieren kann. Die intrazelluläre Hydrolyse der Esterbindungen des Liganden lässt eine hydrophile Verbindung (TDA) entstehen, die die

Membranbarriere nicht mehr durchdringen kann. Ein Austreten des hydrophilen Liganden TDA in den Überstand ist somit nur durch Lyse der Targetzellen mittels zytotoxischer Effektorzellen oder anderweitige Schädigung der Membranbarriere beispielsweise durch chemische oder mechanische Einflüsse möglich. Durch Zugabe von Europium bildet sich ein stark fluoreszierender stabiler Chelatkomplex (EuTDA), welcher im Fluorometer gemessen kann. Die austretende Menge an TDA und somit auch an EuTDA ist proportional zur Anzahl lysierter Zellen.

Ein Maß für die Zytotoxizität der Effektorzellen, ist die durch sie vermittelte prozentuale spezifische Lyse der Targetzellen, zu deren Berechnung folgende Kontrollwerte benötigt werden:

- Maximallyse: Sie bezeichnet den bei kompletter Targetzelllyse gemessenen maximalen Fluoreszenzwert.
- Spontanlyse: Sie bezeichnet den gemessenen Fluoreszenzwert, der nicht auf den zytotoxischen Einfluss von Effektorzellen, sondern auf die Freisetzung des Liganden durch defekte oder abgestorbene Zellen zurückzuführen ist.

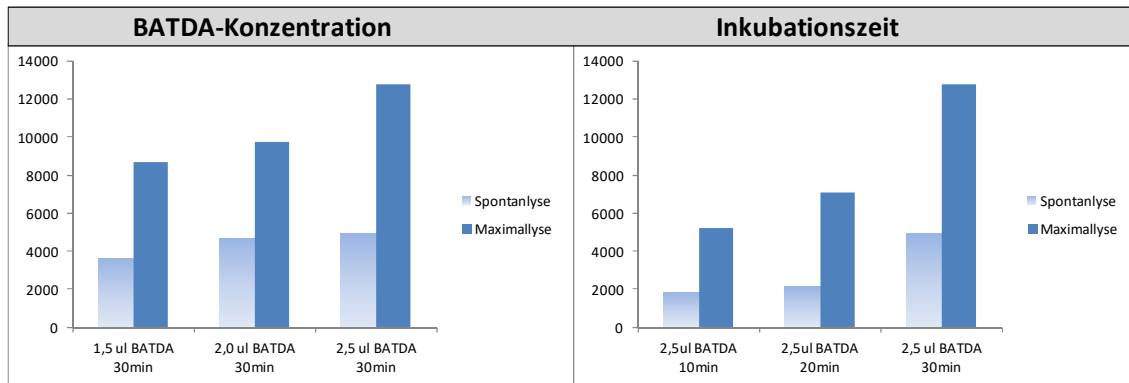
$$\text{Spezifische Lyse in \%} = \frac{\text{Messwert} - \text{Spontanlyse}}{\text{Maximallyse} - \text{Spontanlyse}} \cdot 100 \quad (1)$$

Neben der Messung der Spontanlyse lässt sich zusätzlich durch die Testung unterschiedlicher E:T-Ratios verdeutlichen, dass die gemessene Zelllyse auf die zugegebenen Effektorzellen zurückzuführen ist.

### **BATDA-Optimierung**

In Vorversuchen wurde die Markierung der Zelllinien LAN-1 und LS mit unterschiedlichen BATDA-Konzentrationen und Inkubationszeiten getestet. Ziel dieser Versuche war eine möglichst hohe BATDA-Aufnahme der Targetzellen bei möglichst geringer Spontanlyse. Die Targetzellen wurden für 10 min, 20 min und 30 min mit einer BATDA-Konzentrationen von 1,5 µl/ml, 2,0 µl/ml und 2,5 µl/ml inkubiert und anschließend im Hinblick auf ihre Spontan- und Maximallyse miteinander verglichen. Dies ist exemplarisch für die Zelllinie LS in **Abb. 2.2**

dargestellt. Das Verhältnis von Spontanlyse zu Maximallyse war für beide Zelllinien bei einer BATDA-Konzentration von 2,5  $\mu\text{l}/1 \times 10^6$  Zellen und einer Inkubationszeit von 30 min am günstigsten.



**Abb. 2.2 Optimierung der BATDA-Konzentration und Inkubationszeit für die Zelllinie LS**

Ausgetestet wurden die unterschiedlichen BATDA-Konzentrationen 1,5  $\mu\text{l}$ , 2,0  $\mu\text{l}$  und 2,5  $\mu\text{l}$  pro  $1 \times 10^6$  Zellen/ml mit den Inkubationszeiten 10 min, 20 min und 30 min. Dargestellt sind die im Fluorometer gemessenen Counts der Spontanlyse und Maximallyse mit Lysepuffer abzüglich des gemessenen Backgrounds.

### Durchführung: Vorbereitung der Zellen

Vorbereitung der Effektorzellen: In den vorliegenden Versuchen wurden die expandierten und immunphänotypisierten NK-Klone in einer E:T-Ratio von 5:1 und 1:1 getestet. Die E:T-Ratio richtete sich nach der festen Anzahl von 5000 Targetzellen/Well. Somit mussten die NK-Klone nach der maschinellen Zellzählung abzentrifugiert und auf  $0,25 \times 10^6/\text{ml}$  für die E:T-Ration 5:1 und mittels Verdünnung auf  $0,05 \times 10^6/\text{ml}$  für die E:T-Ration 1:1 mit Stammlösung A eingestellt werden. Die Vitalität der NK-Zellen wurde durch eine Färbung der Zellen mit Trypanblau und Beurteilung unter dem Lichtmikroskop bestätigt.

Vorbereitung der Targetzellen: Als Targetzellen dienten die Neuroblastomzelllinien LAN-1 und LS sowie die erythroleukämische Zelllinie K562. Die Zelllinien LAN-1 und LS wurden nach dem in **Kap. 2.4.2** beschriebenen Verfahren standardisiert ausgesät und geerntet. Alle Zelllinien wurden in der Neubauer-Zählkammer gezählt (**Kap. 2.8**) und anschließend auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in einem 15 ml Falconröhrchen mit Stammlösung A eingestellt. Pro  $1 \times 10^6$  Targetzellen wurde 2,5  $\mu\text{l}$  des BATDA-

Liganden zugegeben und für 30 min im Brutschrank inkubiert. Alle 10 min wurden die Falconröhrchen vorsichtig invertiert. Um das überschüssige BATDA zu entfernen wurden die Zellen nach Ablauf der Inkubationszeit fünfmal mit 200g für 5 min bei 37°C, B5 und R2 gewaschen und anschließend auf  $0,2 \times 10^6/\text{ml}$  eingestellt, sodass ein Pipettivolumen von 25µl 5000 Zellen entspricht. Es wurde eine Probe von allen markierten Targetzelllinien gesondert abzentrifugiert und der Überstand zur Bestimmung des Backgrounds verwendet. Dieser ist notwendig zur Berechnung der Spontanlyse:

$$\text{Spontanlyse in \%} = \frac{\text{Spontanlyse-Background}}{\text{Maximallyse-Background}} \cdot 100 \quad (2)$$

Sie stellt eine der Gütekriterien des Zytotoxizitätstests dar und soll durch schonende Behandlung der Targetzellen möglichst gering gehalten werden.

#### **Durchführung: Testansatz**

Das Ansetzen des Tests erfolgte in fünf 96-Well Rundbodenplatten. LAN-1 und LS wurden in jeweils zwei 96-Well Rundbodenplatten, eine mit und eine ohne Zugabe von ch14.18 getestet.

Als Kontrollzelllinie diente K562 in der fünften Platte. Pro Testansatz konnten 12 NK-Klone parallel getestet werden.

Kontrollleiste: Es erfolgte eine Vierfachbestimmung des Backgrounds, der Spontanlyse, Maximallyse durch Lysepuffer und Maximallyse durch Ultraschall. Zu 25 µl der wie folgt behandelten Probe wurde 175 µl Medium bzw. 170 µl Medium und 5 µl therapeutischer Antikörper ch14.18 (0,04 mg/ml) zugefügt:

- Background: 25 µl des Überstands einer Probe die bei 200 g für 5 min, B5 und R2 abzentrifugiert wurde
- Spontanlyse: 25 µl der markierten Targetzellen ( $0,2 \times 10^6/\text{ml}$ )
- Maximallyse durch Ultraschall: 25 µl ultraschallysierte Targetzellen

Zur Ermittlung der Maximallyse durch Lysepuffer wurde zu 25 µl Targetzellen 50 µl Lysepuffer und 125 µl Medium bzw. 120 µl Medium und 5 µl therapeutischer Antikörper ch14.18 gegeben.

E/T-Verdünnungen: Für jede E:T-Ratio erfolgte eine Dreifachbestimmung. Bei den Platten ohne therapeutischen Antikörper wurden 100 µl NK-Zellen ( $0,25 \times 10^6/\text{ml}$ ,  $0,05 \times 10^6/\text{ml}$ ), 25 µl Targetzellen und 75 µl Medium in jedes Well pipettiert. Bei den Platten mit ch14.18 wurde zuvor 5 µl Antikörper vorgelegt und 30 min mit 25 µl Targetzellen im Brutschrank inkubiert. Erst dann wurden die 100 µl NK-Zellen und 70 µl Medium zugegeben.

Die Platten wurden mit 100g bei 37°C für 2 min, B5 und R2 abzentrifugiert und 2 h im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Platten mit 200g bei 37°C für 5 min, B5 und R2 erneut abzentrifugiert und 20 µl des Überstands in 96-Well Flachbodenplatten, in denen 180 µl Europium vorgelegt wurde, überführt. Unter Lichtabschluss folgte eine 15-minütige Inkubationszeit auf dem Schüttler mit anschließender Messung mit dem Fluorometer. Aus den Einzelwerten der Dreifach- bzw. Vierfachbestimmungen der Wells wurde der Mittelwert gebildet und die spezifische Lyse und Spontanlyse durch Anwendung der Formeln (1) und (2) berechnet.

## 2.15 CD107a und IFN- $\gamma$ Assay

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

### Hintergrund

Das CD107a Assay ist ein durchflusszytometrisches Verfahren zur Untersuchung der NK-Zell Aktivierung durch Kontakt mit Zielzellen. Aktivierte NK-Zellen besitzen durch Freisetzung zytoplasmatischer Vesikel mit Granzym und Perforin die Fähigkeit ihre Zielzellen zu lysieren. Das freigesetzte Perforin schafft Poren in der Zellmembran der Zielzellen, durch die die Proteasen eindringen und eine Apoptose induzieren können. Die Granulamembran enthält CD107a (LAMP-1), welches nach der Fusion der Vesikel mit der Zellmembran auf der NK-Zell Oberfläche mit fluoreszenzmarkiertem CD107a-AK nachweisbar ist [94]. Durch zusätzliche Bestimmung anderer Oberflächenmoleküle mit

fluoreszenzmarkierten Antikörpern ist eine gesonderte Betrachtung der CD107a-Expression der einzelnen NK-Populationen möglich. In unserer Studie wurde die CD107a-Expression Bulk expandierter NK-Zellen bei Kontakt mit den Neuroblastomzelllinien LAN-1 und LS mit und ohne Zugabe des therapeutischen Antikörpers ch14.18 untersucht. Durch eine Intrazellulärfärbung kann gleichzeitig auch die Zytokinproduktion von IFN $\gamma$  der NK-Zellen gemessen werden.

### Durchführung

Der Versuchsansatz wurde in 96-Well Rundbodenplatten durchgeführt. Die Platten wurden mit 1800 RPM für 2 min, B9 und R9 zentrifugiert. Einstellen der Zellen und Lösungen mit Stammlösung A:

	Konzentration	Pipettiervolumen
Effektorzellen	15x10 <sup>6</sup> /ml	50 $\mu$ l
Targetzellen	5x10 <sup>6</sup> /ml	50 $\mu$ l
Brefeldin A/ GolgiStop	40 $\mu$ g/ml; 4:1000	50 $\mu$ l
PMA/Ionomycin	200ng/ml; 4 $\mu$ M	50 $\mu$ l
Ch14.18	4 $\mu$ g/ml	50 $\mu$ l

- 1) In alle Wells mit Ausnahme der Negativ- und Positivkontrolle wurden je 50  $\mu$ l Effektorzellen, Targetzellen, BrefeldinA/GolgiStop und Stammlösung A bzw. ch14.18 gegeben.
- 2) Die Positivkontrolle beinhaltet je 50  $\mu$ l Effektorzellen, BrefeldinA/GolgiStop, PMA/Ionomycin und Stammlösung A bzw. ch14.18. Für die Negativkontrolle wurden nur je 50  $\mu$ l Effektorzellen, BrefeldinA/GolgiStop, 100  $\mu$ l Stammlösung A bzw. je 50  $\mu$ l Stammlösung A und ch14.18 in die Wells pipettiert.
- 3) In alle Wells wurde von 2  $\mu$ l CD107a-AK (APC) zugegeben. Die Platten wurden je nach Ansatz 2, 4 oder 8h inkubiert.
- 4) Die Platten wurden bei 4°C abzentrifugiert und zweimal mit FACS-Puffer gewaschen.
- 5) Es folgte eine Oberflächenfärbung nach dem in **Kap. 2.12** beschriebenen Verfahren.
- 6) Die Platten wurden erneut zweimal gewaschen. Dann wurden die Zellen in 100  $\mu$ l Cytofix/Cytoperm aufgenommen, 20 min unter Lichtausschluss bei 4°C inkubiert und anschließend mit Permwash zweimal gewaschen.

- 7) Zugabe der intrazellulären Zytokinfärbung mit IFN $\gamma$ -PE (1:100) in einem Färbenvolumen von 50  $\mu$ l und erneute Inkubation für 20min unter Lichtausschluss bei 4°C.
- 8) Dreimaliges Waschen der Zellen mit Permwasch. Aufnahme der Zellen in 200  $\mu$ l PA.
- 9) Die Messung erfolgte mit dem BD™ LSR II Flow Cytometer und die Auswertung mit der Software FCS Express 5.0.

## 2.16 xCELLigence

xCELLIGENCE RTCA SP Messgerät	AceaBioscience, San Diego, USA
PC, angeschlossene Hardware	Hewlett-Packard
RTCA Software 1.2.1, Software	AceaBioscience, San Diego, USA
CO <sub>2</sub> – Begasungsbrutschrank, Heraeus Hera Cell	ThermoScientific, Waltham, USA
E-Plate VIEW 96 PET Analyseplatten	AceaBioscience, San Diego, USA

### Hintergrund

Eine weitere Möglichkeit der funktionalen Testung von NK-Zellen bietet das moderne Verfahren mit dem xCELLigence-System. Adhärenz Zellen können von im Boden der Analyseplatte eingebrachten Mikroelektroden durch Messung der Impedanz erfasst werden. Eine Änderung der Impedanz wird als Cell Index (CI) angegeben, welcher eine dimensionslose Einheit darstellt und positiv mit der Anzahl adhärenz Zellen korreliert [95]. Der CI lässt Rückschlüsse auf das Zellwachstum, die Morphologie, Stärke der Adhärenz und Viabilität der Zellen zu. Im Gegensatz zum BATDA Release Assay, das auf einer alleinigen Endpunktmessung beruht, ermöglicht die Echtzeitmessung des xCELLigence-Systems eine Untersuchung der NK-Zell vermittelten Lyse von adhärenz Tumorzellen über den kompletten Versuchszeitraum. Hierzu werden adhärenz Tumorzellen auf der E-Platte ausgesät und in der RTCA SP Station im Brutschrank bis zum adhärenz und proliferieren der Zellen inkubiert. Zu einem definierten Zeitpunkt werden die Effektorzellen zugeführt. Dysfunktionale und lysierte Tumorzellen lösen sich vom Boden der Messplatte, was zu einer Abnahme des CI führt. Neben der funktionalen Testung der gesorteten und



expandierten NK-Subpopulationen mit dem BATDA-Release Assay, wurde die NK-Zell vermittelte Lyse gegenüber den Neuroblastomzelllinien LAN-1 und LS auch mit dem xCELLigence-System untersucht.

### **Durchführung**

Es wurde eine Vierfachbestimmung der spezifischen Lyse jeder NK-Subpopulation mit und ohne Zugabe des therapeutischen AK ch14.18 gegenüber LAN-1 und LS in einer 96-Well E-Platte durchgeführt.

- 1) Zum Kalibrieren der 96-Well E-Platte wurde 50  $\mu$ l Stammlösung A in jedes Well pipettiert und die Platte in die RTCA SP Station im Brutschrank gestellt. Es erfolgte nach Starten der Messung eine automatische Kalibrierung der Platte.
- 2) LAN-1 wurde auf  $0,25 \times 10^6$  Zellen/ml, LS auf  $0,15 \times 10^6$  Zellen/ml in Stammlösung A eingestellt. Nach Aussaat von 100  $\mu$ l LAN-1 bzw. LS wurde die Platte wieder in der RTCA SP Station im Brutschrank positioniert und die Messung mit einem Messintervall von 30 min gestartet.
- 3) Nach 24h/48h erfolgte die Zugabe der Effektorzellen zu den ausgesäten LS/LAN-1. Für eine E/T-Ratio von 5:1 wurden die NK-Subpopulationen bei Versuchen gegen LAN-1 auf  $5 \times 10^6$  Zellen/ml, gegen LS auf  $3 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und 25  $\mu$ l dieser Zellsuspension pro Well zugegeben.
- 4) Die Testung der ADCC erfolgte durch Zugabe von 25  $\mu$ l therapeutischen AK ch14.18 mit der Konzentration 80  $\mu$ g/ml, sodass die AK-Konzentration im Gesamtvolumen des Wells 10  $\mu$ g/ml betrug. Bei der Testung ohne AK wurden 25  $\mu$ l Stammlösung A hinzugegeben.
- 5) Zu den Kontrollwells wurden keine Effektorzellen zugefügt, sondern 50  $\mu$ l Stammlösung A bzw. 25  $\mu$ l Stammlösung A und 25  $\mu$ l ch14.18.
- 6) Die Platte wurde wieder in die RTCA SP Station im Brutschrank gestellt und die Messung mit einem Messintervall von 30 min für 24 h weitergeführt.

### **Auswertung**

Die Rohdaten wurden mit Hilfe der RTCA Software auf den Zeitpunkt der Effektorzellzugabe normalisiert und in Excell exportiert. Es wurde zu jedem

Messpunkt der Mittelwert des jeweils vierfach bestimmten CI gebildet und prozentual zum Mittelwert des CI der Kontrolle angegeben. Der so ermittelte Wert entsprach der prozentualen spezifischen Lyse der Tumorzellen durch die jeweilige NK-Subpopulation.

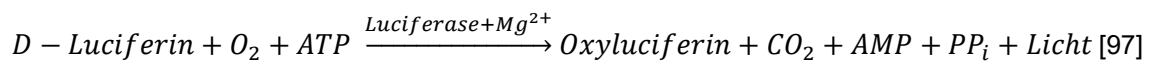
## 2.17 Luciferase-Assay

Cellstar® 96well-Microplate, F-Bottom, weiß	Greiner Bio One
D-Luciferin	Sigma Aldrich
2 <sup>nd</sup> Generation Lentiviraler Transfektor Luciferase/mCherry *	pCDH-EF-eFFly-T2A-mCherry
Victor 1420 Multilabel Counter	Counter Wallac
Hardware, PC	Compacq
Software, Wallac 1420 Workstation	Wallac

\*Luciferase/mCherry Transfektor wurde freundlicherweise von Frau Prof. Irmela Jeremias, Helmholtz Zentrum München (German Research Center for Environmental Health im Rahmen eines Material Transfer Agreements (MTA) mit Dr. Patrick Schlegel zur Verfügung gestellt.

## Hintergrund

Das Luciferase-Assay bietet eine weitere Möglichkeit zur Quantifizierung der NK-zellvermittelten Lyse von Tumorzellen. Das Verfahren basiert auf der Eigenschaft von Luciferase Enzymen ihre Substrate (Luciferine) in einer ATP- und sauerstoffabhängigen chemischen Reaktion umzusetzen, bei welcher Photonen emittiert werden. Diese können in Form von Licht mit einem Emissionsmaximum bei der Wellenlänge  $\lambda=560$  nm mittels Fluorometer gemessen werden [96]. Das bekannteste und am besten erforschte Luciferin-Luciferase System ist das des nordamerikanischen Leuchtkäfers *Photinus pyralis*, welcher D-Luciferin als Substrat umsetzt:



Durch die Transduktion der Neuroblastomzelllinien LAN-1 und LS mit dem Luciferase/Fluorochrom tragenden lentiviralen Doppelvektor mCherry/Luciferase, wird das mCherry/Luciferase-Gen in das Genom der Zielzellen integriert. Durch Transkription und Translation exprimieren die erfolgreich transfizierten Zellen zum einen das Fluorochrom mCherry auf ihrer Oberfläche und zum anderen produzieren sie das Enzym Luciferase. Die

Expression von mCherry ermöglicht die Selektion der erfolgreich transduzierten Zellen mittels durchflusszytometrischer Zellsortierung (**Kap. 2.11**). Hierfür wurde das Fluorochrom mCherry im Kanal PE-Dyomics 590 detektiert und selektiert. D-Luciferin wird mittels ABC-Transporter in die Zellen transportiert [98]. Da die beschriebene chemische Reaktion mit D-Luciferin ATP-abhängig stattfindet, kann sie nur in lebenden Zellen stattfinden. Somit korreliert die messbare Lichtintensität mit der Luciferase-Aktivität und folglich mit der Anzahl der lebenden Tumorzellen.

### Durchführung Transduktion

Es erfolgte die Transduktion der Neuroblastomzelllinien LAN-1 und LS mit dem lentiviralen Doppelvektor mCherry/Luciferase wie folgt:

- 1) Die Neuroblastomzellen werden nach dem in **Kap. 2.4.2** geerntet und auf  $0,125 \times 10^6$  Zellen/ml in Stammlösung A eingestellt.
- 2) Es werden 200  $\mu$ l der Zellsuspension pro Well in eine 48-Well-Platte pipettiert und Virusüberstand hinzugegeben.
- 3) Die Platten werden für 30 min mit 800g, B9 und R0 bei 32°C zentrifugiert und anschließend für 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert.
- 4) Zugabe von 800  $\mu$ l Stammlösung A pro Well. Es erfolgt ein Mediumwechsel nach Farbumschlag.
- 5) Bei einer Dichte von ca. 75% werden die Zellen nach in **Kap. 2.4.2** geerntet und in eine Zellkulturflasche umgesetzt.
- 6) Nach ca. 14 Tagen werden die erfolgreich transduzierten Zellen mittels durchflusszytometrischer Zellsortierung selektiert (**Kap. 2.11**).

### Durchführung Luciferase-Assay

Der Versuchsansatz wird in 96-Well Flachbodenplatte durchgeführt. Es wurden zwei E:T-Ratios 1:1 und 0.5:1 zu drei Messzeitpunkten 6 h, 12 h und 24 h getestet. Das Gesamtvolumen pro Well betrug 200  $\mu$ l.

- 1) Einstellen der Targetzellen mit Stammlösung A auf eine Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml.

In alle Wells mit Ausnahme der Titrationsreihe (Pipettierschema **Abb. 2.3** rot hinterlegt) werden 50 µl der Targetzelllösung gegeben.

- 2) Erstellen einer Titrationsreihe der Targetzellen mit  $2 \times 10^6$ ;  $1,5 \times 10^6$ ;  $1 \times 10^6$ ;  $0,5 \times 10^6$ ;  $0,2 \times 10^6$  Zellen/ml. Pipettieren von jeweils 50 µl der entsprechenden Targetzelllösung nach unten aufgeführtem Pipettierschema und 100 µl Stammlösung A.
- 3) Die Effektorzellen werden auf eine Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml und  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und 50 µl der jeweiligen Effektorzelllösung zu den Targetzellen nach unten aufgeführtem Pipettierschema gegeben (**Abb. 2.3**).
- 4) Einstellen des Antikörpers ch14.18 auf eine Konzentration von 40 µg/ml. Hinzugabe von 50 µl zu den jeweiligen Wells mit Antikörper (siehe Pipettierschema **Abb. 2.3**). Zu den Wells ohne ch14.18 wird stattdessen 50 µl Stammlösung A hinzugefügt.
- 5) Zuletzt Zugabe von 50 µl D-Luciferin mit einer Konzentration von 1 µg/ml unter Lichtausschluss.
- 6) Inkubation der Platten bei 37°C im Brutschrank. Messung nach 6 h, 12 h und 24 h im Victor 1420 Multilabel Counter.

### Messung und Auswertung

Die Luciferase-Aktivität und somit messbare Lichtintensität, Biolumineszenz (BL), nimmt durch die NK-Zellvermittelte Lyse ab. Alle Versuche wurden nach dem hier aufgeführten Pipettierschema durchgeführt, um eine vergleichbare Auswertung zu ermöglichen (**Abb. 2.3**).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	<b>1 *10<sup>5</sup> Targets</b>	<b>CD158a<sup>+</sup>+Targets - ch14.18 1:1</b>		<b>CD158a<sup>+</sup> Targets + ch14.18 1:1</b>				<b>Bulk+Targets - ch14.18 1:1.</b>	<b>1 *10<sup>5</sup> Targets</b>		<b>1 *10<sup>5</sup> Targets</b>	
<b>B</b>	<b>1 *10<sup>5</sup> Targets</b>	<b>CD158a<sup>+</sup>+Targets - ch14.18 0.5:1</b>		<b>CD158a<sup>+</sup> + Targets + ch14.18 0.5:1</b>					<b>0.75*10<sup>5</sup> Targets</b>		<b>1 *10<sup>5</sup> Targets</b>	
<b>C</b>	<b>1 *10<sup>5</sup> Targets</b>	<b>CD158b<sup>+</sup>+Targets - ch14.18 1:1</b>		<b>CD158b<sup>+</sup> Targets + ch14.18 1:1</b>					<b>0.5*10<sup>5</sup> Targets</b>		<b>1 *10<sup>5</sup> Targets</b>	
<b>D</b>	<b>1 *10<sup>5</sup> Targets</b>	<b>CD158b<sup>+</sup>+Targets - ch14.18 0.5:1</b>		<b>CD158b<sup>+</sup> Targets + ch14.18 0.5:1</b>					<b>0.25 *10<sup>5</sup> Targets</b>		<b>1 *10<sup>5</sup> Targets</b>	
<b>E</b>	<b>1 *10<sup>5</sup> Targets</b>	<b>CD158e<sup>+</sup>+Targets - ch14.18 1:1</b>		<b>CD158e<sup>+</sup> Targets + ch14.18 1:1</b>					<b>0.1*10<sup>5</sup> Targets</b>		<b>1 *10<sup>5</sup> Targets</b>	
<b>F</b>	<b>1 *10<sup>5</sup> Targets</b>	<b>CD158e<sup>+</sup>+Targets - ch14.18 0.5:1</b>		<b>CD158e<sup>+</sup> Targets + ch14.18 0.5:1</b>					<b>Medium</b>		<b>1 *10<sup>5</sup> Targets</b>	
<b>G</b>	<b>1 *10<sup>5</sup> Targets</b>	<b>KIR<sup>-</sup> +Targets - ch14.18 1:1</b>		<b>KIR<sup>-</sup> +Targets + ch14.18 1:1</b>				<b>Bulk+Targets + ch14.18 1:1.</b>				<b>1 *10<sup>5</sup> Targets</b>
<b>H</b>	<b>1 *10<sup>5</sup> Targets</b>	<b>KIR<sup>-</sup> +Targets - ch14.18 0.5:1</b>		<b>KIR<sup>-</sup> +Targets - ch14.18 0.5:1</b>				<b>Bulk+Targets + ch14.18 0.5:1.</b>				<b>1 *10<sup>5</sup> Targets</b>

**Abb. 2.3 Pipettierschema Luciferase-Assay**

Dargestellt ist das standardisierte Pipettierschema der 96-Well Flachbodenplatte bei den durchgeführten Luciferase-Assays.

Die Messung der Versuchsplatten erfolgt mit dem Victor 1420 Multilabel Counter reihenweise von A1 nach H12. Die BL nahm während der Messung aufgrund von zeitabhängigen pH-Schwankungen und Temperaturabnahme ab. Die Messwerte

der beiden äußeren Spalten der Messplatte dienen der Erstellung einer Ausgleichsgerade in Excel, durch welche die prozentuale Abnahme der BL pro Well berechnet werden kann:

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

Mit Hilfe der Titrationsreihe, kann eine weitere Ausgleichsgerade erstellt werden, um aus den gemessenen BL-Werten die Zahl der noch lebenden Targetzellen zu ermitteln. Die Steigung der Geraden stellt den Lysefaktor LF dar und der y-Achsenabschnitt die  $BL_0$  ohne Zellen.

$$BL_{kor} = LF \cdot n + BL_0$$

$$n = \frac{(BL_{kor} - BL_0)}{LF}$$

Pro Well wurden 100 000 Targetzellen ausgesät; somit kann die Vitalität und im Umkehrschluss die Lyse berechnet werden:

$$Vitalität = \frac{n}{100000}$$

$$Lyse = 1 - Vitalität$$

## 2.18 Quantitative Durchflusszytometrie QIFIKIT

QIFIKIT bestehend aus: – Set-Up Beads – Calibration Beads – FITC- konjugierte Ziege-anti- Maus Immunglobuline	Dako
---	------

### Hintergrund

Im Gegensatz zur qualitativen erlaubt die quantitative FACS-Analyse mit dem QIFIKIT (Dako®) nicht nur eine Aussage über die Expression bzw. das Fehlen bestimmter Antigene auf der Zelloberfläche, sondern auch über die Anzahl exprimierter Antigene einer Zelle [99]. Ähnlich der qualitativen FACS-Analyse werden die Zellproben mit einem murinen AK gegen das entsprechende Antigen und dem FITC-markierten Ziege-anti-Maus Sekundärantikörper inkubiert. Zur Quantifizierung der Antigenexpression ist jedoch vor Messung der Zellproben

eine Messreihe mit Proben bekannter Antigenexpressionsdichte als Referenz erforderlich. Hierzu dienen die Set-Up und Calibration-Beads, die mit dem FITC-markierten Ziege-anti-Maus Sekundärantikörper inkubiert werden. Die Set-Up Beads bestehen sowohl aus unmarkierten Beads als auch aus Beads mit einer hohen Dichte an gebundenem murinen AK. Sie werden zur Einstellung des unteren und oberen Fluoreszenzbereichs verwendet. Die Calibration Beads enthalten fünf Beadpopulationen mit definierter Menge an gebundenem Mausantikörper. Durch Messung der Beads kann die Fluoreszenzintensität jeder Beadpopulation einer definierten Anzahl an gebundenen Antikörpern und somit Antigenmolekülen zugeordnet werden. Anhand der erstellten Kalibrierungskurve kann durch Messung der MFI der Zellproben die Anzahl der exprimierten Moleküle/Zelle, die der Specific Antibody Binding Capacity (SABC) entspricht, mit Hilfe der Formel 3 ermittelt werden. Auf diese Weise wurde die HLA-Klasse I Expression der Zelllinien LAN-1, LS und K562 untersucht.

### **Durchführung**

- 1) Die Zellen wurden mit FACS-Puffer auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und je 100  $\mu$ l der Zellsuspension in zwei FACS-Analyseröhrchen überführt.
- 2) Zugabe von 10  $\mu$ l unkonjugierten w6/32 HLA-ABC Mausantikörper bzw. unspezifischen IgG2a Mausantikörper für die Isotypkontrolle und Inkubation unter Lichtabschluss bei 4°C für 45 min.
- 3) Zwischenzeitlich wurden in ein drittes Röhrchen 100  $\mu$ l Set-Up Beads und in ein viertes Röhrchen 100  $\mu$ l Calibration Beads gegeben.
- 4) Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden alle vier Probenröhrchen mit PBS aufgefüllt und bei 10°C mit 400g für 10 min gewaschen und dekantiert.
- 5) Der FITC-konjugierte Ziege-anti-Maus Sekundärantikörper wurde mit PBS 1:10 verdünnt und 100  $\mu$ l dieser Verdünnung in jedes Probenröhrchen gegen. Es folgte erneut eine Inkubationszeit von 45 min bei 4°C unter Lichtabschluss.
- 6) Wiederholung von Schritt 4) und Messung der Proben am FACS-Gerät.

## Messung und Auswertung

Die Einstellung des FACS-Geräts erfolgte mit den Set-Up Beads. Anschließend wurden die Calibration-Beads gemessen und als Histogramm dargestellt. Die MFI jeder Beadpopulation konnte so einer definierten Antigendichte zugeordnet werden und eine Kalibrierungsgerade mit entsprechender Formel ermittelt werden. Setzt man in die Geradengleichung die MFI der gemessenen Zellprobe ein, erhält man die Antibody Binding Capacity/Zelle, von der jedoch noch die Anzahl der Oberflächenmoleküle der Kontrolle (BAE) abgezogen werden muss, um die SABC zu erhalten.

$$SABC = ABC - BAE \quad (3)$$

**SABC:** Specific Antibody Binding Capacity

**ABC:** Antibody Binding Capacity

**BAE:** Background Antibody Equivalent



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Auswahl der Neuroblastomzelllinien und NK-Zell Spender

Die Auswahl der Neuroblastomzelllinien und Spender erfolgte auf genetischer Grundlage der HLA I Typisierung. Ausgewählt wurde die Zelllinie LAN-1 mit fehlender HLA-Cw4 Gruppe und die Zelllinie LS, welche alle drei HLA I Gruppen Cw3, Cw4 und Bw4 exprimiert, also die Liganden der von uns untersuchten KIR-Rezeptoren (**Tab. 3.1**).

**Tab. 3.1 HLA I Genotypisierung der Zelllinien LAN-1 und LS**

Auflistung der HLA-Genotypisierung von LAN-1 und LS, Einordnung der HLA I Typisierung in HLA-Gruppen nach Velardi [100], korrespondierende KIR-Rezeptor sowie fehlende KIR-Liganden.

	HLA Genotyp		HLA I-Liganden		Korrespondierender KIR-Rezeptor		Fehlender KIR Ligand
LAN-1	A*02	A*03	--	A3	CD158k		Cw4
	B*07	B*58	--	Bw4	CD158e		
	C*03	C*07	Cw3	Cw3	CD158b		
LS	A*24	A*29	A24	--	CD158e		---
	B*35	B*58	--	B4	CD158e		
	C*05	C*07	Cw4	Cw3	CD158a	CD158b	

**Tab. 3.2 HLA-Gruppen gesunder Spender zur Expansion von NK-Klonen**

Einordnung der HLA I Typisierung dreier gesunder NK-Zell Spender in HLA-Gruppen nach Velardi, korrespondierende KIR-Rezeptoren sowie fehlende KIR-Liganden.

Spender	HLA I- Liganden			Korrespondierender KIR-Rezeptor			Fehlender KIR-Ligand
	Cw3	Cw4	Bw4				
1	--	+	+	--	CD158a	CD158e	Cw3
2	+	--	+	CD158b	--	CD158e	Cw4
3	--	+	+	--	CD158a	CD158e	Cw3

In **Tab. 3.3** ist die molekulargenetische KIR-Genotypisierung und der KIR-Haplotyp der Spender 1-3 dargestellt. Die KIR-Genotypisierung wurde vom Chimärismuslabor der Kinderklinik Tübingen durchgeführt.

**Tab. 3.3 KIR-Genotypisierung der Spender**

Aufgelistet ist die KIR-Genotypisierung der Spender. Annähernd alle Menschen tragen die sogenannten Framework KIR Gene KIR2DL4, KIR3DL2 und KIR3DL3 (rot). Des Weiteren erfolgt eine Einteilung der Spender in Haplotyp A und Haplotyp B. Der Haplotyp B kodiert im Gegensatz zu Haplotyp A noch zusätzlich für aktivierende KIR-Rezeptoren, die sich von den inhibierenden KIR-Rezeptoren durch einen kurze zytoplasmatischen Signaldomäne unterscheiden [72]. Der B Content Score wird entsprechend der Anzahl der aktivierenden KIR-Rezeptoren von 0-4 eingeteilt, d.h. je größer der Wert, desto höher die Anzahl aktivierender KIR-Rezeptoren [73] (**Tab. 1.4**). Die Nomenklatur der KIR-Gene setzt sich zusammen aus der Anzahl der externen Ig-Domänen (2D, 3D) und der Gegenwart eines langen (L = long) oder kurzen (S = short) zytoplasmatischen Anteils des Rezeptors der intrazellulären Signaldomäne.

<b>KIR-Rezeptoren Spender 1: Haplotyp A</b>								
Inhibierend	2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5	3DL1	3DL2	3DL3
Aktivierend	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS5	3DS1		
<b>KIR-Rezeptoren Spender 2: Haplotyp B1</b>								
Inhibierend	2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5	3DL1	3DL2	3DL3
Aktivierend	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS5	3DS1		
<b>KIR-Rezeptoren Spender 3: Haplotyp B1</b>								
Inhibierend	2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5	3DL1	3DL2	3DL3
Aktivierend	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS5	3DS1		

### NK-Alloreaktivitätsmodelle

Unter Berücksichtigung der in **Kap. 1.4** beschriebenen NK-Alloreaktivitätsmodelle werden im Folgenden die verschiedenen Konstellationen der gewählten Tumorzelllinien und Spender dargestellt.

Die HLA-Typisierung ergab nach dem Memphis Rezeptor-Ligand Modell (RL Modell) einen RL Mismatch zwischen der Zelllinie LAN-1 und dem KIR-Rezeptor CD158a, der von allen untersuchten Spendern exprimiert wurde. Für LS gab es auf genetischer Ebene keinen RL Mismatch.

**Tab. 3.4 RL Modell**

Auf Grundlage der HLA-Typisierung der Zelllinien und KIR-Expression der NK-Zellen der Spender sind die RL Matches und Mismatches nach dem Memphis RL Modell aufgelistet. Nach dem RL Modell liegt ein RL Match vor, wenn der Spender den KIR-Rezeptor des korrespondierenden HLA I Liganden exprimiert, welcher von der Targetzelle kodiert wird. Ein RL Mismatch bedeutet, dass der Spender einen KIR Rezeptor trägt, dessen HLA I Ligand vom Tumor nicht exprimiert wird.

	HLA I- Liganden			RL Match			RL Mismatch
	Cw3	Cw4	Bw4				
<b>LAN-1</b>	+	--	+	CD158b	--	CD158e	CD158a
<b>LS</b>	+	+	+	CD158b	CD158a	CD158e	--

Nach dem Perugia Ligand-Ligand Alloreaktivitätsmodell [67] ergibt sich wie in **Tab. 3.5** aufgeführt ein LL Mismatch der Spender 1 und 3 in Graft versus Tumor (GvT) Richtung gegenüber der Zelllinie LAN-1. Ein LL Mismatch in GvT Richtung für LS ist nicht möglich, da alle HLA I Gruppen Cw3, Cw4 und Bw4 vorhanden sind.

**Tab. 3.5 LL Modell in Graft-versus-Tumor Richtung**

Auf Grundlage der HLA-Typisierung der Zelllinien und Spender wurden die LL Matches und Mismatches nach dem Perugia LL Alloreaktivitätsmodell in Graft-versus-Tumor Richtung aufgelistet. Nach dem Ligand-Ligand Modell (LL Modell) liegt ein LL Match vor, wenn sowohl Spender als auch Tumor den gleichen HLA Liganden kodieren. Ein LL Mismatch in Graft-versus-Tumor Richtung bedeutet, dass beim Spender ein HLA Ligand vorliegt, der vom Tumor nicht kodiert wird. Bei diesem Modell wird vom HLA-Typ der Spender auf deren KIR-Repertoire zurückgeschlossen.

Spender	Zelllinie	LL Match		LL Mismatch	Korrespondierender KIR-Rezeptor in GvT Richtung für LL Mismatch
1+3	LAN-1	---	Bw4	Cw4	CD158a
	LS	Cw4	Bw4	---	---
2	LAN-1	Cw3	Bw4	---	---
	LS	Cw3	Bw4	---	--

Das Licensing Modell [79] unterscheidet zwischen „licensed“ und „unlicensed“ NK-Zellen, welche für Spender 1-3 in **Tab. 3.6** aufgelistet werden.

**Tab. 3.6 Licensing Modell**

Entsprechend des Licensing Modells erfahren NK-Zellen während ihrer Maturation einen Licensing Prozess. NK-Zellen, deren KIR-Rezeptor der passende HLA I Ligand präsentiert wird, durchlaufen eine vollständige Reifung und werden als „educated“ oder „licensed“ bezeichnet. Bleibt während der Maturation die Interaktion zwischen HLA I Ligand und KIR-Rezeptor aus, bleiben diese NK-Zellen „uneducated“ oder „unlicensed“ und zeigen sich im nicht inflammatorischen Setting hyporesponsiv. Demgegenüber zeichnen sich unlicensed NK-Zellen, die starken proaktivierenden Signalen ausgesetzt werden, wie beispielsweise bei der ADCC oder im hochinflammatorischen Setting, aufgrund unzureichender Stimulation ihrer inhibierenden Rezeptoren durch eine bessere Infektionskontrolle und Tumorkontrolle aus als die licensed NK-Zellen [78, 79].

Die Tabelle stellt die vorhandenen und fehlenden HLA I Gruppen der Spender 1-3 und die daraus korrespondierenden „licensed“ und „unlicensed“ single KIR positiven NK-Populationen bzw. NK-Klone dar.

Spender	HLA I Liganden			„educated“			„uneducated“
	Cw3	Cw4	Bw4				
1	--	+	+		CD158a	CD158e	CD158b
2	+	--	+	CD158b		CD158e	CD158a
3	--	+	+		CD158a	CD158e	CD158b

Alle drei NK-Zell Spender weisen eine fehlende HLA I Gruppe auf und bilden somit sowohl „licensed“ als auch „unlicensed“ NK-Zellen aus.

### 3.2 Spenderspezifisches KIR-Repertoire der NK-Zellen vor und nach Expansion

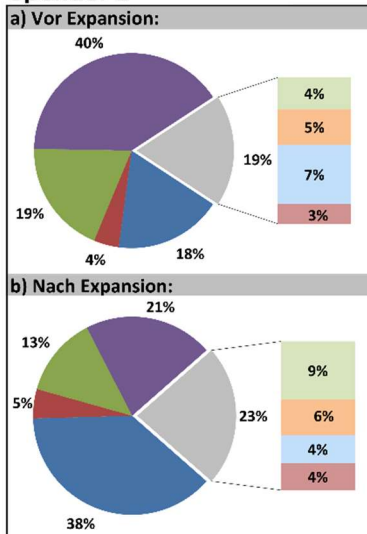
Im Folgenden ist das KIR-Repertoire dreier gesunder Spender vor und nach Expansion von isolierten PBMCs dargestellt.

**Spender 1:** Vor Expansion setzt sich das KIR-Repertoire von Spender 1 aus 40% major KIR<sup>-</sup> NK-Zellen, 41% single KIR<sup>+</sup> NK-Zellen und 19% mehrfach KIR<sup>+</sup> NK-Zellen zusammen. Erwartungsgemäß zeigt sich eine normale Verteilung der CD16<sup>+</sup> und CD16<sup>-</sup> NK-Zellen, dabei ist vor Expansion der Anteil der KIR<sup>+</sup> an den CD16<sup>-</sup> NK-Zellen niedriger als nach Expansion. Konkordant zu anderen Studien ist bei dem Cw3<sup>-</sup> Spender der Anteil der CD158b single KIR positiven NK-Zellen in dessen NK-Repertoire am geringsten [101, 102]. Die Fraktion der CD158a<sup>+</sup> NK-Zellen nimmt während der Expansion um durchschnittlich 20% zu, während insgesamt der Anteil der KIR<sup>-</sup> NK-Zellen während der Expansion abnimmt.

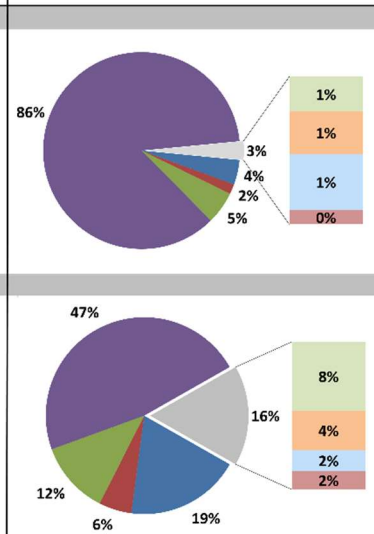
**Spender 2:** Das KIR-Repertoire des Spenders 2 setzt sich vor Expansion aus 38% major KIR<sup>-</sup> NK-Zellen, 40% single KIR<sup>+</sup> NK-Zellen und 22% NK-Zellen mit mehreren KIR-Rezeptoren zusammen. Die CD158a single KIR positive NK-Zellen bilden bei dem Cw4<sup>-</sup> Spender die kleinste Fraktion. Während sich das KIR-Repertoire der CD16<sup>-</sup> NK-Zellen vor und nach Expansion kaum unterscheidet, nimmt bei den CD16<sup>+</sup> NK-Zellen der Anteil der KIR<sup>-</sup> NK-Zellen deutlich zu.

**Spender 3:** Vor Expansion zeigt Spender 3 47% major KIR<sup>-</sup>, 32% single KIR<sup>+</sup> NK-Zellen. Der Anteil an NK-Zellen mit Expression mehrerer KIR-Rezeptoren beträgt 21%. Im Gegensatz zum auch Cw3<sup>-</sup> Spender 1 bilden nicht die CD158b single KIR positiven NK-Zellen die kleinste Fraktion, sondern die CD158a single KIR positive NK-Zellen. Der Anteil der KIR<sup>-</sup> NK-Zellen nimmt während der Expansion in der CD16<sup>-</sup> Fraktion ab, in der CD16<sup>+</sup> Fraktion jedoch zu.

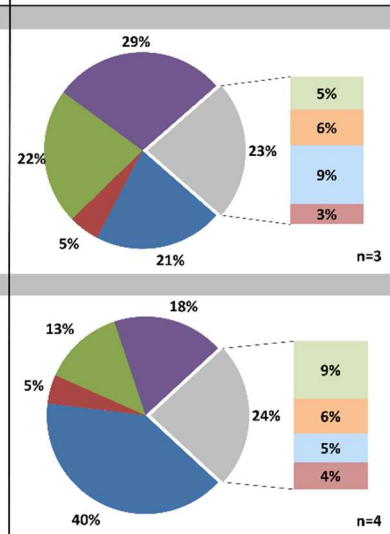
**Alle NK-Zellen  
Spender 1**



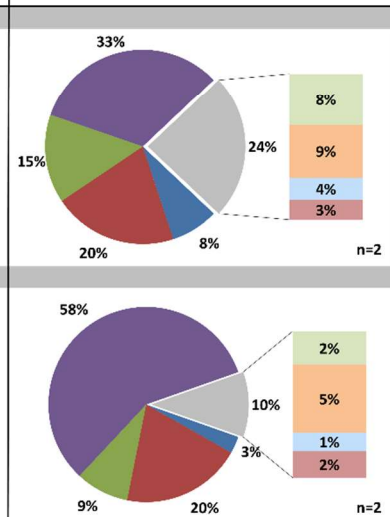
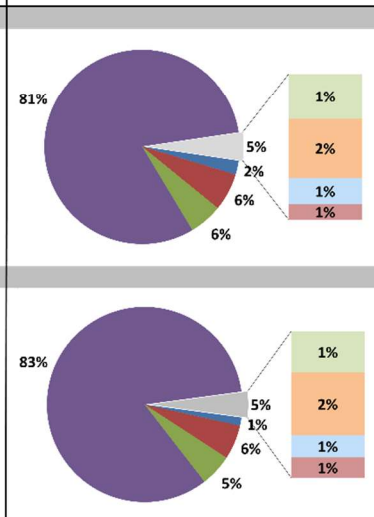
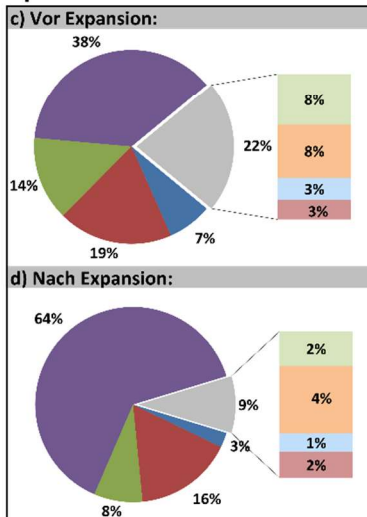
**CD16<sup>-</sup>**



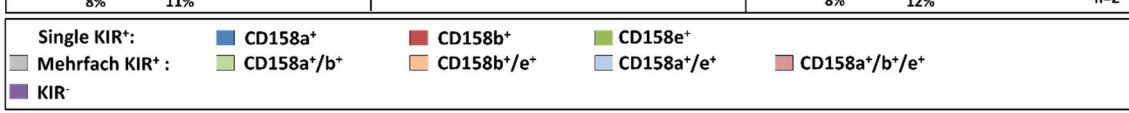
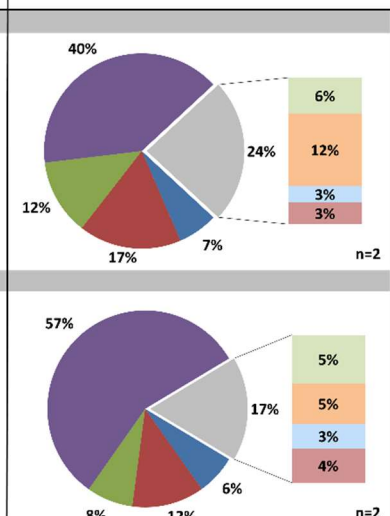
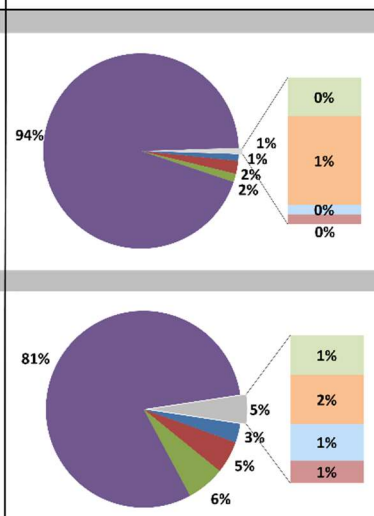
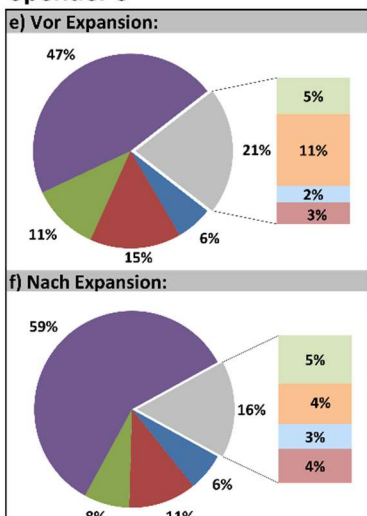
**CD16<sup>+</sup>**



**Spender 2**



**Spender 3**



**Abb. 3.1 Spender 1-3: Darstellung des KIR-Repertoires der NK-Zellen vor und nach Expansion**

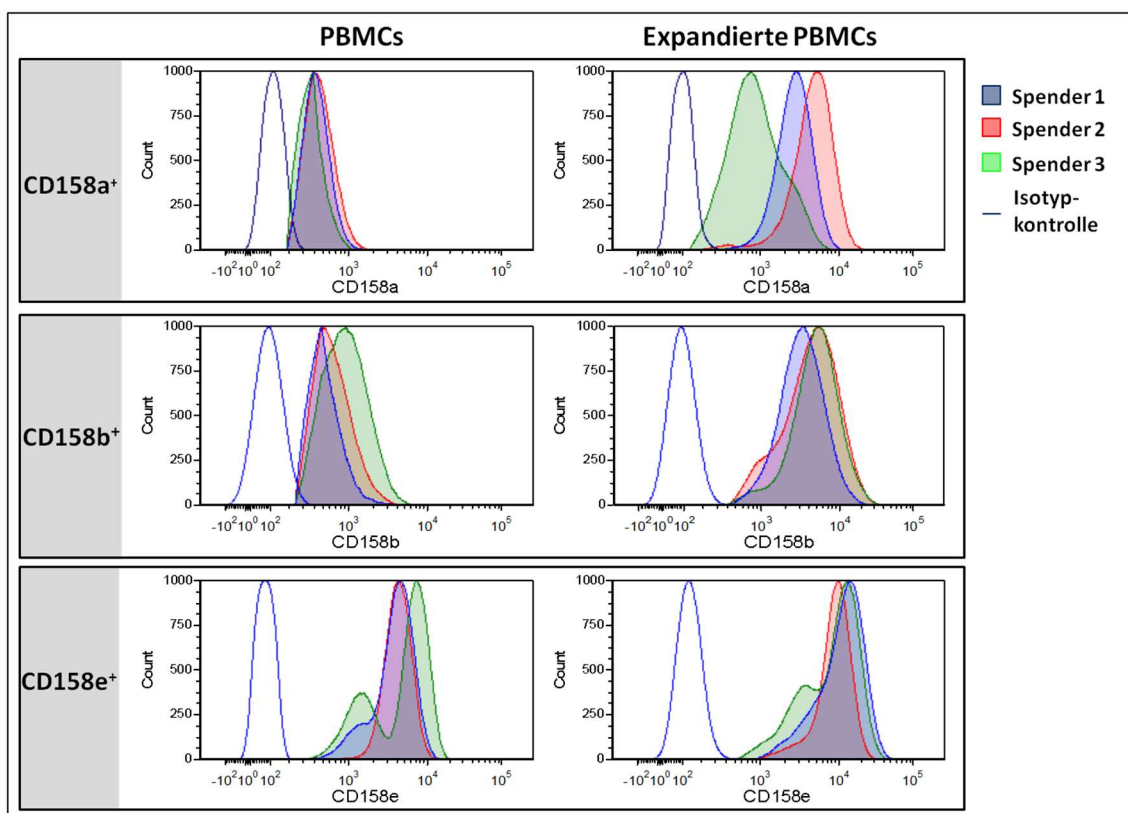
Die Kreisdiagramme zeigen die prozentuale Verteilung des KIR-Repertoires der NK-Zellen von Spender 1-3 vor und nach Expansion. Die single KIR<sup>+</sup> und KIR<sup>-</sup> NK-Zellen sind im Kreisdiagramm einzeln aufgeführt, während die mehrfach KIR<sup>+</sup> NK-Zellen zusammengefasst dargestellt und durch das zugehörige Balkendiagramm in CD158a<sup>+</sup>/b<sup>+</sup>, CD158b<sup>+</sup>/e<sup>+</sup>, CD158a<sup>+</sup>e<sup>+</sup> und CD158a<sup>+</sup>/b<sup>+</sup>/e<sup>+</sup> NK-Zellen aufgeschlüsselt werden. Die Reihen a),c) und e) stellen das KIR-Repertoire der NK-Zellen vor Expansion, die Reihen b),d) und f) das KIR-Repertoire nach Expansion der Spender 1-3 dar. Während in der ersten Spalte die Gesamtheit aller NK-Zellen abgebildet ist, ist das KIR-Repertoire der CD16<sup>-</sup> und CD16<sup>+</sup> NK-Zellen in der zweiten und dritten Spalte in gesonderten Abbildungen dargestellt.

Die KIR-Expression nahm bei allen Spendern während der Expansion zu (**Abb. 3.2**). Dies zeigte sich vor allem in der Expression von CD158a und CD158b. Alle Spender verzeichneten vor Expansion eine hoch positive Expression von CD158e, die durch Expansion nur gering gesteigert wurde. Während sich die MFIR der KIR-Expression der einzelnen Spender vor Expansion nur unwesentlich unterschied, vergrößerten sich diese Unterschiede während der Expansion. Spender 2 wies, gefolgt von Spender 1 die höchste Expression von CD158a nach Expansion auf, während Spender 3 nur eine geringfügige Steigerung der Expression von CD158a während der Expansion zeigte. Auffallend war eine geringere CD158b Expression von Spender 1 gegenüber den Spendern 2 und 3.

**Tab. 3.7 KIR-Expression Spender 1-3: Median Fluorescence Intensity Ratio vor und nach Expansion frischer PBMCs**

Auflistung der zu in **Abb. 3.2** dargestellten Histogramme gehörigen berechneten MFIR (MFI<sub>Ligand</sub>/MFI<sub>Kontrolle</sub>) der single KIR<sup>+</sup> NK-Zellen vor und nach Expansion.

	Median Fluorescence Intensity Ratio					
	Spender 1		Spender 2		Spender 3	
	PBMCs	Expandierte PBMCs	PBMCs	Expandierte PBMCs	PBMCs	Expandierte PBMCs
<b>CD158a</b>	5,06	46,72	5,50	91,69	4,12	16,29
<b>CD158b</b>	6,47	44,38	7,04	77,97	12,00	75,47
<b>CD158e</b>	103,28	113,45	89,62	100,08	146,28	156,27



**Abb. 3.2 Exemplarische Darstellung der Zunahme der KIR-Expression durch Expansion**

Semiquantitative Darstellung der KIR-Expression von CD158a, CD158b und CD158e single KIR NK-Zellen vor und nach Expansion. Die Zellen wurden mit gelabeltem Antikörper gefärbt. Die Messung erfolgte mittels BD™ LSR II Flow Cytometer und die Auswertung der MFI in der Histogramm-Darstellung von FCS Express 5.0.



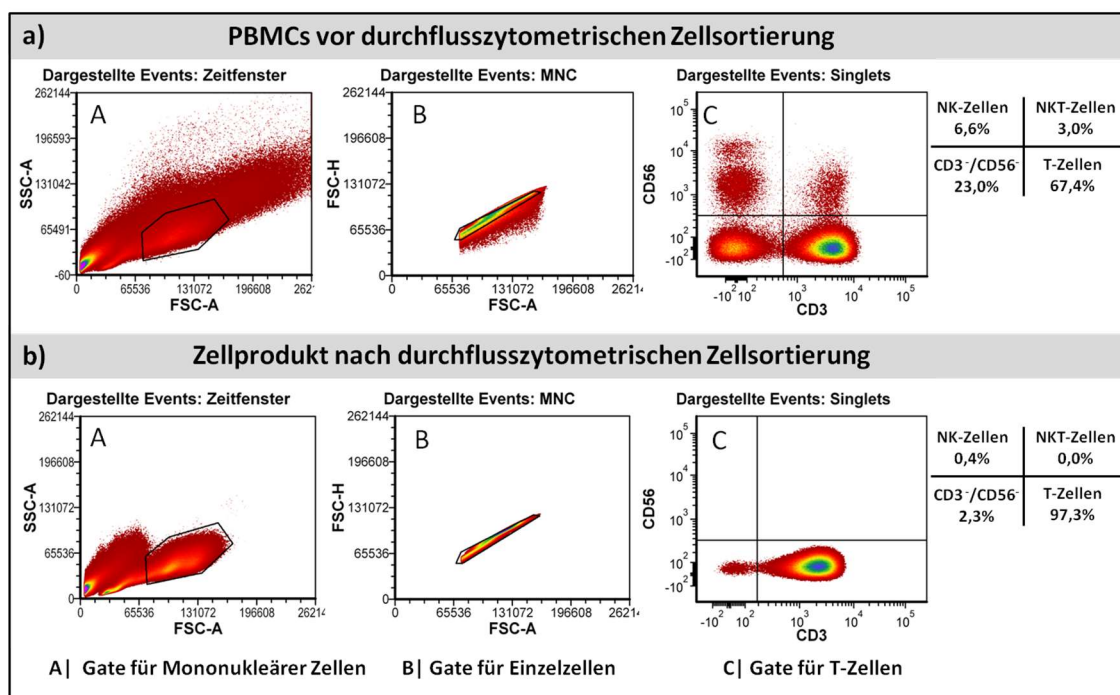
### 3.3 Generierung definierter NK-Klone

Es wurden definierte NK-Klone dreier gesunder Spender mittels Verdünnungsreihe und durchflusszytometrischer Zellsortierung isoliert und unter Zytokinstimulation mit IL2 sowie der Feederzelllinie K562mb15-41BBL expandiert (**Kap. 2.12**).

#### 3.3.1 Reinheit des Zellprodukts nach durchflusszytometrischen Zellsortierung

Als Ausgangsprodukt für die durchflusszytometrische Zellsortierung dienten isolierte PBMCs aus heparinisiertem Vollblut von drei gesunden Spendern. Im Median wurden 55 ml Vollblut (Range 21-110 ml) entnommen, aus welchem sich bei Spender 1 im Median  $1,21 \times 10^6$  (SD: 0,3, n=12), bei Spender 2  $0,95 \times 10^6$  (SD: 0,32, n=6) und bei Spender 3  $1,64 \times 10^6$  (SD: 0,36, n=7) PBMCs pro ml Vollblut isolieren ließen (**Tab. 6.1**)

Die Reinheit eines jeden Sortvorgangs wurde durch eine Sortkontrolle bestätigt. Hierfür wurde, wie in **Abb. 3.3 b)** dargestellt, T-Zellen gesortet und das Zellprodukt anschließend auf seine Reinheit untersucht. Die Reinheit der durchflusszytometrischen Zellsortierung lag bei > 97%.

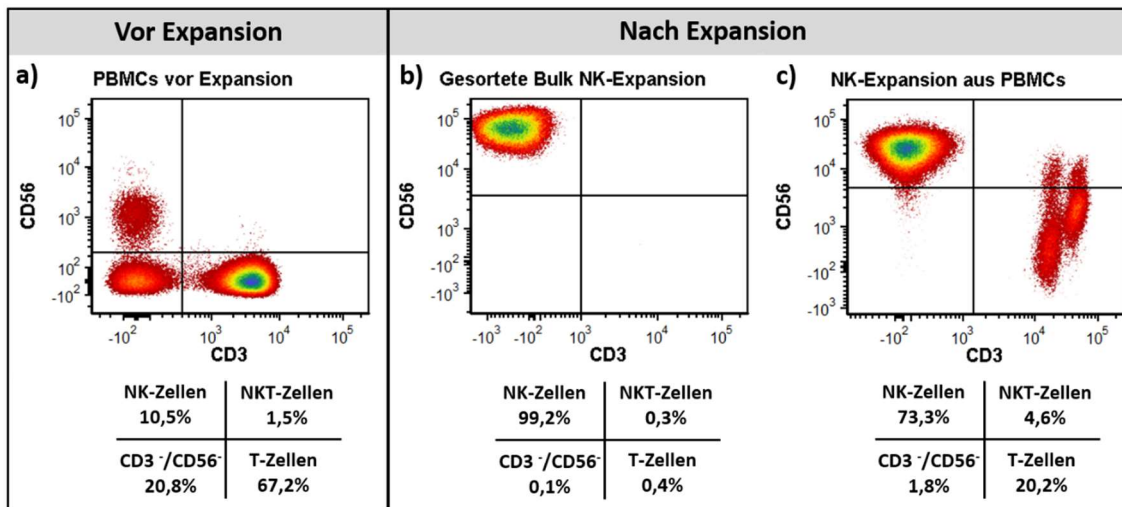


### **Abb. 3.3 Reinheit des Zellprodukts nach durchflusszytometrischer Zellsortierung**

Exemplarisch dargestellt ist die Reinheitskontrolle eines Sortvorgangs. Aus heparinisiertem Vollblut isolierte PBMCs (dargestellt in **a**)) dienten als Ausgangsprodukt für die durchflusszytometrische Zellsortierung. T-Zellen (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>-Zellen) stellen mit 60-70% die größte Population der MNC-Wolke dar und wurden als Reinheitskontrollen in ein gesondertes FACS-Tube gesortet und anschließend mittels BD™ FACSAria Cell Sorter gemessen (dargestellt in **b**)).

### **3.3.2 Darstellung eines Zellprodukts vor und nach Expansion**

Vor Expansion betrug der prozentuale Anteil der NK-Zellen an der PBMC-Wolke bei Spender 1 im Median 7,4% (n=4), bei Spender 2 9,8% (n=2) und Spender 3 9,4% (n=2). Die NK-Expansionen mit 100 Gy bestrahlten K562mb15-41BBL und IL2, ohne vorherige Aufreinigung mittels Zellsortierung, zeigte eine deutliche Zunahme der NK-Zell Fraktion und Abnahme der T-Zell Fraktion im Rahmen der Expansion (**Abb. 3.4**). Der Anteil an NK-Zellen nach Expansion betrug bei Spender 1 im Mittel 93,5% (n=3) bei Spender 2 61,5% (n=1) und Spender 3 75,2% (n=2). Demgegenüber zeigte die gesortete Bulk NK-Expansion nach 14-21 Tagen eine Reinheit von durchschnittlich 99,4% (n=4). In **Abb. 3.4 a**) wird eine normale Verteilung von CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen vor Expansion dargestellt. Sowohl Bulk NK-Expansionen als auch NK-Zellklone und – Populationen zeigten nach Expansion eine Anreicherung der CD56<sup>bright</sup> Population.

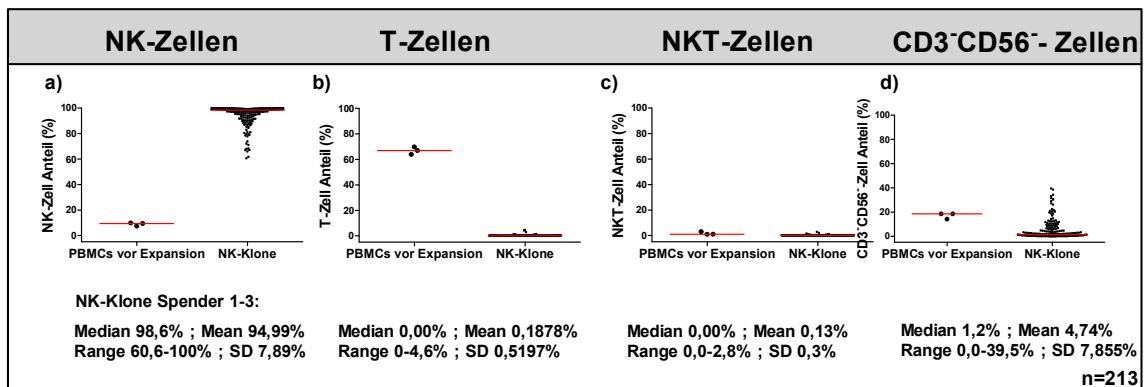


**Abb. 3.4 Darstellung eines Zellprodukts vor und nach Expansion**

Exemplarisch in a) dargestellt sind PBMCs von Spender 3 vor Expansion. Die Schaubilder b) und c) zeigen jeweils ein Zellprodukt des gleichen Spenders nach Expansion. Wobei b) eine NK-Expansion nach durchflusszytometrischer Zellsortierung zeigt und c) eine NK-Expansion aus isolierten PBMCs ohne Aufreinigung. Unter den Schaubildern finden sich analog zu den Quadranten der FACS-Plots die zugehörige Beschriftung und Prozentangaben der NK-, NKT-, T- und CD56<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup> Zellen.

### 3.3.3 Reinheit der NK-Klone nach Expansion

Es wurden 213 NK-Klone nach in **Kap. 3.5** beschriebenen Kriterien in der Gesamtauswertung berücksichtigt. Im Median betrug der Anteil der Einzelzellen am Expansionsprodukt 89,5%, der Anteil der lebenden Zellen an den Einzelzellen 90,8%. **Abb. 3.5** zeigt den Anteil der NK-, T-, NKT- und CD3/CD56<sup>-</sup>-Zellen am Expansionsprodukt verglichen mit frischen PBMCs der Spender 1-3. Der NK-Zell Anteil der Klone betrug im Median 98,6%. Der Anteil an T- und NKT-Zellen konnte durch die durchflusszytometrische Zellsortierung und anschließende NK-Expansion im Median auf 0,0% reduziert werden, der Anteil der CD3/CD56<sup>-</sup> negativen Zellen von 18,5% auf 1,2%.



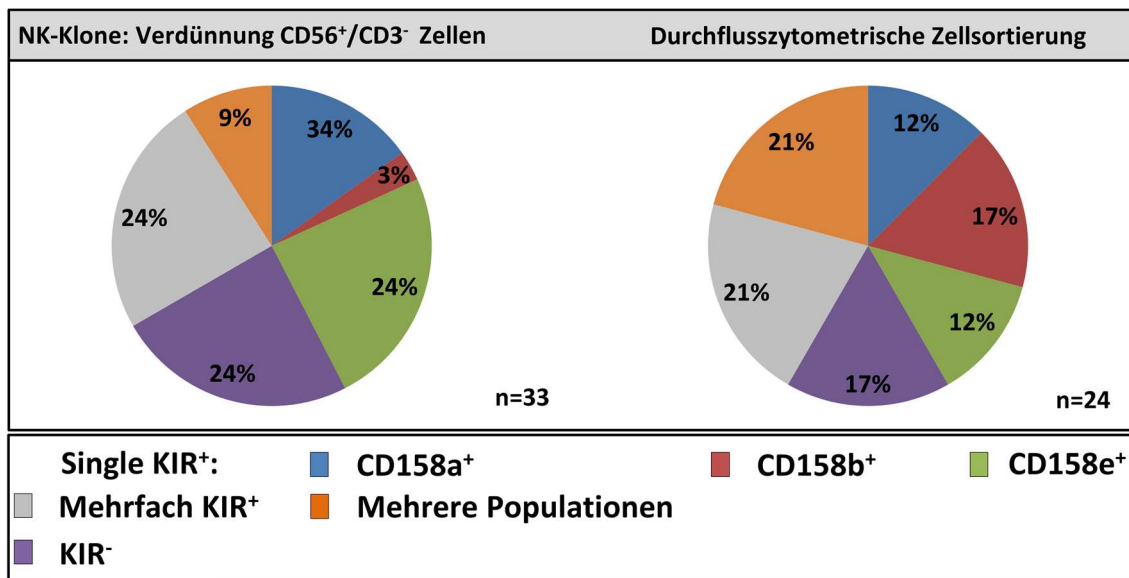
**Abb. 3.5 Reinheit der NK-Klone der Spender 1-3 nach Expansion**

Die Schaubilder a-d) stellen den Anteil der NK-, T-, NKT-, und CD3/CD56 negativen Zellen der lebenden Zellen am Expansionsprodukt der NK-Klone (n=213) im Vergleich zu isolierten PBMCs der Spender 1-3 dar. Unter dem zugehörigen Schaubild werden der Median und der Mittelwert mit zugehörigem Range und Standardabweichung (SD) der NK-Klone angegeben. Durch Immunfluoreszenzfärbung mit CD56 (PeCy7) und CD3 (Pacific Blue) mittels BD™ LSR II Flow Cytometer wurden die NK-Klone und PBMCs charakterisiert. Die Auswertung erfolgte mit FCS Express 5.0.

### 3.3.4 Wachstum und Immunphänotyp der NK-Klone

Eine Grundvoraussetzung des Projekts war die erfolgreiche reproduzierbare selektive Expansion single KIR<sup>+</sup> und KIR<sup>-</sup> NK-Klone. Die Generierung definierter NK-Zellklone erfolgte einerseits mittels durchflusszytometrischer Zellsortierung mit anschließender Verdünnung und Aussaat (siehe **Kap. 2.12** Methode II) und andererseits mittels alleiniger Verdünnung von CD56<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> Zellen nach MACS-Anreicherung und Depletion isolierter PBMCs (siehe **Kap. 2.12** Methode I). In **Abb. 3.6** exemplarisch dargestellt ist ein Expansionszyklus des Spenders 1, bei welchem beide Methoden im Vergleich angewendet wurden. Es erfolgte die Aussaat von 480 NK-Klonen nach alleiniger Verdünnung CD56<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> Zellen und die Aussaat von jeweils 96 CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> CD158a, CD158b, CD158e single KIR positiver, KIR negativer und KIR doppelt positiver gesorteter NK-Klone (n<sub>Gesamt</sub>=480). Nach alleiniger Verdünnung zeigten 6,8% der 480 ausgesäten NK-Klonen ein ausreichendes Wachstum zur Bestimmung des Immunphänotyps und Durchführung der Zytotoxizitätstestung, nach durchflusszytometrischer Zellsortierung 5%. Es stellte sich heraus, dass die immunphänotypische Verteilung der gewachsenen NK-Klone nach alleiniger Verdünnung von

CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> Zellen weitgehend der Verteilung der NK-Populationen frisch isolierter PBMCs des Spenders entsprach (**Abb. 3.6 + Abb. 3.1 a**). Dies betraf bei Spender 1 insbesondere die mit 4% kleinste NK-Zellfraktion der CD158b single KIR positiven NK-Zellen, welche nach alleiniger Verdünnung, Aussaat und Expansion nur 3% der gewachsenen NK-Klone ausmachte. Demgegenüber erzielte die durchflusszytometrischer Zellsortierung und Aussaat von CD158b single positiven NK-Zellen eine Ausbeute von 17% der insgesamt ausgesäten NK-Klone. Dies glich der Ausbeute der gesorteten CD158a single positiven NK-Klone, welche mit 18% eine wesentlich größer NK-Zellfraktion des Spenders ausmachte.

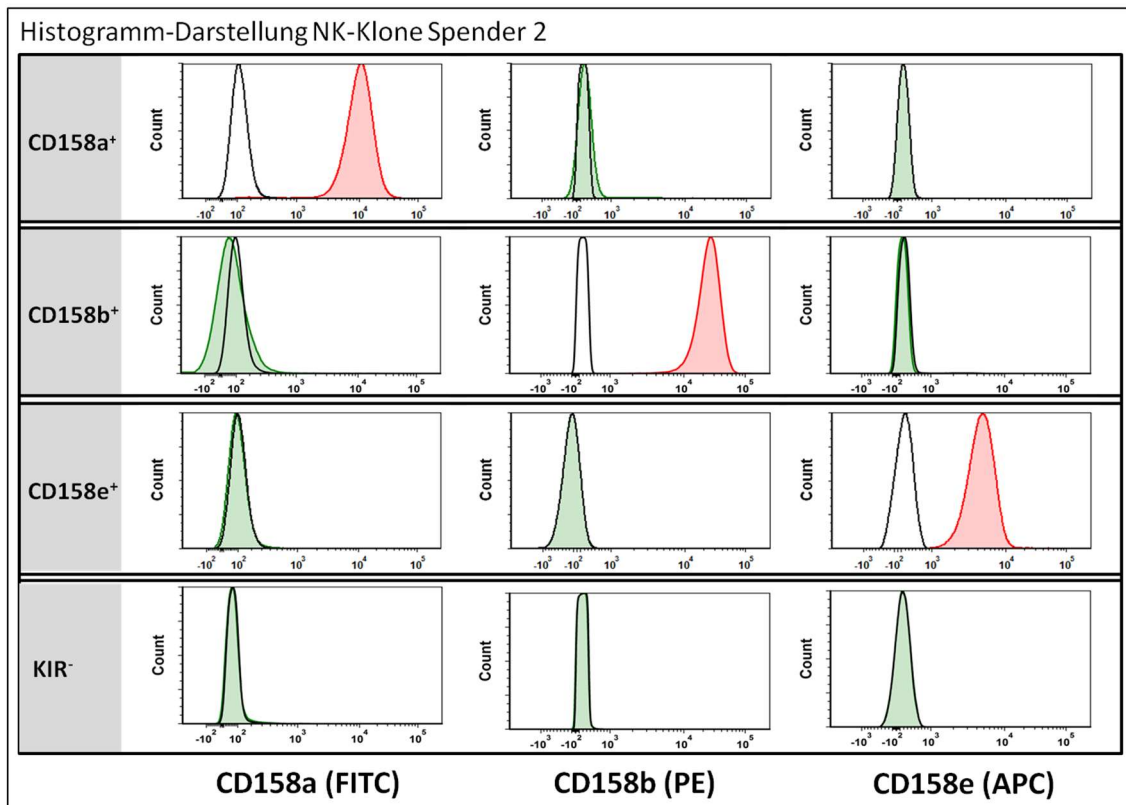


**Abb. 3.6 Immunphänotyp der gewachsenen NK-Klonen nach alleiniger Verdünnung von CD56<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> Zellen im Vergleich zur durchflusszytometrischen Zellsortierung**

Die Kreisdiagramme zeigen die prozentuale Verteilung des Immunphänotyps der gewachsenen NK-Klone. Während das linke Kreisdiagramm den Immunphänotyp, der durch alleinige Verdünnung und Aussaat von CD56<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> Zellen generierten NK-Klone darstellt (Methode I), zeigt das rechte Diagramm den Immunphänotyp der durch durchflusszytometrische Zellsortierung und Verdünnung (Methode II) generierten NK-Klone. Nach beiden Methoden wurden 480 NK-Klone ausgesät. Wobei nach Methode II jeweils 96 Klone CD158a, CD158b, CD158e single KIR positiv, KIR negativ und KIR doppelt positiv ausgesät wurden. Von je 480 nach Methode I/II ausgesäten Klonen, zeigten 33/24 NK-Klone ein ausreichendes Zellwachstum zur Durchführung der Immunphänotypisierung sowie funktionellen Testung.

In den darauffolgenden Expansionszyklen wurden die NK-Klone der Spender 1-3 nur noch durch durchflusszytometrische Zellsortierung mit anschließender

Verdünnung und Expansion generiert. Beim Sortvorgang wurden die Merkmale CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> und Expression der HLA I korrespondierenden NK-Rezeptoren CD158a, CD158b, CD158e berücksichtigt. **Abb. 3.7** zeigt eine Übersicht der Rezeptorexpression nach Expansion. In der folgenden Auswertung werden nur single KIR<sup>+</sup> und KIR<sup>-</sup> gesortete NK-Klone dargestellt. NK-Klone, die eine Populationsreinheit von unter 80% aufwiesen wurden nicht berücksichtigt.



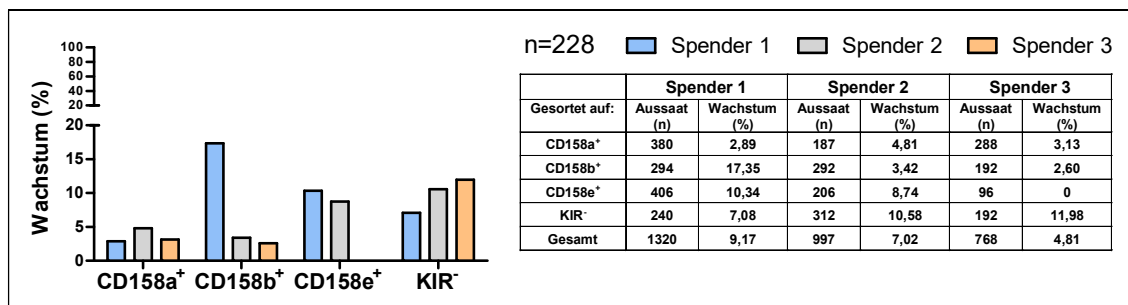
**Abb. 3.7** Expression der major KIR-Rezeptoren von single KIR<sup>+</sup> und KIR<sup>-</sup> gesorteten NK-Klonen nach Expansion

Die Histogramme in Reihe 1-4 zeigen NK-Klone des Spenders 2, die auf den jeweils rot dargestellten Rezeptor positiv und den grün dargestellten Rezeptor negativ gesortet wurden. Die Isotypkontrolle ist in allen Histogrammen als schwarze Linie dargestellt. In Spalte 1-3 findet sich Darstellung der Rezeptoren CD158a (FITC), CD158b (PE) und CD158e (APC).

Die **Abb. 3.8** zeigt das prozentuale Wachstum der auf einen definierten KIR-Rezeptor gesorteten NK-Zellklone im Verhältnis zu den von diesem Phänotyp insgesamt ausgesäten NK-Klonen. Dabei bleibt unberücksichtigt, ob der gesäte Phänotyp auch dem Phänotyp nach Expansion entsprach. Es wurden von Spender 1 NK-Zellklone aus 3, von Spender 2 aus 4 und Spender 3 aus 2 Expansionszyklen berücksichtigt. Spender 1 zeigte insgesamt das beste

Klonwachstum mit 9,17% der ausgesäten Klone, gefolgt von Spender 2 mit 7,02% und Spender 3 mit 4,81% (**Abb. 3.8**).

Betrachtet man das phänotypspezifische Wachstum der NK-Klone, fielen deutliche spenderspezifische Unterschiede im Wachstum der KIR single positiv gesorteten NK-Klone auf (siehe **Abb. 3.8**). Hervorzuheben ist hierbei das mit 17,36% beste Klonwachstum der CD158b single KIR<sup>+</sup> gesorteten NK-Klone des Spenders 1, gefolgt von den CD158e single KIR<sup>+</sup> gesorteten NK-Klone der Spender 1 und 2. Die CD158a single KIR<sup>+</sup> gesorteten NK-Klone zeigten spenderunabhängig mit 2,89-4,81% ein geringes Wachstum.



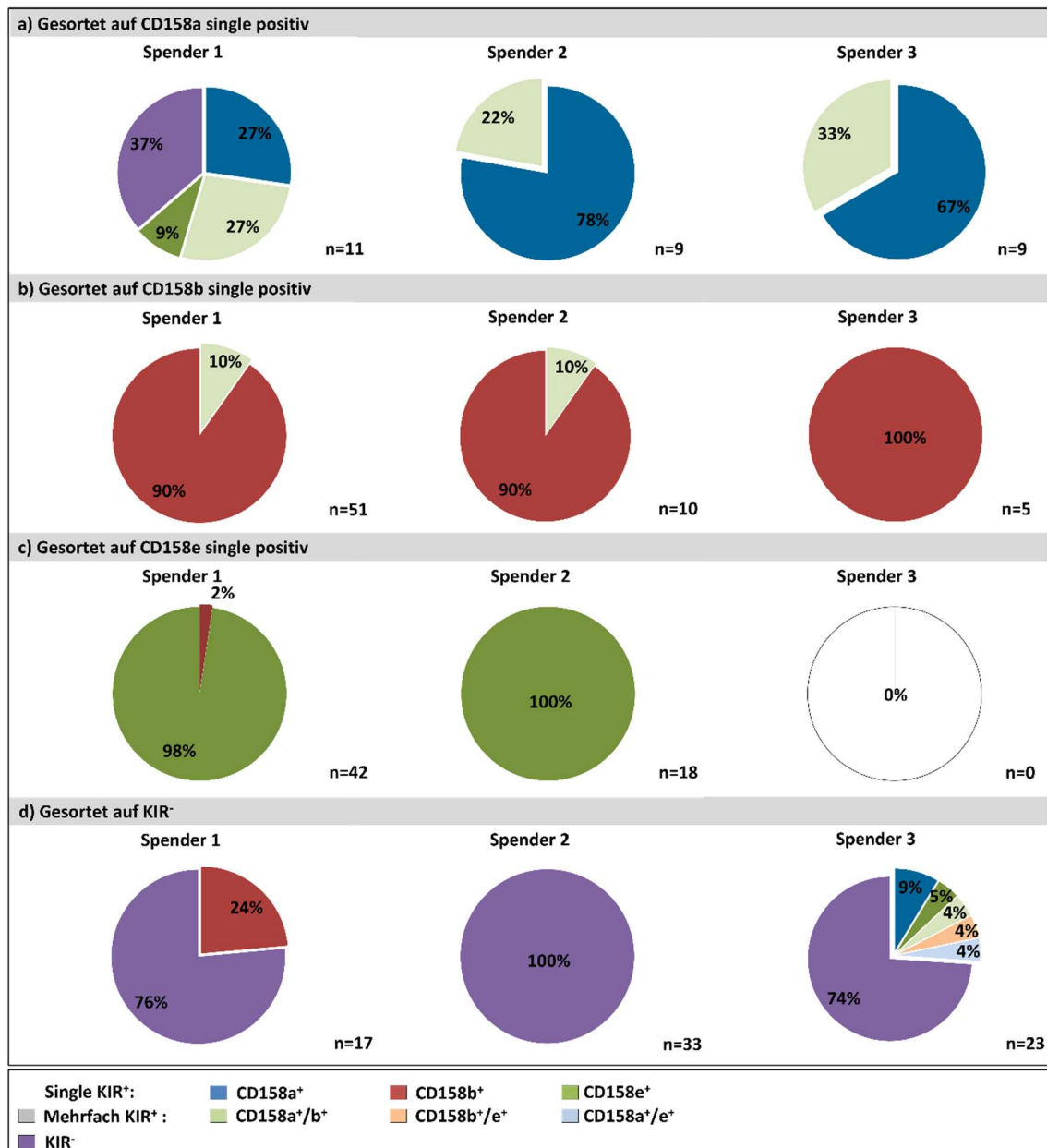
**Abb. 3.8** Expansionsstatistik der single KIR<sup>+</sup> und KIR<sup>-</sup> gesorteten NK-Klone

Expansionsstatistik der nach durchflusszytometrische Zellsortierung, Aussaat und Expansion gewachsenen NK-Klone der Spender 1-3 unabhängig von deren Immunphänotyp nach Expansion. Das Balkendiagramm zeigt das prozentuale Wachstum, der auf CD158a, CD158b, CD158e single KIR<sup>+</sup> und KIR<sup>-</sup> gesorteten NK Klone. Polyklonale NK-Klone mit verschiedenen Immunphänotypen wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt.

Die **Abb. 3.9** zeigt das Ergebnis der Immunphänotypisierung der NK-Klone nach Expansion. 96% der gewachsenen single KIR<sup>+</sup> gesorteten NK-Klone (n=155) exprimierten den entsprechenden KIR-Rezeptor und 86,8% der NK-Klone (n=228) zeigten den durch Zellsortierung prädefinierten Immunphänotyp. Die Reinheit der single KIR positiven NK-Klone für ihren gesorteten und nach Expansion durchflusszytometrisch bestätigten KIR-Rezeptor lag für CD158a bei 92,8±5,2% (n=16), für CD158b bei 96,9±3,9% (n=60) und für CD158e bei 96,6±5,3% (n=59).

Auffallend war, dass 22-33% der auf CD158a gesorteten NK-Klone den Immunphänotyp CD158a<sup>+</sup>b<sup>+</sup> zeigten. 36,4% der CD158a<sup>+</sup> single KIR<sup>+</sup> gesorteten

NK-Klone des Spenders 1 exprimierten keinen der beim Sortvorgang berücksichtigten Major KIR-Rezeptoren CD158a/b/e.



**Abb. 3.9 Immunphänotyp der mittels durchflusszytometrische Zellsortierung und anschließender Verdünnung ausgesäten NK-Klone**

Darstellung des Immunphänotyps der nach durchflusszytometrische Zellsortierung, Aussaat und Expansion gewachsenen NK-Klone. Schaubilder a-c) zeigen den nach Expansion durch FACS-Analyse bestätigten Immunphänotyp der single KIR<sup>+</sup> gesorteten NK-Klone, Schaubild d) den der KIR<sup>-</sup> gesorteten NK-Klone. In der Auswertung berücksichtigt wurden NK-Klone, die auf CD158a, CD158b, CD158e single KIR<sup>+</sup> und KIR<sup>-</sup> gesortet wurden. Aus der Auswertung wurden NK-Klone ausgeschlossen, die ein Wachstum mehrerer Populationen aufwiesen.

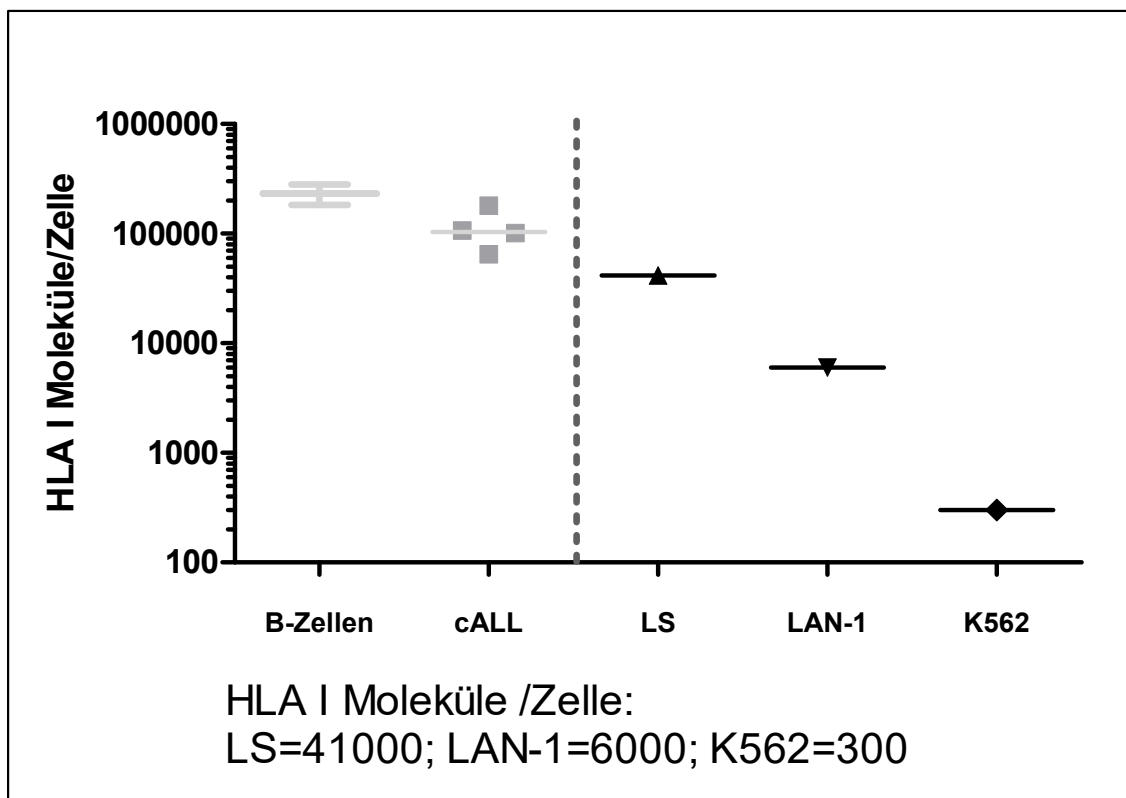


### 3.4 Immunphänotypisierung der Zelllinien

Durch quantitative und semiquantitative durchflusszytometrische Analysen untersuchten wir die Zelllinien LAN-1, LS und K562 auf ihre Expression von HLA-Klasse I Molekülen, aktivierenden NKG2D und DNAM-1 Liganden sowie Adhäsionsmolekülen, die für die Suszeptibilität NK-Zell vermittelter Erkennung und Zelllyse eine Rolle spielen können [103].

#### 3.4.1 Quantitative HLA-Klasse I Expression der Zelllinien

Sowohl frisch isolierte Neuroblastomzellen von Patienten als auch die meisten Neuroblastomzelllinien zeichnen sich durch eine im Vergleich zu B-Zellen und cALL-Blasten sehr niedrige HLA-Klasse I Expression aus [104]. LS zeigte mit 41000 Molekülen/Zelle eine wesentlich höhere HLA-Klasse I Expression als LAN-1 mit nur 6000 Molekülen/Zelle. Die erythroblastäre Zelllinie K562 exprimierte nur 300 HLA-Klasse I Molekülen/Zelle.



**Abb. 3.10 Quantitative HLA-Klasse I Expression der verwendeten Zelllinien im exemplarischen Vergleich zu cALL-Blasten und B-Zellen**

Zur Quantifizierung der HLA-Klasse I Expression wurde Quifikit® (Dako) verwendet. Die Quantifizierung der HLA I Moleküle pro Zelle wurde mit Hilfe der erstellten Kalibrierungskurve berechnet (**Kap. 2.18**).

Die grau dargestellten Daten sind der Dissertationsschrift von Horrer, A. und der Publikation von Pfeiffer, M. et al 2007 entnommen [105, 106].

### **3.4.2 Semiquantitative HLA-Klasse I Expression**

Die HLA-Typisierung ergab, dass sowohl LAN-1 als auch LS HLA-Bw4 positiv sind (**Tab. 3.1**). Es wurde eine semiquantitative durchflusszytometrische Analyse durchgeführt, um den Anteil und Expressionsintensität von HLA-Bw4 und HLA-Bw6 zu ermitteln. Die Histogrammdarstellung mit FCS Express 5.0 (**Abb. 3.11**) diente der Bestimmung der Median Fluorescence Intensity (MFI). Zum besseren Vergleich der Zelllinien wurde die Median Fluorescence Intensity Ratio (MFIR) aus der MFI der untersuchten Moleküle und MFI der Isotypkontrollen mittels Division berechnet ( $MFI_{HLA} / MFI_{Kontrolle}$ ). Eine MFIR <2 wurde als negativ, eine MFIR ≥2 als positiv und eine MFIR ≥10 als hoch positiv gewertet.

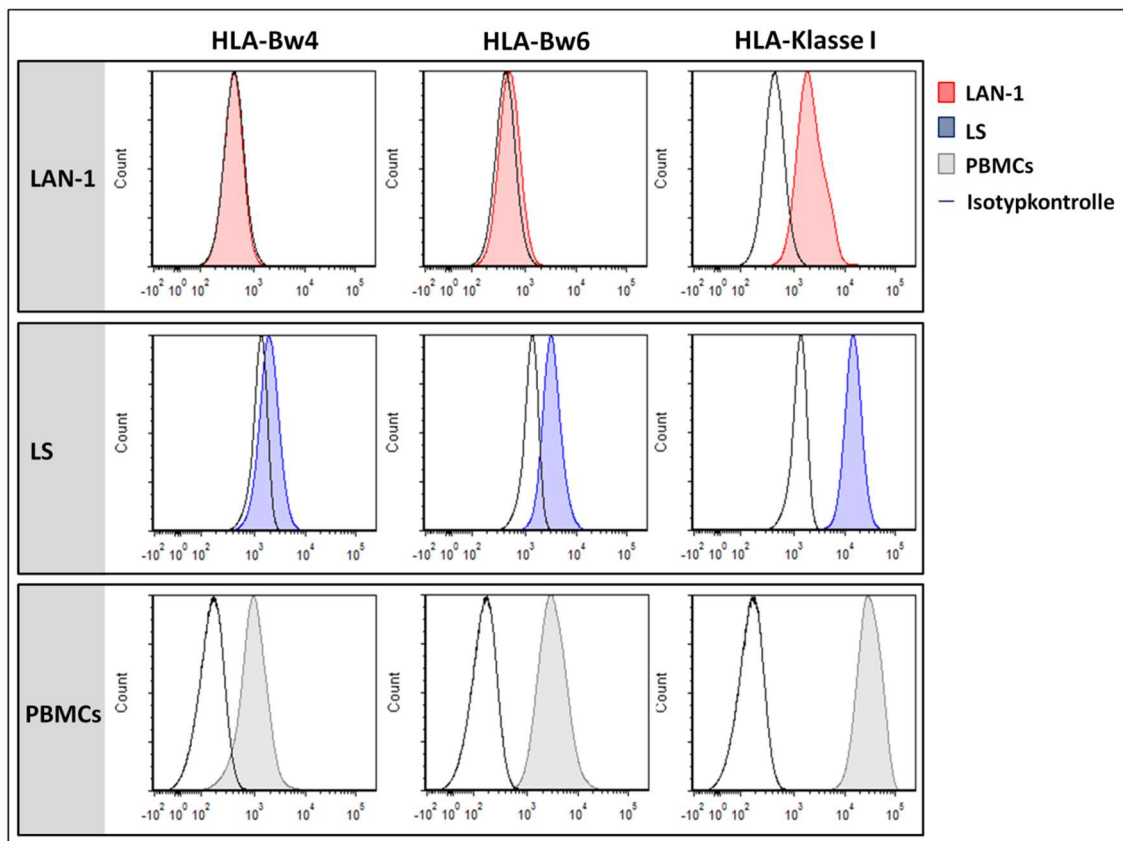
Von den untersuchten Zelllinien zeigte LS eine höhere HLA-Klasse I Expression ( $MFIR_{LS}=11,29$ ) als LAN-1 ( $MFIR_{LAN-1}=4,5$ ). Die Daten bestätigten die Ergebnisse der quantitativen HLA-Klasse I Untersuchung (**Abb. 3.10**).

Während auf LAN-1 weder eine messbare HLA-Bw4 ( $MFIR=0,94$ ) noch HLA-Bw6 Expression ( $MFIR=1,17$ ) nachgewiesen werden konnte, zeigte LS eine geringe HLA-Bw6 ( $MFIR=2,47$ ) jedoch eine nicht nachweisbare HLA-Bw4 Expression ( $MFIR=1,48$ ). Als Positivkontrolle wurden PBMCs aus einem Buffy-Coat verwendet. Die fehlende HLA-Bw4 Expression beider Zelllinien weist auf einen funktionellen RL Mismatch mit dem korrespondierenden KIR-Rezeptor CD158e (KIR3DL1) hin.

**Tab. 3.8 HLA-Klasse I Expression: Median Fluorescence Intensity Ratio**

Auflistung der zu **Abb. 3.11** gehörigen berechneten MFIR ( $MFI_{HLA}/MFI_{Kontrolle}$ ). Eine  $MFIR < 2$  wurde als negativ, eine  $MFIR \geq 2$  als positiv und eine  $MFIR \geq 10$  als hoch positiv gewertet.

	Median Fluorescence Intensity Ratio (MFIR)		
	HLA-Bw4	HLA-Bw6	HLA-Klasse I
<b>LAN-1</b>	0,97	1,17	4,53
<b>LS</b>	1,48	2,47	11,29
<b>PBMCs</b>	5,71	17,98	165,76

**Abb. 3.11 Semiquantitative Darstellung der HLA I Expression der verwendeten Zelllinien**

Semiquantitative Darstellung der HLA-Klasse I Expression sowie gesonderte Darstellung von HLA-Bw4 und HLA-Bw6 auf den Zelllinien LAN-1, LS und auf PBMCs. Zur Quantifizierung wurden FITC markierte Antikörper verwendet. Die Messung erfolgte mittels BD™ LSR II Flow Cytometer und die Auswertung der MFI in der Histogramm-Darstellung von FCS Express 5.0.

Die farbig hinterlegten Kurven stellen die MFI der gefärbten Liganden dar, die schwarzen Kurven die zugehörigen Isotypkontrollen.

Ein  $MFIR < 2$  wurde als negativ, eine  $MFIR \geq 2$  als positiv und ein  $MFIR \geq 10$  als hoch positiv gewertet.

### 3.4.3 Expression der Adhäsionsmoleküle, NKG2D und DNAM-1 Liganden auf LAN-1, LS und K562

Die Zelllinien LAN-1, LS und K562 wurden durchflusszytometrisch auf die Expression wichtiger Adhäsionsmoleküle, aktivierender NKG2D und DNAM-1 Liganden untersucht. Diese spielen eine Rolle bei der Erkennung, Adhäsion und Aktivierung von NK-Zellen.

Die in **Abb. 3.12** - **Abb. 3.17** dargestellten Histogramme zeigen die semiquantitativ ermittelte Expression der untersuchten Moleküle. Die Histogrammdarstellung mit FCS Express 5.0 diente der Bestimmung der Median Fluorescence Intensity (MFI). Zum besseren Vergleich der Zelllinien wurde die Median Fluorescence Intensity Ratio (MFIR) aus der MFI der untersuchten Moleküle und MFI der Isotypkontrollen mittels Division berechnet ( $MFI_{\text{Ligand}} / MFI_{\text{Kontrolle}}$ ). Eine  $MFIR < 2$  wurde als negativ, eine  $MFIR \geq 2$  als positiv und eine  $MFIR \geq 10$  als hoch positiv gewertet.

#### Adhäsionsmoleküle

Es wurde die semiquantitative Expression der Adhäsionsmoleküle CD11a, CD50, CD54 und CD58 auf den Zelllinien LAN-1, LS und K562 untersucht. Die MFI und mittels Subtraktionsverfahren berechnete prozentuale Expression wird in **Abb. 3.12** graphisch dargestellt und die zugehörigen Werte in **Tab. 3.9** aufgelistet. In **Tab. 3.10** wird ergänzend die MFIR der untersuchten Adhäsionsmoleküle aufgelistet.

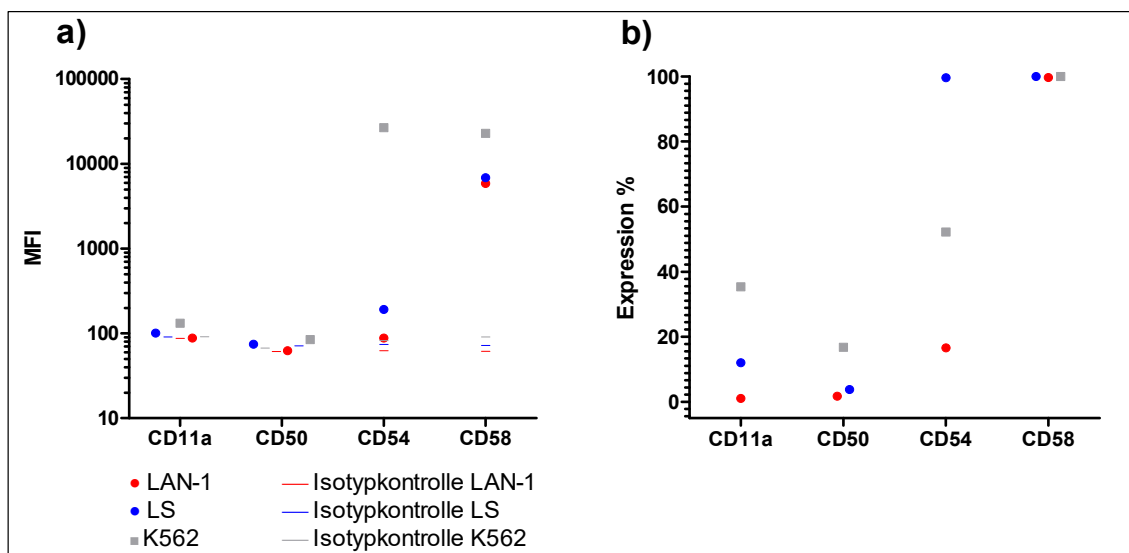
CD11a und CD50 konnten auf keiner der untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden ( $MFIR < 2$ ). Alle Zelllinien verzeichneten eine hoch positive CD58 Expression ( $MFIR \geq 10$ ). Dabei wiesen LAN-1 und LS eine vergleichbar hohe CD58 Expression ( $MFIR = 95$ ) auf, unterschieden sich jedoch in der Expression von CD54. LAN-1 zeigte keine und LS eine niedrig positive CD54 Expression ( $MFIR < 10$ ). Dabei fiel LS durch zwei Populationen CD54 positiver Zellen auf. Während die Hauptpopulation nur eine MFIR von 2,3 verzeichnete, zeigte die kleinere Population eine sehr hohe MFIR von 185,86.

Die Zelllinie K562 wies von den untersuchten Zelllinien die höchste Expression von CD54 und CD58 auf.

**Tab. 3.9 Adhäsionsmoleküle: Median Fluorescence Intensity und prozentuale Expression**

Auflistung der in **Abb. 3.12** dargestellten MFI und mittels Subtraktionsverfahren berechnete prozentuale Expression der Adhäsionsmoleküle auf den Zelllinien LAN-1, LS und K562.

	Median Fluorescence Intensity			Expression %		
	LAN-1	LS	K562	LAN-1	LS	K562
CD11a	96,33	101,02	132,32	5,74	11,99	35,33
CD50	62,46	74,38	84,67	1,75	3,78	16,81
CD54	88	191,84	26672,8	16,54	52,17	99,65
CD58	5868,33	6866,98	22914,13	99,69	99,98	99,98



**Abb. 3.12 Adhäsionsmoleküle: Median Fluorescence Intensity und prozentuale Expression**

Die semiquantitative Bestimmung der Adhäsionsmoleküle auf den Zelllinien LAN-1, LS und K562 erfolgte durch Inkubation der Zelllinien mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern CD11a (FITC), CD50 (PE), CD54 (APC), CD58 (PE) und anschließender Messung mittels BD™ LSR II Flow Cytometer. Die Auswertung der MFI sowie die mit Subtraktionsverfahren berechnete prozentuale Expression der Adhäsionsmoleküle erfolgte in der Histogramm-Darstellung von FCS Express 5.0.

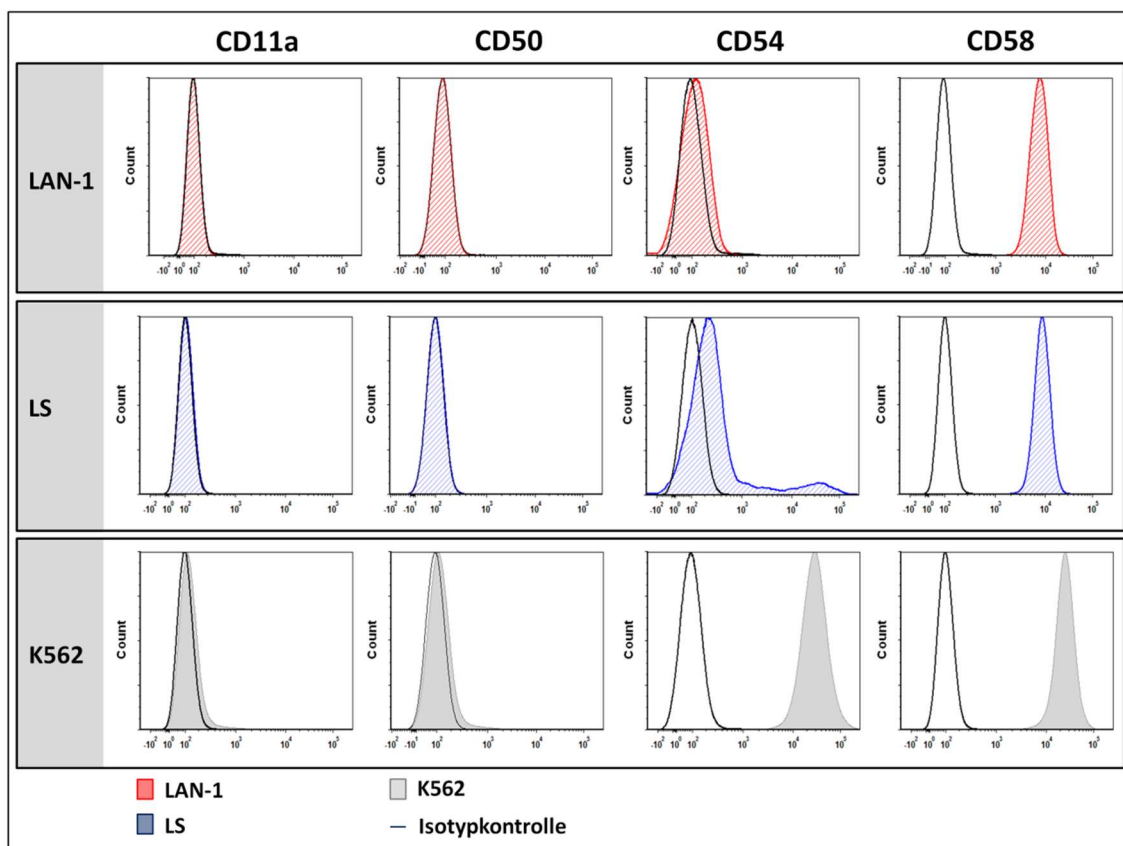
**a)** Logarithmische Darstellung der MFI der Adhäsionsmoleküle auf den Neuroblastomzelllinien LAN-1 und LS sowie auf der erythroleukämischen Zelllinie K562. Die waagerechten Striche stellen die farblich zugehörigen Isotypkontrollen der Zelllinien dar.

**b)** Prozentuale Expression der Adhäsionsmoleküle auf den Neuroblastomzelllinien LAN-1 und LS sowie auf der erythroleukämischen Zelllinie K562.

**Tab. 3.10 Adhäsionsmoleküle: Median Fluorescence Intensity Ratio**

Auflistung der zu **Abb. 3.13** gehörigen berechneten MFIR ( $MFI_{Ligand}/MFI_{Kontrolle}$ ). Eine  $MFIR < 2$  wurde als negativ, eine  $MFIR \geq 2$  als positiv und eine  $MFIR \geq 10$  als hoch positiv gewertet. LS/LAN-1 entspricht dem Quotienten  $MFIR_{LS}$  und  $MFIR_{LAN-1}$ .

	Median Fluorescence Intensity Ratio			
	CD11a	CD50	CD54	CD58
LAN-1	1,05	1,02	1,41	95,37
LS	1,11	1,04	2,60	95,37
K562	1,45	1,26	324,17	251,61
LS/LAN-1	1,06	1,03	1,84	1,00



**Abb. 3.13 Adhäsionsmoleküle: Histogramm-Darstellung**

Semiquantitative Darstellung der Adhäsionsmoleküle CD11a (FITC), CD50 (PE), CD54 (APC), CD58 (PE) auf den Zelllinien LAN-1, LS und K562. Zur Quantifizierung wurden mit Fluoreszenz markierte Antikörper verwendet. Die Messung erfolgte mittels BD™ LSR II Flow Cytometer und die Auswertung der MFI in der Histogramm-Darstellung von FCS Express 5.0. Die farbig hinterlegten Kurven stellen die MFI der gefärbten Liganden dar, die schwarzen Kurven die zugehörigen Isotypkontrollen.

## DNAM-1 Liganden

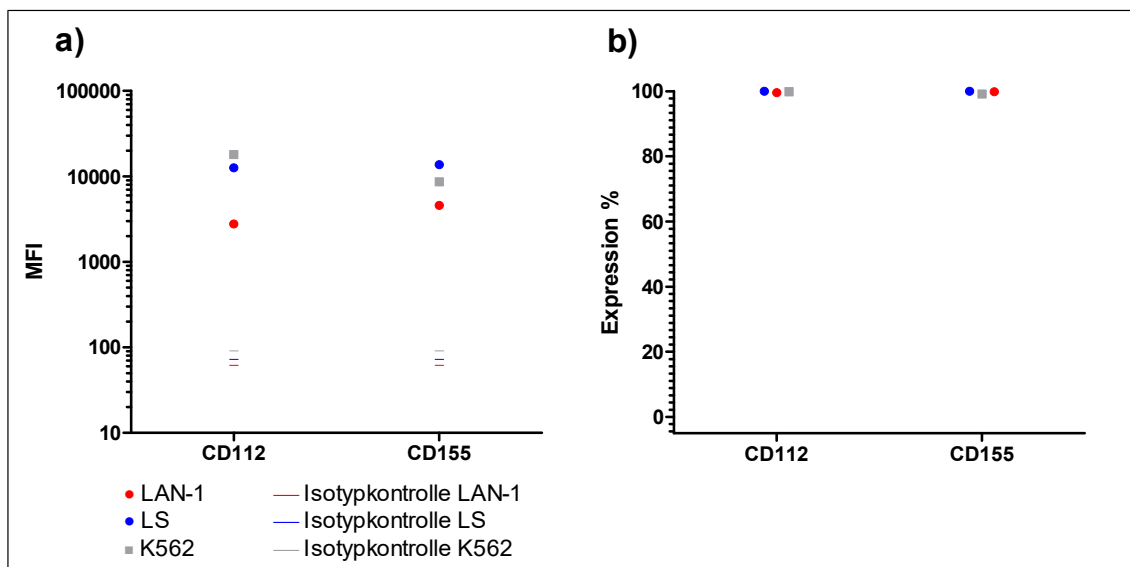
Weiterhin wurde die Expression der DNAM-1 Liganden CD112 (Nectin-2) und CD155 (PVR) untersucht, die insbesondere bei der Therapie und Prognose von Neuroblastomen eine Rolle spielen könnten [15].

Alle Zelllinien zeigten eine hohe Expression der DNAM-1 Liganden (MFIR>10) (**Tab. 3.12**). Während sich die beiden Neuroblastomzelllinien durch eine höhere Expression von CD155 als CD112 auszeichneten, verhielt es sich bei K562 genau umgekehrt. LAN-1 zeigte von den Zelllinien die geringste DNAM-1L Expression, K562 die höchste CD112 und LS die höchste CD155 Expression.

**Tab. 3.11 DNAM-1 Liganden: Median Fluorescence Intensity und prozentuale Expression**

Auflistung der in **Abb. 3.14** dargestellten MFI und der mittels Subtraktionsverfahren berechnete prozentuale Expression der DNAM-1 Liganden auf den Zelllinien LAN-1, LS und K562.

	Median Fluorescence Intensity			Expression %		
	LAN-1	LS	K562	LAN-1	LS	K562
<b>CD112</b>	2773,25	12579,64	18012,87	99,57	99,98	99,83
<b>CD155</b>	4584,51	13719,82	8608,38	99,85	99,99	99,11



**Abb. 3.14 DNAM-1 Liganden: Median Fluorescence Intensity und prozentualer Anteil positive Zellen**

Die semiquantitative Bestimmung der DNAM-1 Liganden auf den Zelllinien LAN-1, LS und K562 erfolgte durch Inkubation der Zelllinien mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern CD112 (PE) und CD155 (PE) und anschließender Messung mittels BD™ LSR II Flow Cytometer. Die Auswertung der MFI sowie die mit Subtraktionsverfahren berechnete prozentuale Expression der DNAM-1 Liganden erfolgte in der Histogramm-Darstellung von FCS Express 5.0.

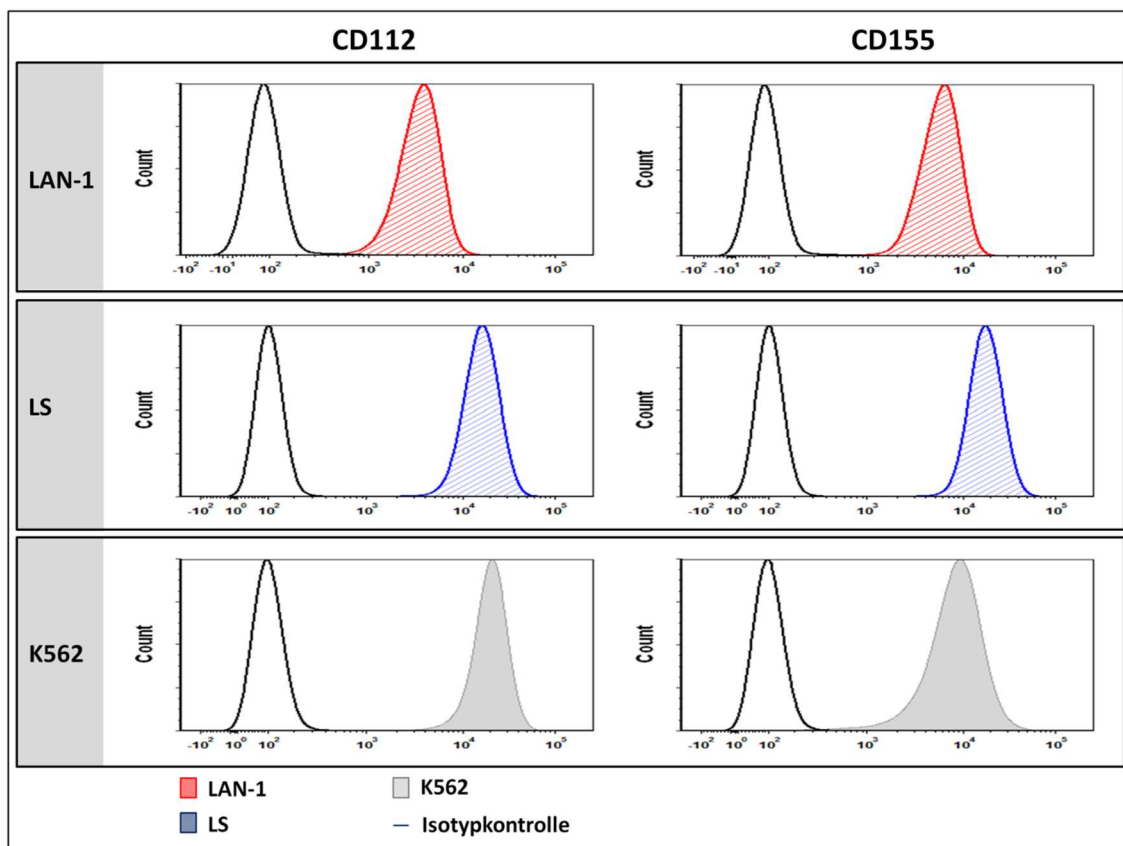
a) Logarithmische Darstellung der MFI der DNAM-1 Liganden auf den Neuroblastomzelllinien LAN-1 und LS sowie auf der erythroleukämischen Zelllinie K562. Die waagerechten Striche stellen die farblich zugehörigen Isotypkontrollen der Zelllinien dar.

b) Prozentuale Expression der DNAM-1 Liganden auf den Neuroblastomzelllinien LAN-1 und LS sowie auf der erythroleukämischen Zelllinie K562.

**Tab. 3.12 DNAM-1 Liganden: Median Fluorescence Intensity Ratio**

Auflistung der zu **Abb. 3.15** gehörigen berechneten MFIR ( $MFI_{Ligand}/MFI_{Kontrolle}$ ). Eine MFIR < 2 wurde als negativ, eine MFIR  $\geq 2$  als positiv und eine MFIR  $\geq 10$  als hoch positiv gewertet. LS/LAN-1 entspricht dem Quotienten  $MFIR_{LS}$  und  $MFIR_{LAN-1}$ .

	Median Fluorescence Intensity Ratio	
	CD112	CD155
LAN-1	45,07	74,51
LS	174,72	190,55
K562	197,79	94,52
LS/LAN-1	3,88	2,56



**Abb. 3.15 DNAM-1 Liganden: Histogramm-Darstellung**

Semiquantitative Darstellung der DNAM-1 Liganden CD112 und CD155. Zur Quantifizierung wurden mit PE gelabelte Antikörper verwendet. Die Messung erfolgte mittels BD™ LSR II Flow Cytometer und die Auswertung der MFI in der Histogramm-Darstellung von FCS Express 5.0.



Die farbig hinterlegten Kurven stellen die MFI der gefärbten Liganden dar, die schwarzen Kurven die zugehörigen Isotypkontrollen.

## NKG2D Liganden

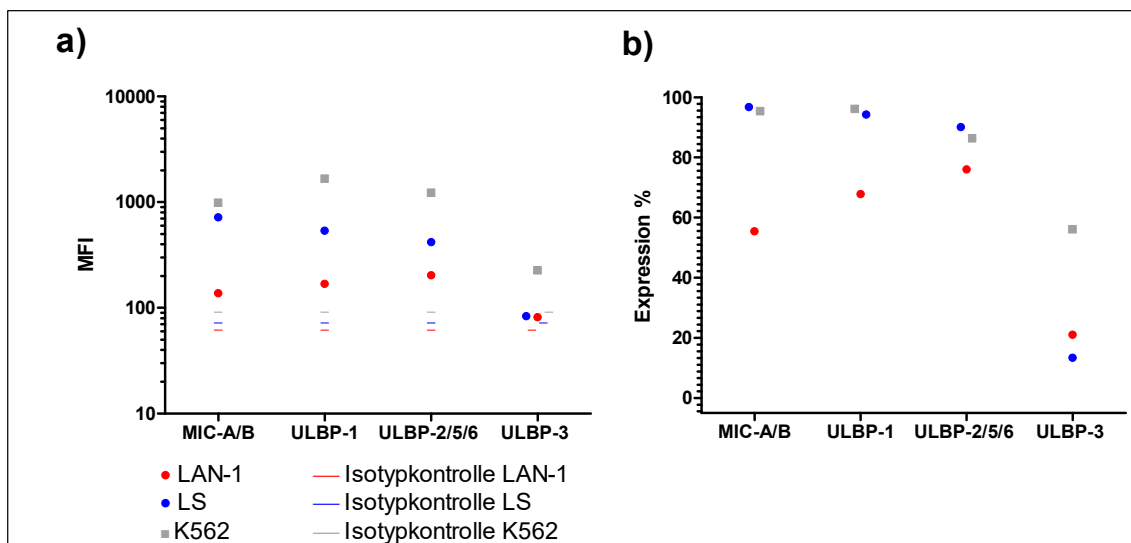
In **Abb. 3.16** sind die MFI der untersuchten aktivierenden NKG2D Liganden MIC-A/B, ULBP-1, ULBP 3 und ULBP-2/5/6 dargestellt.

Beide Neuroblastom-Zelllinien exprimierten kein ULBP-3. Die Expression der übrigen aktivierenden NKG2DL war auf LS durchweg höher als auf LAN-1.

**Tab. 3.13 NKG2D Liganden: Median Fluorescence Intensity und prozentuale Expression**

Auflistung der in **Abb. 3.16** dargestellten MFI und der mittels Subtraktionsverfahren berechnete prozentuale Expression der NKG2D Liganden auf den Zelllinien LAN-1, LS und K562

	Median Fluorescence Intensity			Expression %		
	LAN-1	LS	K562	LAN-1	LS	K562
MIC-A/B	137,85	718,67	989,16	55,42	96,72	95,36
ULBP-1	168,69	538,71	1669,79	67,77	94,24	96,11
ULBP-2/5/6	203,65	418,73	1229,5	76,01	90,07	86,36
ULBP-3	81,7	83,74	226,76	21,05	13,41	56,1



**Abb. 3.16 NKG2D Liganden: Median Fluorescence Intensity und prozentualer Anteil positiver Zellen**

Die semiquantitative Bestimmung der NKG2D Liganden auf den Zelllinien LAN-1, LS und K562 erfolgte durch Inkubation der Zelllinien mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern MIC-A/B (PE), ULBP-1 (PE), ULBP-3 (PE) und ULBP-2/5/6 (PE) und anschließender Messung mittels BD™ LSR II Flow Cytometer. Die Auswertung der MFI sowie die mit dem Subtraktionsverfahren berechnete prozentuale Expression der NKG2D Liganden erfolgte in der Histogramm-Darstellung von FCS Express 5.0.

a) Logarithmische Darstellung der MFI der NKG2D Liganden auf den Neuroblastomzelllinien

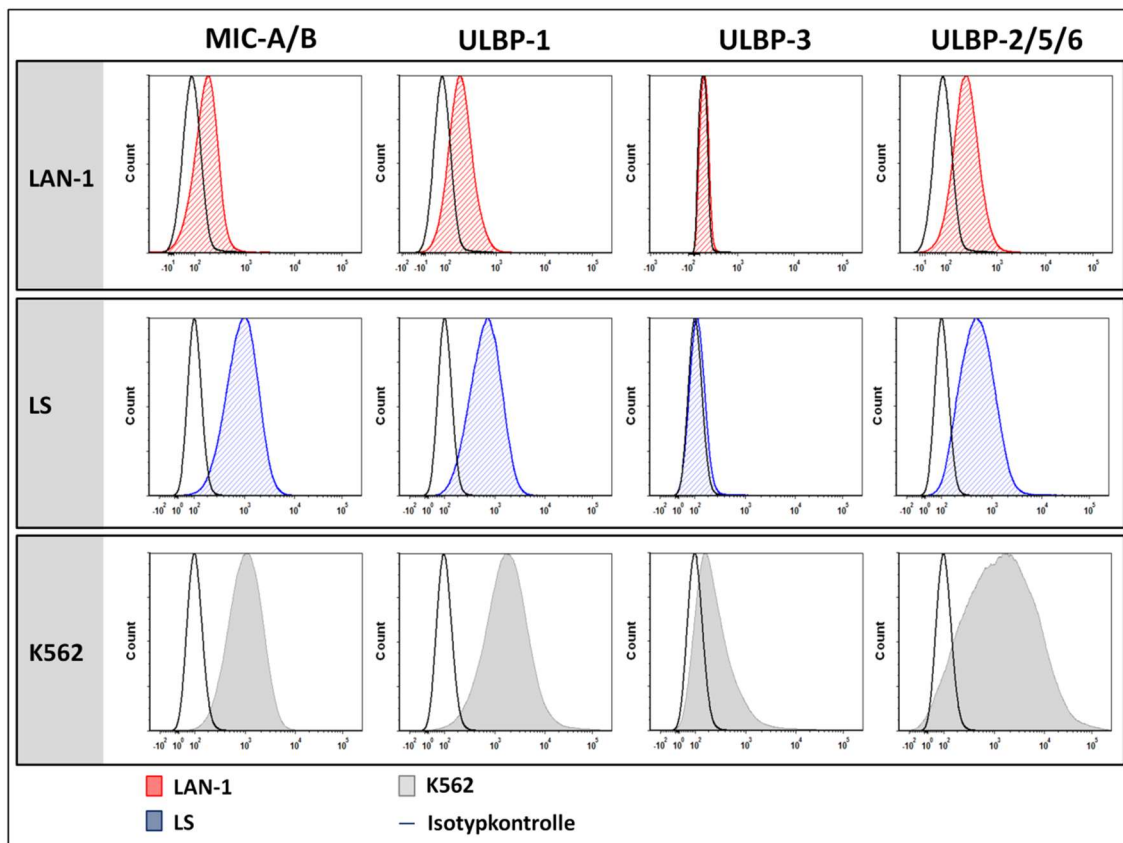
LAN-1 und LS sowie auf der erythroleukämischen Zelllinie K562. Die waagerechten Striche stellen die farblich zugehörigen Isotypkontrollen der Zelllinien dar.

b) Prozentuale Expression der NKG2D Liganden auf den Neuroblastozelllinien LAN-1 und LS sowie auf der erythroleukämischen Zelllinie K562.

**Tab. 3.14 NKG2D Liganden: Median Fluorescence Intensity Ratio**

Auflistung der zu **Abb. 3.17** gehörigen berechneten MFIR ( $MFI_{Ligand}/MFI_{Kontrolle}$ ). Eine MFIR < 2 wurde als negativ, eine MFIR ≥ 2 als positiv und eine MFIR ≥ 10 als hoch positiv gewertet. LS/LAN-1 entspricht dem Quotienten  $MFIR_{LS}$  und  $MFIR_{LAN-1}$ .

	Median Fluorescence Intensity Ratio			
	MIC-A/B	ULBP-1	ULBP-3	ULBP-2/5/6
<b>LAN-1</b>	2,24	2,74	1,33	3,31
<b>LS</b>	9,98	7,48	1,16	5,82
<b>K562</b>	10,87	18,34	2,49	13,51
<b>LS/LAN-1</b>	4,46	2,73	0,88	1,76



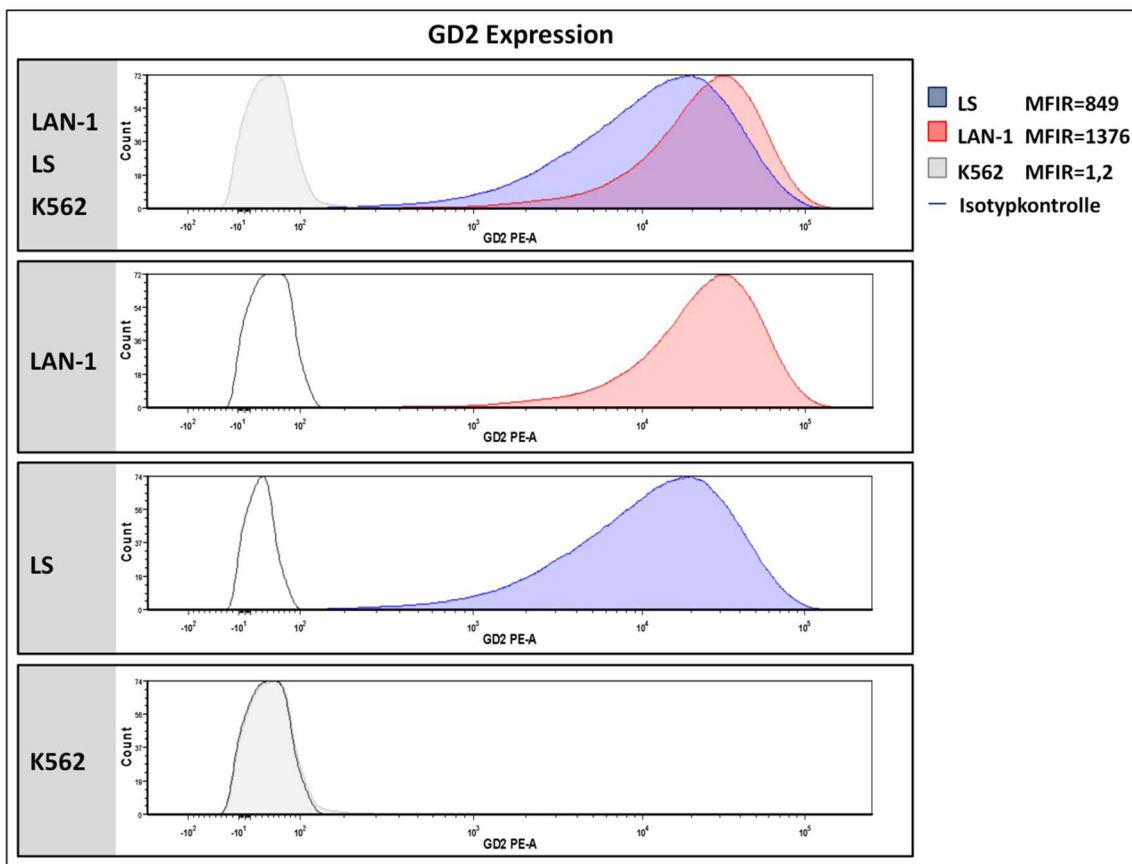
**Abb. 3.17 NKG2D Liganden: Histogramm-Darstellung**

Semiquantitative Darstellung der NKG2D Liganden MIC-A/B, ULBP-1, ULBP-3 und ULBP-2/5/6 auf den Zelllinien LAN-1, LS und K562. Zur Quantifizierung wurden PE markierte Antikörper verwendet. Die Messung erfolgte mittels BD™ LSR II Flow Cytometer und die Auswertung der MFI in der Histogramm-Darstellung von FCS Express 5.0

Die farbig hinterlegten Kurven stellen die MFI der gefärbten Liganden dar, die schwarzen Kurven die zugehörigen Isotypkontrollen.

### 3.4.4 GD2-Expression der Zelllinien LAN-1 und LS

Als wichtiges therapeutisches Target wurde die GD2 Expression der Zelllinien LAN-1 und LS untersucht. Beide Neuroblastomzelllinien zeigten eine sehr hohe GD2 Expression, wobei LAN-1 eine wesentlich höhere Expression (MFIR=1376) aufwies als LS (MFIR=849) (**Abb. 3.18**).



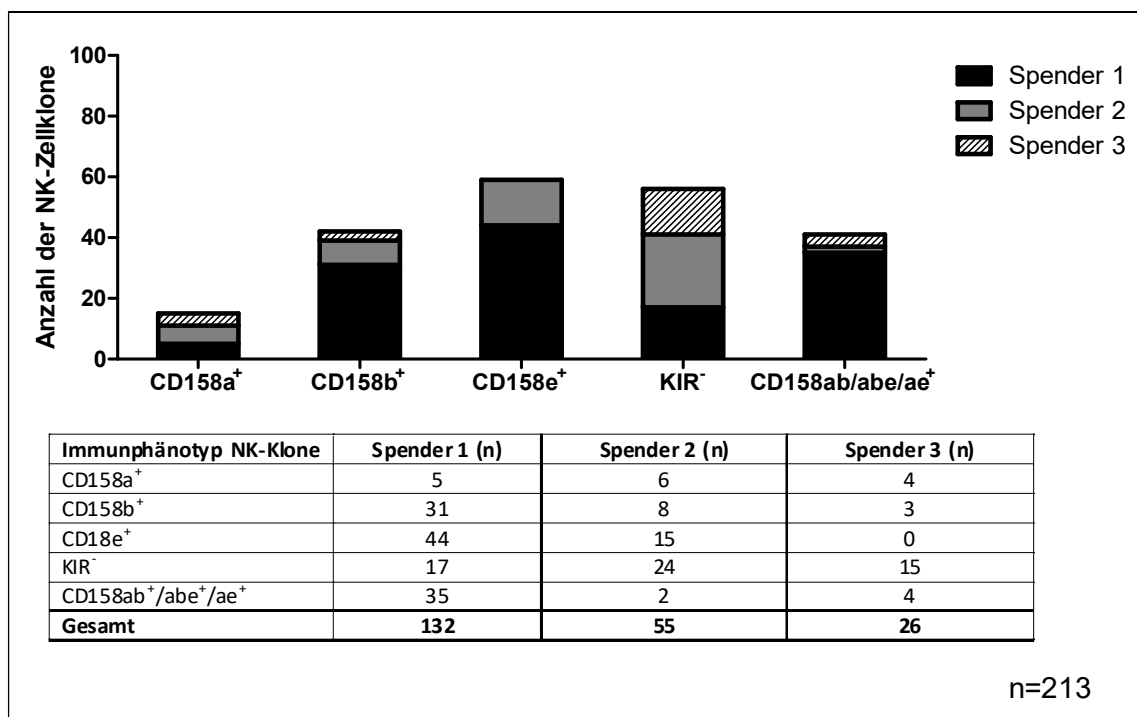
**Abb. 3.18 GD2 Expression: Histogramm-Darstellung**

Semiquantitative Darstellung der GD2 Expression auf LAN-1, LS und K562. Die farbig hinterlegten Kurven stellen die Expression von GD2 auf LAN-1 (rot), LS (blau) und K562 (grau) dar, die schwarze Kurve die zugehörige Isotypkontrolle.

Die Zellen wurden mit dem therapeutischen GD2 Antikörper ch14.18 inkubiert und anschließend mit PE gelabeltem Fcy Fragment spezifischen Goat-Anti-Human IgG Antikörper gefärbt. Als Isotypkontrollen wurden mit Rituximab und PE gelabeltem Fragment spezifischen Goat-Anti-Human IgG Antikörper inkubierte LAN-1, LS und K562 verwendet. Die Messung erfolgte mittels BD™ LSR II Flow Cytometer und die Auswertung der MFI in der Histogramm-Darstellung von FCS Express 5.0.

### 3.5 NK-Zell vermittelte Lyse der Zelllinien LAN-1, LS und K562

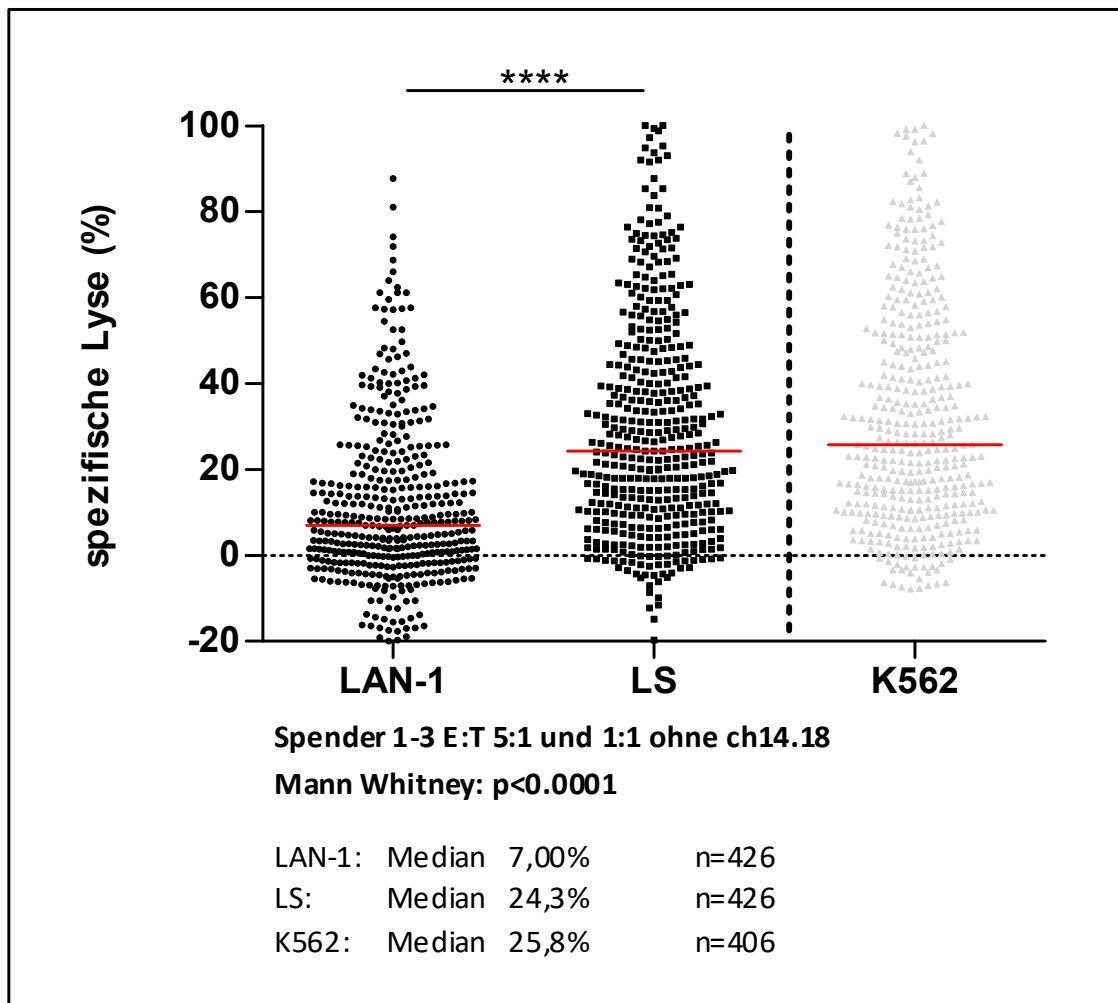
Bei der Auswertung der Zytotoxizitätstests wurden in **Abb. 3.19** dargestellte NK-Klone der Spender 1-3 berücksichtigt. Nicht berücksichtigt wurden NK-Klone, deren spezifische Lyse gegenüber LAN-1 und LS in An- und Abwesenheit des therapeutischen Antikörpers ch14.18 unter 20% blieb und auch gegenüber K562 eine Lyse <25% zeigten. Zur internen Beurteilung der Testvalidität wurden NK-Klone von der Auswertung ausgeschlossen, deren spezifische Lyse in E:T Ratio 1:1 höher war als in E:T Ratio 5:1. Außerdem wurden NK-Klone, deren Populationsreinheit unter 80% lag aus der Auswertung genommen, da ersichtlich war, dass immunphänotypisch kein klonales Wachstum vorlag. Insgesamt wurden 341 NK-Klone getestet, von denen 213 nach oben genannten Kriterien in die statistische Auswertung eingeschlossen wurden.



**Abb. 3.19 Immunphänotyp und Anzahl der in der statistischen Auswertung berücksichtigten NK-Klone dreier gesunder Spender**

Im gestapelten Säulendiagramm dargestellt ist die Anzahl der NK-Klone dreier gesunder Spender nach dem jeweiligen Immunphänotyp. Ausgeschlossen wurden NK-Klone, die entweder den Reinheitskriterien nicht entsprachen, in der funktionalen Testung eine zu geringe Lyse oder die Validitätskriterien des Tests verletzten (siehe in **Kap. 3.5** beschriebene Ausschlusskriterien).

Bei der Zytotoxizitätstestung der NK-Klone im 2h BATDA Release Assay fiel die Zelllinie LAN-1 durch eine signifikant niedrigere spezifische Lyse (Median=7,0%) als LS (Median=24,3%) auf. K562 zeigte mit einer mittleren spezifischen Lyse von 25,8% eine nicht signifikant höhere spezifische Lyse als LS mit 24,3% (**Abb. 3.20**).

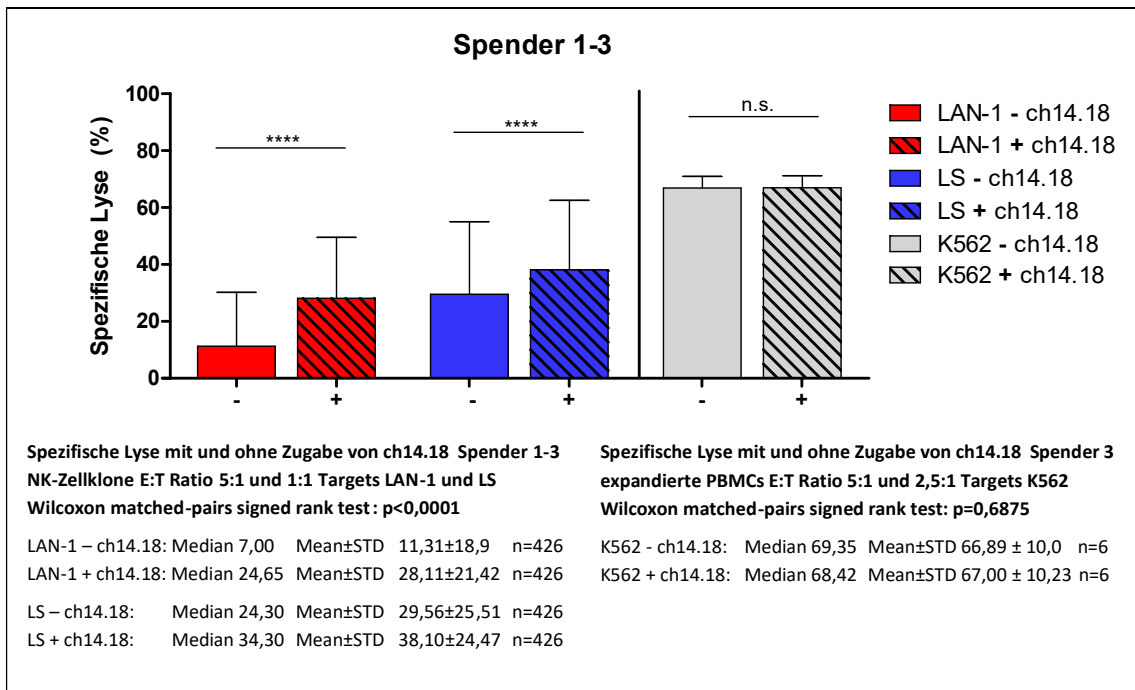


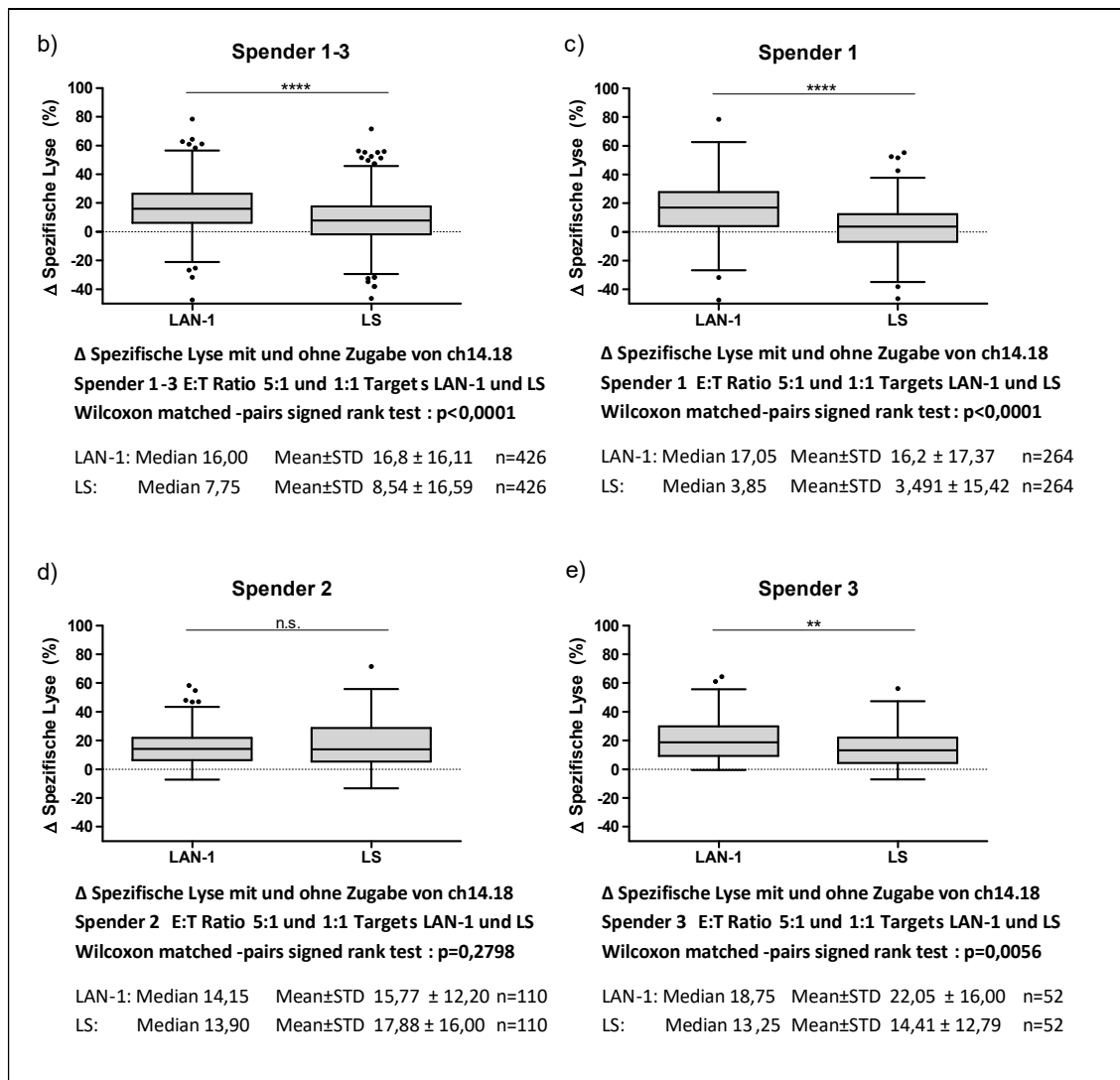
**Abb. 3.20** NK- Zellvermittelte Lyse der Zelllinien LAN-1, LS und K562

Dargestellt ist die spezifische Lyse der NK-Klone im 2h BATDA-Release Assay gegenüber der Zelllinie LAN-1, LS und K562 in E:T Ratio 5:1 und 1:1 ohne Zugabe von ch14.18. In der Auswertung berücksichtigt wurden alle NK-Zellklone, die die in **Kap. 3.5** beschriebenen Kriterien erfüllten.

### 3.5.1 NK-Zellaktivität unter Berücksichtigung der GD2-Expression der Zelllinien LAN-1 und LS

Die Steigerung der Lyse durch den Antikörper ch14.18 im 2h BATDA Release Assay wird in der **Abb. 3.21** dargestellt. Sowohl LAN-1 als auch LS zeigten eine signifikante ADCC (**Abb. 3.21 a**). Die mittlere Lysesteigerung durch ch14.18 war gegenüber LAN-1 mit 16,87% höher als gegenüber LS mit 8,54%. Während die Lysesteigerung durch ch14.18 bei Spender 1 und 3 gegenüber LAN-1 signifikant höher war als gegenüber LS, konnte dies für Spender 2 nicht gezeigt werden. Exemplarisch ist in **Abb. 3.21 a**) abgebildet, dass erwartungsgemäß beim GD2 negativen Target K562 keine ADCC durch Zugabe von ch14.18 beobachtet werden konnte.





**Abb. 3.21 Ch14.18 vermittelte ADCC dreier gesunder Spender gegenüber LAN-1, LS und K562 im 2h BATDA Release Assay**

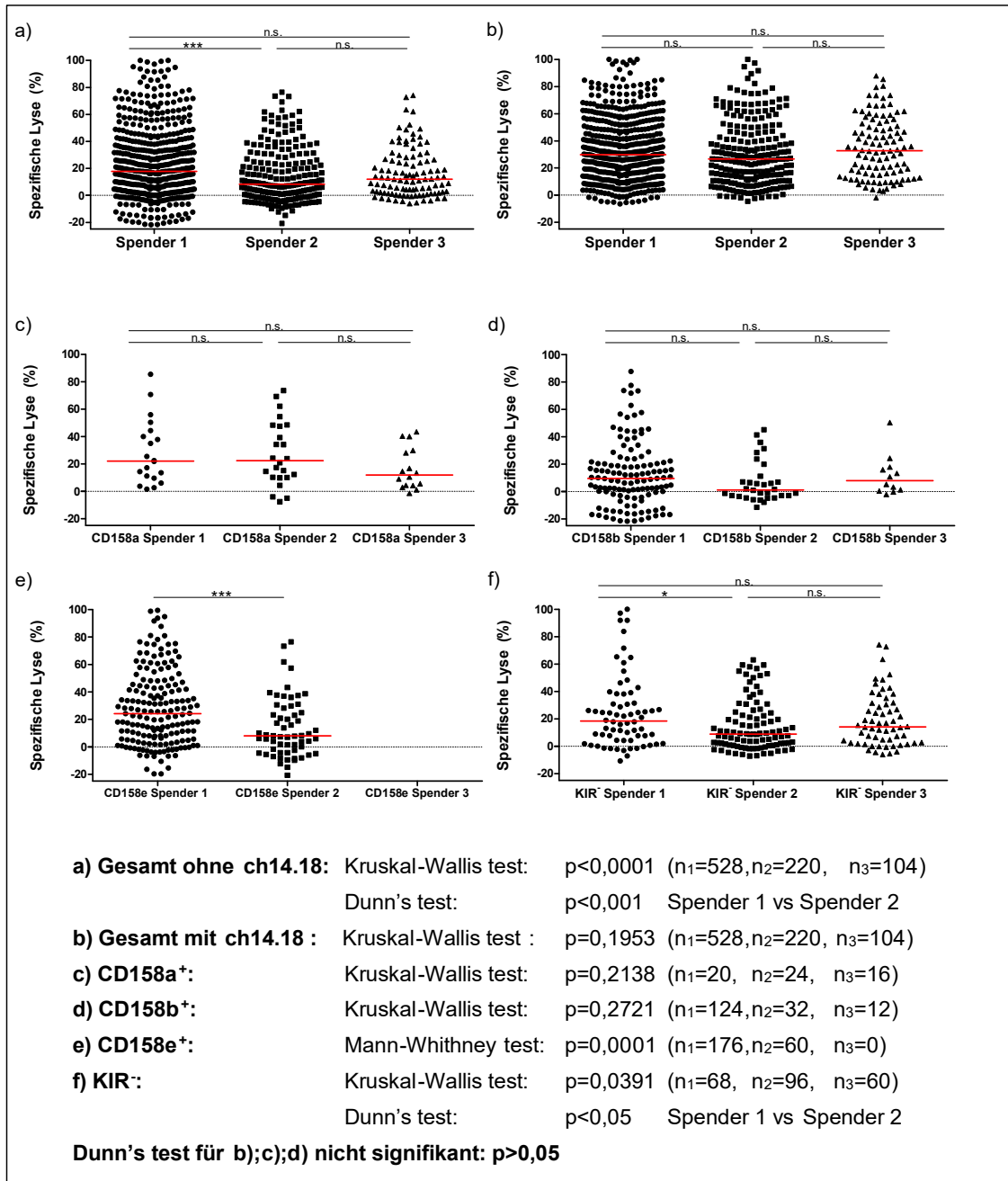
a) Dargestellt sind die Lysewerte aller NK-Zellklone von drei gesunden Spendern gegenüber LAN-1 und LS ohne und mit Zugabe von ch14.18 in E:T-Ration 5:1 und 1:1 im 2 h BATDA Release Assay sowie exemplarisch ein 2 h BATDA Release Assay expandierter PBMCs gegenüber K562 ohne und mit Zugabe von ch14.18. In den Schaubildern b-e) ist die durch ch14.18 vermittelte absolute prozentuale Lysesteigerung der NK-Klone gegenüber LAN-1 und LS in E:T-Ratio 5:1 und 1:1 dargestellt. Die Lysesteigerung wurde durch die Differenz der prozentualen Lysewerte der spezifischen Lyse in Abwesenheit und Gegenwart von ch14.18 berechnet und dargestellt ( $\Delta$  Spezifische Lyse (%)). Angewendet wurde ein Wilcoxon matched-pairs signed rank test.

### 3.5.2 Zytotoxische Aktivität unter Berücksichtigung der HLA I Typisierung und KIR-Genotypisierung der Spender

Wie in **Kap. 3.1** beschrieben erfolgte die Einteilung der Spender in HLA-Gruppen nach Velardi et al. [100] auf Grundlage der HLA I Typisierung und ergab für Spender 1 und 3 ein Fehlen von HLA Liganden der Cw3-Gruppe (Cw3<sup>-</sup> Cw4<sup>+</sup> Bw4<sup>+</sup>) und für Spender 2 von HLA Liganden der Cw4-Gruppe (Cw3<sup>+</sup> Cw4<sup>-</sup> Bw4<sup>+</sup>) (**Tab. 3.2**).

Die KIR-Genotypisierung zeigte für Spender 2 und 3 den KIR-Haplotyp B1 mit identischem KIR-Genotyp und für Spender 1 den KIR-Haplotyp A. Neben den Framework Genes KIR2DL4, KIR3DL2 und KIR3DL3 waren alle Spender positiv für die inhibitorischen KIR-Rezeptoren KIR2DL1, KIR2DL3 und KIR3DL1 und den aktivierenden Rezeptor KIR2DS4. Des Weiteren waren Spender 2 und 3 positiv für den inhibitorischen KIR-Rezeptor KIR2DL2 und dessen korrespondierenden aktivierenden KIR-Rezeptor KIR2DS2. Ohne Zugabe des therapeutischen Antikörpers ch14.18 wiesen die NK-Klone des Spenders 1 (Haplotyp A) im Gesamtvergleich eine signifikant höhere Lyse gegenüber den Neuroblastomzelllinien LAN-1 und LS auf als die des Spenders 2 (Kruskal Wallis test:  $p < 0,0001$ , Dunns test Spender 1 vs Spender 2  $p < 0,001$ ,  $n_{\text{Spender 1}}=528$ ,  $n_{\text{Spender 2}}=220$ ,  $n_{\text{Spender 3}}=104$ ) (**Abb. 3.22a**). Unter Zugabe von ch14.18 fand sich kein signifikanter Unterschied der NK-Zell vermittelten Lyse der Spender 1-3 gegenüber diesen Zelllinien (Kruskal-Wallis test:  $p=0,1963$ ,  $n=884$ ) (**Abb. 3.22 b**). Die CD158e single KIR<sup>+</sup> NK-Klone (Mann-Whitney:  $p=0,0001$ ,  $n_{\text{Spender 1}}=176$ ,  $n_{\text{Spender 2}}=60$ ) und KIR<sup>-</sup> NK-Klone (Kruskal-Wallis test:  $p=0,0391$  Dunn's test  $p < 0,05$  Spender 1 vs Spender 2,  $n=224$ ,) des Spenders 1 zeigten sowohl gegenüber LAN-1 als auch LS eine signifikant höhere Lyse als die korrespondierenden NK-Klone des Spenders 2 (**Abb. 3.22 e**). Gegenüber K562 war jedoch kein signifikanter Unterschied dieser NK-Klone zu vermerken. Es fand sich kein signifikanter Unterschied der CD158a<sup>+</sup> (Kruskal-Wallis test  $p=0,2138$ ,  $n=60$ ) und CD158b<sup>+</sup> (Kruskal-Wallis test  $p=0,5017$ ,  $n=168$ ) NK-Klonen zwischen den Spendern.





**Abb. 3.22 Vergleich der NK- Zell vermittelten Lyse von Spender 1-3 gegenüber LAN-1 und LS im 2h BATDA Release Assay**

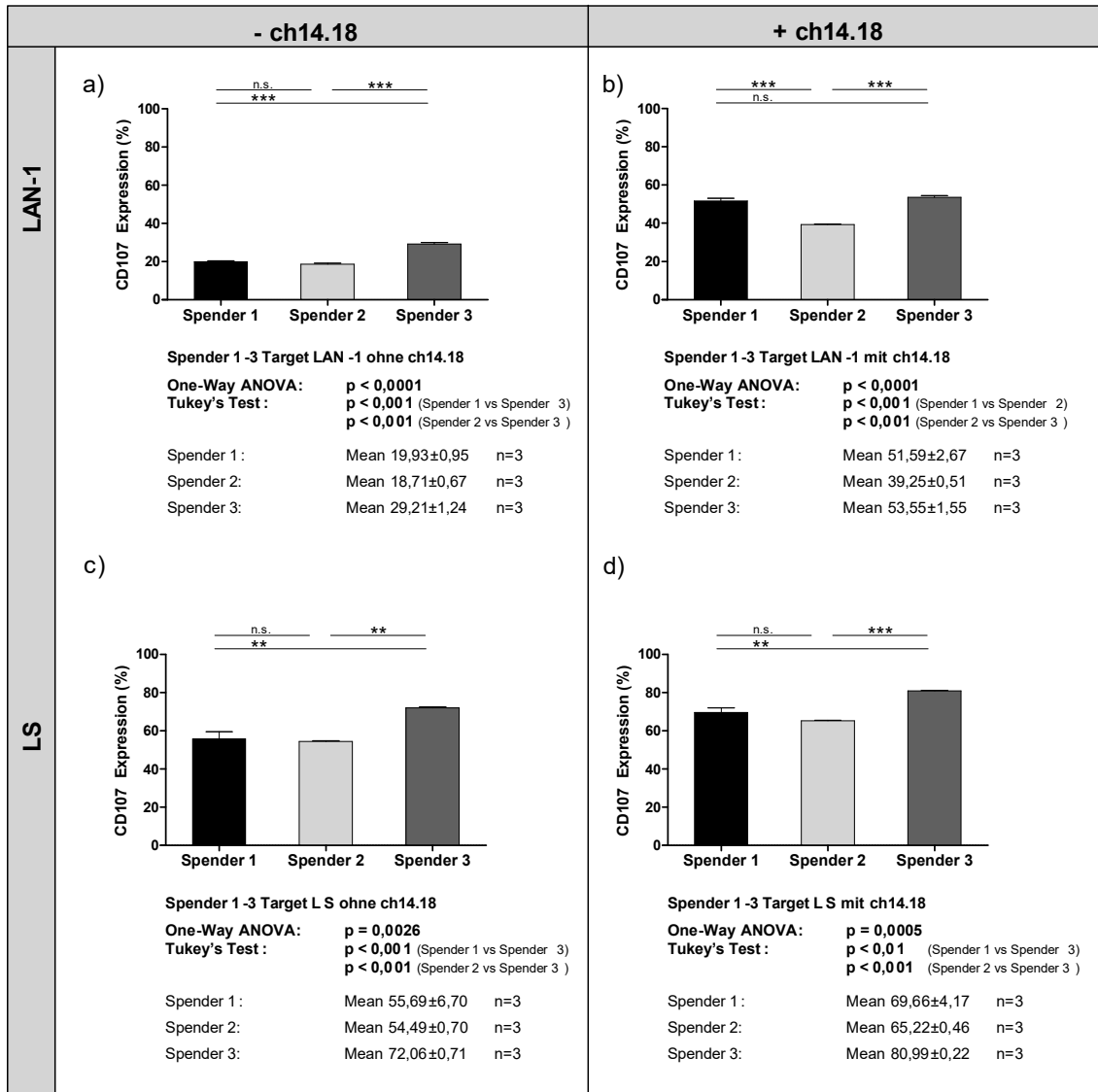
Dargestellt sind die Lysewerte der NK-Klone dreier gesunder Spender gegenüber LAN-1 und LS in der E:T Ratio 5:1 und 1:1 im 2h BATDA Release Assay.

a) Zeigt die Lysewerte aller NK-Klone der Spender 1-3 ohne Zugabe von ch14.18  
b) Zeigt die Lysewerte aller NK-Klone der Spender 1-3 mit Zugabe von ch14.18  
c-f) Vergleich der NK-Zell vermittelten Lyse der NK-Klone eines Phänotyps der Spender 1-3 ohne Zugabe von ch14.18. Berücksichtigt wurden die Immunphänotypen CD158a<sup>+</sup>, CD158b<sup>+</sup>, CD158e<sup>+</sup>, sowie KIR<sup>-</sup> NK-Klone.

### 3.5.3 Zytotoxische Aktivität nach dem LL Modell

Entsprechend dem Ligand-Ligand Modell (LL Modell) liegt ein LL Match vor, wenn sowohl der Spender der Effektorzellen (Stammzellspender) als auch der Empfänger/Tumor (Patient) den gleichen HLA Liganden kodieren. Ein LL Mismatch in Graft-versus-Tumor Richtung bedeutet, dass der Spender für einen HLA Ligand kodiert, der vom Empfänger/Tumor nicht kodiert wird. Ein LL Mismatch in Host versus Graft Richtung wird in dem Modell nicht berücksichtigt und spielt keine Rolle.

Gemäß dem LL Modell weisen Spender 1 und 3 ein LL Mismatch in Graft versus Tumor Richtung für die Zelllinie LAN-1 auf, während Spender 2 keinen Mismatch aufweist (siehe **Tab. 3.5**). Zum Vergleich ist in **Abb. 3.23 c-d** und **Abb. 3.24 c-d** auch die spezifische Lyse der Spender 1-3 gegenüber der Zelllinie LS aufgetragen. Es besteht für keinen der drei untersuchten Spender ein LL Mismatch gegenüber der Zelllinie LS. Somit ist nach dem LL Modell zu erwarten, dass Spender 1 und 3 eine signifikant höhere spezifische Lyse der Zelllinie LAN-1 aufweisen als Spender 2. Aufgrund des fehlenden LL Mismatch aller drei untersuchten Spender gegenüber der Zelllinie LS ist nach dem LL Modell kein signifikanter Unterschied zwischen den Spendern für diese Zelllinie zu erwarten. Wie in der Diskussion **Kap. 4.4.1** ausführlich erläutert, ist das LL Modell nicht auf die getesteten NK-Zellklone anwendbar. Aus diesem Grund erfolgte exemplarisch die Austestung von expandierten Bulk NK-Zellen aller drei Spender gegenüber den Zelllinien LAN-1 und LS ohne und mit Zugabe des therapeutischen Antikörpers ch14.18 mittels Luciferase- und CD107a-Assay. Die in **Abb. 3.23** und **Abb. 3.24** dargestellten Daten entstammen zwei unterschiedlichen Expansionszyklen. So fiel Spender 3 durch eine signifikant höhere CD107a Expression verglichen mit Spender 1 und 2 nach zweistündiger Inkubation mit beiden Neuroblastomzelllinien auf (**Abb. 3.23 a, c-d**). Unter Zugabe von ch14.18 zeigte zusätzlich auch Spender 1 eine höhere CD107a Aktivität als Spender 2 (**Abb. 3.23 b**).



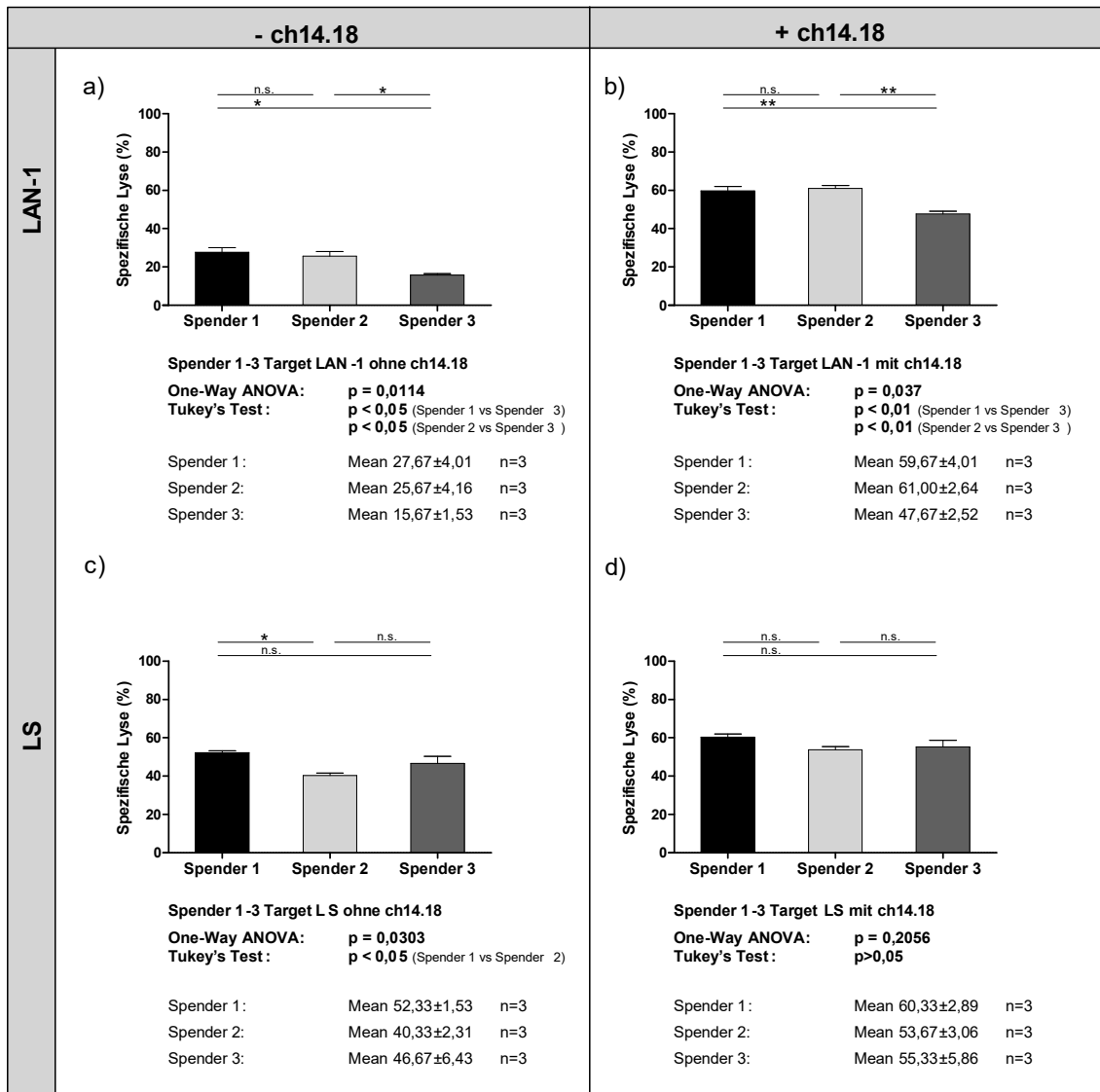
**Abb. 3.23 LL Modell: CD107a Aktivität expandierter Bulk NK-Zellen der Spender 1-3 gegenüber den Zelllinien LAN-1 und LS**

Dargestellt ist die CD107a Expression expandierter Bulk NK-Zellen der Spender 1-3 aus einem Expansionszyklus nach 2-stündiger Inkubation mit den Zelllinien LAN-1 und LS ohne und mit Zugabe des therapeutischen Antikörpers ch.14.18.

- gegenüber der Zelllinie LAN-1 ohne Zugabe von ch14.18
- gegenüber der Zelllinie LAN-1 mit ch14.18
- gegenüber der Zelllinie LS ohne Zugabe von ch14.18
- gegenüber der Zelllinie LS mit Zugabe von ch14.18

Die Messung erfolgte mittels BD™ LSR II Flow Cytometer und die Auswertung mit FCS Express 5.0 durch Berechnung des prozentualen Anteils der CD107a der Bulk NK-Zellen der Spender 1-3.

Demgegenüber wies Spender 3 jedoch im Luciferase-Assay gegenüber LAN-1 eine signifikant niedrigere spezifische Lyse auf verglichen mit Spender 1 und 2 (Abb. 3.24 a-b).



**Abb. 3.24 LL Modell: NK-Zellvermittelte Lyse expandierter Bulk NK-Zellen der Spender 1-3 gegenüber der Zelllinie LAN-1 und LS im Luciferase-Assay**

Dargestellt ist die spezifische Lyse expandierter Bulk NK-Zellen von Spender 1-3 gegenüber den Zelllinien LAN-1 und LS (E:T Ratio 1:1) mit und ohne Zugabe des therapeutischen Antikörpers ch14.18 im Luciferase-Assay nach 12h. Nach dem LL Modell besteht, wie in Kap. 3.1 beschrieben, ein LL Mismatch der Spender 1 und 3 gegenüber der Zelllinie LAN-1, während Spender 2 kein LL-Mismatch aufweist.

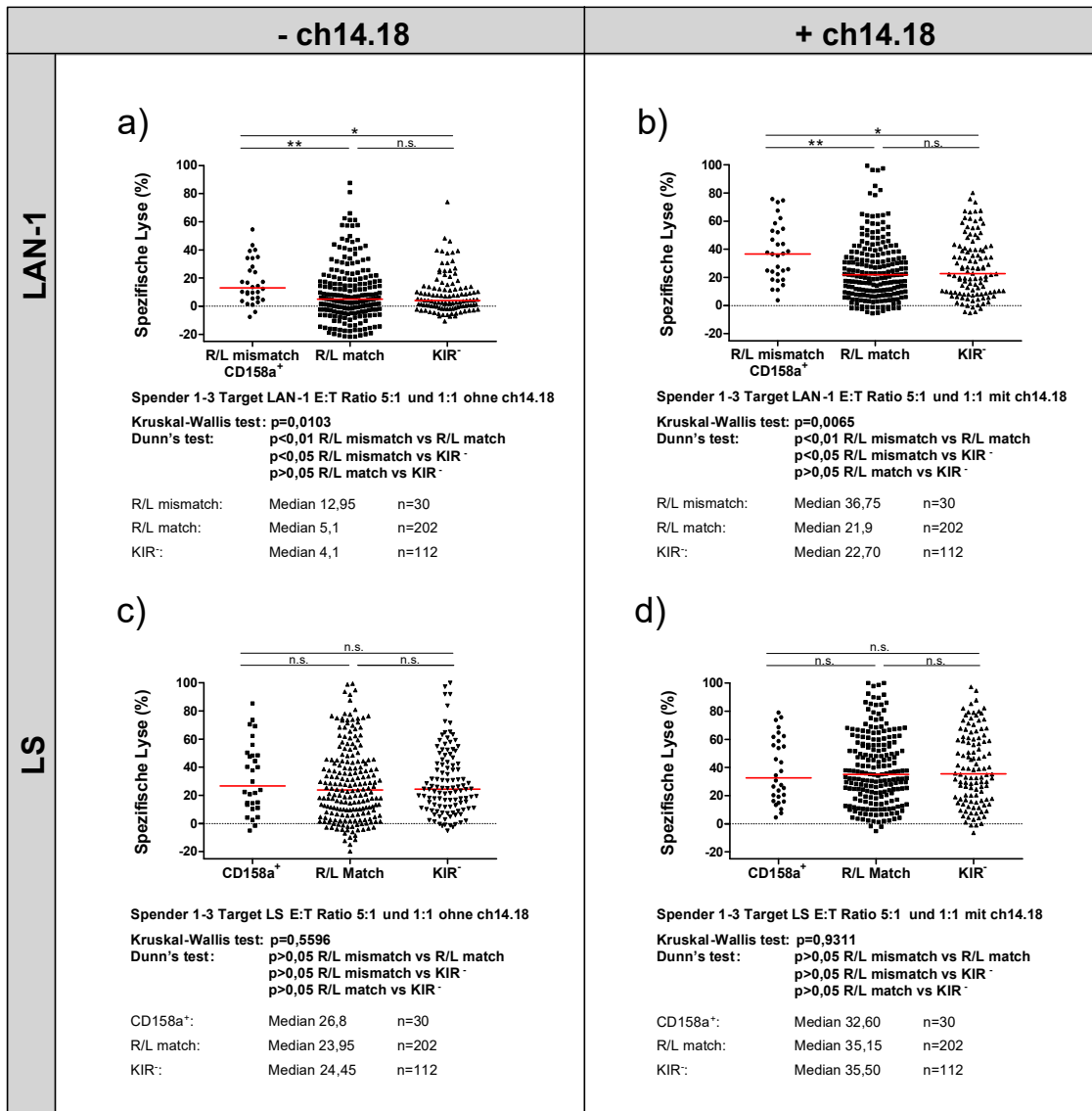
Vergleich der spenderspezifischen Lyse der expandierte Bulk NK-Zellen von Spender 1-3 aus einem Expansionszyklus a) gegenüber der Zelllinie LAN-1 ohne Zugabe von ch14.18,

b) gegenüber der Zelllinie LAN-1 mit ch14.18, c) gegenüber der Zelllinie LS ohne Zugabe von ch14.18, d) gegenüber der Zelllinie LS mit Zugabe von ch14.18

Es zeigten sich in beiden Assays zwar spenderspezifische Unterschiede sowohl der NK-zellvermittelten Lyse als auch CD107a Aktivität, diese waren jedoch unabhängig von der verwendeten Zelllinie und nur bedingt mit dem LL-Modell in Einklang zu bringen.

#### **3.5.4 Zytotoxische Aktivität nach dem Memphis RL Modell**

Die Untersuchung des RL Modells erfolgte in unserer Studie mit den Neuroblastomzelllinien LAN-1 (Cw4<sup>-</sup> Cw3<sup>+</sup> Bw4<sup>+</sup>) und LS (Cw4<sup>+</sup> Cw3<sup>+</sup> Bw4<sup>+</sup>). Wie in **Kap.3.1** beschrieben ergab sich nach HLA-Typisierung ein RL Mismatch zwischen der Zelllinie LAN-1 und CD158a single KIR positiven NK-Zellen. Für die Zelllinie LS (Cw4<sup>+</sup> Cw3<sup>+</sup> Bw4<sup>+</sup>) wurde auf genetischer Ebene kein RL Mismatch für die von uns untersuchten Major KIR-Rezeptoren CD158a, CD158b und CD158e festgestellt. Die semiquantitative Untersuchung der HLA I Expression (**Kap. 3.4.2**) ergab jedoch für beide Zelllinien eine nicht nachweisbare HLA Bw4 Expression und somit einen funktionellen RL Mismatch der CD158e single KIR positiven NK-Zellen. Wertete man die NK-Klone getrennt, sowohl nach genetischem als auch funktionellem Mismatch aus, zeigte sich in beiden Fällen eine signifikant höhere spezifische Lyse der RL-Mismatched NK-Zellklone verglichen mit den RL-Matched NK-Klonen (**Abb. 3.25** und **Abb. 3.26**).

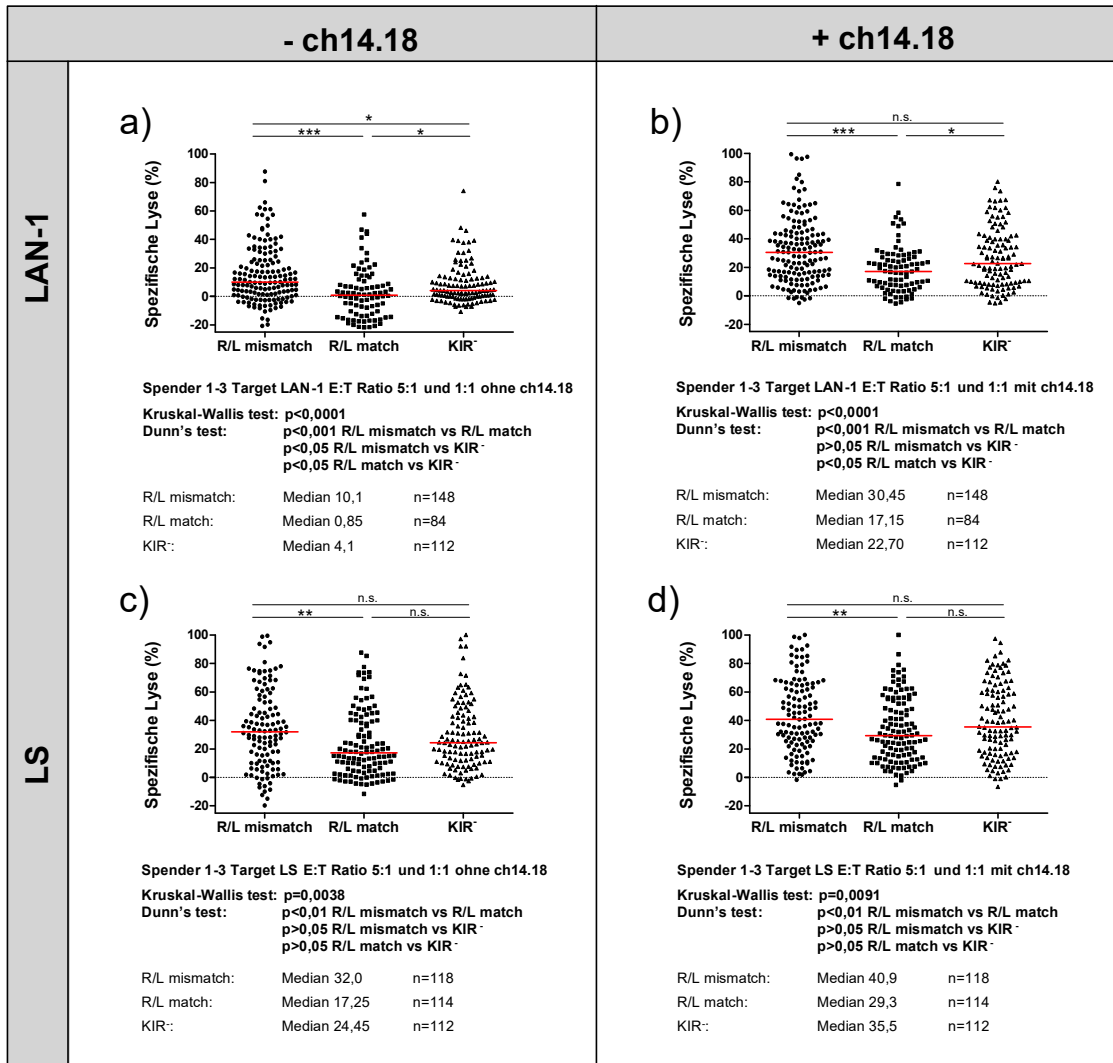


**Abb. 3.25 RL Modell: NK-Zell vermittelte Lyse der NK-Klone gegenüber LAN-1 und LS (genetischer R/L match/mismatch)**

Dargestellt ist die spezifische Lyse der CD158a, CD158b, CD158e single KIR positiven und KIR negativen NK-Klone im 2 h BATDA Release Assay gegenüber LAN-1 und LS in E:T Ratio 5:1 mit und ohne Zugabe des therapeutischen Antikörpers ch14.18. Die NK-Klone wurden nach dem Memphis RL Modell wie folgt eingeteilt:

a+b) R/L mismatch: CD158a<sup>+</sup>; R/L match: CD158b<sup>+</sup>, CD158e<sup>+</sup>; KIR<sup>-</sup>

c+d) CD158a<sup>+</sup>; R/L match: CD158a<sup>+</sup>, CD158b<sup>+</sup>, CD158e<sup>+</sup>; KIR<sup>-</sup>



**Abb. 3.26 RL Modell: NK-Zell vermittelte Lyse der NK-Klone gegenüber LAN-1 und LS (funktioneller R/L match/mismatch)**

Dargestellt ist die spezifische Lyse der CD158a, CD158b, CD158e single positiven und KIR negativen NK-Klone im 2 h BATDA Release Assay gegenüber LAN-1 und LS in E:T Ratio 5:1 mit und ohne Zugabe des therapeutischen Antikörpers ch14.18. Die NK-Klone wurden nach dem Memphis RL Modell wie folgt eingeteilt:

a+b) R/L mismatch: CD158a<sup>+</sup>; CD158e<sup>+</sup>; R/L match: CD158b<sup>+</sup>; KIR<sup>-</sup>

c+d) R/L mismatch: CD158e<sup>+</sup>; R/L match: CD158a<sup>+</sup>, CD158b<sup>+</sup>; KIR<sup>-</sup>

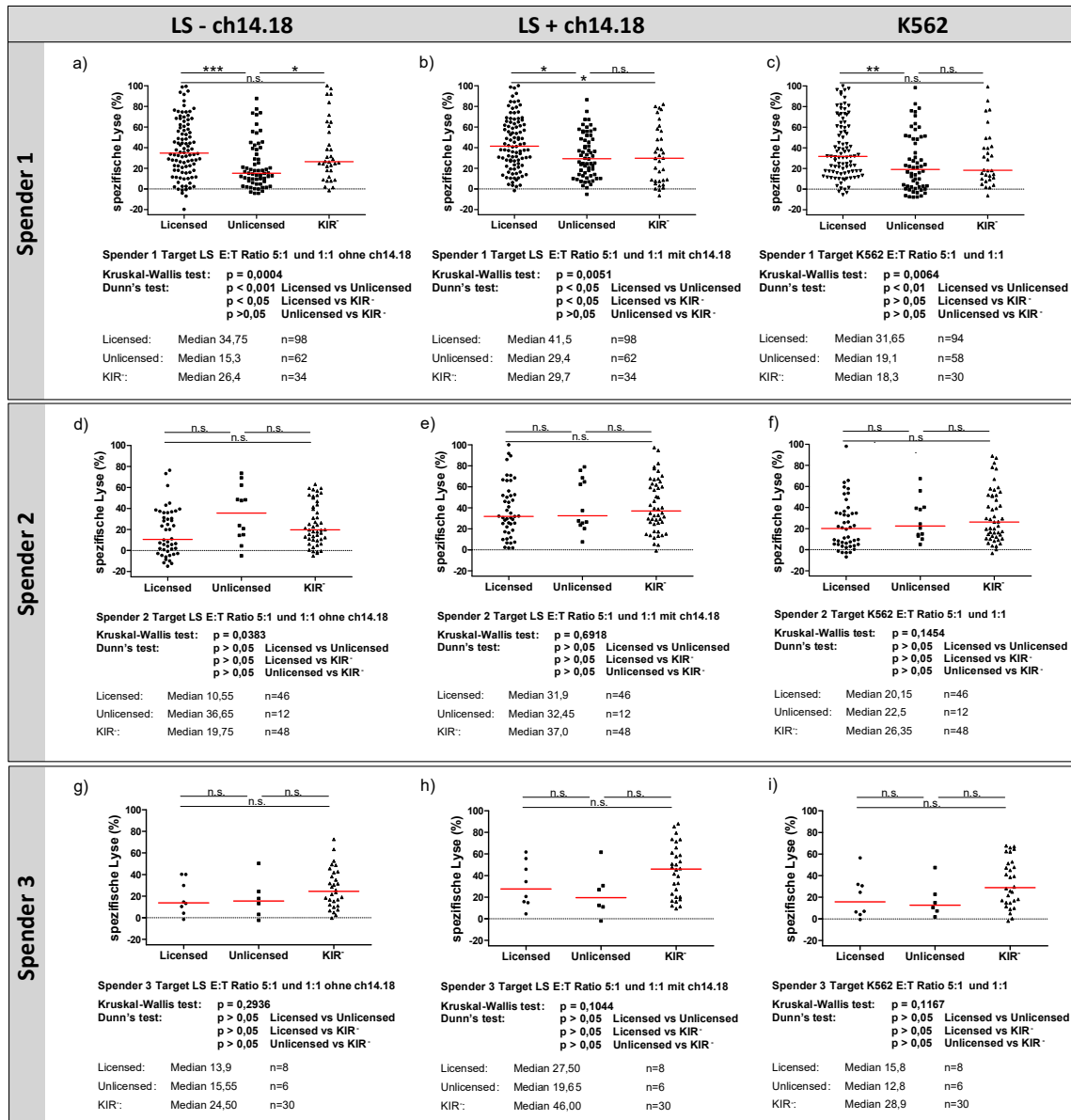
### 3.5.5 Zytotoxische Aktivität nach dem Licensing Modell

Nach dem Licensing Modell werden NK-Zellen während der Maturation durch Kontakt der KIR-Rezeptoren zum korrespondierenden körpereigenen HLA I Ligand maßgeblich in ihrer Reifung und Funktionalität beeinflusst und als „educated“ oder „licensed“ bezeichnet. NK-Zellen, die durch fehlende

Präsentation des korrespondierenden HLA I Ligand diesen Prozess nicht durchlaufen, werden als „uneducated“ oder „unlicensed“ klassifiziert. Spender 1 und 3 wiesen keinen Vertreter der HLA-Cw3 Gruppe auf, Spender 2 keinen der HLA-Cw4 Gruppe. Entsprechend des Licensing Modells sind demnach die CD158b<sup>+</sup> NK-Zellen der Spender 1 und 3 und die CD158a<sup>+</sup> NK-Zellen des Spenders 2 als „uneducated“ einzustufen. Zur Testung des Licensing Modells verglichen wir die NK-Funktionalität der „educated“ und „uneducated“ NK-Zellen gegenüber der Zelllinie K562 mit fehlender HLA I Expression und gegenüber der Zelllinie LS ohne und mit Zugabe von ch14.18.

Die „educated“ NK-Klone (CD158a<sup>+</sup>, CD158e<sup>+</sup>) des Spenders 1 zeigten eine signifikant höhere Lyse gegenüber K562 und LS als die „uneducated“ CD158b<sup>+</sup> NK-Klone. Weder für Spender 2 noch für Spender 3 fand sich ein signifikanter Unterschied der NK-Zell vermittelten Lyse der „educated“ und „uneducated“ NK-Klone gegenüber K562 und LS (**Abb. 3.27**).





**Abb. 3.27 Licensing Modell: NK-Zellvermittelte Lyse der Spender 1-3 gegenüber LS und K562**

Abgebildet ist die spezifische Lyse der NK-Zelleklone der Spender 1-3 gegenüber den Zelllinien und LS und K562 nach dem Licensing Modell. Die ersten Spalte (a,d,g) zeigt die Lyse gegenüber LS ohne Zugabe von ch14.18, die zweite Spalte (b,e,h) unter Zugabe von ch14.18 und die dritte Spalte (c,f,i) stellt die Lyse gegenüber K562 dar. Die NK-Zellklone wurden anhand ihres Phänotyps als „licensed“, „unlicensed“ oder KIR negativ klassifiziert. Zur statistischen Auswertung wurde der Kruskal-Wallis test und der Dunn's multiple comparison test verwendet.

a-c) Spender 1: Licensed: CD158a, CD158e; Unlicensed: CD158b; KIR-

d-f) Spender 2: Licensed: CD158b, CD158e; Unlicensed: CD158a; KIR-

g-i) Spender 3: Licensed: CD158a; Unlicensed: CD158b; KIR-

### 3.5.6 Zytotoxische Aktivität nach dem KIR-Genotyping Modell

Entgegen des KIR-Genotyping Modells zeigte Spender 1 (Haplotyp A) mit  $23,67 \pm 26,21\%$  die höchste spezifische Lyse gegenüber den Neuroblastomzelllinien LAN-1 und LS, gefolgt von Spender 3 (Haplotyp B1) mit  $16,7 \pm 18,3\%$  und Spender 2 (Haplotyp B1)  $14,46 \pm 20,04\%$ . Auch die CD158b single KIR<sup>+</sup> NK-Zellklone der KIR2DL2<sup>+</sup>/KIR2DS2<sup>+</sup> positiven Spender 2 und 3 zeigten keine signifikant höhere zytotoxische Aktivität als die des KIR2DL2<sup>-</sup>/KIR2DS2<sup>-</sup> negativen CD158b<sup>+</sup> NK-Zellklone des Spenders 1. Nach Zugabe von ch14.18 konnte kein signifikanter Unterschied der spezifischen Lyse zwischen den Spendern festgestellt werden (vgl. **Abb. 3.22**).

### 3.5.7 Echtzeitmessung der zytotoxischen Aktivität expandierter NK-Populationen

Zur Validierung der beschriebenen Ergebnisse im BATDA-Assay, testeten wir exemplarisch expandierte NK-Zellpopulationen gleichen Immunphänotyps mittels zweier weiterer Methoden, welche eine Echtzeitmessung der NK-Zellvermittelten Lyse über einen längeren Zeitraum hinweg ermöglichten.

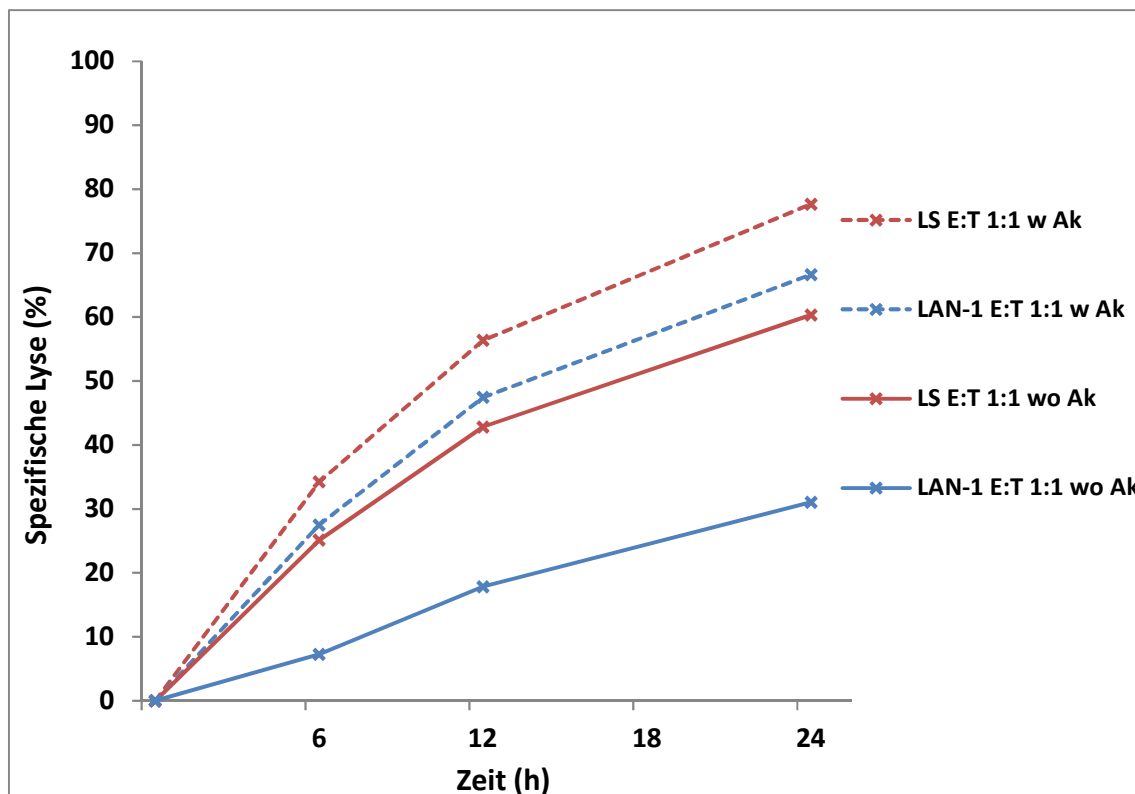
#### Luciferase-Assay

Neben der Testung expandierter NK-Zellklone definierten Immunphänotyps im 2 h BATDA-Release Assay erfolgte exemplarisch eine Testung von expandierten NK-Zellpopulationen gleichen Immunphänotyps der Spender 1-3 mittels eines enzymbasierten Luciferase-Assays über einen Zeitraum von 24 h. Bei diesem wurde die Lyse nach 6 h, 12 h und 24 h mit und ohne Zugabe des therapeutischen Antikörpers ch14.18 gemessen. In **Abb. 3.28** ist die zeitabhängige Lyse der NK-Zellpopulationen gegenüber LAN-1 und LS dargestellt. Entgegen der xCELLigence Messung (**Abb. 3.33**) wird ein Steady-State der Lyse im gemessenen Versuchszeitraum bei den verwendeten E:T Ratios nicht erreicht. Die stärkste Lysesteigerung verzeichnet sich jedoch in den ersten 12 h (**Abb. 3.28**).

Des Weiteren konnte, wie auch in den 2 h BATDA Release Assays (**Abb. 3.20**), gezeigt werden, dass die Zelllinie LS eine höhere spezifische Lyse aufwies als die Zelllinie LAN-1 (**Tab. 3.15**).

**Tab. 3.15 Luciferase-Assay: Zeitabhängige Lyse der NK-Zellpopulationen gegenüber LAN-1 und LS**  
Auflistung der in **Abb. 3.28** dargestellten mittleren Lysewerte nach 6 h, 12 h und 24 h der NK-Zellpopulationen dreier gesunder Spender gegenüber LAN-1 und LS in E:T 1:1 mit und ohne Zugabe des therapeutischen Antikörpers ch14.18.

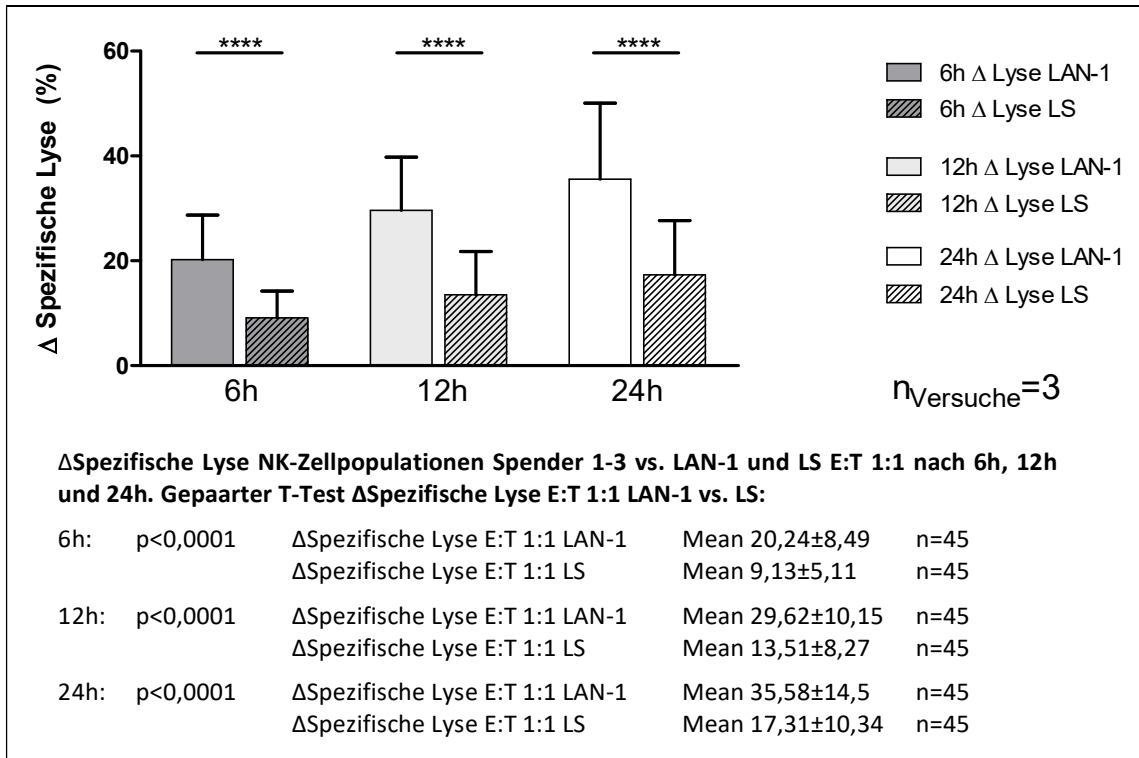
Zeit	LAN-1		LS	
	Mittelwert $\pm$ STABW ohne ch14.18 n=45	Mittelwert $\pm$ STABW mit ch14.18 n=45	Mittelwert $\pm$ STABW ohne ch14.18 n=45	Mittelwert $\pm$ STABW mit ch14.18 n=45
6h	7,27 $\pm$ 8,77	27,51 $\pm$ 13,19	25,14 $\pm$ 5,16	34,26 $\pm$ 7,02
12h	17,84 $\pm$ 12,16	47,47 $\pm$ 18,26	42,83 $\pm$ 15,27	56,37 $\pm$ 9,25
24h	31,07 $\pm$ 15,15	66,64 $\pm$ 23,14	60,32 $\pm$ 19,13	77,66 $\pm$ 10,90



**Abb. 3.28 Luciferase-Assay: Zeitabhängige Lyse expandierter NK-Zellpopulationen dreier gesunder Spender gegenüber LAN-1 und LS**

Dargestellt ist die im Luciferase-Assay gemessene spezifische Lyse der NK-Zellpopulationen dreier gesunder Spender gegenüber der Neuroblastomzelllinien LAN-1 und LS nach 6 h, 12 h und 24 h mit und ohne Zugabe des therapeutischen Antikörpers ch14.18 in der E:T Ratios 1:1.

Auch in der Luciferase-Testung zeigte sich eine signifikant höhere antikörpervermittelte Lysesteigerung der NK-Zellpopulationen zu jedem Messzeitpunkt gegenüber der Zelllinie LAN-1 verglichen mit der Zelllinie LS, wobei die zeitabhängige Dynamik in **Abb. 3.29** dargestellt ist.



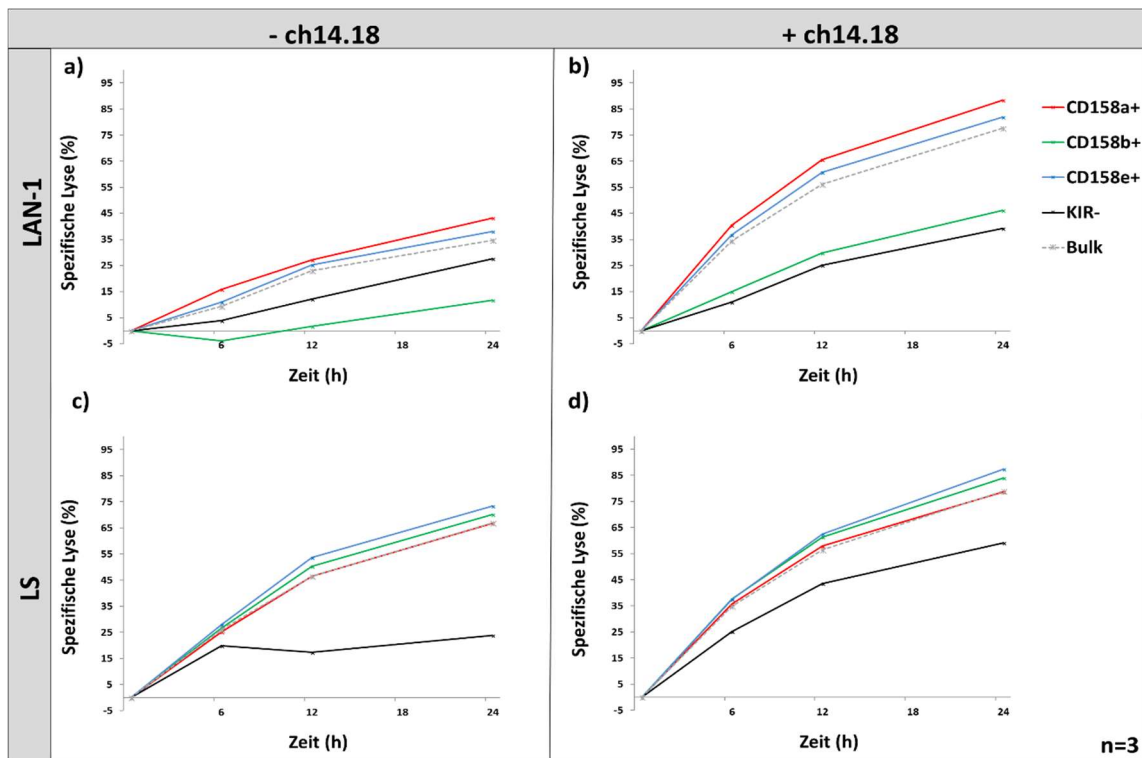
**Abb. 3.29** Zeitabhängige ch14.18 vermittelte ADCC expandierter NK-Zellpopulationen dreier gesunder Spender gegenüber LAN-1 und LS im Luciferase-Assay

Dargestellt ist die durch ch14.18 vermittelte absolute prozentuale Lysesteigerung der NK-Populationen dreier gesunder Spender gegenüber LAN-1 und LS in E:T-Ratio 1:1. Die Lysesteigerung wurde durch die Differenz der prozentualen Lysewerte der spezifischen Lyse in Abwesenheit und Gegenwart von ch14.18 berechnet und dargestellt ( $\Delta$  Spezifische Lyse).

**Tab. 3.16** Luciferase-Assay: Zeitabhängige Lyse definierter expandierter NK-Zellpopulationen dreier gesunder Spender gegenüber LAN-1 und LS mit und ohne Zugabe von ch14.18

Auflistung der in **Abb. 3.30** dargestellten mittleren Lysewerte nach 6h, 12h und 24h der NK-Zellpopulationen dreier gesunder Spender gegenüber LAN-1 und LS in E:T 1:1 mit und ohne Zugabe des therapeutischen Antikörpers ch14.18.

Zeit	NK-Zellpopulation	LAN-1		LS	
		Mittelwert ± STABW ohne ch14.18 n=9	Mittelwert ± STABW mit ch14.18 n=9	Mittelwert ± STABW ohne ch14.18 n=9	Mittelwert ± STABW mit ch14.18 n=9
6h	CD158a <sup>+</sup>	15,8±5,72	40,4±5,59	25,2±5,43	35,8±4,35
	CD158b <sup>+</sup>	-3,89±5,35	15,0±4,64	26,67±4,42	37,67±7,91
	CD158e <sup>+</sup>	11,0±5,59	36,8±4,82	28,0±4,72	37,6±4,03
	KIR <sup>-</sup>	4,0±6,30	11,0±6,40	19,9±4,76	25,1±3,95
	Bulk	9,4±6,0	34,3±4,53	26,0±3,57	34,9±5,84
12h	CD158a <sup>+</sup>	27,1±8,27	65,6±8,99	46,4±6,65	58,0±6,36
	CD158b <sup>+</sup>	1,8±5,93	29,9±5,37	50,3±6,89	61,3±9,22
	CD158e <sup>+</sup>	25,2±8,32	60,7±7,97	53,7±4,15	62,6±4,22
	KIR <sup>-</sup>	12,1±9,25	25,1±7,36	17,3±12,97	43,6±6,64
	Bulk	23,0±6,32	56,1±6,92	46,4±6,27	56,4±4,69
24h	CD158a <sup>+</sup>	43,2±12,40	88,3±14,58	66,8±1,99	78,7±2,65
	CD158b <sup>+</sup>	11,7±6,65	46,1±6,66	70,2±6,40	84,0±8,69
	CD158e <sup>+</sup>	38,1±14,08	81,9±13,72	73,4±1,42	87,4±1,24
	KIR <sup>-</sup>	27,7±8,60	39,2±8,86	23,9±6,57	59,1±4,11
	Bulk	34,7±10,87	77,7±13,17	67,0±3,5	79,0±2,69

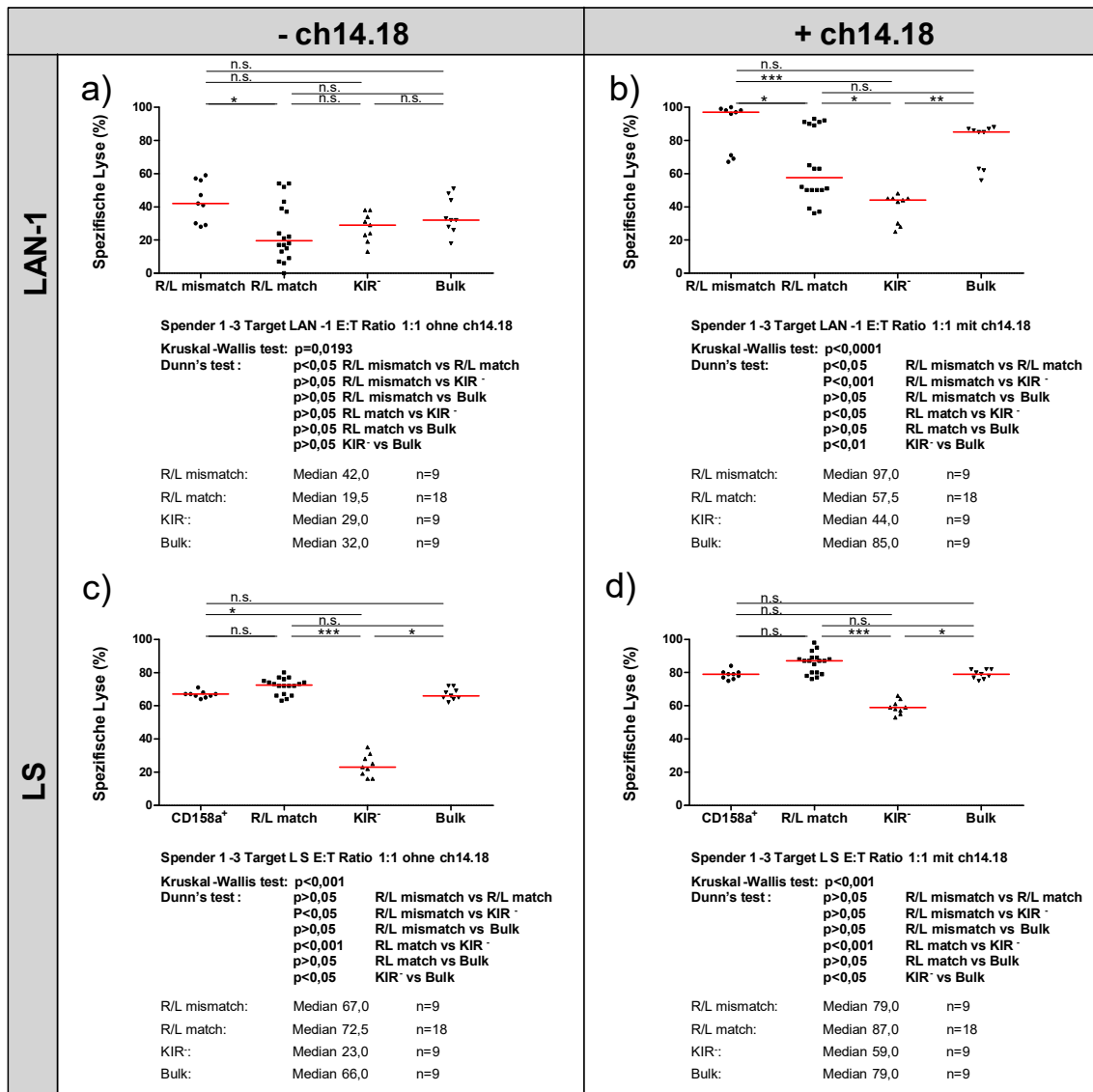


n=3

**Abb. 3.30 Luciferase-Assay: Zeitabhängige Lyse definierter expandierter NK-Zellpopulationen dreier gesunder Spender gegenüber LAN-1 und LS mit und ohne Zugabe von ch14.18**

Dargestellt ist die mittlere spezifische Lyse (**Tab. 3.16**) der NK-Zellpopulationen CD158a (rot), CD58b (grün), CD158e (blau) single KIR positiv, KIR<sup>-</sup> (schwarz) und Bulk-NK-Zellen (grau) der Spender 1-3 mit und ohne Zugabe des therapeutischen Antikörpers ch14.18 im Luciferase-Assay. Die Messung der BL erfolgte nach 6 h, 12 h und 24 h mit dem Luminometer Victor 1420 Multilabel Counter. Die Lyse wurde nach in **Kap. 2.17** beschriebenem Verfahren berechnet und die Kurvendiagramme in Microsoft Excel erstellt.

Die Auswertung der zytotoxischen Aktivität im Hinblick auf das Memphis RL Modell erfolgte bei der Luciferase-Testung äquivalent zu **Kap. 3.5.4**. Es wurde auch hier die Einteilung der NK-Zellpopulationen nach RL Match und Mismatch vorgenommen. Hierbei erfolgte die Auswertung nicht nur nach dem klassischen RL Modell, welches für die Einteilung allein die genetische HLA Typisierung heranzieht, sondern auch nach der in **Kap. 3.4.2** beschriebenen tatsächlichen HLA Expression auf den Tumorzelllinien im Sinne eines sogenannten „funktionellen“ Mismatch. Es zeigte sich auch hier eine signifikant höhere Lyse der NK-Zellpopulationen mit genetischem und funktionellem RL Mismatch gegenüber der Zelllinie LAN-1 verglichen mit den NK-Zellpopulationen ohne RL Mismatch (**Abb. 3.31+Abb. 3.32** vgl. **Abb. 3.25** und **Abb. 3.26**). Gegenüber LS fand sich bei der Luciferase Testung kein signifikanter Unterschied der single KIR<sup>+</sup> NK-Zellpopulationen CD158e<sup>+</sup> mit funktionellem RL Mismatch verglichen mit den übrigen single KIR<sup>+</sup> NK-Zellpopulationen (**Abb. 3.32**). Während die Bulk NK-Zellen ein ähnlich gutes Lysepotential aufwiesen wie die NK-Zellpopulationen mit RL Mismatch, zeigten die KIR negativen Populationen konsistent die niedrigsten Lysewerte (**Abb. 3.31** und **Abb. 3.32**).



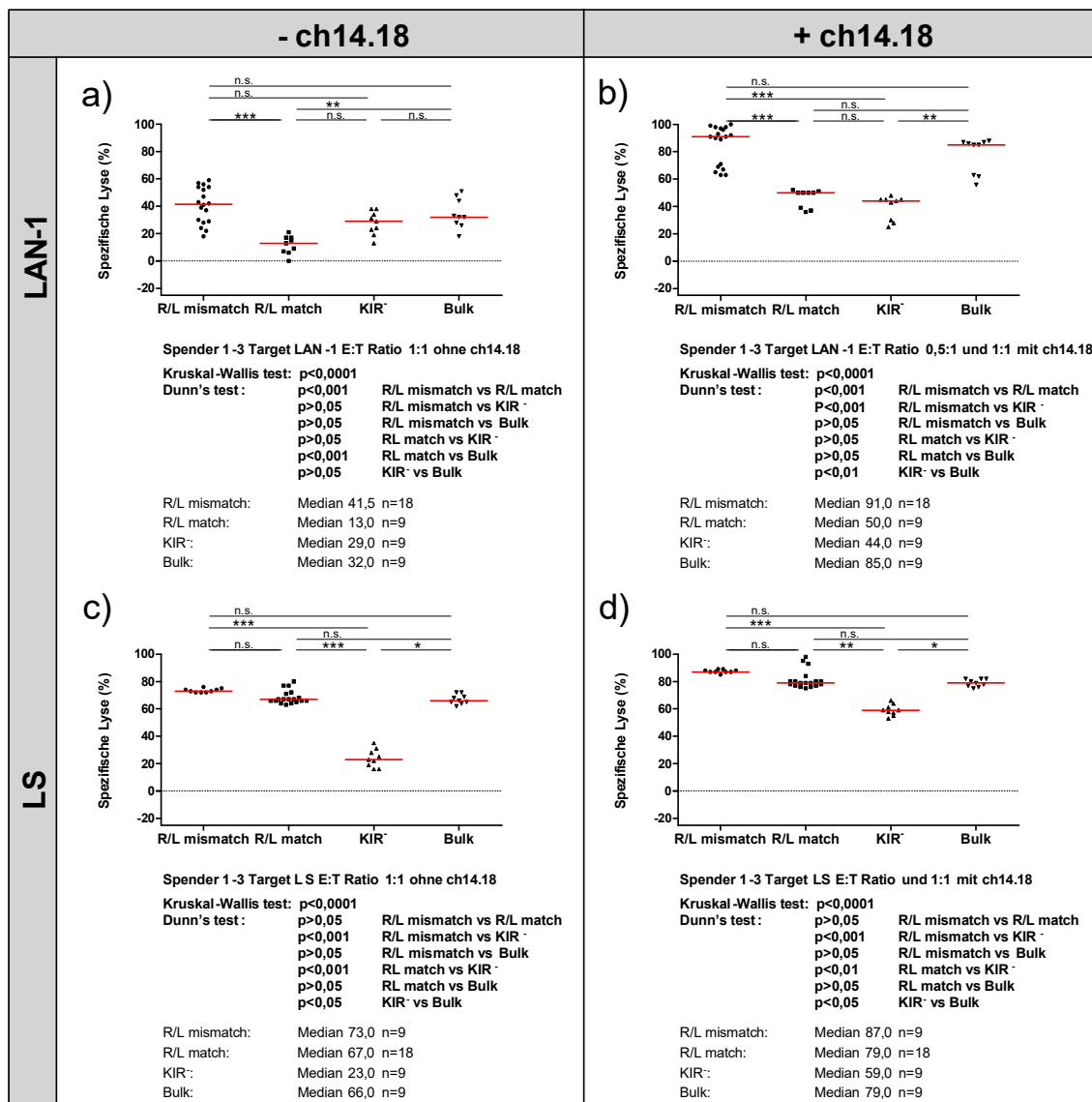
**Abb. 3.31 Luciferase-Assay: NK-Zell vermittelte Lyse der NK-Populationen dreier gesunder Spender gegenüber LAN-1 und LS (genetischer R/L match/mismatch)**

Dargestellt ist die spezifische Lyse der CD158a, CD158b, CD158e single KIR positiven und KIR negativen NK-Zellpopulation der Spender 1-3 im Luciferase Assay gegenüber LAN-1 und LS in E:T Ratio 1:1 nach 24 h mit und ohne Zugabe des therapeutischen Antikörpers ch14.18. Die NK-Populationen wurden nach dem Memphis RL Modell wie folgt eingeteilt:

a+b) R/L mismatch: CD158a<sup>+</sup>; R/L match: CD158b<sup>+</sup>, CD158e<sup>+</sup>; KIR<sup>-</sup>

c+d) CD158a<sup>+</sup>; R/L match: CD158a<sup>+</sup>, CD158b<sup>+</sup>, CD158e<sup>+</sup>; KIR<sup>-</sup>

Die Messung der BL erfolgte mit dem Luminometer Victor 1420 Multilabel Counter. Die Lyse wurde nach in **Kap. 2.17** beschriebenem Verfahren berechnet und als Scatter Plots in GraphGraphPad Prism 5 dargestellt.



**Abb. 3.32 Luciferase-Assay: NK-Zell vermittelte Lyse der NK-Populationen gegenüber LAN-1 und LS (funktionelle R/L match/mismatch)**

Dargestellt ist die spezifische Lyse der CD158a, CD158b, CD158e single positiven und KIR negativen NK-Zellpopulation der Spender 1-3 im Luciferase Assay gegenüber LAN-1 und LS in E:T Ratio 1:1 nach 24h mit und ohne Zugabe des therapeutischen Antikörpers ch14.18. Die NK-Populationen wurden nach dem Memphis RL Modell wie folgt eingeteilt:

a+b) R/L mismatch: CD158a<sup>+</sup>; CD158e<sup>+</sup>; R/L match: CD158b<sup>+</sup>; KIR<sup>-</sup>; Bulk

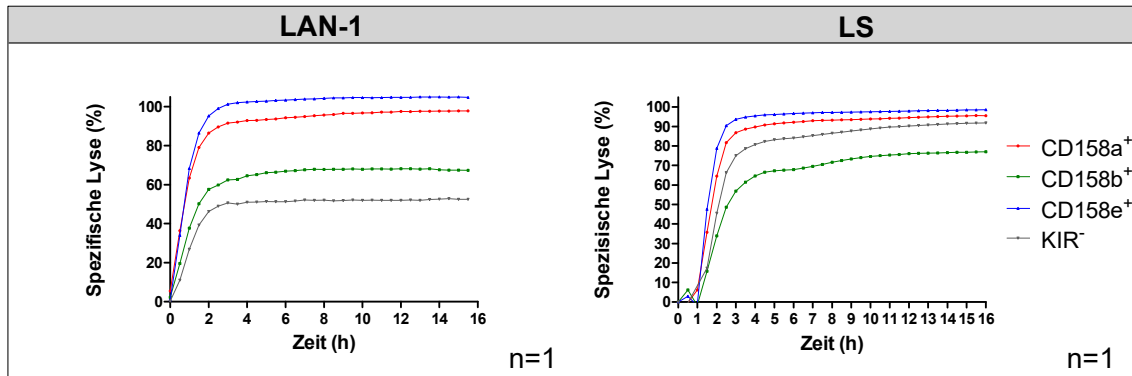
c+d) R/L mismatch: CD158e<sup>+</sup>; R/L match: CD158a<sup>+</sup>, CD158b<sup>+</sup>; KIR<sup>-</sup>; Bulk

Die Messung der BL erfolgte mit dem Luminometer Victor 1420 Multilabel Counter. Die Lyse wurde nach in **Kap. 2.17** beschriebenem Verfahren berechnet und als Scatter Plots in GraphGraphPad Prism 5 dargestellt.



## xCELLigence

Die xCELLigence-Testung wurde mit expandierten NK-Zellpopulationen des Spenders 1 gegenüber den Zelllinien LAN-1 und LS durchgeführt. Nach Zugabe der Effektorzellen wurde halbstündlich der Zellindex über einen Zeitraum von 16 Stunden gemessen und daraus die spezifische Lyse berechnet (**Kap. 2.16**). Wie in **Abb. 3.33** dargestellt, fand eine exponentielle Steigerung der NK-Zellvermittelten Lyse bei einer E:T Ratio von 5:1 im Wesentlichen innerhalb der ersten zwei Stunden statt und erreichte dann gegenüber LAN-1 und LS ein Steady State. Die xCELLigence Testung zeigte einen deutlichen Unterschied der RL Mismatched NK-Zellpopulationen CD158a<sup>+</sup> und CD158e<sup>+</sup> zu der RL Matched Population CD158b<sup>+</sup> gegenüber der Zelllinie LAN-1. Um diesen besser quantifizieren zu können, berechneten wir die  $\Delta$ Lyse der RL Mismatched Population CD158a<sup>+</sup> und RL Matched Population CD158b<sup>+</sup> gegenüber LAN-1 im Steady State und verglichen diese mittels gepaartem t-Test mit dem Lyseunterschied der gleichen Populationen gegenüber LS ( $n_{\text{Messwerte } 2\text{h-16h}}=28$ ). Der Lyseunterschied dieser Populationen gegenüber LAN-1 erwies sich signifikant höher verglichen mit LS ( $p<0,0001$  LAN-1  $\Delta$ Lyse  $28,8\pm 1,0\%$   $n_{\text{Messwerte}}=28$  vs. LS  $\Delta$ Lyse  $21,7\pm 3,9\%$   $n_{\text{Messwerte}}=28$ ). Unter Zugabe von ch14.18 lysierten alle NK-Zellpopulationen die Zelllinien LAN-1 und LS zu 100% (E:T Ratio 5:1).



**Abb. 3.33 Exemplarische xCELLigence Testung definierter NK-Zellpopulationen des Spenders 1 ohne ch14.18 gegenüber der Zelllinie LAN-1 und LS**

Das xCELLigence-System ermöglicht eine Echtzeitmessung der NK-Zellvermittelten Lyse adhärenter Tumorzelllinien wie LAN-1 und LS (**Kap. 2.16**). Dargestellt ist die spezifische Lyse durchflusszytometrisch gesorteter und expandierter NK-Zellpopulation des Spenders 1 mit dem Immunphänotyp CD158a, CD158b, CD158e single KIR positiv und KIR negativ über einen Messzeitraum von 16 Stunden. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit der RTCA Software, mit welcher die Daten auf den Zeitpunkt der Effektorzellzugabe normalisiert wurden. Zu jedem Messpunkt wurde der Mittelwert des normalisierten CI der technischen Quartette gebildet und prozentual zum Mittelwert der Kontrolle angegeben und als spezifische Lyse abgebildet.

### 3.5.8 CD107a-Assay- Indirekte Messung der zytotoxischen Aktivität expandierter NK-Zellen

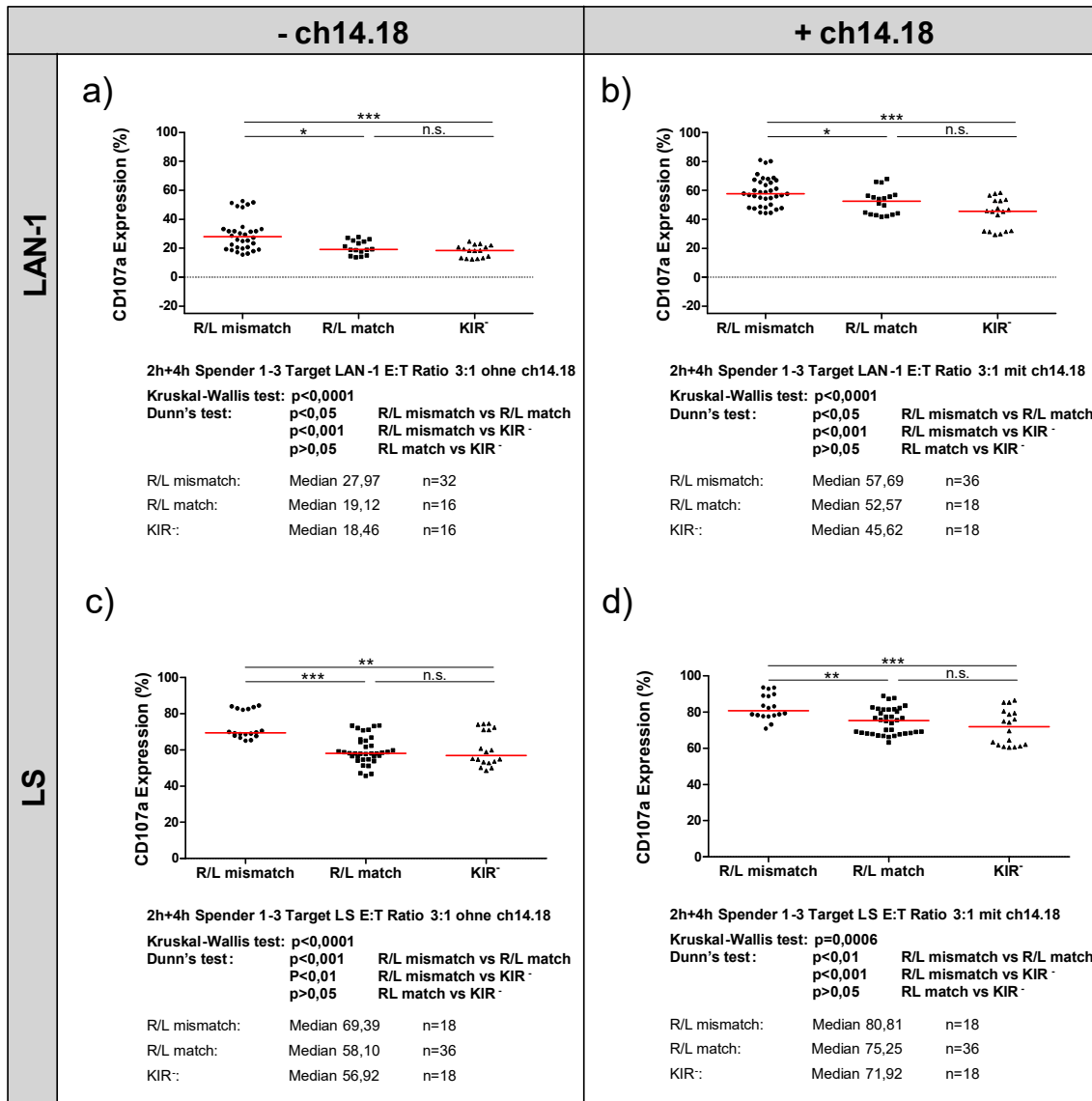
Exemplarisch erfolgte auch die Durchführung eines CD107a Assays mit expandierten Bulk NK-Zellen der drei gesunden Spender und den Neuroblastomzelllinien LAN-1 und LS mit und ohne Zugabe des therapeutischen Antikörpers ch14.18

CD107a ist ein Marker der NK-Zell Aktivierung, welcher durch Fusion zytoplasmatischer Vesikel mit Granzym und Perforin auf der NK-Zelloberfläche erscheint und mittels fluoreszenzmarkiertem CD107a -AK durchflusszytometrisch gemessen werden kann. Im Gegensatz zu den klassischen Zytotoxizitäts-Assays wird hierbei nicht direkt die Tumorzelllyse, sondern die NK-Zellaktivierung gemessen, welche mit dem Tumorzelllyse korreliert [107].

Die Auswertung der zytotoxischen Aktivität im Hinblick auf das Memphis RL Modell erfolgte beim CD107a-Assay äquivalent zu **Kap. 3.5.4**. Es wurde auch

hier die Einteilung der NK-Zellfraktionen nach RL Match und Mismatch vorgenommen. Wobei die Auswertung nicht nur nach dem klassischen RL Modell erfolgte, welches für die Einteilung allein die genetische HLA Typisierung heranzieht, sondern auch die in **Kap. 3.4.2** beschriebene tatsächlichen HLA Expression auf den Tumorzelllinien berücksichtigt wurde im Sinne eines sogenannten „funktionellen“ Mismatch.

Auch hier zeigte sich eine signifikant höhere CD107a-Expression der NK-Zellfraktionen mit RL Mismatch verglichen mit den NK-Zellfraktionen mit RL match (**Abb. 3.34**).



**Abb. 3.34 CD107a-Assay: NK-Zellvermittelte Lyse der expandierter NK-Zellen gegenüber LAN-1 und LS (funktionelle R/L match/mismatch)**

Dargestellt ist die prozentuale CD107a-Expression der CD158a, CD158b, CD158e single KIR positiven und KIR negativen NK-Zellfraktion expandierter Bulk NK-Zellen der Spender 1-3 gegenüber LAN-1 und LS in E:T Ratio 3:1 nach 2 h und 4 h mit und ohne Zugabe des therapeutischen Antikörpers ch14.18. Die NK-Populationen wurden nach dem Memphis RL Modell wie folgt eingeteilt:

a+b) R/L mismatch: CD158a<sup>+</sup>; CD158e<sup>+</sup>; R/L match: CD158b<sup>+</sup>; KIR<sup>-</sup>; Bulk

c+d) R/L mismatch: CD158e<sup>+</sup>; R/L match: CD158a<sup>+</sup>, CD158b<sup>+</sup>; KIR<sup>-</sup>; Bulk

Die Messung erfolgte mittels BD™ LSR II Flow Cytometer und die Auswertung mit FCS Express 5.0 durch Berechnung des prozentualen Anteils der CD107a positiven NK-Zellen der jeweiligen Fraktion.

## 4 Diskussion

### 4.1 NK-Zell Suszeptibilität solider Tumore/ Antitumoraktivität von NK-Zellen

Die NK-Zell vermittelte Immunantwort ist ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunabwehr virusinfizierter und entarteter Zellen. Die NK-Zell Aktivität wird hierbei durch ein komplexes Zusammenspiel zahlreicher aktivierender, inhibierender und costimulatorischer Rezeptoren und deren korrespondierenden Liganden auf der Zelloberfläche gesunder und entarteter Zellen beeinflusst [108]. Aus der Summe dieser hierarchischen und vielschichtigen Signale ergibt sich entweder eine Aktivierung oder Hemmung der NK-Zelle [109].

NK-Zellen können entartete Zellen anhand reduzierter HLA I Expression (missing self) und gesteigerter Expression von NKG2D (induced self), DNAM1 und anderer aktivierender Liganden erkennen und Apoptose induzieren [15, 40, 41, 60]. Einige der genannten Eigenschaften treffen auch auf solide Tumore wie beispielsweise das Osteosarkom, Nierenzellkarzinom, Melanom, Lungenkarzinom sowie auf das im Fokus dieser Arbeit stehende Neuroblastom zu und machen sie dadurch zu einem guten Ziel für NK basierte Immuntherapien [110-112].

Ein weiterer Erkennungsmechanismus, welcher darüber hinaus auch das zytotoxische Potential der NK-Zellen steigert, liegt in der Markierung der Zielzelle mit Antikörpern, die an Oberflächenmoleküle auf Tumorzellen binden. Da es sich nicht um exklusive Antigene handelt, werden auch gesunde Zellen, die das Antigen exprimieren erkannt, was zu unerwünschten Nebenwirkungen führt [113, 114]. Die gebundenen Antikörper auf der Zelloberfläche der Tumorzellen werden durch Fc-Rezeptoren abgegriffen. Auf NK Zellen wird der FcγIIIa Rezeptor CD16 exprimiert, der ein starkes aktivierendes Signal vermittelt und zur Lyse markierter Zielzellen führen kann [61].

So gibt es bereits zahlreiche therapeutische Antikörper in der klinischen Anwendung, die durch relativ selektive Markierung von Tumorzellen die zielgerichtete Immunantwort durch NK Zellen ermöglichen und damit die NK-Zelltherapie verbessern [115-118]. Beispielsweise stellt die GD2 Antikörpertherapie mittlerweile eine der Grundsäulen der Neuroblastomtherapie bei Hochrisikopatienten dar [11]. GD2 ist hier nicht nur eine vielversprechende Zielstruktur bei der Behandlung des Neuroblastoms. Vielmehr konnte eine gesteigerte Expression auch auf Melanomen, Osteosarkomen und kleinzelligen Lungenkarzinomen gezeigt werden [79, 119, 120].

## 4.2 Expansion und Charakterisierung des Zellprodukts

Das neu etablierte Expansionsprotokoll gewährleistete eine stabile Expansion von NK-Zellklonen mit prädefiniertem KIR-Immunphänotyp. Dies war die Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche funktionelle Testung und Untersuchung von KIR Match und Mismatch Situationen, wie sie beispielsweise im Rahmen der allogenen-, insbesondere der haploidenten SZT auftreten können. Hierfür wurden single KIR positive und KIR negative NK-Zellklone auf ihre Lysefähigkeit gegenüber den Neuroblastomzelllinien LAN-1 und LS verglichen. Um das alloreaktive Potential der NK-Zellklone nach Expansion zu bestätigen, untersuchten wir die NK-Zellklone auch auf ihre Zytotoxizität gegenüber dem empfindlichen NK-Zell Target K562. Hyporesponsive NK-Zellklone wurden so nach den in **Kap. 3.5** beschriebenen Kriterien von der Auswertung ausgeschlossen.

Durch die durchflusszytometrische Zellsortierung sowie anschließende NK-Expansion konnte eine hervorragende Reinheit des Zellprodukts mit einem T-Zellanteil von im Median 0,0% erreicht werden (**Abb. 3.3 + Abb. 3.5**), sodass eine Beeinflussung der zytotoxischen Austestung der NK-Zellklone durch eine T-Zell vermittelte Alloreaktivität ausgeschlossen werden konnte. Ein Expansionszeitraum von 3-6 Wochen war erforderlich, um eine ausreichende Zellzahl für die funktionelle Testung zu generieren.

Nach Expansion unter Zytokinstimulation mit IL2, mbIL15 und mb41-BBL fielen die NK-Zellklone durch eine gesteigerte CD56 Expression (CD56<sup>bright</sup>) und KIR-Expression auf (siehe **Abb. 3.2** und **Abb. 3.4**). Dies entspricht unter anderem den Beobachtungen von Peragine et. al, welche zusätzlich noch eine Hochregulation aktivierender Rezeptoren für NKG2D und DNAM1 gezeigt haben [121]. So wurde dies auch in einer Vorläuferarbeit unserer Arbeitsgruppe bestätigt [106]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression aktivierender Rezeptoren zwar nicht untersucht, es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass die beschriebene Expressionssteigerung dieser Rezeptoren einen Einfluss auf die Lysefähigkeit der getesteten NK-Zellklone hatte.

Entgegen der *in vivo* beschriebenen immunmodulatorischen Funktion der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen, zeichnen sich expandierte CD56<sup>bright</sup> NK-Zellklone durch eine hohe zytotoxische Funktionalität aus und unterscheiden sich von immunregulatorischen NK-Zellen durch die Expression von CD16 [50, 84, 121]. Es ist davon auszugehen, dass durch die veränderten Milieufaktoren unter Zytokinstimulation *in vitro* das veränderte genetische Expressionsprofil und somit der veränderte NK-Zell Phänotyp wenig gemeinsam hat mit der *in vivo* Population der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen [84].

Nach CD3 Depletion und nachfolgender Verdünnung und zufälliger Klonaussaat entsprach die immunphänotypische Verteilung der gewachsenen Klone weitestgehend dem KIR-Repertoire frischer PBMCs des entsprechenden Spenders. Die durchflusszytometrische Zellsortierung bietet deshalb gegenüber dieser Methode den Vorteil, dass NK-Zellklone, deren Immunphänotyp im KIR-Repertoire des Spenders selten vertreten ist, in ausreichender Anzahl generiert werden können. Nach Expansion, der mittels durchflusszytometrischer Zellsortierung generierten NK-Zellklone, exprimierten 96% der gewachsenen Klone auch den gesorteten Rezeptor. Ein nicht unerheblicher Teil der NK-Zellklone, wies jedoch nach Expansion noch einen zusätzlichen KIR-Rezeptor auf. Das KIR-Expressionsmuster ausgereifter NK-Zellen erweist sich *in vivo* und *in vitro* als recht stabil [122]. Neben methodischen Ursachen, könnte dieses Phänomen möglicherweise in der Aussaat noch unreifer NK-Zellen, welche zum

Zeitpunkt der durchflusszytometrischen Zellsortierung noch nicht ihren endgültigen Immunphänotyp aufwiesen, begründet liegen [123]. In der vorliegenden Studie wurden bei der Generierung der NK-Zellklone Reifemarker wie CD57, CD86, CD69 nicht berücksichtigt, sodass eine genauere Differenzierung des Reifegrads, der zur Aussaat verwendeten NK-Zellen, nicht möglich ist [33, 124]. Auch eine sequentielle Expression der KIR-Rezeptoren ist denkbar [125]. So hat sich gezeigt, dass KIR negative NK-Zellen unter IL2 und IL15 Stimulation ihren Immunphänotyp zu KIR<sup>+</sup> ändern können [126, 127]. Gemäß **Abb. 3.9** fielen 36,4% der auf CD158a gesorteten NK-Zellklone durch eine fehlende KIR-Expression nach Expansion auf. Hier scheinen methodische Ursachen am wahrscheinlichsten, da alle betroffenen NK-Zellklone einem Expansionszyklus entstammten und keine Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse für die folgenden Expansionszyklen vorlag.

### **4.3 Mediatoren der NK-Zell vermittelten Lyse**

#### **4.3.1 HLA Klasse I Expression**

Ein Mechanismus vieler Tumorentitäten, der Überwachung des Immunsystems zu entgehen, besteht in der Herunterregulation der HLA I Expression. Hierdurch können sie teilweise der T-Zellerkennung entgehen, werden aber gleichzeitig zum besseren NK-Zell Target [40]. Neuroblastome wiesen in zahlreichen Untersuchungen eine geringe oder nicht nachweisbare HLA-Klasse I Expression auf und stellen aus diesem Grund generell ein gutes NK-Zelltarget dar [128, 129]. So wurde gezeigt, dass eine Hochregulation von HLA-Klasse I auf unterschiedlichen Targets in einer verminderten und eine Herunterregulierung in einer erhöhten NK-Zell Suszeptibilität resultierte [130, 131]. Überdies fanden Pfeiffer et al. eine direkte Korrelation zwischen Quantität der HLA Klasse I Expression pädiatrischer Vorläufer B-ALL Blasten und deren Lysierbarkeit durch NK-Zellen [105]. Eine solche Korrelation konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Die quantitative Analyse, der verwendeten Neuroblastomzelllinien LAN-1 und LS, ergab erwartungsgemäß eine sehr niedrige HLA-Klasse I Expression beider



Zelllinien. Interessanterweise fiel die Zelllinie LS, trotz höherer HLA-Klasse I Expression, durch eine signifikant bessere Lysierbarkeit als die Zelllinie LAN-1 auf. Aufgrund der generierten NK vermittelten Lysedaten in dieser Arbeit ist davon auszugehen, dass die HLA I Expression die Lyse beeinflusst hat. Dies wird insbesondere auf single KIR Ebene deutlich. Der Vergleich der Lysedaten von LAN-1 und LS legt allerdings nahe, dass andere aktivierende Einflussfaktoren eine übergeordnete Rolle in der Aktivierung von NK-Zellen und Lyse der Neuroblastomzelllinien gespielt haben. Diese wurden in Form der Expression aktivierender Liganden und Adhäsionsmoleküle untersucht (siehe **Kap. 13.4.3**) und als ausschlaggebender für die unterschiedliche Suszeptibilität gewertet [132-134].

Für diese These spricht, dass die Kontrollzelllinie K562 mit nahezu keiner HLA-Klasse I Expression bei gleichzeitig ähnlicher oder gar höherer Expression aktivierender Liganden und Adhäsionsmoleküle als LS nicht signifikant besser lysiert wurde als diese (**Abb. 3.20**).

Die semiquantitative Analyse der HLA-Bw4 Expression auf den Zelllinien LAN-1 und LS ergab des Weiteren eine Inkongruenz zwischen HLA Genotypisierung und der tatsächlichen Expression der entsprechenden HLA-Bw4 Liganden. Es bestand somit eine Diskrepanz zwischen dem Immunophänotyp und dem Genotyp. Die laut Genotypisierung (HLA I Typisierung) positiven Zelllinien exprimierten kein HLA-Bw4. Dies wurde bereits für die Zelllinie LAN-1 von Tarek et al. gezeigt [79].

Das herkömmliche RL Modell, welches sich bei der Vorhersage von RL Matches und Mismatches alleinig auf die HLA-Genotypisierung des Empfängers bzw. der Tumorzellen verließ, erwies sich hier als zu ungenau und könnte durch eine Genexpressionsanalyse, RNA Sequenzierung oder direkten Nachweis der entsprechenden HLA Liganden auf der Zelloberfläche der Tumorzellen erweitert werden [135].

#### **4.3.2 GD2 Expression und ADCC**

Das Glykolipid GD2 findet sich auf Geweben neuroektodermalen Ursprungs und ist eines der wichtigsten immunologischen Zielstrukturen in der

Antikörpertherapie des Neuroblastoms und vieler anderer Tumorerkrankungen [27]. GD2 stellt ein exzellentes Antigen für eine gezielte Immuntherapie dar, da es zum einen unabhängig vom Stadium der Erkrankung von nahezu allen Neuroblastomen hoch exprimiert wird, während gesundes Gewebe eine sehr niedrige Expressionsdichte aufweist [114]. Zum anderen erfolgt keine Internalisierung des Antigens unter Antikörpertherapie, da es sich nicht um einen aktiven Internalisierungsprozess handelt wie z.B. bei Rezeptoren (CD3, CD19 oder CD22) [24, 136, 137].

Bei der Antikörper basierten Immuntherapie scheint neben der Affinität und Spezifität des Antikörpers auch die Expressionsdichte des Antigens einen Einfluss auf die Effektivität der ADCC zu haben [138].

Aus diesem Grund haben wir in der vorliegenden Arbeit die semiquantitative Expression von GD2 auf den Neuroblastomzelllinien LAN-1 und LS untersucht und die absolute Lysesteigerung der NK-Zellklone unter Zugabe des chimären therapeutischen GD2 Antikörpers ch14.18 ermittelt.

Erwartungsgemäß zeigten beide Neuroblastomzelllinien eine hohe GD2 Expression, wobei LAN-1 eine höhere Expression aufwies als LS (**Abb. 3.18**). Auch die absolute Lysesteigerung durch ADCC war bei LAN-1 signifikant höher als bei LS (**Abb. 3.21**). Die höhere delta-Lyse könnte auf die höhere GD2 Expression zurückzuführen sein [139]. Es ist davon auszugehen, dass die absolute Lysekapazität der NK-Zellen gegenüber dem sehr suszeptiblen Target LS weit ausgeschöpft wurde und hierdurch das diagnostische Fenster für den spezifischen Antikörpereffekt eingeschränkt wurde. Um einen direkten Zusammenhang zwischen ADCC und Quantität der GD2 Expression zu zeigen, könnte in einer zukünftigen Studie die ADCC unter einer titrierten Blockade der GD2 Moleküle auf den Tumorzellen getestet werden.

Erfreulicherweise nivellierten sich die spenderspezifischen Unterschiede der NK-Zell vermittelten Lyse unter Zugabe von ch14.18 (**Abb. 3.22**). Dies lässt darauf schließen, dass selbst Patienten mit geringer intrinsischer NK Aktivität von der Antikörpertherapie, neben der Komplement vermittelten Lyse auch von der ADCC profitieren könnten. Weniger leicht aktivierbare NK Zellen können somit für eine zielgerichtete Immuntherapie rekrutiert werden. Dies könnte in der

Situation nach Stammzelltransplantation einen großen Vorteil bieten, um den Zeitpunkt der minimalen Tumorlast optimal immunologisch auszunutzen [11].

Die GD2 Antikörpertherapie stellt mittlerweile eine der Grundsäulen der Neuroblastomtherapie bei Hochrisikopatienten dar. Yu et al. untersuchten in einer Phase III Studie 226 Hochrisiko Neuroblastompatienten nach myeloablativer Chemotherapie mit folgender autologer SZT. Ein Arm der Studie erhielt die Standardkonsolidierungstherapie mit Retinoiden, der andere Arm erhielt zusätzlich ch14.18, GM-CSF und IL2. Die mit Immuntherapie behandelten Patienten beeindruckten durch ein um 20% verbessertes ereignisfreies Überleben über einen Beobachtungszeitraum von 2 Jahren. Unpublizierte Daten der klinischen Phase II Studie NCT02258815 (Peter Lang, Universitätskinderklinik Tübingen) zeigen ein 5-Jahres-Überleben von >50% bei Patienten in kompletter Remission vor haploidenter SZT mit nachfolgender GD2-Antikörpertherapie (ch14.18) in Kombination mit IL2, verglichen mit 23% nach alleiniger haploidenter SZT [18].

Nichtsdestotrotz ist die Therapie oft nicht ausreichend wirksam und darüber hinaus mit dosislimitierenden schwerwiegenden Nebenwirkungen wie Schmerzen, Fieber, Blutdruckentgleisungen und Capillary-Leak Syndrom verbunden [11]. Daher ist es notwendig, neue alternative Therapieansätze zu verfolgen und die bestehenden Therapieprotokolle weiter zu verbessern.

Auch genetische Polymorphismen, welche die Affinität der ADCC vermittelnden Rezeptoren FCGR2A und FCGR3A (CD16) verändern, scheinen einen Einfluss auf die Wirksamkeit einer Immuntherapie mit ch14.18 zu haben. Genotypen mit hoher Rezeptoraffinität zeigten ein höheres ADCC Level und ein besseres ereignisfreies Überleben als Genotypen mit niedriger Rezeptoraffinität. Dieser Effekt trat noch deutlicher bei Patienten mit KIR Haplotyp B hervor [140].

#### **4.3.3 Adhäsionsmoleküle**

Adhäsionsmoleküle sind bedeutend für den Zell-Zell Kontakt. Die Moleküle CD54 und CD58 sind außerdem dafür bekannt, Liganden aktivierender Co-Rezeptoren auf NK-Zellen zu sein und die Suszeptibilität von Neuroblastomzellen gegenüber

NK-Zellen beeinflussen zu können [62]. Untersuchungen frisch isolierter Tumorproben ergab bei Stadium IV Neuroblastomen keine Expression von CD54 und CD58, bei Stadium I-III Neuroblastomen konnte zum Teil eine Expression nachgewiesen werden, was auf einen Zusammenhang zwischen Differenzierungsgrad des Tumors und Expression dieser Adhäsionsmoleküle hinwies [63, 64].

In dieser Studie untersuchten wir die Expression der Adhäsionsmoleküle CD11a (LFA-1), CD50 (ICAM-3), CD54 (ICAM-1) und CD58 (LFA-3) auf den Neuroblastomzelllinien LAN-1 und LS-1. Die Zelllinien exprimierten weder CD11a noch CD50. Beide fielen jedoch durch eine vergleichbar hohe Expression von CD58 auf. LAN-1 zeigte keine und LS eine niedrig positive CD54 Expression, wobei LS zwei Populationen, eine niedrig und eine hochpositive Fraktion CD54 positiver Zellen aufwies.

Neben anderen Faktoren könnte die Expression von CD54 auf der Zelllinie LS eine Bedeutung für deren höhere Lysierbarkeit im Vergleich mit der Zelllinie LAN-1 haben [141].

#### **4.3.4 NKG2D Liganden**

Stressinduzierte NKG2D Liganden werden insbesondere von kranken und entarteten Zellen exprimiert.

Es fand sich eine höhere Expression der aktivierenden NKG2D-Liganden MIC A/B, ULBP-2/5/6 und ULBP-1 auf der Zelllinie LS als auf der Zelllinie LAN-1.

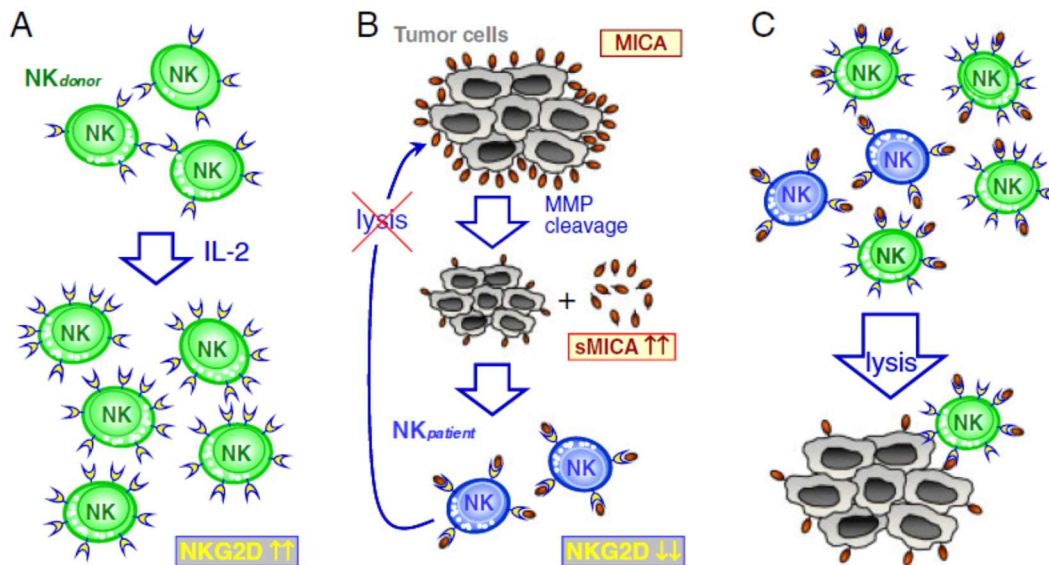
Die tatsächliche NK-zellvermittelte Lyse einer Tumorzelle ist abhängig vom Zusammenspiel aktivierender und hemmender Signale. Überwiegen die proaktivierenden Signale, welche mitunter durch NKG2D Rezeptoren und andere aktivierende Natural Cytotoxicity Receptors (NCRs) vermittelt werden können, kommt es zur Formation einer zytolytischen Synapse und Lyse der Tumorzelle [56, 142]. Die Aktivierung von NK Zellen durch NKG2D Rezeptor-Ligand Interaktion scheint im Fall von niedrig HLA Klasse I exprimierenden Tumoren der Inhibition durch HLA Klasse I zu überwiegen, denn trotz relativ erhöhter HLA Klasse I Expression war LS wesentlich stärker suszeptibel für eine NK-vermittelte

Lyse. Dies wurde von unserer Arbeitsgruppe auch bei HLA Klasse I hoch-exprimierenden Tumoren wie der AML gezeigt [132].

Die gesteigerte Zytotoxizität expandierter IL2 stimulierter NK-Zellen gegenüber nativen NK-Zellen beruht, wie in der Literatur beschrieben, auf einer gesteigerten Expression aktivierender Rezeptoren [143].

Wie auch andere Tumorentitäten entkommt das Neuroblastom durch zahlreiche Mechanismen der Überwachung des Immunsystems.

Dabei scheint insbesondere MICA eine übergeordnete Rolle zu spielen, das in löslicher Form als soluble MICA (sMICA) erhöht im Plasma von Patienten unterschiedlicher Tumorerkrankungen - so auch bei Neuroblastompatienten gefunden wurde [144]. Es wird angenommen, dass sMICA auf zwei unterschiedliche Arten die Aktivität von NK-Zellen beeinflussen kann. Zum einen wird bei hohen Plasmaspiegeln von sMICA eine Abnahme von NKG2D Rezeptoren auf NK-Zellen beobachtet, was eine reduzierte Zytotoxizität zur Folge hat. Zum anderen scheint die Zell-Zell-Interaktion durch Besetzung der NKG2D Bindungsstellen mit löslichem sMICA blockiert zu sein und hierdurch wird wiederum die Ausbildung einer zytolytischen Synapse behindert [144]. Bei einer Untersuchung von Neuroblastompatienten nach haploidenter SZT fand sich eine inverse Korrelation der antitumoralen NK-Zell Funktionalität gegenüber der Neuroblastomzelllinie UKF-NB-3 und der Plasmakonzentration löslichen MICAs. Ein lohnender Ansatz die Effektivität einer zellbasierten Immuntherapie mit Spender NK-Zellen zu steigern, bestünde laut Kloess et al. in einer effektiveren Neutralisation von sMICA. Durch Anwendung von IL2 könnte die Steigerung der NKG2D Rezeptorexpression expandierter Spender NK-Zellen sowie die Transfusion einer großen Anzahl aktivierter NK-Zellen zu einer verbesserten Tumorerkennung und Lyse führen, um den Resistenzmechanismus der sMICA Sekretion durch eine verbesserte sMICA Clearance zu durchbrechen (**Abb. 4.1**) [145]. Erwähnenswert bleibt jedoch, dass auf frisch isolierten Neuroblastomzellen im Gegensatz zu vielen Neuroblastomzelllinien kein MICA auf der Oberfläche exprimiert ist und somit der tatsächliche Einfluss einer besseren sMICA Clearance *in vivo* fraglich bleibt [144].



**Abb. 4.1 Optimierung der NK-zellbasierten Immuntherapie durch Neutralisation von sMICA**

Dargestellt in A) ist die gesteigerte Expression von NKG2D Rezeptoren auf NK-Zellen durch IL2 Stimulation. B) Zeigt die Freisetzung von sMICA durch Tumorzellen, welche eine Reduktion der NKG2D Rezeptorexpression induziert. Die verminderte NKG2D Rezeptorexpression zusammen mit der Blockade der verbliebenen Bindungsstellen bewirkt eine verminderte Lyse der Tumorzellen. C) Die Gabe von IL2 stimulierte Spender NK-Zellen in hoher Anzahl führt durch gesteigerte NKG2D Rezeptorexpression zu einer Neutralisation von sMICA. Die verbliebenen NK-Zellen können folglich unbeeinträchtigt von sMICA ihr zytotoxisches Potential entfalten. (aus Kloess et al. 2010, *European Journal of Immunology*) [145]

#### 4.3.5 DNAM-1 Liganden

Die höhere Expression der untersuchten DNAM-1 Liganden CD155 (PVR) und CD112 (Nectin-2) auf der Zelllinie LS im Vergleich zur Zelllinie LAN-1, könnte die gesteigerte NK-Suszeptibilität von LS beeinflussen.

Castriconi et al. fanden einen Zusammenhang zwischen der NK-Zellvermittelten Lyse frisch isolierter Neuroblastomzellen und deren CD155 Expression. Klinisch wiesen insbesondere Patienten mit Neuroblastom Rezidiv eine fehlende Expression von DNAM-1 Liganden auf, was auf einen Immune Escape Mechanismus refraktärer Neuroblastome hinweist [104].

Demzufolge stellt CD155 ein weiteres interessantes Zielantigen für die Entwicklung neuer Immuntherapien dar. Folglich könnte eine bessere NK-Suszeptibilität durch eine Induktion aktivierender NKG2D und DNAM-1 Liganden

auf den Tumorzellen erreicht werden.

Nicht zu vernachlässigen ist jedoch, dass aktivierende Liganden wie CD155 (PVR) und CD112 (Nectin-2) keine tumorspezifischen Antigene darstellen, sondern auch auf neuronalem, epithelialem, endothelialem und fibroblastischem Gewebe zu finden sind und somit durch eine Induktion der betreffenden Liganden eine massive On-Target Off-Tumor Toxizität gegen gesundes Gewebe auslösen könnte [146].

#### **4.4 Einfluss der NK-Alloreaktivitätsmodelle auf die Lysierbarkeit der Neuroblastomzelllinien LAN-1 und LS**

Die beschriebenen Alloreaktivitätsmodelle dienen der Vorhersage der Aktivität von NK-Zellen unter Berücksichtigung unterschiedlicher Faktoren. Durch das zunehmende molekulare Verständnis wurden diese Modelle in den letzten Jahren fortlaufend ergänzt und weiterentwickelt. Sie bieten eine gute vereinfachte Möglichkeit, in vielen Fällen die Alloreaktivität von NK-Zellen zutreffend vorherzusagen und gewinnen als Teilaspekt zunehmend Bedeutung für die Spenderauswahl bei der HSCT. Allerdings gelangen sie auch durch das komplexe vielschichtige Regulationssystem der NK-Zellaktivität an ihre Grenzen.

Im Folgenden werden die Modelle im Kontext der im Fokus dieser Arbeit stehenden experimentellen Daten diskutiert.

##### **4.4.1 Anwendung des Ligand-Ligand Modells**

Das von der Perugia-Gruppe beschriebene LL Modell zur Vorhersage der NK-Zell Alloreaktivität bezeichnet zeitlich das erste der Modelle und ist folglich das Vorläufermodell des präziseren RL Modells [67].

Ein LL Match liegt vor, wenn sowohl Spender als auch Empfänger den gleichen HLA Liganden kodieren. Ein LL Mismatch in Graft-versus-Host Richtung bedeutet, dass beim Spender ein HLA Ligand vorliegt, der vom Empfänger nicht kodiert wird. Von Interesse sind hierbei die HLA I Liganden der Gruppen Cw3, Cw4, Bw4 sowie HLA A3/11, die nachweislich für die Steuerung von NK-Zellen durch KIR Rezeptoren von übergeordneter Bedeutung sind [67, 68].

In dieser Studie besteht nach dem LL Modell ein LL Mismatch der Spender 1 und 3 zur Zelllinie LAN-1 nicht jedoch zur Zelllinie LS. Bei der Anwendung des Modells muss jedoch berücksichtigt werden, dass das Studiendesign auf die Austestung des RL Modells ausgelegt war und nicht auf die des LL Modells. Die Vorhersage der NK-Zell Alloreaktivität eines Spenders basiert im LL Modell auf der natürlichen Verteilung der KIR-Rezeptoren innerhalb der Bulk NK-Zellen [67]. Durch die selektive Expansion prädefinierter NK-Zellklone, spiegelt die Gesamtheit der getesteten Klone nicht mehr diese natürliche Verteilung der NK-Zellen mit den zu den HLA I Liganden korrespondierenden KIR-Rezeptoren innerhalb der Bulk NK-Zellen wider und ist folglich für die Anwendung des Modells nicht geeignet.

Aus diesem Grund erfolgte die exemplarische Testung von expandierten Bulk NK-Zellen aller drei Spender im Luciferase- und CD107a-Assay. Es verzeichneten sich zwar, wie in **Abb. 3.23** und **Abb. 3.24** dargestellt, signifikante spenderspezifische Unterschiede. Diese waren jedoch unabhängig von der verwendeten Zelllinie und somit auch unabhängig vom Vorliegen eines LL Mismatches.

Eine Schwäche des LL Modells besteht darin, dass vom HLA Klasse I Ligand auf das KIR-Repertoire geschlossen wird. Die Vorhersage nach dem LL Modell ist jedoch nicht immer zutreffend, da die Vererbung der HLA Klasse I Liganden und die des KIR-Genotyps unabhängig voneinander erfolgt [56]. Der KIR-Genotyp ist auf Chromosom 19, die KIR-Liganden sind auf Chromosom 6 lokalisiert. Somit besteht die Möglichkeit, dass ein Spender trotz vorhandenem HLA Klasse I Ligand den zugehörigen KIR-Rezeptor nicht exprimiert und umgekehrt. In diesen Fällen wird die Vorhersage entsprechend des LL Modells jedoch fehlerhaft [56, 68]. Leung et al. zeigte, dass 24-36%, in einer anderen Studie von Hsu et al. bis zu 63% [68, 147] der untersuchten Spender einen der drei prädominanten KIR-Rezeptoren CD158a, CD158b oder CD158e aufweisen können, ohne den korrespondierenden HLA Klasse I Liganden zu tragen. Umgekehrt trugen nur 0-8% der Spender einen HLA Klasse I Liganden ohne korrespondierenden KIR-Rezeptor [68]. Diese Verteilung spiegelte sich auch in den Spendern unserer



Studie wider. Die Cw4 negativen Spender 1 und 3 und der Cw3 negative Spender 2 wiesen in ihrem KIR-Repertoire trotzdem alle drei Major KIR Rezeptoren CD158a, CD158b und CD158e auf. Stochastisch gesehen erklärt Letzteres, warum das LL Modell in bis zu einem Drittel der Fälle im Sinne der Rezeptorinteraktion nicht zutreffend sein kann.

Durch eine direkte Untersuchung der KIR-Expression der Spender NK-Zellen zusammen mit der HLA-Typisierung des Empfängers besitzt das RL Modell, wie im folgenden Kapitel beschrieben, eine höhere Prädiktionskraft als das LL Modell [56, 68].

#### 4.4.2 Anwendung des Rezeptor-Ligand Modells

Entsprechend des RL Modells liegt ein Mismatch vor, wenn zum KIR-Rezeptor des Spenders kein korrespondierender HLA Ligand des Empfängers vorhanden ist [68]. Neben der HLA-Typisierung der untersuchten Neuroblastomzelllinien LAN-1 und LS berücksichtigten wir bei der Auswertung auch die semiquantitative Expression bestimmter KIR Liganden auf Zellebene und unterteilten in einen genetischen Mismatch und funktionellen Mismatch. Ein genetischer Mismatch besteht zwischen der Cw4 negativen Zelllinie LAN-1 und CD158a single KIR positiven NK-Zellen aller Spender. Bei der Untersuchung der semiquantitativen HLA Klasse I Expression stellte sich heraus, dass sowohl LAN-1 als auch LS kein HLA Bw4 exprimieren und somit auf Zellebene ein funktioneller Mismatch der beiden Zelllinien und den CD158e single KIR positiven NK-Zellen der Spender vorlag (**Abb. 3.11**). Die fehlenden HLA-Bw4 Expression wurde bereits für LAN-1 in einer Arbeit von Tarek et al. 2012 beschrieben [79].

Die Auswertung der durchgeführten BATDA-Release Assays erfolgte konsekutiv sowohl nach genetischem als auch nach funktionellem Mismatch und zeigte eine signifikant bessere Lyse der single KIR positiven NK-Zellen mit RL Mismatch gegenüber der NK-Zellklone ohne RL Mismatch (**Abb. 3.25** und **Abb. 3.26**). Diese Ergebnisse wurden zusätzlich durch drei weitere Methoden zur Erfassung der Zytotoxizität bestätigt. Sowohl die Luciferase-Assays als auch die xCELLigence-Testung und die CD107a-Assays zeigten einen Vorteil der NK-

Populationen mit RL-Mismatch gegenüber den Populationen ohne Mismatch (**Abb. 3.31;Abb. 3.32; Abb. 3.33;**

**Abb. 3.34).**

Das herkömmliche RL Modell erweist sich in bestimmten Fällen als zu ungenau, da die Vorhersage eines RL Matches oder Mismatches auf der HLA-Genotypisierung des Empfängers und der Tumorzellen beruht. Wie in unseren Untersuchungen gezeigt wurde, kann jedoch eine Diskrepanz zwischen Immunphänotyp und genetischer HLA I Typisierung vorliegen. Der Verlust genetischen Materials auf Proteinebene wurde bereits für viele verschiedene Tumorentitäten demonstriert, die HLA Expression mit inbegriffen [40]. Diese Diskrepanz führt zu einem funktionellen Mismatch, der auf Rezeptorebene ebenbürtig ist mit einem fehlenden HLA Merkmal auf genetischer Ebene und ohne Berücksichtigung der Proteinexpression unerkannt bliebe.

#### **4.4.3 Anwendung des KIR-Genotyping Modells**

Die KIR-Gene werden zwar unabhängig von den HLA-Merkmalen vererbt, weisen jedoch genau wie diese vielfältige Polymorphismen auf. Hierbei treten bestimmte KIR Gene häufig auf, andere selten und verleihen so jedem Menschen ein individuelles KIR Expressionsmuster [148]. Im KIR-Genotyping Modell wird das molekulare Aktivierungspotential der KIR Gene subsummiert. Es wird berücksichtigt, dass die NK-Zell Alloreaktivität mitunter durch die Anzahl aktivierender KIR-Rezeptoren eines Spenders beeinflusst wird. Eine Einteilung der Spender erfolgt in zwei Gruppen, KIR Haplotyp A und Haplotyp B. Während der KIR Haplotyp A als einziges aktivierendes Gen KIR2DS4 trägt, kodiert der Haplotyp B zusätzlich für KIR2DS1 und/oder KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS5. Ein KIR Haplotyp B Spender weist somit auf genetischer Ebene eine höhere Anzahl aktivierender KIR Rezeptoren auf als ein KIR Haplotyp A Spender. Es wird folglich eine gesteigerte Alloreaktivität von NK-Zellen angenommen, die eine größere Vielfalt an aktivierenden KIR-Rezeptoren tragen und mit korrespondierenden Liganden auf Tumorzellen interagieren können [73].

Sollte das KIR Genotyping Modell *in vitro* in unserem Experimentaufbau nachweisbar sein, müssten zumindest in der Summe, Haplotyp B Spender eine gesteigerte Lyse gegenüber Haplotyp A Spendern aufweisen.

Entgegen der Vorhersage des KIR-Genotyping Modells zeigten in unserer Studie jedoch NK-Zellklone des Spenders 1 (Haplotyp A) die höchste spezifische Lyse gegenüber den Neuroblastomzelllinien LAN-1 und LS, gefolgt von Spender 3 (Haplotyp B1) und Spender 2 (Haplotyp B1). Nach Zugabe von ch14.18 konnte kein signifikanter Unterschied der spezifischen Lyse zwischen den Spendern festgestellt werden, (vgl. **Abb. 3.22**). Bei der Bewertung der dargestellten Daten muss jedoch berücksichtigt werden, dass sich das Modell zur Vorhersage der NK-Zell Alloreaktivität auf die natürliche Verteilung der KIR-Expression innerhalb der Bulk NK-Zellen bezieht, welche hier durch die Expansion zytokinstimulierter NK-Zellklone prädefinierten Immunphänotyps außer Kraft gesetzt wurde. Jedoch zeigte auch die exemplarische Testung expandierter Bulk NK-Zellen im CD107a Assay als auch im Luciferase-Assay zwar spenderspezifische Unterschiede, jedoch keine konsistent bessere Lyse der Spender mit Haplotyp B1 (vgl. **Abb. 3.23** und **Abb. 3.24**) unter diesen artifiziellen Bedingungen.

Hemmende und aktivierende KIR-Rezeptoren unterscheiden sich nur unwesentlich in ihrer extrazellulären Bindungsdomäne, sodass eine Differenzierung der Rezeptoren durch die zur Immunphänotypisierung verwendeten gängigen immunfluoreszenzmarkierten Antikörper nicht möglich ist [149]. Der wesentliche Unterschied inhibierender und aktivierender KIR-Rezeptoren ist die zytoplasmatische Signaldomäne, die entweder ein aktivierendes Signal über ITAM oder inhibierendes Signal über ITIM vermittelt (**Kap. 1.3.2**) [150].

In dieser Arbeit fand sich kein signifikanter Lyseunterschied der CD158b single KIR<sup>+</sup> NK-Zellklone der KIR2DS2 positiven Spender 2 und 3 zum KIR2DS2 negativen Spender 1 (**Abb. 3.22**). Der für die Immunphänotypisierung verwendete Antikörper bindet jedoch sowohl KIR2DS2 als auch KIR2DL2, sodass eine Aussage über die tatsächliche Expressionsverteilung hemmender

und aktivierender KIR2D Rezeptoren auf den CD158b<sup>+</sup> NK-Zellklone unklar bleibt [151, 152].

#### 4.4.4 Anwendung des Licensing Modells

Neben zahlreichen anderen Milieufaktoren ist die Erkennung körpereigener Zellen im Maturationsprozess der NK-Zellen maßgeblich für deren spätere NK-Zellfunktionalität verantwortlich. Das Licensing ist Teil dieses Reifungsprozesses und beschreibt die Interaktion körpereigener HLA Liganden durch den korrespondierenden KIR-Rezeptor der NK-Zellen *in vivo* während der NK-Maturation. Diese NK-Zellen bezeichnet man als „licensed“ oder „educated“. Wird kein passender HLA Ligand kodiert, bleibt dieser Maturationsschritt aus und die NK-Zelle gilt als „unlicensed“ oder „uneducated“ und somit immunologisch hyporesponsiv [153, 154]. Wie Tarek et al. jedoch in *in vitro* Versuchen mit Neuroblastomzelllinien zeigten, kann dieser hyporesponsive Zustand der uneducated NK-Zellen durch proaktivierende Signale wie bei der ADCC überwunden werden. Überdies wird durch Hochregulierung von HLA I Liganden sogar eine Umkehr der zu erwartenden NK Alloreaktivität entsprechend des Licensing Modells beobachtet. Interessanterweise scheint die HLA I Interaktion bei educated NK Zellen mit dem korrespondierenden KIR zu einer stärkeren Hemmung der NK Zellen zu führen, d.h. hyporesponsive unlicensed NK-Zellen erreichen unter bestimmten Konditionen sogar eine höhere Aktivität als licensed NK-Zellen. Insbesondere in Kombination mit Antikörpern wie z.B. ch14.18 können die ansonsten hyporesponsiven NK-Zellen durch die fehlende Inhibition leichter in einen aktivierten Zustand überführt werden und eine Zytolyse induzieren [79].

In dieser Arbeit konnte keine eindeutige Aussage über das Licensing Modell getroffen werden - so zeigten zwar „educated“ NK-Klone (CD158a<sup>+</sup>, CD158e<sup>+</sup>) des Spenders 1 - entsprechend des Licensing Modells, eine signifikant höhere Lyse gegenüber K562 und LS als die „uneducated“ CD158b<sup>+</sup> NK-Klone. Dies galt jedoch nicht für Spender 2 und Spender 3 (**Abb. 3.27**). Auch kam es unter Zugabe von ch14.18 gegenüber der Zelllinie LS zu keiner Umkehr des Licensing Modells mit Überlegenheit der unlicensed NK-Zellen wie

bei Tarek et al. beschrieben (**Abb. 3.27**). Allerdings verzichteten wir auf eine Modifikation/Steigerung der HLA-Expression der verwendeten Zelllinien durch IFN $\gamma$  Stimulation, wie dies in oben genannter Studie erfolgte [79]. Zusammenfassend gilt jedoch zu beachten, dass das Studiendesign nicht für die Austestung des Licensing Modells konzipiert war. Das *in vitro* Milieu der NK-Zellexpansion unterschied sich durch den Einsatz proinflammatorischer Zytokine wie IL2 sowie Stimulation durch K562-mb15-41BBL und zahlreicher anderer Faktoren maßgeblich vom *in vivo* Milieu natürlicher NK-Zellreifung und den Untersuchungsbedingungen, unter welchen dieser Mechanismus von Tarke et al. beschrieben wurden [79]. Dies könnte mitunter ein Grund für die fehlende Übereinstimmung der NK-Alloreaktivität nach dem Licensing Modell und Aufhebung der funktionalen Unterschiede zwischen „licensed“ und „unlicensed“ NK-Zellen sein.

Der Licensing Prozess ist ein komplexer und noch nicht vollständig verstandener Vorgang der NK-Zellreifung, bei dem zahlreiche bekannte und unbekannte Faktoren eine Rolle spielen. So wurde festgestellt, dass sich die CD158e<sup>+</sup> NK-Zellen Bw4/Bw4 homozygoter Spender gegenüber Bw4/Bw6 heterozygoter Spender durch ein höheres Lysepotential auszeichnen. Als Ursache hierfür wurde der Einfluss von Gendosiseffekten auf die Avidität der Rezeptor-Ligand-Bindungen sowie auf das Licensing von NK-Zellen diskutiert [155]. Auch in unseren Untersuchungen fielen insbesondere die CD158e<sup>+</sup> NK-Zellklone des Bw4/Bw4 homozygoten Spenders 1 durch eine höhere Zytotoxizität gegenüber allen getesteten Zelllinien - verglichen mit den entsprechenden NK-Zellklonen des Bw4/Bw6 heterozygoten Spenders 2 - auf (**Abb. 3.22 e**).

#### **4.5 Klinischer Einfluss der Alloreaktivitätsmodelle und Implikation zur Spenderauswahl bei alloHSCT**

Für den im Rahmen von haploidenten Stammzelltransplantationen bei hämatologischen Erkrankungen, wie der kindlichen ALL und AML beschriebenen Graft-versus-Leukemia Effekt, werden aufgrund der frühen Rekonstitution nach HSCT insbesondere alloreaktive NK-Zellen verantwortlich gemacht [18, 20, 100, 156]. Im Hinblick auf die Behandlung solider Tumore wie des Neuroblastoms gibt

es zahlreiche Anhaltspunkte/Fallberichte, dass ein vergleichbarer Graft-versus-Tumor Effekt auch einen relevanten klinischen Einfluss auf den Krankheitsverlauf und die Prognose von Patienten mit fortgeschrittenem Neuroblastom haben könnte, jedoch sind in diesem Bereich weitere klinische Studien zur Evaluation erforderlich [18, 156-158].

Im Folgenden wird genauer auf die verschiedenen Alloreaktivitätsmodelle mit Fokus auf ihren klinischen Einfluss und mögliche Bedeutung für die Spenderauswahl bei allogenen HSCT eingegangen.

#### **4.5.1 Klinischer Einfluss des Ligand-Ligand Modells**

Ausgehend von Beobachtungen bei haploident transplantierten adulten AML und CML Patienten mit gesteigerter NK-Alloreaktivität bei LL Mismatch in Graft-versus-Host Richtung, entwickelte die Perugia-Gruppe das LL Model [100].

Die von Ruggeri et al. 2002 in Science veröffentlichte Studie untersuchte adulte ALL und AML Patienten nach haploidenter SZT. Während für die adulte ALL kein besseres Gesamtüberleben bei LL Mismatch gezeigt werden konnte, traf das Gegenteil für die AML zu. Die 5-Jahres Rezidivrate betrug bei Patienten mit LL Mismatch 0%, während diese bei Patienten mit HLA kompatiblen Spender bei 75% lag. Patienten mit LL Mismatch zeigten außerdem keine Abstoßung des Grafts und keine GVHD. In multivariaten Datenanalysen wurden bedeutende Einflussfaktoren auf den Transplantationserfolg wie beispielsweise das Konditionierungsregime, Anzahl der Stammzellen und T-Zellen im Transplantat und das Erkrankungsstadium bei Transplantation untersucht. Hierbei wurde als einziger unabhängiger Prädiktor die KIR Ligand-Inkompatibilität in Graft-versus-Host Richtung für das Überleben von AML Patienten ermittelt [67]. Diese Hypothese wurde durch eine spätere Studie der Perugia-Gruppe mit einer größeren Studienkohorte von 112 AML-Patienten nach haploidenter HSCT weiter gefestigt. Die Studienkohorte umfasste 61 Patienten in kompletter Remission CR, sowie 51 Patienten im bestehenden Rezidiv, welche allesamt eine haploidente SZT erhielten. NK alloreaktive Spender wiesen alle einen KIR Ligand Mismatch, den korrespondierenden KIR-Rezeptor für den fehlenden Liganden beim

Empfänger sowie nachweisbare alloreaktive NK-Zell auf. Patienten in morphologischer Remission, die von NK-alloreaktiven Spendern transplantiert wurden, beeindruckten gegenüber Patienten in morphologischer Remission, die von Spendern transplantiert wurden mit LL Match, d.h. ohne alloreaktive NK Zellen entsprechend dieses Modells, mit einer signifikant niedrigeren Rezidivrate (3% vs. 47%). Des Weiteren wurde bei LL Mismatch transplantierten Patienten ein besseres ereignisfreies Überleben im Rezidiv (34% vs. 6%) und damit auch besseres Gesamtüberleben beobachtet [19].

Diese Ergebnisse werden jedoch weiterhin kontrovers diskutiert, da zahlreiche Studien anderer Forschergruppen zum Teil gegenteilige Ergebnisse hervorbrachten, welche keinen oder gar einen nachteiligen Einfluss eines LL Mismatch auf das Überleben der Patienten zeigten [56, 159]. Die Studien unterschieden sich jedoch durch zahlreiche Faktoren wie beispielsweise durch die Art der Transplantation (haploidente HSCT vs. allogene Transplantation nicht verwandter Spender), der Spenderauswahl, dem Konditionierungsregime sowie Anzahl der Stammzellen und T-Zellen im Transplantat.

Bislang gibt es nur wenige Daten bezüglich solider Tumore wie das Neuroblastom. Die bislang größte Phase I/II Studie mit Einschluss von insgesamt 26 Neuroblastompatienten im fortgeschrittenen Stadium fand keinen signifikanten Einfluss eines LL Mismatches auf die Rezidivwahrscheinlichkeit nach haploidenter HSCT. Ursächlich hierfür könnten allerdings auch eine Maskierung des Effekts durch eine hohe Tumorlast bei den meisten Studienteilnehmern und eine eingeschränkte statistische Aussagekraft aufgrund der kleinen Patientenkohorte sein [18].

Zusammenfassend erweist sich zwar das LL Modell als leicht anwendbar, da lediglich die HLA I Typisierung des Spenders und Empfängers erforderlich sind, jedoch scheint das Modell zu ungenau zur Spenderauswahl, da der Rückschluss von HLA-Liganden auf das KIR-Repertoire zwar wie in **Kap. 4.4.1** beschrieben stochastisch gesehen zutreffen kann, jedoch nicht immer zutrifft und alleine hierdurch die Qualität des Modells und damit die Wertigkeit in der Spenderauswahl für den Patienten eingeschränkt ist.

#### 4.5.2 Klinischer Einfluss des Rezeptor-Ligand Modells

Der Einfluss des RL Modells wurde bereits in mehreren Studien neben hämatologischen Erkrankungen wie der kindlichen AML und ALL auch für solide Tumoren wie Osteosarkome, Neuroblastome und Ewing-Sarkome bestätigt [20, 68, 160, 161]. Das Modell ist nicht nur, wie anfänglich von Ruggeri et al. postuliert, im allogenen sondern auch im autologen Setting anwendbar. So zeigten Hochrisiko Neuroblastompatienten mit RL Mismatch nach autologer HSCT ein signifikant besseres Überleben als Patienten ohne Mismatch [162, 163]. In dieser groß angelegten Studie mit 169 Patienten nach autologer HSCT beeindruckten Patienten mit RL Mismatch durch ein um 46% reduziertes Mortalitätsrisiko und um 34% reduziertes Progressionsrisiko im Vergleich zu Patienten mit RL Match über einen Beobachtungszeitraum von 3 Jahren.

Bei der Anwendung des RL Modells im autologen Setting kommt es zu einer Überschneidung des Modells mit dem Licensing Modell. Per Definition handelt es sich hier bei den NK-Zellen mit RL Mismatch gleichzeitig aufgrund der fehlenden HLA-Interaktion während der NK-Zellreifung um unlicensed/uneducated NK-Zellen [79, 163]. Die Mehrzahl der Patienten erhielt in dieser Studie eine GD2-Antikörpertherapie. Aufgrund der bekannten Mechanismen, die educated bzw. uneducated NK Zellen in einen Aktivitätszustand bringen, ist es plausibel, dass die Trias aus hochinflammatorischem Milieu durch den Tumor und den eingesetzten GD2-Antikörper im Zusammenhang einer Stammzelltransplantation dazu beitragen kann, hyporesponsive unlicensed NK-Zellen mit einem RL Mismatch leichter und effektiver gegen den Tumor zu richten als educated NK Zellen, die durch zahlenmäßig überlegene, inhibierende KIR-Rezeptoren ein prädominant-hemmendes Signal erhalten. Bereits der Einsatz Fc-rekrutierender Antikörper ermöglicht vermutlich die Welt der unlicensed und licensed NK Zellen auf den Kopf zu stellen. Dies ist vermutlich der Grund, warum dies nur im Zusammenhang mit therapeutischen Fc-rekrutierenden Antikörpern beobachtet wurde [79, 164, 165].

Bei der Untersuchung pädiatrischer ALL und AML Patienten nach haploidenter HSCT erlaubt das RL Modell eine genauere Vorhersage des Rezidivrisikos als



das LL Modell. Die Überlegenheit des RL Modells gründet auf der direkten Untersuchung des KIR-Repertoires des Spenders, während beim LL Modell vom KIR Liganden des Spenders auf dessen Rezeptor-Repertoire geschlossen wird. Das LL Modell erwies sich hier als zu ungenau und teilweise nicht zutreffend, da 24-36% der Spender einen der drei prädominanten KIR-Rezeptoren CD158a, CD158b, CD158e trugen, ohne den korrespondierenden HLA-Liganden zu exprimieren [56, 68]. Eine Zunahme des antileukämischen Effekts wird *in vitro* mit steigender Anzahl an RL mismatched Paaren beobachtet. Neben dem Einfluss des RL Mismatch gelang es Leung und Handgretinger aber auch zu zeigen, dass die Hemmung durch KIR-HLA I Interaktion bei RL Match durch Zytokinstimulation der NK-Zellen mit IL-12 und IL-18 überwunden werden kann [68].

#### 4.5.3 Klinischer Einfluss des Homozygotie-Alloreaktivitätsmodells

Pfeiffer et al. untersuchten den Einfluss des Rekonstitutionsverhaltens von NK-Zell Rezeptoren nach haploidenter SZT auf die Rezidivrate und NK-Zellaktivität bei malignen pädiatrischen Erkrankungen. Es stellte sich heraus, dass nach allogener HSCT, unabhängig von den HLA-Liganden des Spenders und Empfängers, der Rezeptor CD158b eine frühere Rekonstitution als CD158a und CD158e aufwies [166].

Unabhängig vom Remissionsstatus vor Transplantation, fielen pädiatrische AML und ALL Patienten mit homozygotem HLA-C1 Allel – dem HLA I Liganden von CD158b – gegenüber HLA-C2 homozygoten und HLA-C1/C2 heterozygoten Patienten durch eine signifikant höhere Rezidivrate nach Transplantation auf.

Auf dieser Beobachtung gründet das sogenannte Homozygotie-Alloreaktivitätsmodell. Dieses Modell unterscheidet sich von den in **Kap. 1.4** beschriebenen Modellen dadurch, dass in diesem nur der HLA I Typ des Empfängers berücksichtigt wird, welcher nicht ausgewählt oder verändert kann, d.h. dieses Modell hat keinen Einfluss auf die Spenderauswahl. Der Patient hat folgerichtig einen vorteilhaften oder nachteiligen HLA I Immunophänotyp, der sich durch die KIR-HLA I Interaktion von CD158b und HLA-C1 ergibt.

Dies kann indirekt durch das RL Modell wie folgt erklärt werden: Durch die frühe Rekonstitution von CD158b<sup>+</sup> Spender NK-Zellen nach haploidenter Transplantation findet sich ein RL Match zum homozygotem C1/C1 Empfänger. Diese Konstellation führt demnach unweigerlich zu einer Hemmung der rekonstituierenden NK Zellen, wodurch die Antitumoraktivität sinkt und die Rezidivwahrscheinlichkeit ansteigt. Im Gegensatz dazu ist in einer Mismatch Situation bei C1/C2 heterozygoten oder C2/C2 homozygoten Empfängern, die Hemmung der früh rekonstituierenden NK-Zellen gegen den Tumor geringer ausgeprägt und es kommt zu einer verstärkten antitumoralen NK-Aktivität [68, 166].

Auch C1 negative Neuroblastompatienten nach autologer HSCT zeigten verglichen mit C1 positiven Patienten, eine erhöhte 3-Jahres-Überlebensrate (81% vs. 65%) [163]. Unklar bleibt, ob dieser Effekt auch auf eine frühe Rekonstitution der CD158b<sup>+</sup> NK-Zellen zurückzuführen ist. In diesem Bereich sind weitere Studien zur Untersuchung der NK-Rekonstitution im autologen Setting erforderlich.

Zusammenfassend scheinen jedoch NK-Zellen insgesamt durch ihre frühe Rekonstitution nach Transplantation eine wichtige Bedeutung bei der immunologischen Kontrolle, insbesondere in der Frühphase nach Transplantation und vor allen Dingen bei der haploidenten HSCT maligner hämatologischer Erkrankungen wie der AML und ALL sowie solider Tumore eine übergeordnete Rolle einzunehmen [20, 156, 163, 166].

Demgegenüber zeigten Babor et al. jedoch, dass HLA-C2 häufiger bei kindlichen ALL-Patienten als in der Allgemeinbevölkerung zu finden ist und dass mit steigender Zahl der HLA-C2 Allele das Rezidivrisiko steigt. Als mögliche Begründung für dieses Phänomen wird eine höhere Rezeptoraffinität von CD158a (KIR2DL1) und somit stärkere Inhibition der NK-Zellen angeführt [167]. Eine weitere Ursache könnte die späte Rekonstitution der CD158a positiven NK-Zellen nach Transplantation sein, was in einer verminderten Tumorkontrolle in der Frühphase nach Transplantation resultiert [168, 169]. Die widersprüchlichen Ergebnisse bezüglich des prognostischen Stellenwerts von HLA-C1 und HLA-C2

auf das Outcome unterschiedlicher hämatologischer Erkrankungen wie der ALL, AML und CML könnte unter anderem in den unterschiedlichen Studiendesigns und der eingeschränkten Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Transplantationssettings (allogen matched vs. haploidente HSCT) begründet liegen [166].

#### 4.5.4 Klinischer Einfluss des KIR Genotyping Modell

Das KIR Genotyping Modell wurde in einigen überzeugenden Studien im Rahmen der allogenen HSCT mit signifikantem Einfluss auf das Überleben der Patienten beobachtet [72, 73, 170]. So zeigten Cooley et al. in einer Studie bei 448 AML Patienten nach Fremdspendertransplantation, dass Patienten mit einem Haplotyp B/x Spender ein signifikant besseres 3-Jahresüberleben und um 30% reduziertes relatives Rezidivrisiko aufwiesen als Patienten mit Haplotyp A/A Spendern. Außerdem verzeichneten Patienten mit Haplotyp B/x Spendern häufiger eine cGvHD, jedoch nicht aGvHD [72]. Diese Ergebnisse konnten in einer späteren Studie mit größerem Patientenkollektiv (n=1086) reproduziert werden und durch den Einfluss des B Content Scores ergänzt werden [73].

Zusammengefasst liegt die molekulargenetische Lokalisation der aktivierenden und inhibierenden KIR Gene auf Zentromer- (Cen) sowie Telomerregionen (Tel) des Chromosoms 19. Die Zentromerregion kodiert für KIR2DS2, KIR2DL2 sowie KIR2DL3, die Telomerregion für KIR3DL1, KIR3DS1, KIR2DS1 und KIR2DS4. Der B Content Score wird entsprechend der Anzahl der Cen-B und Tel-B Motive, wie in **Tab. 1.4** dargestellt, ermittelt und mit einem Wert von 0-4 angegeben [73]. Die Höhe des Scores korreliert positiv mit dem Gesamtüberleben und reduzierter Rezidivwahrscheinlichkeit adulter AML Patienten, nicht jedoch adulter ALL Patienten, nach allogener Fremdspendertransplantation. Wobei sich dies am stärksten bei Patienten mit Cen-B/B homozygoten Spendern zeigte [73].

Oevermann et al. untersuchten das KIR-Genotyping Modell bei pädiatrischen ALL Patienten nach haploidenter HSCT. Patienten mit Haplotyp B Spendern zeigten ein signifikant besseres ereignissfreies Überleben als Patienten mit Haplotyp A Spendern (50,6% vs. 29,5%). Darüber hinaus profitierten auch hier die Patienten, deren Spender einen hohen B Content Score aufwiesen, durch

eine bessere ereignisfreie 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit (B Content Score 3/4 65% vs. B Content Score 1/2 48%) [170].

Das KIR-Genotyping Modell ist hilfreich einen vorteilhaften Spender bei der haploidenten HSCT für die pädiatrische ALL zu identifizieren. Für die AML konnte ein positiver Einfluss dieses Modells auf das Überleben sowohl für allogene Fremdspendertransplantationen als auch für haploidente HSCT mit T-Zell depletiertem Graft gezeigt werden [73, 170].

Verglichen mit adulten ALL Blasten weisen pädiatrische Blasten eine höhere Expression aktivierender Liganden auf, welche deren Suszeptibilität gegenüber NK-Zellenvermittelter Lyse erklärt und ein Grund dafür sein könnte, warum das KIR-Genotyping Modell überhaupt nur bei der pädiatrischen ALL zum Tragen kommt [143].

Bislang gibt es nur wenige Studien, welche die Anwendbarkeit des KIR-Genotyping Modells bei soliden Tumoren wie dem Neuroblastom untersucht haben. Siebert et al. zeigten einen positiven Einfluss von KIR2DS2 auf die ADCC mit ch14.18/CHO bei Neuroblastompatienten *in vitro*. Darüber hinaus konnte beim zusätzlichen Vorliegen eines hochaffinen FCGR2/3A ein signifikant besseres Überleben der untersuchten Patienten unter ch14.18 Antikörpertherapie festgestellt werden. Zusammenfassend ist hier von einem synergistischen Effekt des Rezeptorpolymorphismus FCGR2/3A und des aktivierenden Rezeptors KIR2DS2 auszugehen [140]. In einer kleinen Studie mit nur 7 Neuroblastompatienten verzeichneten alle drei Patienten mit Haplotyp B Spender nach haploidenter HSCT ein progressionsfreies 3-Jahres-Überleben, während die vier Patienten mit Haplotyp A Spendern allesamt progredient waren [171]. Venstrom et al. fanden demgegenüber in einer größeren Patientenkohorte mit 169 Patienten, jedoch nach autologer HSCT und deshalb nicht vergleichbar, keinen Einfluss des KIR Haplotyps auf das Gesamtüberleben der Patienten [163].

Neben der groben Einteilung der Spender in Haplotyp A und Haplotyp B, scheinen auch genetische Polymorphismen der einzelnen KIR-Gene von Bedeutung zu sein und eine Berücksichtigung lohnenswert bei der Spenderauswahl zu sein. Durch den alleinigen Austausch der Aminosäure

Cystein (C) gegen Arginin (R) an Position 245 zeigte sich die Funktionalität des KIR Rezeptors KIR2DL1 maßgeblich gesteigert. Innerhalb dieser Studie wurden pädiatrische AML und ALL Patienten nach allogener HSCT untersucht. Es wurde ein signifikant besseres Überleben und eine geringere kumulative Rezidivrate bei Patienten beobachtet, deren Spender den Polymorphismus des funktional stärkeren KIR2DL1 Rezeptors (KIR2DL1<sup>245</sup>-R) aufwiesen. Ein stärkeres Licensing könnte mitunter eine Ursache für die bessere NK-Zellfunktionalität dieser Spender sein. Interessanterweise wurde beobachtet, dass insbesondere Patienten mit KIR2DL1<sup>245</sup>-R Spender mit einem HLA-C RL Mismatch eine signifikant bessere Überlebensrate hatten, als Patienten mit KIR2DL1<sup>245</sup>-C positivem Spender [172].

#### 4.5.5 Klinischer Einfluss des Licensing Modells

Der Stellenwert des Licensing für die NK-Zellfunktionalität muss aus immunmodulatorischer Sicht weiterhin kontrovers diskutiert werden. So zeigte eine groß angelegte Studie mit 242 Neuroblastompatienten unter GD2-Antikörpertherapie mit 3F8, einen deutlichen Überlebensvorteil derjenigen Patienten, denen ein KIR Ligand fehlte und die folglich „unlicensed“ NK-Zellen besaßen [79]. Die in dieser Studie erworbenen Erkenntnisse führten zu einer Neubewertung der „unlicensed“ NK-Zellen bei der Tumorüberwachung. Der hyporesponsive Status der „unlicensed“ NK-Zellen wurde durch das proinflammatorische Milieu unter Antikörpertherapie aufgehoben. *In vitro* zeigte sich sogar eine Umkehr des Licensing Modells mit einer höheren zytotoxischen Aktivität der „unlicensed NK-Zellen“ verglichen mit den „licensed“ NK-Zellen. Dieser Effekt wurde insbesondere durch die Hochregulation der HLA I Expression auf den Tumorzellen durch IFN $\gamma$  verstärkt, welcher durch eine gesteigerte Hemmung der „licensed“ NK-Zellen durch ihre korrespondierenden HLA Liganden erklärt wurde. Auch die IFN $\gamma$ -Freisetzung aktivierter NK-Zellen führte zu einer relevanten Steigerung der HLA I Expression. Ein ähnlicher Effekt ist auch *in vivo* unter NK-Zellrekrutierung und lokaler Zytokinausschüttung vorstellbar. So wurde bereits in vorangegangenen Studien eine gesteigerte

HLA I Expression von Tumoren in Zusammenhang mit Chemo- und Immuntherapien beschrieben [64, 130, 173].

Die Überschneidung des Licensing Modells mit dem RL Modell ergibt sich im autologen Setting. Denn hier besteht für alle „unlicensed“ NK-Zellen per definitionem ein RL Mismatch.

#### **4.6 Zusammenfassung der Alloreaktivitätsmodelle im klinischen und präklinischen Setting**

Die beschriebenen Alloreaktivitätsmodelle greifen ineinander und bieten jedes für sich genommen kein suffizientes Mittel die NK-Alloreaktivität immer zutreffend vorherzusagen. Durch das zunehmende molekulare Verständnis wurden zum einen bestehende Modelle wie das LL Modell zum RL Modell weiterentwickelt, zum anderen wurden neue Modelle wie das KIR-Genotyping oder Licensing Modell auf der Grundlage neuer Erkenntnisse entwickelt. Diese Verzahnung der Modelle erklärt warum die Datenlage kontrovers und keines der Modelle universal anwendbar ist [67, 68, 71, 153, 166]

Das LL Modell zeichnet sich nach wie vor durch die einfache Anwendbarkeit aus, da lediglich die HLA-Typisierungen des Spenders und Empfängers erforderlich sind [67]. Es hat sich jedoch als zu ungenau erwiesen, da von der HLA Typisierung auf das KIR-Repertoire des Spenders geschlossen wird [56]. Somit besteht die Möglichkeit, dass ein Spender trotz vorhandenem HLA Klasse I Ligand den zugehörigen KIR-Rezeptor nicht exprimiert und umgekehrt [68, 147]. Aus diesem Grund ist das RL Modell zutreffender und darüber hinaus auch im autologen Setting anwendbar [162]. Eine Schwachstelle sowohl des LL als auch des RL Modells besteht jedoch in der alleinigen Berücksichtigung der HLA-Genotypisierung des Spenders/Tumors. So fanden wir in unserer Studie eine Diskrepanz zwischen der HLA-Typisierung der Tumorzellen und deren Immunphänotyp, sodass mögliche funktionelle RL Mismatches ohne Expressionsanalyse unerkannt bleiben können [40, 135].

Das Licensing ist zwar im Reifungsprozess von NK-Zellen maßgeblich für deren spätere NK-Zellfunktionalität verantwortlich. Allerdings wurde gezeigt, dass der

hyporesponsive Status der „unlicensed“ NK-Zellen beim Vorliegen zusätzlicher proaktivierender Signale überwunden werden kann [78, 79, 153]. Per Definition findet sich bei allen Patienten mit unlicensed NK-Zellen automatisch ein RL Mismatch, welcher beispielsweise unter Antikörpertherapie zum Tragen kommt [79, 163].

Sowohl für die adulte AML als auch kindliche ALL wurde ein beeindruckender Einfluss des KIR-Genotyps der Spender nach allogener Stammzelltransplantation auf den Krankheitsverlauf der Patienten gezeigt [73, 170, 174]. Jedoch ist auch hier die Datenlage kontrovers; denn die Ergebnisse von McQueen et al. widersprachen der Hypothese, dass AML Patienten mit Haplotyp B Spendern generell ein besseres Gesamtüberleben aufweisen und fanden darüber hinaus, dass die Haplotyp-Kombination des Spenders und Empfängers von Bedeutung ist. So zeigte sich eine erhöhte Rezidivrate und aGVHD bei Patienten mit Haplotyp A, deren Spender den Haplotyp B aufwies [71]. Interessanterweise waren diese Beobachtungen auf HLA-C1 homozygote Patienten mit Haplotyp B Spender beschränkt. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist die niedrigere Rezeptoraffinität von HLA-C1 zu KIR2DL2/3 und somit eingeschränkte Hemmung der NK-Zellen verglichen zur KIR-Interaktion mit HLA-C2 [175, 176]. Der Haplotyp B Spender zeichnet sich durch ein KIR-Repertoire mit sowohl hemmenden als auch aktivierenden KIR-Rezeptoren aus, welches durch die HLA-C1 Interaktion nicht ausreichend gehemmt wird, was eine aGVH Reaktion begünstigt auf Kosten der antitumoralen Aktivität [71]. Zu berücksichtigen ist jedoch, dass die Daten dieser Studie auf einer wesentlich kleineren Patientenkohorte gründen als die von Cooley et al.. Insbesondere im Rahmen der haploidenten Stammzelltransplantation beim Neuroblastom und anderen soliden Tumoren sind weitere klinische Studien erforderlich.

Auch berücksichtigen die Modelle lediglich die Immunologie der KIR-Rezeptoren und lassen aktivierende Rezeptoren wie NKG2D und DNAM-1 außer Acht. Insbesondere bei HLA<sub>low</sub> Tumoren, wie dem Neuroblastom, ist zwar ein Einfluss der KIR-Rezeptoren auf die NK-Funktionalität, insbesondere auf single KIR

Ebene zu verzeichnen [20, 177], jedoch scheinen andere Regulationsmechanismen der NK-Zellen in den Vordergrund zu treten [15, 129]. Um eine optimale Spenderauswahl zu ermöglichen, sollten daher neben der Berücksichtigung eines möglichen RL Mismatches und des KIR Genotyps auch eine funktionelle Testung der Spender NK-Zellen erfolgen.

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss des RL Matches/Mismatches auf die Lysefähigkeit von single KIR positiven NK-Zellklonen gegenüber den Neuroblastomzelllinien LAN-1 und LS *in vitro* bestätigt.

Dieser Funktionsmechanismus besitzt vermutlich nicht nur bei hämatologischen Erkrankungen, sondern auch bei soliden Tumoren wie dem Neuroblastom einen relevanten klinischen Einfluss, bedarf jedoch weiterer klinischer Studien, insbesondere im Setting der haploidenten HSCT, bei der die frühe NK Zell Rekonstitution eine übergeordnete Rolle spielt [18, 20, 166, 177].



## 5 Zusammenfassung

Das Neuroblastom ist der häufigste solide extrakranielle Tumor im Kindesalter mit etwa 120 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland. Patienten im metastasierten Tumorstadium und genetischer Risikodisposition haben trotz intensiver Therapie mit multimodalen Therapiekonzepten ein ungünstiges Langzeitüberleben.

Die Kombination aus intensiver Chemotherapie, chirurgischer Tumorresektion, mIBG-Therapie, Radiotherapie und allogener haploidenter Stammzelltransplantation mit anschließender GD2-Antikörpertherapie sowie immunstimulatorischer Therapie mit Interleukin-2, haben bei Patienten ohne Tumornachweis vor Transplantation mit Stadium IV Neuroblastom Rezidiv, zu einem deutlich verbesserten 5-Jahres-Überleben von >50% geführt, das zuvor durch die haploidentische HSCT bei ca. 20% lag. Maßgeblich mitverantwortlich für den Therapieerfolg, ist demnach die nach haploidenter HSCT eingesetzte GD2-Antikörpertherapie mit dem chimären Antikörper Dinutuximab beta (ch14.18/CHO), der hauptsächlich NK-Zellen als Effektorzellen rekrutiert. Hierdurch kann residuelles Tumorgewebe immunologisch eradiziert werden und das Entstehen eines Rezidivs verhindert werden.

NK-Zellen bilden einen wichtigen körpereigenen Abwehrmechanismus gegen entartete Zellen. NK Zellen weisen eine gute spontane antitumorale Aktivität gegen das Neuroblastom auf, welche durch GD2-Antikörper massiv gesteigert werden kann.

Im Fokus dieser Forschungsarbeit lag die Untersuchung der KIR-Rezeptor Liganden Interaktion expandierter single KIR positiver NK-Zellklone gegen Neuroblastomzelllinien *in vitro*. Im Rahmen der Arbeit etablierten wir ein neues NK-Expansionsprotokoll für single KIR positive NK-Zellen, welches eine stabile Expansion von NK-Zellklonen mit prädefiniertem KIR-Immunchenotyp ermöglichte. Dies war die Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche funktionelle Testung und Untersuchung von KIR Match und Mismatch Situationen, wie sie

beispielsweise im Rahmen der allogenen-, insbesondere der haploidenten SZT auftreten können. Es konnte gezeigt werden, dass ein KIR RL Mismatch zu einer signifikant gesteigerten Lyse von Neuroblastomen durch single KIR positive NK-Zellklone führt. Berücksichtigt wurden die Major KIR Rezeptoren KIR2DL1, KIR2DL2/KIR2DL3, KIR3DL1 und deren korrespondierenden HLA I Liganden. Dies bedeutet, dass die KIR-Rezeptor HLA I Interaktion einen maßgeblichen Anteil trägt, ob und wie effektiv NK Zellen Neuroblastomzellen erkennen und lysieren.

Das Ligand-Ligand Modell, welches sich bei der Vorhersage der NK-Alloreaktivität alleinig auf die HLA-Genotypisierung des Spenders und Empfängers, hier den Tumorzellen beruht, erwies sich in dieser Arbeit als nicht vorhersagefähig. Überdies wäre das RL Modell, ohne Testung der Expression der HLA I Liganden ebenfalls nicht ausreichend vorhersagefähig gewesen, da sich eine Inkongruenz zwischen HLA-Genotypisierung und der tatsächlichen Expression, dem HLA I Immunophänotyp, auf den Neuroblastomzelllinien zeigte. Zur besseren Vorhersagbarkeit der NK-Alloreaktivität sind neben der HLA-Genotypisierung auch eine HLA I Immunophäntypisierung, d.h. Expressionsanalyse der relevanten HLA I Liganden notwendig, um die KIR-HLA I Interaktion korrekt zu beurteilen. Allerdings stehen derzeit nur eingeschränkt Antikörper zur Differenzierung der HLA-C Untergruppe zur Verfügung, sodass wir uns in dieser Arbeit auf die quantitative Analyse der HLA-Bw4/Bw6 Liganden beschränkten. Eine Proteomanalyse des Tumors würde diese Frage zuverlässig beantworten und die Aussagekraft von NK-Alloreaktivitätsmodellen erhöhen. In zukünftigen Untersuchungen sollte dies berücksichtigt werden.

Die quantitative Expression aktivierender NKG2D und DNAM-1 Liganden korrelierte mit einer besseren Lysierbarkeit der Neuroblastomzelllinien und scheint von übergeordneter Relevanz für die NK-Suszeptibilität zu sein verglichen mit der quantitativen HLA I Expression.

Spenderunabhängig konnte eine gute ADCC durch die Verwendung des therapeutischen GD2-Antikörper ch14.18 gezeigt werden. Darüber hinaus nivellierten sich unter Verwendung des Antikörpers spenderspezifische

Unterschiede der NK-zellvermittelten Lyse. Dies lässt darauf schließen, dass selbst Patienten mit reduzierter intrinsischer NK-Aktivität von der Antikörpertherapie profitieren. Die Rekrutierung von Effektorzellen durch ADCC ist klinisch relevanter, als die Komplement vermittelte Lyse.

Immuntherapien haben bei der Behandlung solider Tumore, so auch beim Neuroblastom, eine vielversprechende Zukunft. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Lyse der untersuchten Neuroblastomzelllinien maßgeblich von der KIR-HLA I Interaktion beeinflusst wird und somit das RL Modell an klinischer Relevanz gewinnen könnte. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Expression aktivierender Liganden und Adhäsionsmoleküle sowie der Einsatz therapeutischer Antikörper eine übergeordnete Rolle bei der Tumorzelllyse spielen.

Das Ziel ist es, durch die Weiterentwicklung von Immuntherapien gegen das Neuroblastom, ein verbessertes Überleben bei gleichzeitig reduzierter Toxizität zu erreichen.

## 6 Anhang

**Tab. 6.1 Isolierte PBMCs aus heparinisiertem Vollblut dreier gesunder Spender**

Aufgelistet sind die verwendeten Volumina heparinisierten Vollbluts der drei gesunden Spender, der daraus mittels Ficoll gewonnenen PBMCs und die berechnete Anzahl an PBMCs pro ml Vollblut.

Versuch	Spender	Vollblut (ml)	PBMCs ( $1 \times 10^6$ )	PBMCs/1ml Vollblut
1	1	50	60,4	1,21
2	1	40	34,5	0,86
3	1	116	83	0,72
4	1	50	35	0,70
5	1	55	40	0,73
6	1	110	133,4	1,21
7	1	21	27,8	1,32
8	1	56	90,4	1,61
9	1	110	155,6	1,41
10	1	60	78	1,30
11	1	55	61,4	1,12
12	1	50	72	1,44
<b>Mittelwert</b>		<b>64,42</b>	<b>72,63</b>	<b>1,14</b>
<b>Median</b>		<b>55,00</b>	<b>66,70</b>	<b>1,21</b>
<b>SD</b>		<b>30,43</b>	<b>39,60</b>	<b>0,31</b>
13	2	60	21	0,35
14	2	50	50	1,00
15	2	55	50	0,91
16	2	110	116,6	1,06
17	2	22	28,5	1,30
18	2	80	62	0,78
<b>Mittelwert</b>		<b>62,83</b>	<b>54,68</b>	<b>0,90</b>
<b>Median</b>		<b>57,50</b>	<b>50,00</b>	<b>0,95</b>
<b>SD</b>		<b>29,73</b>	<b>33,92</b>	<b>0,32</b>
19	3	55	90	1,64
20	3	55	135	2,45
21	3	50	80	1,60
22	3	55	96	1,75
23	3	110	172,5	1,57
24	3	22	39,9	1,81
25	3	95	122	1,28
<b>Mittelwert</b>		<b>55,00</b>	<b>96,00</b>	<b>1,64</b>
<b>Median</b>		<b>63,14</b>	<b>105,06</b>	<b>1,73</b>
<b>SD</b>		<b>29,65</b>	<b>42,65</b>	<b>0,36</b>

## 7 Literaturverzeichnis

1. Hoehner JC, Gestblom C, Hedborg F, Sandstedt B, Olsen L, Pahlman S: **A developmental model of neuroblastoma: differentiating stroma-poor tumors' progress along an extra-adrenal chromaffin lineage.** *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 1996, **75**(5):659-675.
2. Maris JM: **Recent Advances in Neuroblastoma.** *The New England Journal of Medicine* 2010, **362**(23):2202-2211.
3. Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL: **Neuroblastoma.** *The Lancet* 2007, **369**(9579):2106-2120.
4. He W-G, Yan Y, Tang W, Cai R, Ren G: **Clinical and biological features of neuroblastic tumors: A comparison of neuroblastoma and ganglioneuroblastoma.** *Oncotarget* 2017, **8**(23):37730-37739.
5. Whittle SB, Smith V, Doherty E, Zhao S, McCarty S, Zage PE: **Overview and recent advances in the treatment of neuroblastoma.** *Expert Review of Anticancer Therapy* 2017, **17**(4):369-386.
6. Park Julie R, Bagatell R, London Wendy B, Maris John M, Cohn Susan L, Mattay Katherine M, Hogarty M: **Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: Neuroblastoma.** *Pediatric Blood & Cancer* 2012, **60**(6):985-993.
7. De Bernardi B, Nicolas B, Boni L, Indolfi P, Carli M, Cordero di Montezemolo L, Donfrancesco A, Pession A, Provenzi M, di Cataldo A, Rizzo A, Tonini GP, Dallorso S, Conte M, Gambini C, Garaventa A, Bonetti F, Zanazzo A, D'Angelo P, Bruzzi P: **Disseminated Neuroblastoma in Children Older Than One Year at Diagnosis: Comparable Results With Three Consecutive High-Dose Protocols Adopted by the Italian Co-Operative Group for Neuroblastoma.** *Journal of Clinical Oncology* 2003, **21**(8):1592-1601.
8. Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, Stram DO, Harris RE, Ramsay NK, Swift P, Shimada H, Black CT, Brodeur GM, Gerbing RB, Reynolds CP: **Treatment of High-Risk Neuroblastoma with Intensive Chemotherapy, Radiotherapy, Autologous Bone Marrow Transplantation, and 13-cis-Retinoic Acid.** *New England Journal of Medicine* 1999, **341**(16):1165-1173.
9. Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM: **Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage.** *Science* 1984, **224**(4653):1121.
10. Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, Dalton A, Siegel SE, Wong KY, Hammond D: **Association of Multiple Copies of the N-myc Oncogene with Rapid Progression of Neuroblastomas.** *New England Journal of Medicine* 1985, **313**(18):1111-1116.
11. Yu AL, Gilman AL, Ozkaynak MF, London WB, Kreissman SG, Chen HX, Smith M, Anderson B, Villablanca JG, Matthay KK, Shimada H, Grupp SA, Seeger R, Reynolds CP, Buxton A, Reisfeld RA, Gillies SD, Cohn SL, Maris JM, Sondel PM: **Anti-GD2 Antibody with GM-CSF, Interleukin-2, and Isotretinoin for Neuroblastoma.** *New England Journal of Medicine* 2010, **363**(14):1324-1334.
12. Cheung N-KV, Dyer MA: **Neuroblastoma: developmental biology, cancer genomics and immunotherapy.** *Nat Rev Cancer* 2013, **13**(6):397-411.
13. Salazar BM, Balczewski EA, Ung CY, Zhu S: **Neuroblastoma, a Paradigm for Big Data Science in Pediatric Oncology.** *International Journal of Molecular Sciences* 2017, **18**(1):37.

14. Moreno L, Rubie H, Varo A, Deley Marie C, Amoroso L, Chevance A, Garaventa A, Gambart M, Bautista F, Valteau-Couanet D, Georger B, Vassal G, Paoletti X, Pearson Andrew DJ: **Outcome of children with relapsed or refractory neuroblastoma: A meta-analysis of ITCC/SIOPEN European phase II clinical trials.** *Pediatric Blood & Cancer* 2016, **64**(1):25-31.
15. PBottino C, Dondero A, Bellora F, Moretta L, Locatelli F, Pistoia V, Moretta A, Castriconi R: **Natural Killer Cells and Neuroblastoma: Tumor Recognition, Escape Mechanisms, and Possible Novel Immunotherapeutic Approaches.** *Frontiers in Immunology* 2014, **5**:56.
16. Seeger RC: **Immunology and immunotherapy of neuroblastoma.** *Seminars in Cancer Biology* 2011, **21**(4):229-237.
17. Pule MA, Savoldo B, Myers GD, Rossig C, Russell HV, Dotti G, Huls MH, Liu E, Gee AP, Mei Z, Yvon E, Weiss HL, Liu H, Rooney CM, Heslop HE, Brenner MK: **Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma.** *Nature medicine* 2008, **14**(11):1264-1270.
18. Iganllhardt T, Toporski J, Feuchtinger T, Turkiewicz D, Teltschik H-M, Ebinger M, Schwarze C-P, Holzer U, Lode HN, Albert MH, Gruhn B, Urban C, Dykes JH, Teuffel O, Schumm M, Handgretinger R, Lang P: **Haploidentical Stem Cell Transplantation for Refractory/Relapsed Neuroblastoma.** *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2018.
19. Ruggeri L, Mancusi A, Capanni M, Urbani E, Carotti A, Aloisi T, Stern M, Pende D, Perruccio K, Burchielli E, Topini F, Bianchi E, Aversa F, Martelli MF, Velardi A: **Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value.** *Blood* 2007, **110**(1):433-440.
20. Pérez-Martínez A, de Prada Vicente I, Fernández L, González-Vicent M, Valentín J, Martín R, Maxwell H, Sevilla J, Vicario JL, Díaz MÁ: **Natural killer cells can exert a graft-vs-tumor effect in haploidentical stem cell transplantation for pediatric solid tumors.** *Experimental Hematology* 2012, **40**(11):882-891.e881.
21. Hale GA, Arora M, Ahn KW, He W, Camitta B, Bishop MR, Bitan M, Cairo MS, Chan K, Childs RW, Copelan E, Davies SM, Perez MAD, Doyle JJ, Gale RP, Vicent MG, Horn BN, Hussein AA, Jodele S, Kamani NR, Kasow KA, Kletzel M, Lazarus HM, Lewis VA, Myers KC, Olsson R, Pulsipher M, Qayed M, Sanders JE, Shaw PJ, Soni S, Stiff PJ, Stadtmauer EA, Ueno NT, Wall DA, Grupp SA: **ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC CELL TRANSPLANTATION FOR NEUROBLASTOMA: THE CIBMTR EXPERIENCE.** *Bone marrow transplantation* 2013, **48**(8):1056-1064.
22. Cheresch DA, Pierschbacher MD, Herzig MA, Mujoo K: **Disialogangliosides GD2 and GD3 are involved in the attachment of human melanoma and neuroblastoma cells to extracellular matrix proteins.** *J Cell Biol* 1986, **102**(3):688-696.
23. Terzic T, Cordeau M, Herblot S, Teira P, Cournoyer S, Beaunoyer M, Peuchmaur M, Duval M, Sartelet H: **Expression of Disialoganglioside (GD2) in Neuroblastic Tumors: A Prognostic Value for Patients Treated With Anti-GD2 Immunotherapy.** *Pediatric and Developmental Pathology* 2017:1093526617723972.
24. Kramer K, Gerald WL, Kushner BH, Larson SM, Hameed M, Cheung NK: **Disialoganglioside GD2 loss following monoclonal antibody therapy is rare in neuroblastoma.** *Clinical Cancer Research* 1998, **4**(9):2135-2139.
25. Gul N, van Egmond M: **Antibody-Dependent Phagocytosis of Tumor Cells by Macrophages: A Potent Effector Mechanism of Monoclonal Antibody Therapy of Cancer.** *Cancer Res* 2015, **75**(23):5008-5013.

26. Weiskopf K, Weissman IL: **Macrophages are critical effectors of antibody therapies for cancer.** *mAbs* 2015, **7**(2):303-310.
27. Yang RK, Sondel PM: **Anti-GD2 Strategy in the Treatment of Neuroblastoma.** *Drugs of the future* 2010, **35**(8):665.
28. Saleh MN, Khazaeli MB, Wheeler RH, Allen L, Tilden AB, Grizzle W, Reisfeld RA, Yu AL, Gillies SD, LoBuglio AF: **Phase I trial of the chimeric anti-GD2 monoclonal antibody ch14.18 in patients with malignant melanoma.** *Human antibodies and hybridomas* 1992, **3**(1):19-24.
29. Mueller BM, Romerdahl CA, Gillies SD, Reisfeld RA: **Enhancement of antibody-dependent cytotoxicity with a chimeric anti-GD2 antibody.** *The Journal of Immunology* 1990, **144**(4):1382.
30. Anghelescu DL, Goldberg JL, Faughnan LG, Wu J, Mao S, Furman WL, Santana VM, Navid F: **Comparison of Pain Outcomes between Two Anti-GD2 Antibodies in Patients with Neuroblastoma.** *Pediatric blood & cancer* 2015, **62**(2):224-228.
31. Isaacs JD, Greenwood J, Waldmann H: **Therapy with Monoclonal Antibodies. II. The Contribution of Fcγ Receptor Binding and the Influence of CH<sub>1</sub> and CH<sub>3</sub> Domains on In Vivo Effector Function.** *The Journal of Immunology* 1998, **161**(8):3862.
32. Siebert N, Seidel D, Eger C, Jüttner M, Lode HN: **Functional Bioassays for Immune Monitoring of High-Risk Neuroblastoma Patients Treated with ch14.18/CHO Anti-GD(2) Antibody.** *PLoS ONE* 2014, **9**(9):e107692.
33. Huntington ND, Vosshenrich CAJ, Di Santo JP: **Developmental pathways that generate natural-killer-cell diversity in mice and humans.** *Nature Reviews Immunology* 2007, **7**:703.
34. Maghazachi AA: **Role of Chemokines in the Biology of Natural Killer Cells.** In: *The Chemokine System in Experimental and Clinical Hematology.* edn. Edited by Bruserud O. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010: 37-58.
35. Zamai L, Ahmad M, Bennett IM, Azzoni L, Alnemri ES, Perussia B: **Natural Killer (NK) Cell-mediated Cytotoxicity: Differential Use of TRAIL and Fas Ligand by Immature and Mature Primary Human NK Cells.** *The Journal of Experimental Medicine* 1998, **188**(12):2375-2380.
36. Lee RK, Spielman J, Zhao DY, Olsen KJ, Podack ER: **Perforin, Fas ligand, and tumor necrosis factor are the major cytotoxic molecules used by lymphokine-activated killer cells.** *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1996, **157**(5):1919-1925.
37. Ljunggren HG, Karre K: **In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition.** *Immunol Today* 1990, **11**(7):237-244.
38. Raulet DH, Vance RE: **Self-tolerance of natural killer cells.** *Nat Rev Immunol* 2006, **6**(7):520-531.
39. Noam SG, Ofer M: **An integrated view of the regulation of NKG2D ligands.** *Immunology* 2009, **128**(1):1-6.
40. Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Pérez-Villar JJ, López-Botet M, Duggan-Keen M, Stern PL: **Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours.** *Immunology Today* 1997, **18**(2):89-95.
41. Raulet DH, Gasser S, Gowen BG, Deng W, Jung H: **Regulation of Ligands for the NKG2D Activating Receptor.** *Annual Review of Immunology* 2013, **31**(1):413-441.
42. Cooper MA, Colonna M, Yokoyama WM: **Hidden talents of natural killers: NK cells in innate and adaptive immunity.** *EMBO reports* 2009, **10**(10):1103-1110.

43. Sun JC, Lanier LL: **Natural killer cells remember: an evolutionary bridge between innate and adaptive immunity?** *Eur J Immunol* 2009, **39**(8):2059-2064.
44. Paust S, Blish CA, Reeves RK: **Redefining Memory: Building the Case for Adaptive NK Cells.** *Journal of virology* 2017, **91**(20).
45. Cooper MA, Elliott JM, Keyel PA, Yang L, Carrero JA, Yokoyama WM: **Cytokine-induced memory-like natural killer cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009, **106**(6):1915-1919.
46. Kimura MY, Nakayama T: **Differentiation of NK1 and NK2 cells.** *Crit Rev Immunol* 2005, **25**(5):361-374.
47. Perussia B, Loza MJ: **Linear '2-0-1' lymphocyte development: hypotheses on cellular bases for immunity.** *Trends in Immunology* 2003, **24**(5):235-241.
48. Spits H, Lanier LL: **Natural Killer or Dendritic: What's in a Name?** *Immunity* 2007, **26**(1):11-16.
49. Penack O, Gentilini C, Fischer L, Asemussen AM, Scheibenbogen C, Thiel E, Uharek L: **CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>neg</sup> cells are responsible for natural cytotoxicity against tumor targets.** *Leukemia* 2005, **19**.
50. Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, Cella M, Facchetti F, Colonna M, Caligiuri MA: **CD56<sup>bright</sup> natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity.** *Blood* 2003, **101**(8):3052.
51. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA: **The biology of human natural killer-cell subsets.** *Trends in Immunology* 2001, **22**(11):633-640.
52. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, Carson WE, Caligiuri MA: **Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56<sup>bright</sup> subset.** *Blood* 2001, **97**(10):3146.
53. Perussia B, Chen Y, Loza MJ: **Peripheral NK cell phenotypes: multiple changing of faces of an adapting, developing cell.** *Molecular Immunology* 2005, **42**(4):385-395.
54. Michel T, Poli A, Cuapio A, Briquemont B, Iserentant G, Ollert M, Zimmer J: **Human CD56<sup>bright</sup> NK Cells: An Update.** *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2016, **196**(7):2923-2931.
55. Farag SS, Caligiuri MA: **Human natural killer cell development and biology.** *Blood Reviews* 2006, **20**(3):123-137.
56. Leung W: **Use of NK cell activity in cure by transplant.** *Br J Haematol* 2011, **155**(1):14-29.
57. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S: **Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells.** *Science (New York, NY)* 2011, **331**(6013):44-49.
58. Aribi M: **Introductory Chapter: A Brief Overview on Natural Killer Cells;** 2017.
59. Kulkarni S, Martin MP, Carrington M: **The Ying and Yang of HLA and KIR in Human Disease.** *Seminars in immunology* 2008, **20**(6):343-352.
60. Bottino C, Castriconi R, Pende D, Rivera P, Nanni M, Carnemolla B, Cantoni C, Grassi J, Marcenaro S, Reymond N, Vitale M, Moretta L, Lopez M, Moretta A: **Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as Cell Surface Ligands for the Human DNAM-1 (CD226) Activating Molecule.** *The Journal of Experimental Medicine* 2003, **198**(4):557-567.



61. Bryceson YT, March ME, Ljunggren H-G, Long EO: **Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion.** *Blood* 2006, **107**(1):159-166.
62. Foreman NK, Rill DR, Coustan-Smith E, Douglass EC, Brenner MK: **Mechanisms of selective killing of neuroblastoma cells by natural killer cells and lymphokine activated killer cells. Potential for residual disease eradication.** *British Journal of Cancer* 1993, **67**(5):933-938.
63. Gross N, Favre S, Beck D, Meyer M: **Differentiation-related expression of adhesion molecules and receptors on human neuroblastoma tissues, cell lines and variants.** *International Journal of Cancer* 1992, **52**(1):85-91.
64. Favrot MC, Combaret V, Goillot E, Tabone E, Bouffet E, Dolbeau D, Bouvier R, Coze C, Michon J, Philip T: **Expression of leucocyte adhesion molecules on 66 clinical neuroblastoma specimens.** *International Journal of Cancer* 1991, **48**(4):502-510.
65. Binnerts ME, van Kooyk Y: **How LFA-1 binds to different ligands.** *Immunology Today* 1999, **20**(5):240-245.
66. Springer TA, Dustin ML, Kishimoto TK, Marlin SD: **The Lymphocyte Function Associated LFA-1, CD2, and LFA-3 Molecules: Cell Adhesion Receptors of the Immune System.** *Annual Review of Immunology* 1987, **5**(1):223-252.
67. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, Posati S, Rogaia D, Frassoni F, Aversa F, Martelli MF, Velardi A: **Effectiveness of Donor Natural Killer Cell Alloreactivity in Mismatched Hematopoietic Transplants.** *Science* 2002, **295**(5562):2097-2100.
68. Leung W, Iyengar R, Turner V, Lang P, Bader P, Conn P, Niethammer D, Handgretinger R: **Determinants of Antileukemia Effects of Allogeneic NK Cells.** *The Journal of Immunology* 2003, **172**(1):644.
69. Oevermann L, Handgretinger R: **New strategies for haploidentical transplantation.** *Pediatr Res* 2012, **71**(4-2):418-426.
70. Gagne K, Brizard G, Gueglio B, Milpied N, Herry P, Bonneville F, Chéneau M-L, Schleinitz N, Cesbron A, Folléa G, Harrousseau J-L, Bignon J-D: **Relevance of KIR gene polymorphisms in bone marrow transplantation outcome.** *Human Immunology* 2002, **63**(4):271-280.
71. McQueen KL, Dorigi KM, Guethlein LA, Wong R, Sanjanwala B, Parham P: **Donor-Recipient Combinations of Group A and B KIR Haplotypes and HLA class I Ligand Affect the Outcome of HLA-Matched, Sibling Donor Hematopoietic Cell Transplantation.** *Human Immunology* 2007, **68**(5):309-323.
72. Cooley S, Trachtenberg E, Bergemann TL, Saeteurn K, Klein J, Le CT, Marsh SGE, Guethlein LA, Parham P, Miller JS, Weisdorf DJ: **Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia.** *Blood* 2009, **113**(3):726-732.
73. Cooley S, Weisdorf DJ, Guethlein LA, Klein JP, Wang T, Le CT, Marsh SGE, Geraghty D, Spellman S, Haagenson MD, Ladner M, Trachtenberg E, Parham P, Miller JS: **Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia.** *Blood* 2010, **116**(14):2411-2419.
74. Moesta AK, Norman PJ, Yawata M, Yawata N, Gleimer M, Parham P: **Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand-binding site makes KIR2DL2 a stronger receptor for HLA-C than KIR2DL3.** *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2008, **180**(6):3969-3979.

75. Yawata M, Yawata N, Draghi M, Partheniou F, Little AM, Parham P: **MHC class I-specific inhibitory receptors and their ligands structure diverse human NK-cell repertoires toward a balance of missing self-response.** *Blood* 2008, **112**(6):2369-2380.
76. Brodin P, Karre K, Hoglund P: **NK cell education: not an on-off switch but a tunable rheostat.** *Trends Immunol* 2009, **30**(4):143-149.
77. Germain RN: **An innately interesting decade of research in immunology.** *Nat Med* 2004, **10**(12):1307-1320.
78. Orr MT, Murphy WJ, Lanier LL: **'Unlicensed' natural killer cells dominate the response to cytomegalovirus infection.** *Nat Immunol* 2010, **11**(4):321-327.
79. Tarek N, Le Luduec J-B, Gallagher MM, Zheng J, Venstrom JM, Chamberlain E, Modak S, Heller G, Dupont B, Cheung N-KV, Hsu KC: **Unlicensed NK cells target neuroblastoma following anti-GD2 antibody treatment.** *The Journal of Clinical Investigation* 2012, **122**(9):3260-3270.
80. Seeger RC, Rayner SA, Banerjee A, Chung H, Laug WE, Neustein HB, Benedict WF: **Morphology, growth, chromosomal pattern and fibrinolytic activity of two new human neuroblastoma cell lines.** *Cancer Res* 1977, **37**(5):1364-1371.
81. Rudolph G, Schilbach-Stuckle K, Handgretinger R, Kaiser P, Hameister H: **Cytogenetic and molecular characterization of a newly established neuroblastoma cell line LS.** *Human genetics* 1991, **86**(6):562-566.
82. Lozzio CB, Lozzio BB: **Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome.** *Blood* 1975, **45**(3):321-334.
83. Litwin V, Gumperz J, Parham P, Phillips JH, Lanier LL: **Specificity of HLA class I antigen recognition by human NK clones: evidence for clonal heterogeneity, protection by self and non-self alleles, and influence of the target cell type.** *The Journal of Experimental Medicine* 1993, **178**(4):1321.
84. Fujisaki H, Kakuda H, Shimasaki N, Imai C, Ma J, Lockett T, Eldridge P, Leung WH, Campana D: **Expansion of Highly Cytotoxic Human Natural Killer Cells for Cancer Cell Therapy.** *Cancer Research* 2009, **69**(9):4010.
85. Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG: **Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture.** *Cancer communications* 1991, **3**(7):207-212.
86. Kattiparambil Rajan D, Patrikoski M, Verho J, Sivula J, Ihalainen H, Miettinen S, Leikkala J: **Optical non-contact pH measurement in cell culture with sterilizable, modular parts.** *Talanta* 2016, **161**:755-761.
87. Cohen RI, Thompson ML, Schryver B, Ehrhardt RO: **Current Protocols in Stem Cell Biology.** 2015:1C.14.11-11C.14.14.
88. Boyum A: **A one-stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood. General sedimentation properties of white blood cells in a 1g gravity field.** *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1968, **97**:51-76.
89. Miltenyi S, Müller W, Weichel W, Radbruch A: **High gradient magnetic cell separation with MACS.** *Cytometry* 1990, **11**(2):231-238.
90. Naume B, Nonstad U, Steinkjer B, Funderud S, Smeland E, Espevik T: **Immunomagnetic isolation of NK and LAK cells.** *J Immunol Methods* 1991, **136**(1):1-9.

91. Oren A, Husebo C, Iversen AC, Austgulen R: **A comparative study of immunomagnetic methods used for separation of human natural killer cells from peripheral blood.** *J Immunol Methods* 2005, **303**(1-2):1-10.
92. Valet G: **Past and present concepts in flow cytometry: a European perspective.** *Journal of biological regulators and homeostatic agents* 2003, **17**(3):213-222.
93. Blomberg K, Granberg C, Hemmilä I, Lövgren T: **Europium-labelled target cells in an assay of natural killer cell activity.** *Journal of Immunological Methods* 1986, **92**(1):117-123.
94. Alter G, Malenfant JM, Altfeld M: **CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity.** *Journal of Immunological Methods* 2004, **294**(1-2):15-22.
95. Ke N, Wang X, Xu X, Abassi Y: **The xCELLigence System for Real-Time and Label-Free Monitoring of Cell Viability.** In: *Mammalian Cell Viability. Volume 740*, edn. Edited by Stoddart MJ: Humana Press; 2011: 33-43.
96. Kaskova ZM, Tsarkova AS, Yampolsky IV: **1001 lights: luciferins, luciferases, their mechanisms of action and applications in chemical analysis, biology and medicine.** *Chemical Society reviews* 2016, **45**(21):6048-6077.
97. Marques Simone M, Esteves da Silva Joaquim CG: **Firefly bioluminescence: A mechanistic approach of luciferase catalyzed reactions.** *IUBMB Life* 2008, **61**(1):6-17.
98. Zhang Y, Pullambhatla M, Latterra J, Pomper MG: **Influence of Bioluminescence Imaging Dynamics by D-Luciferin Uptake and Efflux Mechanisms.** *Molecular imaging* 2012, **11**(6):499-506.
99. Poncelet P, Carayon P: **Cytofluorometric quantification of cell-surface antigens by indirect immunofluorescence using monoclonal antibodies.** *J Immunol Methods* 1985, **85**(1):65-74.
100. Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, Volpi I, Tosti A, Perruccio K, Urbani E, Negrin RS, Martelli MF, Velardi A: **Role of Natural Killer Cell Alloreactivity in HLA-Mismatched Hematopoietic Stem Cell Transplantation.** *Blood* 1999, **94**(1):333-339.
101. Shilling HG, Young N, Guethlein LA, Cheng NW, Gardiner CM, Tyan D, Parham P: **Genetic Control of Human NK Cell Repertoire.** *The Journal of Immunology* 2002, **169**(1):239.
102. Yawata M, Yawata N, Draghi M, Little A-M, Partheniou F, Parham P: **Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function.** *The Journal of Experimental Medicine* 2006, **203**(3):633.
103. Boerman GH, van Ostaijen-ten Dam MM, Kraal KCJM, Santos SJ, Ball LM, Lankester AC, Schilham MW, Egeler RM, van Tol MJD: **Role of NKG2D, DNAM-1 and natural cytotoxicity receptors in cytotoxicity toward rhabdomyosarcoma cell lines mediated by resting and IL-15-activated human natural killer cells.** *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2015, **64**(5):573-583.
104. Castriconi R, Dondero A, Corrias MV, Lanino E, Pende D, Moretta L, Bottino C, Moretta A: **Natural Killer Cell-Mediated Killing of Freshly Isolated Neuroblastoma Cells: Critical Role of DNAX Accessory Molecule-1–Poliovirus Receptor Interaction.** *Cancer Research* 2004, **64**(24):9180-9184.
105. Pfeiffer M, Schumm M, Feuchtinger T, Dietz K, Handgretinger R, Lang P: **Intensity of HLA class I expression and KIR-mismatch determine NK-cell mediated lysis of leukaemic blasts from children with acute lymphatic leukaemia.** *British Journal of Haematology* 2007, **138**(1):97-100.

106. Horrer A: **In vitro Untersuchung antileukämischer NK-Zell Subpopulationen auf ihre Lysefähigkeit gegenüber primärer pädiatrischer BPC-ALL Blasten.** 2015.
107. Aktas E, Kucuksezer UC, Bilgic S, Erten G, Deniz G: **Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity.** *Cellular Immunology* 2009, **254**(2):149-154.
108. Chiossone L, Vienne M, Kerdiles YM, Vivier E: **Natural killer cell immunotherapies against cancer: checkpoint inhibitors and more.** *Seminars in Immunology* 2017, **31**:55-63.
109. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S: **Functions of natural killer cells.** *Nature Immunology* 2008, **9**:503.
110. Vitale M, Cantoni C, Pietra G, Mingari Maria C, Moretta L: **Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function.** *European Journal of Immunology* 2014, **44**(6):1582-1592.
111. Aptsiauri N, Ruiz-Cabello F, Garrido F: **The transition from HLA-I positive to HLA-I negative primary tumors: the road to escape from T-cell responses.** *Current Opinion in Immunology* 2018, **51**:123-132.
112. Atkins D, Ferrone S, Schmahl GE, StÖrkel S, Seliger B: **Down-Regulation of HLA Class I Antigen Processing Molecules: An Immune Escape Mechanism of Renal Cell Carcinoma?** *The Journal of Urology* 2004, **171**(2):885-889.
113. Hinrichs CS, Restifo NP: **Reassessing target antigens for adoptive T-cell therapy.** *Nature Biotechnology* 2013, **31**:999.
114. Svennerholm L, Boström K, Fredman P, Jungbjer B, Lekman A, Månsson J-E, Rynmark B-M: **Gangliosides and allied glycosphingolipids in human peripheral nerve and spinal cord.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1994, **1214**(2):115-123.
115. Gennari R, Menard S, Fagnoni F, Ponchio L, Scelsi M, Tagliabue E, Castiglioni F, Villani L, Magalotti C, Gibelli N, Oliviero B, Ballardini B, Prada GD, Zambelli A, Costa A: **Pilot Study of the Mechanism of Action of Preoperative Trastuzumab in Patients with Primary Operable Breast Tumors Overexpressing HER2.** *Clinical Cancer Research* 2004, **10**(17):5650.
116. Maréchal R, De Schutter J, Nagy N, Demetter P, Lemmers A, Devière J, Salmon I, Tejpar S, Van Laethem J-L: **Putative contribution of CD56 positive cells in cetuximab treatment efficacy in first-line metastatic colorectal cancer patients.** *BMC Cancer* 2010, **10**(1):340.
117. Laurent S, Queirolo P, Boero S, Salvi S, Piccioli P, Boccardo S, Minghelli S, Morabito A, Fontana V, Pietra G, Carrega P, Ferrari N, Tosetti F, Chang L-J, Mingari MC, Ferlazzo G, Poggi A, Pistillo MP: **The engagement of CTLA-4 on primary melanoma cell lines induces antibody-dependent cellular cytotoxicity and TNF- $\alpha$  production.** *Journal of Translational Medicine* 2013, **11**(1):108.
118. Wang W, Erbe AK, Hank JA, Morris ZS, Sondel PM: **NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy.** *Frontiers in Immunology* 2015, **6**:368.
119. Yamane BH, Hank JA, Albertini MR, Sondel PM: **The development of antibody –based immunotherapy with (EMD-273063) Hu14.18-IL2 in melanoma and neuroblastoma.** *Expert opinion on investigational drugs* 2009, **18**(7):991-1000.
120. Aixinjueluo W, Furukawa K, Zhang Q, Hamamura K, Tokuda N, Yoshida S, Ueda R, Furukawa K: **Mechanisms for the apoptosis of small cell lung cancer cells induced by anti-GD2 monoclonal antibodies: roles of anoikis.** *The Journal of biological chemistry* 2005, **280**(33):29828-29836.

121. Peragine N, Torelli GF, Mariglia P, Pauselli S, Vitale A, Guarini A, Foà R: **Immunophenotypic and functional characterization of ex vivo expanded natural killer cells for clinical use in acute lymphoblastic leukemia patients.** *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2015, **64**(2):201-211.
122. Chan H-W, Kurago ZB, Stewart CA, Wilson MJ, Martin MP, Mace BE, Carrington M, Trowsdale J, Lutz CT: **DNA Methylation Maintains Allele-specific KIR Gene Expression in Human Natural Killer Cells.** *The Journal of Experimental Medicine* 2003, **197**(2):245.
123. Bjorkstrom NK, Riese P, Heuts F, Andersson S, Fauriat C, Ivarsson MA, Bjorklund AT, Flodstrom-Tullberg M, Michaelsson J, Rottenberg ME, Guzman CA, Ljunggren HG, Malmberg KJ: **Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education.** *Blood* 2010, **116**(19):3853-3864.
124. Nielsen CM, White MJ, Goodier MR, Riley EM: **Functional Significance of CD57 Expression on Human NK Cells and Relevance to Disease.** *Frontiers in Immunology* 2013, **4**:422.
125. Andersson S, Fauriat C, Malmberg J-A, Ljunggren H-G, Malmberg K-J: **KIR acquisition probabilities are independent of self-HLA class I ligands and increase with cellular KIR expression.** *Blood* 2009, **114**(1):95.
126. Ferlazzo G, Thomas D, Lin S-L, Goodman K, Morandi B, Muller WA, Moretta A, Münz C: **The Abundant NK Cells in Human Secondary Lymphoid Tissues Require Activation to Express Killer Cell Ig-Like Receptors and Become Cytolytic.** *The Journal of Immunology* 2004, **172**(3):1455.
127. de Rham C, Ferrari-Lacraz S, Jendly S, Schneiter G, Dayer J-M, Villard J: **The proinflammatory cytokines IL-2, IL-15 and IL-21 modulate the repertoire of mature human natural killer cell receptors,** vol. 9; 2007.
128. Wölfl M, Jungbluth AA, Garrido F, Cabrera T, Meyen-Southard S, Spitz R, Ernestus K, Berthold F: **Expression of MHC class I, MHC class II, and cancer germline antigens in neuroblastoma.** *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2005, **54**(4):400-406.
129. Whelan JP, Chatten J, Lampson LA: **HLA Class I and  $\beta_2$ -Microglobulin Expression in Frozen and Formaldehyde fixed Paraffin Sections of Neuroblastoma Tumors.** *Cancer Research* 1985, **45**(11 Part 2):5976-5983.
130. Neal ZC, Imboden M, Rakhmilevich AL, Kim K-M, Hank JA, Surfus J, Dixon JR, Lode HN, Reisfeld RA, Gillies SD, Sondel PM: **NXS2 murine neuroblastomas express increased levels of MHC class I antigens upon recurrence following NK-dependent immunotherapy.** *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2004, **53**(1):41-52.
131. Jonges LE, Giezeman-Smits KM, Van Vlierberghe RLP, Ensink N, Hagens M, Joly é, Eggermont AMM, Van De Velde CJH, Fleuren GJ, Kuppen PJK: **NK Cells Modulate MHC Class I Expression on Tumor Cells and their Susceptibility to Lysis.** *Immunobiology* 2000, **202**(4):326-338.
132. Schlegel P, Ditthard K, Lang P, Mezger M, Michaelis S, Handgretinger R, Pfeiffer M: **NKG2D Signaling Leads to NK Cell Mediated Lysis of Childhood AML.** *Journal of Immunology Research* 2015, **2015**:10.
133. Holmes TD, El-Sherbiny YM, Davison A, Clough SL, Blair GE, Cook GP: **A Human NK Cell Activation/Inhibition Threshold Allows Small Changes in the Target Cell Surface Phenotype To Dramatically Alter Susceptibility to NK Cells.** *The Journal of Immunology* 2011, **186**(3):1538.
134. Pende D, Rivera P, Marcenaro S, Chang C-C, Biassoni R, Conte R, Kubin M, Cosman D, Ferrone S, Moretta L, Moretta A: **Major Histocompatibility Complex Class I-related Chain A and UL16-Binding Protein Expression on Tumor Cell Lines of Different Histotypes.** *Analysis of Tumor Susceptibility to NKG2D-dependent Natural Killer Cell Cytotoxicity* 2002, **62**(21):6178-6186.

135. Hicklin DJ, Marincola FM, Ferrone S: **HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story.** *Molecular Medicine Today* 1999, **5**(4):178-186.
136. Du X, Beers R, FitzGerald DJ, Pastan I: **Differential Cellular Internalization of Anti-CD19 and -CD22 Immunotoxins Results in Different Cytotoxic Activity.** *Cancer Research* 2008, **68**(15):6300.
137. Telerman A, Amson Robert B, Romasco F, Wybran J, Galand P, Mosselmans R: **Internalization of human T lymphocyte receptors.** *European Journal of Immunology* 1987, **17**(7):991-997.
138. Velders MP, van Rhijn CM, Oskam E, Fleuren GJ, Warnaar SO, Litvinov SV: **The impact of antigen density and antibody affinity on antibody-dependent cellular cytotoxicity: relevance for immunotherapy of carcinomas.** *British Journal of Cancer* 1998, **78**(4):478-483.
139. Mujoo K, Cheresch DA, Yang HM, Reisfeld RA: **Disialoganglioside GD2 on human neuroblastoma cells: target antigen for monoclonal antibody-mediated cytotoxicity and suppression of tumor growth.** *Cancer Res* 1987, **47**(4):1098-1104.
140. Siebert N, Jensen C, Troschke-Meurer S, Zumpe M, Jüttner M, Ehlert K, Kietz S, Müller I, Lode HN: **Neuroblastoma patients with high-affinity FCGR2A, -3A and stimulatory KIR 2DS2 treated by long-term infusion of anti-GD2 antibody ch14.18/CHO show higher ADCC levels and improved event-free survival.** *OncolImmunology* 2016, **5**(11):e1235108.
141. Barber DF, Faure M, Long EO: **LFA-1 contributes an early signal for NK cell cytotoxicity.** *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2004, **173**(6):3653-3659.
142. Eleme K, Taner SB, Önfelt B, Collinson LM, McCann FE, Chalupny NJ, Cosman D, Hopkins C, Magee AI, Davis DM: **Cell Surface Organization of Stress-inducible Proteins ULBP and MICA That Stimulate Human NK Cells and T Cells via NKG2D.** *The Journal of Experimental Medicine* 2004, **199**(7):1005-1010.
143. Torelli GF, Peragine N, Raponi S, Pagliara D, De Propriis MS, Vitale A, Bertaina A, Barberi W, Moretta L, Basso G, Santoni A, Guarini A, Locatelli F, Foà R: **Recognition of adult and pediatric acute lymphoblastic leukemia blasts by natural killer cells.** *Haematologica* 2014, **99**(7):1248-1254.
144. Raffaghello L, Prigione I, Airoidi I, Camoriano M, Levreri I, Gambini C, Pende D, Steinle A, Ferrone S, Pistoia V: **Downregulation and/or Release of NKG2D Ligands as Immune Evasion Strategy of Human Neuroblastoma.** *Neoplasia (New York, NY)* 2004, **6**(5):558-568.
145. Kloess S, Huenecke S, Piechulek D, Esser R, Koch J, Brehm C, Soerensen J, Gardlowski T, Brinkmann A, Bader P, Passweg J, Klingebiel T, Schwabe D, Koehl U: **IL-2-activated haploidentical NK cells restore NKG2D-mediated NK-cell cytotoxicity in neuroblastoma patients by scavenging of plasma MICA.** *European Journal of Immunology* 2010, **40**(11):3255-3267.
146. Campadelli-Fiume G, Cocchi F, Menotti L, Lopez M: **The novel receptors that mediate the entry of herpes simplex viruses and animal alphaherpesviruses into cells.** *Reviews in Medical Virology* 2000, **10**(5):305-319.
147. Hsu KC, Keever-Taylor CA, Wilton A, Pinto C, Heller G, Arkun K, O'Reilly RJ, Horowitz MM, Dupont B: **Improved outcome in HLA-identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukemia predicted by KIR and HLA genotypes.** *Blood* 2005, **105**(12):4878-4884.
148. Middleton D, Gonzelez F: **The extensive polymorphism of KIR genes.** *Immunology* 2010, **129**(1):8-19.

149. Pende D, Marcenaro S, Falco M, Martini S, Bernardo ME, Montagna D, Romeo E, Cagnet C, Martinetti M, Maccario R, Mingari MC, Vivier E, Moretta L, Locatelli F, Moretta A: **Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity.** *Blood* 2009, **113**(13):3119.
150. Lanier LL: **NK CELL RECOGNITION.** *Annual Review of Immunology* 2004, **23**(1):225-274.
151. David G, Morvan M, Gagne K, Kerdudou N, Willem C, Devys A, Bonneville M, Folléa G, Bignon J-D, Retière C: **Discrimination between the main activating and inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptor positive natural killer cell subsets using newly characterized monoclonal antibodies,** vol. 128; 2009.
152. Miltenyi Biotec: **CD158b (KIR2DL2/DL3) antibodies, human.** . unter: <https://www.miltenyibiotec.com/DE-en/products/mac-flow-cytometry/antibodies/primary-antibodies/cd158b-kir2dl2-dl3-antibodies-human-dx27-1-11.html>, [Zugriff am 26.06.2018].
153. Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott SM, Lybarger L, Song Y-J, Yang L, French AR, Sunwoo JB, Lemieux S, Hansen TH, Yokoyama WM: **Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules.** *Nature* 2005, **436**(7051):709-713.
154. Anfossi N, André P, Guia S, Falk CS, Roeytynck S, Stewart CA, Breso V, Frassati C, Reviron D, Middleton D, Romagné F, Ugolini S, Vivier E: **Human NK Cell Education by Inhibitory Receptors for MHC Class I.** *Immunity* 2006, **25**(2):331-342.
155. Kim S, Sunwoo JB, Yang L, Choi T, Song Y-J, French AR, Vlahiotis A, Piccirillo JF, Cella M, Colonna M, Mohanakumar T, Hsu KC, Dupont B, Yokoyama WM: **HLA alleles determine differences in human natural killer cell responsiveness and potency.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008, **105**(8):3053-3058.
156. Lang P, Pfeiffer M, Müller I, Schumm M, Ebinger M, Koscielniak E, Feuchtinger T, Föll J, Martin D, Handgretinger R: **Haploidentical Stem Cell Transplantation in Patients with Pediatric Solid Tumors: Preliminary Results of a Pilot Study and Analysis of Graft versus Tumor Effects.** *Klin Padiatr* 2006, **218**(06):321-326.
157. Inoue M, Nakano T, Yoneda A, Nishikawa M, Nakayama M, Yumura-Yagi K, Sakata N, Yasui M, Okamura T, Kawa K: **Graft-versus-tumor effect in a patient with advanced neuroblastoma who received HLA haplo-identical bone marrow transplantation.** *Bone Marrow Transplant* 2003, **32**(1):103-106.
158. Marabelle A, Paillard C, Tchirkov A, Halle P, Chassagne J, Demeocq F, Kanold J: **Graft-versus-tumour effect in refractory metastatic neuroblastoma.** *Bone Marrow Transplant* 2007, **39**(12):809-810.
159. Davies SM, Ruggieri L, DeFor T, Wagner JE, Weisdorf DJ, Miller JS, Velardi A, Blazar BR: **Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatched unrelated donor hematopoietic transplants.** *Blood* 2002, **100**(10):3825-3827.
160. Delgado D, Webster DE, DeSantes KB, Durkin ET, Shaaban AF: **KIR Receptor-Ligand Incompatibility Predicts Killing of Osteosarcoma Cell Lines by Allogeneic NK Cells.** *Pediatric blood & cancer* 2010, **55**(7):1300-1305.
161. Leung W, Handgretinger R, Iyengar R, Turner V, Holladay MS, Hale GA: **Inhibitory KIR–HLA receptor–ligand mismatch in autologous haematopoietic stem cell transplantation for solid tumour and lymphoma.** *British Journal of Cancer* 2007, **97**(4):539-542.

162. Venstrom JM, Zheng J, Hasan RS, Danis KE, Cheung IY, Dupont B, Cheung NK, Hsu KC: **Lack of HLA Class I Ligands for Autologous Inhibitory KIR Is Associated with Improved Survival Following Autologous Stem Cell Transplant for Children with Neuroblastoma.** *Blood* 2008, **112**(11):3322-3322.
163. Venstrom JM: **KIR and HLA Genotypes Are Associated with Disease Progression and Survival following Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation for High-Risk Neuroblastoma.** *Clin Cancer Res* 2009.
164. Du J, Lopez-Verges S, Pitcher BN, Johnson J, Jung S-H, Zhou L, Hsu K, Czuczman MS, Cheson B, Kaplan L, Lanier LL, Venstrom JM: **CALGB 150905 (Alliance): Rituximab Broadens the Antilymphoma Response by Activating Unlicensed NK Cells.** *Cancer Immunology Research* 2014.
165. Yu J, Venstrom JM, Liu X-R, Pring J, Hasan RS, O'Reilly RJ, Hsu KC: **Breaking tolerance to self, circulating natural killer cells expressing inhibitory KIR for non-self HLA exhibit effector function after T cell-depleted allogeneic hematopoietic cell transplantation.** *Blood* 2009, **113**(16):3875-3884.
166. Pfeiffer MM: **Reconstitution of natural killer cell receptors influences natural killer activity and relapse rate after haploidentical transplantation of T- and B-cell depleted grafts in children.** *haematologica* 2010.
167. Babor F, Manser AR, Fischer JC, Scherenschlich N, Enczmann J, Chazara O, Moffett A, Borkhardt A, Meisel R, Uhrberg M: **KIR ligand C2 is associated with increased susceptibility to childhood ALL and confers an elevated risk for late relapse.** *Blood* 2014, **124**(14):2248-2251.
168. Fischer JC, Ottinger H, Ferencik S, Sribar M, Punzel M, Beelen DW, Schwan MA, Grosse-Wilde H, Wernet P, Uhrberg M: **Relevance of C1 and C2 Epitopes for Hemopoietic Stem Cell Transplantation: Role for Sequential Acquisition of HLA-C-Specific Inhibitory Killer Ig-Like Receptor.** *The Journal of Immunology* 2007, **178**(6):3918.
169. Giebel S, Locatelli F, Wojnar J, Velardi A, Mina T, Giorgiani G, Krawczyk-Kulis M, Markiewicz M, Wylezol I, Holowiecki J: **Homozygosity for human leucocyte antigen-C ligands of KIR2DL1 is associated with increased risk of relapse after human leucocyte antigen-C-matched unrelated donor haematopoietic stem cell transplantation.** *British Journal of Haematology* 2005, **131**(4):483-486.
170. Michaelis SU, Mezger M, Bornhäuser M, Trenschel R, Stuhler G, Federmann B, Oevermann L, Kanz L, Handgretinger R, Bethge WA: **KIR haplotype B donors but not KIR-ligand mismatch result in a reduced incidence of relapse after haploidentical transplantation using reduced intensity conditioning and CD3/CD19-depleted grafts.** *Annals of Hematology* 2014, **93**(9):1579-1586.
171. Lee Ji W, Kang ES, Sung Ki W, Yi E, Lee Soo H, Yoo Keon H, Koo Hong H: **Incorporation of high-dose 131I-metaiodobenzylguanidine treatment into killer immunoglobulin-like receptor/HLA-ligand mismatched haploidentical stem cell transplantation for children with neuroblastoma who failed tandem autologous stem cell transplantation.** *Pediatric Blood & Cancer* 2017, **64**(6):e26399.
172. Bari R, Rujkijyanont P, Sullivan E, Kang G, Turner V, Gan K, Leung W: **Effect of Donor KIR2DL1 Allelic Polymorphism on the Outcome of Pediatric Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation.** *Journal of Clinical Oncology* 2013, **31**(30):3782-3790.
173. Vertuani S, De Geer A, Levitsky V, Kogner P, Kiessling R, Levitskaya J: **Retinoids Act as Multistep Modulators of the Major Histocompatibility Class I Presentation Pathway and Sensitize Neuroblastomas to Cytotoxic Lymphocytes.** *Cancer Research* 2003, **63**(22):8006.



174. Oevermann L, Michaelis SU, Mezger M, Lang P, Toporski J, Bertaina A, Zecca M, Moretta L, Locatelli F, Handgretinger R: **KIR B haplotype donors confer a reduced risk for relapse after haploidentical transplantation in children with ALL.** *Blood* 2014, **124**(17):2744-2747.
175. Winter CC, Gumperz JE, Parham P, Long EO, Wagtmann N: **Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition.** *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1998, **161**(2):571-577.
176. Ahlenstiel G, Martin MP, Gao X, Carrington M, Rehermann B: **Distinct KIR/HLA compound genotypes affect the kinetics of human antiviral natural killer cell responses.** *The Journal of Clinical Investigation* 2008, **118**(3):1017-1026.
177. de Witte MA, Sarhan D, Davis Z, Felices M, Vallera DA, Hinderlie P, Curtsinger J, Cooley S, Wagner J, Kuball J, Miller JS: **Early Reconstitution of NK and  $\gamma\delta$  T Cells and Its Implication for the Design of Post-Transplant Immunotherapy.** *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2018, **24**(6):1152-1162.

## 8 Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1 Therapieregime abhängig von der Risikogruppe (modifiziert aus Cheung et al. 2013 [12]) .....	3
Tab. 1.2 Inhibierende und aktivierende Rezeptoren mit den zugehörigen Liganden .....	12
Tab. 1.3 Adhäsionsmoleküle .....	13
Tab. 1.4 KIR-Gene der Zentromer- und Telomerregion und der daraus ermittelte B-Content Score .....	16
Tab. 3.1 HLA I Genotypisierung der Zelllinien LAN-1 und LS .....	55
Tab. 3.2 HLA-Gruppen gesunder Spender zur Expansion von NK-Klonen .....	55
Tab. 3.3 KIR-Genotypisierung der Spender .....	56
Tab. 3.4 RL Modell .....	57
Tab. 3.5 LL Modell in Graft-versus-Tumor Richtung .....	57
Tab. 3.6 Licensing Modell .....	58
Tab. 3.7 KIR-Expression Spender 1-3: Median Fluorescence Intensity Ratio vor und nach Expansion frischer PBMCs .....	62
Tab. 3.8 HLA-Klasse I Expression: Median Fluorescence Intensity Ratio .....	73
Tab. 3.9 Adhäsionsmoleküle: Median Fluorescence Intensity und prozentuale Expression .....	75
Tab. 3.10 Adhäsionsmoleküle: Median Fluorescence Intensity Ratio .....	76
Tab. 3.11 DNAM-1 Liganden: Median Fluorescence Intensity und prozentuale Expression .....	77
Tab. 3.12 DNAM-1 Liganden: Median Fluorescence Intensity Ratio .....	78

Tab. 3.13 NKG2D Liganden: Median Fluorescence Intensity und prozentuale Expression.....	79
Tab. 3.14 NKG2D Liganden: Median Fluorescence Intensity Ratio .....	80
Tab. 3.15 Luciferase-Assay: Zeitabhängige Lyse der NK-Zellpopulationen gegenüber LAN-1 und LS.....	97
Tab. 3.16 Luciferase-Assay: Zeitabhängige Lyse definierter expandierter NK-Zellpopulationen dreier gesunder Spender gegenüber LAN-1 und LS mit und ohne Zugabe von ch14.18.....	98
Tab. 6.1 Isolierte PBMCs aus heparinisiertem Vollblut dreier gesunder Spender.....	138

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 NK-Zell Reifung und Expression funktionaler Rezeptoren .....	9
Abb. 1.2 NK-Zell Rezeptoren und deren Liganden.....	10
Abb. 1.3 Aktivierende und inhibierende KIR-Rezeptoren .....	11
Abb. 1.4 Rezeptor-Ligand Modell.....	15
Abb. 2.1 MTS Proliferationsassay der Zelllinien LAN-1 und LS .....	25
Abb. 2.2 Optimierung der BATDA-Konzentration und Inkubationszeit für die Zelllinie LS.....	42
Abb. 2.3 Pipettierschema Luciferase-Assay.....	51
Abb. 3.1 Spender 1-3: Darstellung des KIR-Repertoires der NK-Zellen vor und nach Expansion.....	61
Abb. 3.2 Exemplarische Darstellung der Zunahme der KIR-Expression durch Expansion.....	62
Abb. 3.3 Reinheit des Zellprodukts nach durchflusszytometrischer Zellsortierung .....	64
Abb. 3.4 Darstellung eines Zellprodukts vor und nach Expansion.....	65
Abb. 3.5 Reinheit der NK-Klone der Spender 1-3 nach Expansion .....	66
Abb. 3.6 Immunphänotyp der gewachsenen NK-Klonen nach alleiniger Verdünnung von CD56 <sup>+</sup> /CD3 <sup>-</sup> Zellen im Vergleich zur durchflusszytometrischen Zellsortierung.....	67
Abb. 3.7 Expression der major KIR-Rezeptoren von single KIR <sup>+</sup> und KIR <sup>-</sup> gesorteten NK-Klonen nach Expansion.....	68
Abb. 3.8 Expansionsstatistik der single KIR <sup>+</sup> und KIR <sup>-</sup> gesorteten NK-Klone...	69

Abb. 3.9 Immunphänotyp der mittels durchflusszytometrische Zellsortierung und anschließender Verdünnung ausgesäten NK-Klone.....	70
Abb. 3.10 Quantitative HLA-Klasse I Expression der verwendeten Zelllinien im exemplarischen Vergleich zu cALL-Blasten und B-Zellen .....	72
Abb. 3.11 Semiquantitative Darstellung der HLA I Expression der verwendeten Zelllinien .....	73
Abb. 3.12 Adhäsionsmoleküle: Median Fluorescence Intensity und prozentuale Expression.....	75
Abb. 3.13 Adhäsionsmoleküle: Histogramm-Darstellung .....	76
Abb. 3.14 DNAM-1 Liganden: Median Fluorescence Intensity und prozentualer Anteil positive Zellen .....	77
Abb. 3.15 DNAM-1 Liganden: Histogramm-Darstellung .....	78
Abb. 3.16 NKG2D Liganden: Median Fluorescence Intensity und prozentualer Anteil positiver Zellen .....	79
Abb. 3.17 NKG2D Liganden: Histogramm-Darstellung .....	80
Abb. 3.18 GD2 Expression: Histogramm-Darstellung .....	81
Abb. 3.19 Immunphänotyp und Anzahl der in der statistischen Auswertung berücksichtigten NK-Klone dreier gesunder Spender.....	82
Abb. 3.20 NK- Zellvermittelte Lyse der Zelllinien LAN-1, LS und K562 .....	83
Abb. 3.21 Ch14.18 vermittelte ADCC dreier gesunder Spender gegenüber LAN-1, LS und K562 im 2h BATDA Release Assay .....	85
Abb. 3.22 Vergleich der NK- Zell vermittelten Lyse von Spender 1-3 gegenüber LAN-1 und LS im 2h BATDA Release Assay .....	87
Abb. 3.23 LL Modell: CD107a Aktivität expandierter Bulk NK-Zellen der Spender 1-3 gegenüber den Zelllinien LAN-1 und LS .....	89

Abb. 3.24 LL Modell: NK-Zellvermittelte Lyse expandierter Bulk NK-Zellen der Spender 1-3 gegenüber der Zelllinie LAN-1 und LS im Luciferase-Assay.....	90
Abb. 3.25 RL Modell: NK-Zell vermittelte Lyse der NK-Klone gegenüber LAN-1 und LS (genetischer R/L match/mismatch) .....	92
Abb. 3.26 RL Modell: NK-Zell vermittelte Lyse der NK-Klone gegenüber LAN-1 und LS (funktioneller R/L match/mismatch).....	93
Abb. 3.27 Licensing Modell: NK-Zellvermittelte Lyse der Spender 1-3 gegenüber LS und K562.....	95
Abb. 3.28 Luciferase-Assay: Zeitabhängige Lyse expandierter NK-Zellpopulationen dreier gesunder Spender gegenüber LAN-1 und LS .....	97
Abb. 3.29 Zeitabhängige ch14.18 vermittelte ADCC expandierter NK-Zellpopulationen dreier gesunder Spender gegenüber LAN-1 und LS im Luciferase-Assay.....	98
Abb. 3.30 Luciferase-Assay: Zeitabhängige Lyse definierter expandierter NK-Zellpopulationen dreier gesunder Spender gegenüber LAN-1 und LS mit und ohne Zugabe von ch14.18.....	99
Abb. 3.31 Luciferase-Assay: NK-Zell vermittelte Lyse der NK-Populationen dreier gesunder Spender gegenüber LAN-1 und LS (genetischer R/L match/mismatch) .....	101
Abb. 3.32 Luciferase-Assay: NK-Zell vermittelte Lyse der NK-Populationen gegenüber LAN-1 und LS (funktionelle R/L match/mismatch).....	102
Abb. 3.33 Exemplarische xCELLigence Testung definierter NK-Zellpopulationen des Spenders 1 ohne ch14.18 gegenüber der Zelllinie LAN-1 und LS.....	104
Abb. 3.34 CD107a-Assay: NK-Zell vermittelte Lyse der expandierter NK-Zellen gegenüber LAN-1 und LS (funktionelle R/L match/mismatch).....	106
Abb. 4.1 Optimierung der NK-zellbasierten Immuntherapie durch Neutralisation von sMICA.....	116

## **10 Erklärung zum Eigenanteil**

Die vorliegende Arbeit wurde von Dr. med. P. Schlegel und Prof. Dr. P. Lang konzipiert und unter deren Betreuung an der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen von mir durchgeführt.

Die Betreuung beinhaltete die gemeinsame Versuchsplanung, Besprechung der Ergebnisse, gemeinschaftliche Konzeption und Korrektur der Arbeit.

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

Unterstützung erhielt ich von Dr. med. P. Schlegel bei der durchflusszytometrischen Zellsortierung, quantitativen HLA-Bestimmung mittels Quifikit und der exemplarischen Luciferase-Testung.

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

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

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

Tübingen, den 19.07.2018

---





## **Danksagung**

Ich möchte all jenen danken, die mich während der letzten Jahre bei der Entstehung dieser Arbeit begleitet, unterstützt und motiviert haben.

Für die Aufnahme am Institut und für sein aufrichtiges Interesse an der vorliegenden Arbeit danke ich Prof. Dr. med. Rupert Handgretinger. Herrn Prof. Dr. med. Peter Lang danke ich für die herzliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe, die Bereitstellung des Projekts und Unterstützung bei der Umsetzung.

Mein besonderer Dank gilt Dr. med. Patrick Schlegel für seine langjährige engagierte Betreuung und die daraus entstandene wertvolle Freundschaft. Ich kenne kaum einen Menschen, dessen Begeisterung für seine Arbeit und die Forschung so ansteckend und ermutigend ist. Seine tatkräftige Unterstützung und konstruktive Kritik haben wesentlich zu dieser Arbeit beigetragen. Auch wurde mir durch seinen Einsatz die Aufnahme im Graduiertenkolleg des Sonderforschungsbereich 685 und die Teilnahme an internationalen Kongressen ermöglicht.

Ferner gilt mein Dank insbesondere Annika Horrер, die mir während unserer gemeinsamen Zeit im Labor und auch danach eine unschätzbare Hilfe war und gute Freundin wurde. Danken möchte ich auch meinen Kollegen für die schöne Laborzeit sowie die fachlichen Diskussionen und Anregungen. Besonders zu nennen sind hier Dr. rer. nat. Christina Kyzirakos, Annie Barbarin-Dorner, Rouwen Teltschik, Chihab Klose, Anne Schilling, Alexander Jöchner, Maximilian Widemann und die Kollegen der Arbeitsgruppe Feuchtinger.

Meinen Freunden Corinna Weiss, Margrit Salzbrunn, Annette Hermann und Sylvia Pflederer danke ich für die schöne Studienzeit, die Motivation und das stets offene Ohr. Meinem Partner Niklas Heinsohn danke ich für seine Geduld und für die schönen Erholungsphasen zwischendurch während der Ausarbeitung der Doktorarbeit.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern einen ganz besonderen Dank aussprechen. Durch ihre außerordentliche Unterstützung und Zuspruch haben sie mir stets Vertrauen und Sicherheit gegeben.